

Roar Amundsen

Effekten av to uker med høyfrekvent okklusjonstrening på variabler i det proteinnedbrytende ubiquitin-proteasom systemet.

Hvordan påvirker okklusjonstrening mengden og lokaliseringen av variabler i ubiquitin-proteasom systemet akutt og over en treningsperiode, og er den akutte responsen lik etter 10 dager hvile mellom to treningsuker?

Masteroppgave i idrettsvitenskap

Seksjon for fysisk prestasjonsevne
Norges idrettshøgskole, 2015

Sammendrag

Innledning: Styrketrening med lav motstand og redusert blodtilførsel (okklusjonstrening) kan øke muskelstørrelse og muskelstyrke på kort tid. En tidligere studie viste stor økning i muskelfiberareal etter tre uker med okklusjonstrening, men økningen ble observert allerede etter første treningsuke og flatet deretter ut. En mulig teori er at de fysiologiske systemene ble «mettet» etter en uke med hard trening. Hensikten med vår studie var å undersøke hvordan okklusjonstrening påvirker ulike variabler knyttet til proteinnedbrytning (ubiquitin-proteasom systemet; UPS) akutt og over en treningsperiode, og om den akutte responsen er lik etter 10 dager hvile mellom to treningsuker. **Metode:** 13 forsøkspersoner gjennomførte 7 økter okklusjonstrening i kneekstensjon med lav motstand (20 % 1RM) på 5 dager. Etter ti dager hvile gjennomførte de 7 nye økter på 5 dager. Muskelbiopsier fra *m.vastus lateralis* ble tatt før, under og etter intervensjonen. Biopsiene ble analysert for viktige komponenter i UPS; målt som mengde og lokalisering av ubiquitin, FOXO3a og MURF1, samt mengde ubiquitinerte proteiner. Muskelvekst ble undersøkt med ultralyd, MR og muskelfiberareal, og muskelstyrke ble målt som 1RM i kneekstensjon. **Resultater:** Mengden ubiquitinerte proteiner var redusert 1 time etter okklusjonstrening både i første og andre treningsuke, men mer redusert i treningsuke 2. MURF1 i cytoskjelett økte 1 time etter okklusjonstrening både i første og andre treningsuke. FOXO3a viste ingen endring akutt etter trening, men var redusert ved dag 4 og dag 9 av intervensjonen. Muskeltykkelse av *m. vastus lateralis* økte med $5,2 \pm 5,3$ %, 10 dager etter siste treningsøkt, men det var ingen signifikant økning av muskelfiberareal for verken type I eller type II muskelfibre. Det var heller ingen endring i tverrsnittsarealet av quadriceps eller 1RM kneekstensjon. **Diskusjon:** Okklusjonstrening hadde en akutt påvirkning på målte variabler i UPS. Akutt reduksjon i ubiquitinerte proteiner kan tyde på en redusert ubiquitinering av proteiner eller økt hastighet på nedbrytning av ubiquitinerte proteiner i proteasomet. Økning av MURF1 i cytoskjelett kan være grunnet økt binding til titin. Alle målte variabler i UPS var normalisert ved siste måling. Noe overaskende ble det ikke observert økning i muskelfiberareal, tverrsnittsareal av quadriceps eller 1RM kneekstensjon, muligens på grunn av at treningsbelastning var for stor.

Nøkkelord: Okklusjonstrening, proteinnedbrytning, MURF, FOXO, ubiquitin.

Innhold

Sammendrag	3
Forord	6
Forkortelser	7
1. Innledning	8
2. Teori	12
2.1 Okklusjonstrening	12
2.1.1 Metodiske forskjeller	12
2.1.2 Farer med okklusjonstrening	14
2.1.3 Muskelvekst og økning i styrke med okklusjonstrening	15
2.2 Mekanismene bak muskelvekst ved okklusjonstrening	20
2.2.1 Metabolsk stress	20
2.2.2 Muskelfiberrekruttering.....	21
2.2.3 Systemiske og lokale vekstfaktorer	23
2.2.4 Muskelsvelling.....	24
2.2.5 Oppsummering	25
2.3 Muskelvekst	25
2.3.1 Muskelproteinnedbrytning.....	26
2.3.2 Ubiquitineringsprosessen.....	27
2.3.3 E3 ubiquitin ligaser.....	28
2.3.4 Transkripsjonsfaktorer.....	29
2.3.5 Styrketrening og proteolytiske markører	31
2.3.6 Lokalisering av MURF1	34
2.3.7 Oppsummering	35
3. Metode	36
3.1 Studiedesign	36
3.1.1 Utvalg	36
3.1.2 Treningsprotokoll	37
3.2 Akuttdager	39
3.3 Styrketester	40
3.3.1 Isokinetisk og isometrisk styrke	41
3.3.2 1RM i kneekstensjon	41
3.4 Blodprøver	42
3.5 Ultralyd	42
3.6 Biopsier	43
3.6.1 Homogenisering.....	43
3.7 Muskelanalyser	44

3.7.1	Totalproteinmåling	44
3.7.2	Western-Blot.....	44
3.7.3	Muskelfiberareal.....	48
3.8	Statistikk.....	48
4.	Resultater.....	49
4.1	Trening.....	49
4.2	Blodanalyser	52
4.3	Effekter på ubiquitin-proteasom systemet	53
4.4	Muskelvekst.....	55
4.4.1	Muskelfiberareal.....	55
4.4.2	Muskeltykkelse	56
4.5	Styrke	57
5.	Diskusjon	58
5.1	Trening.....	58
5.2	Blodanalyser	59
5.3	Subjektive målinger	60
5.4	Effekter på ubiquitin-proteasom systemet	61
5.4.1	Ubiquitin.....	61
5.4.2	FOXO3a.....	62
5.4.3	MURF1	63
5.5	Muskelvekst.....	64
5.6	Styrke	66
5.7	Svakheter	67
6.	Konklusjon.....	69
	Referanser.....	70
	Tabelloversikt	87
	Figuroversikt.....	88
	Vedlegg	90

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet i forbindelse med gjennomføring av prosjektet «Okklusjon 3» ved Norges Idrettshøgskole høsten 2014. En stor takk rettes til alle som har bidratt på prosjektet.

Takk til Truls Raastad for god veiledning, og et utfordrende tema å skrive masteroppgave om. Takk til Thomas Bjørnsen for god oppfølging og gode svar på alle spørsmål gjennom hele året. Takk til Lasse for godt samarbeid og grytidlige morgener under gjennomføringen av prosjektet.

På laboratoriet rettes en stor takk til Ingrid Uglestad, Hege Østgaard og Håvard Hamarsland for god hjelp og veiledning gjennom arbeidet med analysene, og til Fridtjof Seeberg for sitt gode humør i frustrerende timer. Takk til forsøkspersonene som bidro med god innsats og kompakte muskler.

Takk til alle gode klassekamerater som har bidratt til at det har blitt 5 fine år på NIH, og til Canada-gjengen for et fint semester i Edmonton. Takk også til andre som har bidratt til 5 fine år i Oslo; til ulike medlemmer av 8a (eller 4a?), til Bislett-banden og andre gode lagkamerater. Takk til gode (?) venner fra hjemme som har sørget for mange gode historier de siste årene, og for at fokuset ikke bare har vært på masteroppgaven den siste tiden selv om det har vært «låkt med tid». Takk til familien for god støtte gjennom alle år.

Takk til restore-funksjonen i dropbox.

Til slutt et lite klapp på skuldra til meg selv for god innsats.

Sognsvann, mai 2015

Roar Amundsen

Forkortelser

1RM	1 Repetisjon maksimum
AMPK	AMP-activated protein kinase
BCAA	Forgrenede aminosyrer (Branched-chain amino acid)
CK	Kreatin kinase
CSA	Tverrsnittsareal (Cross sectional area)
DOMS	Muskelstølhet (Delayed onset muscle soreness)
EMG	Elektromyografi
FOXO	Forkhead box O
GH	Veksthormon
GMEB-1	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
MFA	Muskelfiberareal
MGF	Mechano growth factor
MR	Magnetresonanstomografi
MURF	Muscle RING (Really Interesting New Gene) finger protein
MyBP-C	Myosin binding protein C
MyLC1 og 2	Myosin light chain 1 og 2
NFκB	Nuclear factor kappa B
P38 MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
PI3K	Phosphoinositidylinositol 3 kinase
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α
ROS	Frøe radikaler (Reactive oxygen species)
SRF	Serum response factor
TNFα	Tumor necrosis factor α
UPS	Ubiquitin proteasom systemet

1. Innledning

Styrketrening er viktig både i et helseperspektiv og som en metode for å bedre prestasjon og forbygge skader i de fleste idretter. Det har vært en generell oppfatning at styrketrening må utføres med tung treningsmotstand for å kunne øke styrke og føre til muskelvekst (hypertrofi) (Kraemer et al., 2002; Pearson & Hussain, 2015; Scott, Slattey, Sculley, & Dascombe, 2014; Wernbom, Augustsson, & Raastad, 2008). I noen tilfeller, for eksempel i rehabilitering etter skader og hos eldre med ledd som ikke tåler tung belastning, kan imidlertid den tunge treningsmotstanden være ugunstig (Wernbom et al., 2008). I nyere tid har styrketrening med lav treningsmotstand og redusert blodstrøm (okklusjonstrening) blitt et populært forskningstema. Okklusjonstrening med lav treningsmotstand (20-50 % 1 RM) har ført til muskelvekst og økning i styrke både hos unge (Abe, Yasuda, et al., 2005; Kubo et al., 2006; G. C. Laurentino et al., 2012; Shinohara, Kouzaki, Yoshihisa, & Fukunaga, 1998), eldre (Karabulut, Abe, Sato, & Bemben, 2010; Yasuda et al., 2014) og godt trente (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Takarada, Sato, & Ishii, 2002; Takarada, Tsuruta, & Ishii, 2004).

På grunn av den lave treningsmotstanden som benyttes ved okklusjonstrening kan det tenkes at restitusjonstiden som kreves er kortere enn ved tung styrketrening (Abe, Yasuda, et al., 2005; Wernbom et al., 2008). Av den grunn har en del studier gjennomført okklusjonstrening med høy frekvens (1-2 økter per dag) over en kort periode (1-3 uker) (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita, Brechue, Kurita, Sato, & Abe, 2008; Nielsen et al., 2012). Disse studiene har sett en lignende muskelvekst og styrkeøkning på 2 uker som det som normalt blir observert etter 2-4 måneder med tung styrketrening (Abe, Yasuda, et al., 2005; Nielsen et al., 2012). Dette er antagelig i hovedsak på grunn av at det utføres så mange økter på kort tid, fordi hvis man deler muskelveksten på antall økter er den tilnærmet den samme for okklusjonstrening og tung styrketrening (Fujita et al., 2008). Økningen i styrke etter okklusjonstrening virker hovedsakelig å være knyttet til den parallelle muskelveksten (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008; Kubo et al., 2006). En stor økning i muskelfibernes tverrsnittsareal (MFA) ble observert allerede etter første treningsuke av en tre ukers intervensjon med høyfrekvent okklusjonstrening med lav treningsmotstand (Nielsen et al., 2012). Dette var muligens grunnet cellulær svelling som følge av treningen heller enn akkumulering av myofibrillære proteiner.

Mesteparten av økningen i antall muskelcellekjerner skjedde imidlertid også etter første treningsuke, og det holdt seg stabilt til etter treningsperioden (Nielsen et al., 2012). I og med at størstparten av adaptasjonene skjedde etter første treningsuke kan det spekuleres i om systemet ble «mettet» og ikke klarte å respondere på den videre treningen. En hvileperiode kan muligens resette den anabole responsen i muskelfibre. Det er tidligere sett at sensitiviteten til den anabole signaleringen var redusert etter 18 styrkeøkter, men at den var tilbake etter 12 dagers hvile (Ogasawara et al., 2013).

For at muskelvekst skal være mulig kreves en positiv netto proteinbalanse over tid (Marcotte, West, & Baar, 2015). Dette kan potensielt skje ved økt hastighet på proteinsyntese og/eller redusert hastighet på proteinnedbrytning, noe som ikke ble undersøkt av Nielsen et al (2012). Endringer i proteinsyntesehastighet er antagelig mer påvirkelig for stimuli enn endringer i hastigheten på proteinnedbrytning (Phillips, 2009). Proteinnedbrytning er imidlertid også viktig da en redusert proteinnedbrytning potensielt vil føre til en større anabol effekt. Målinger av hastigheten på muskelproteinsyntese og muskelproteinnedbrytning kan gi informasjon om det proteinbalansen er positiv eller negativ over en viss tid. Okklusjonstrening har tidligere ikke ført til endringer i hastighet på proteinnedbrytning (Gundermann et al., 2014). For å undersøke mekanismene bak proteinnedbrytning er det nødvendig å undersøke signalveier. Ubiquitin-proteasom systemet (UPS) er ansett som det viktigste systemet for nedbrytning av muskelproteiner (Glickman & Ciechanover, 2002). UPS merker utvalgte proteiner for nedbrytning med ubiquitin (Reid, 2005). Et protein som er viktig i denne prosessen er E3 ubiquitin ligasen Muscle RING-finger protein-1 (MURF1), som blant annet reguleres av transkripsjonsfaktoren FOXO (Bodine & Baehr, 2014). Studiene som har undersøkt MURF1 i sammenheng med okklusjonstrening har vært på mRNA-nivå og vist reduksjon 8 timer etter okklusjonstrening (Manini et al., 2011), men økning 3 timer etter okklusjonstrening (Drummond et al., 2008). Det er imidlertid foreslått at den intracellulære lokaliseringen av MURF1 også kan være viktig for å koordinere de ulike funksjonene deres for regulering av proteinomsetning (Braun & Gautel, 2011). Vi har ikke funnet noe tidligere forskning på lokalisering av MURF1 i forbindelse med trening. Den intracellulære lokaliseringen er også viktig for FOXO. FOXO er inaktiv i cytosol når den er fosforylert, men hvis den defosforyleres skjer det en translokasjon til kjernen (Brunet et al., 1999) hvor den påvirker transkripsjon av blant annet MURF1 (Stitt et al., 2004). Én og 3 timer etter okklusjonstrening ble det

imidlertid ikke observert endring i fosforylering av FOXO3a (Fry et al., 2013). For å undersøke en viktig del av proteinnedbrytning etter okklusjonstrening har vi derfor undersøkt tre markører for UPS gjennom en kort, høyfrekvent periode med okklusjonstrening som bygger på protokollen fra Nielsen et al (2012). Vi har imidlertid lagt inn ti dager hvile mellom to treningsuker for å undersøke om det kan «resette» de fysiologiske systemene slik at adaptasjonene ikke flater ut etter første treningsuke som den gjorde hos Nielsen et al (2012).

Mine problemstillinger er:

Hvordan påvirkes ubiquitin-proteasom systemet (UPS) akutt etter okklusjonstrening, og over en to ukers treningsperiode med høyfrekvent okklusjonstrening?

H₀: Okklusjonstrening vil ikke endre målte variabler tilknyttet UPS verken akutt eller etter en treningsperiode.

H₁: Okklusjonstrening vil endre målte variabler tilknyttet UPS akutt og under en treningsperiode.

Vil ti dager hvile etter en fem dagers periode med høyfrekvent okklusjonstrening føre til forskjeller i aktivitet av UPS?

H₀: Det vil ikke være forskjell i målte variabler tilknyttet UPS akutt ved oppstart av treningsuke to, sammenlignet med oppstart i uke én.

H₁: Det vil være forskjell i målte variabler tilknyttet UPS akutt ved oppstart av treningsuke to, sammenlignet med oppstart i uke én.

Markører for aktivitet i UPS som ble brukt i denne oppgaven var:

- Mengde og lokalisering av FOXO3a (translokking fra cytosol til nukleære fraksjon vil indikere økt aktivitet)
- Mengde og lokalisering av E3-ligasen MURF1 (økt mengde i cytosol vil indikere økt aktivitet og økt translokking til cytoskjelettet vil indikere stressede myofibrillære strukturer)
- Mengde og lokalisering av ubiquitinerte proteiner og fritt ubiquitin (økt mengde fritt ubiquitin vil indikere økt aktivitet, mens endret mengde ubiquitinerte proteiner må tolkes i sammenheng med de andre endringene fordi det kan indikere både økt og redusert total aktivitet i UPS)

2. Teori

2.1 Okklusjonstrening

Styrketrening med redusert blodstrøm har blitt et populært forskningstema de senere årene. Eksperimentering med denne typen trening startet imidlertid allerede på 1960- og 70-tallet (Sato, 2005), under navnet KAATSU trening (*kaatsu er to japanske ord som grovt kan oversettes til «applisert trykk»*). I litteraturen i dag går denne type trening under ulike navn i tillegg til KAATSU, blant annet blood flow restriction (BFR) training, ischemisk trening og okklusjonstrening. I denne oppgaven vil okklusjonstrening benyttes. Okklusjonstrening har ført til muskelvekst og økning i styrke hos både utrente, godt trente og eldre (Tabell 2.1). Det er imidlertid store metodiske forskjeller på protokollene som har blitt benyttet. I dette kapitlet vil viktige hensyn som bør vurderes ved okklusjonstrening gjennomgås, før effektene av okklusjonstrening og mekanismene bak treningseffektene vil gjennomgås. Fokus vil hovedsakelig være på studier hvor underkstremiteten har blitt trent da dette vil være mest relevant for denne oppgaven.

2.1.1 Metodiske forskjeller

Metoder for å oppnå okklusjon varierer mellom ulike studier, men som oftest benyttes en trykkmansjett som festes proksimalt på ekstremiteten som skal trenes for å redusere blodstrømmen (Fahs, Loenneke, Rossow, Thiebaud, & Bembem, 2012; Pearson & Hussain, 2015). Trykket bør være så høyt at det stenger venøs tilbakestrømning fra ekstremiteten, men tillater arteriell innstrømning (Loenneke, Thiebaud, Abe, & Bembem, 2014) Hvor høyt trykket som kreves for å oppnå dette avhenger blant annet av bredden på trykkmansjetten og omkretsen på ekstremiteten som skal okkluderes. (Loenneke, Fahs, Rossow, Sherk, et al., 2012; Loenneke, Fahs, et al., 2013). Mange studier på okklusjonstrening har benyttet smale trykkmansjetter (3-5 cm) og relativt høyt trykk (200-250 mmHg). Bruk av bredere trykkmansjetter fører imidlertid til samme reduksjon i blodstrøm ved lavere trykk enn smale (Loenneke, Fahs, Rossow, Sherk, et al., 2012). Å benytte brede trykkmansjetter virker og være gunstig da treningen kan gjennomføres med lavere trykk, og at skjærkreftene dermed er mindre (Wernbom et al., 2008). Mengden vev som omringer blodårene vil også påvirke trykket som blir applisert på blodårene og derfor også reduksjonen i blodstrøm (Loenneke, Fahs, Rossow, Sherk, et al., 2012). Omkrets på låret har blitt vist som den viktigste

bestemmende faktoren for arterielt okklusjonstrykk (Loenneke, Fahs, Rossow, Sherk, et al., 2012). På bakgrunn av dette er det foreslått at trykket som appliseres ved okklusjonstrening justeres individuelt med bakgrunn i bredde på trykkmansjett og omkrets på ekstremiteten som skal okkluderes (Fahs et al., 2012; Loenneke, Fahs, Rossow, Sherk, et al., 2012; Loenneke, Fahs, et al., 2013). I de fleste studier er det imidlertid vanlig å applisere det samme trykket til alle deltagere, uavhengig av individuelle forskjeller (Fahs et al., 2012). Ved bruk av brede trykkmansjetter virker det som okklusjonseffekten er mindre avhengig av omkretsen på ekstremiteten (Crenshaw, Hargens, Gershuni, & Rydevik, 1988; Wernbom et al., 2008). Et trykk på 90-110 mmHg er foreslått som tilstrekkelig for å delvis avstenge den arterielle blodstrømmen og dermed påvirke muskeltretthet ved vedvarende arbeid ved bruk av brede trykkmansjetter (135 mm) (Wernbom et al., 2008).

De fleste studiene på okklusjonstrening har benyttet lav treningsmotstand (20-50 % 1RM). I noen tilfeller kan vanlig tung styrketrening være problematisk å gjennomføre, for eksempel i rehabilitering etter skade eller hos eldre som ikke tåler den tunge belastningen på leddene (Wernbom et al., 2008). At trening med lav motstand og okklusjon kan føre til muskelvekst og styrkeøkninger vil derfor gjøre okklusjonstrening til et svært godt alternativ for disse gruppene. Til og med okklusjonstrening uten ytre belastning, som gangtrening (Abe, Kearns, & Sato, 2006; Ozaki et al., 2011) og sirkeltrening med egen kroppsvekt (Ishii, Madarame, Odagiri, Naganuma, & Shinoda, 2005) har vist økt styrke og muskelvolum, og repetert okklusjon uten trening har redusert atrofi ved immobilisering (Clark, Fernhall, & Ploutz-Snyder, 2006; Kubota, Sakuraba, Sawaki, Sumide, & Tamura, 2008; Takarada, Takazawa, & Ishii, 2000). Okklusjonstrening er også undersøkt i kombinasjon med styrketrening med tung treningsmotstand, men har ikke gitt noen ytterligere effekt på styrke og muskelareal sammenlignet med samme trening uten okklusjon (G. Laurentino et al., 2008).

Okklusjonstrening med lav treningsmotstand gjennomføres med mange repetisjoner og korte pauser (30-60 sekunder) for å skape økt metabolsk stress; en av mekanismene som er foreslått og være årsak til effekten av okklusjonstrening (se «Mekanismene bak muskelvekst ved okklusjonstrening»). Noen studier benytter repetisjoner til utmattelse, andre benytter et submaksimalt antall repetisjoner. Teoretisk sett vil okklusjonstrening utført til utmattelse føre til større metabolsk stress og dermed potensielt en større

treningsstimulus enn submaksimalt antall repetisjoner (Fahs et al., 2012). Ved å opprettholde okklusjonen i pausene skapes større metabolsk stress enn om okklusjonen slippes opp i pausene (Suga et al., 2012). Når okklusjonstrykket blir sluppet opp i pausene kan muskeltrettheten raskt bli restituert mellom seriene, akkurat som ved styrketrening uten okklusjon. Under styrketrening vil alltid en viss reduksjon av blodstrøm oppstå på grunn av muskelkontraksjoner. Derfor kan det tenkes at når eksternt trykk kun blir applisert under treningen, og ikke i pausene, vil det ikke gi noe ekstra stimuli som bidrar til muskulære adaptasjoner (Fahs et al., 2012).

Frekvensen på okklusjonstrening varierer også mellom ulike studier (Tabell 2.1). En del studier har brukt samme frekvens som det er vanlig å bruke ved tradisjonell tung styrketrening (2-3 økter per uke) over en lengre periode (6-16 uker). På grunn av den lave treningsmotstanden som ofte blir brukt ved okklusjonstrening kan det imidlertid tenkes at restitusjonstiden er kortere sammenlignet med tung styrketrening. Det har blitt argumentert for at okklusjonstrening med lav treningsmotstand skaper lite eller ingen muskelskade (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014). En del studier har derfor benyttet svært høy frekvens på okklusjonstrening (1-2 økter om dagen) over korte perioder (1-3 uker).

2.1.2 Farer med okklusjonstrening

Langvarig ischemi¹ og rask reperfusjon² kan potensielt føre til muskelskade og nekrose av muskelvev, men dette er avhengig av lengden og graden av ischemi (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014; Pope, Willardson, & Schoenfeld, 2013). På grunn av den korte varigheten på øktene, samt at de gjennomføres uten fullstendig okklusjon, er dette antagelig ikke et problem ved okklusjonstrening (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014). Oppsamlingen av blod ved okklusjonstrening kan også potensielt føre til formasjon av blodpropp (Wernbom et al., 2008). En japansk survey av 12.600 personer av ulik alder og fysisk form som har benyttet seg av okklusjonstrening tyder imidlertid på at okklusjonstrening er en sikker treningsmetode, og forekomsten av sideeffekter er lav (Nakajima et al., 2006). Selv om det har blitt foreslått at okklusjonstrening fører til lite/ingen muskelskade (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014) og studier har vist at det

¹ Redusert blodstrøm til et organ eller vev grunnet f.eks trykkbelastning

² Gjenopprettelse av blodstrøm til et organ eller vev

ikke er noen økning i kreatinkinase (CK) (Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008; Takarada, Nakamura, et al., 2000; Yasuda et al., 2014), har enkelttilfeller av rbdomyolyse blitt observert (Iversen & Rostad, 2010). Det er heller ikke uvanlig med muskelstølhøhet (delayed onset muscle soreness; DOMS) etter okklusjonstrening (Wernbom et al., 2008; Wernbom, Augustsson, & Thomee, 2006). DOMS ser imidlertid ut til å reduseres etter noen økter som tyder på at kroppen venner seg til denne typen trening. Antagelig kan mye av DOMS unngås om forsøkspersonene gradvis tilvennes okklusjonstrening (starter med mindre treningsvolum) (Wernbom et al., 2008).

2.1.3 Muskelvekst og økning i styrke med okklusjonstrening

Okklusjonstrening med lav treningsmotstand har ført til økt styrke og muskelvolum hos eldre, yngre, godt trente, dårlig trente og pasienter (Tabell 2.1). Økningen i styrke og muskelvolum er større sammenlignet med tilsvarende trening uten okklusjon, og lignende som ved tung styrketrening (Tabell 2.1). I studiene som har hatt høy frekvens på okklusjonstreningsøktene har økningen i muskelstørrelse i noen tilfeller vært tilsvarende det som er sett etter 2-4 måneder med vanlig tung styrketrening (Abe, Yasuda, et al., 2005; Nielsen et al., 2012). Økningen er tilnærmet lik når du deler på antall økter, men på grunn av den høye frekvensen med okklusjonstrening oppnår du det samme resultatet på kortere tid (Fujita et al., 2008). Ved høyfrekvent okklusjonstrening med lav treningsmotstand over tre uker var nesten all framgangen man så oppnådd allerede etter første treningsuke (Nielsen et al., 2012).

Okklusjonstrening har også vist forbedringer på funksjonelle tester som sprint (Abe, Kawamoto, et al., 2005), på skjelettet til eldre menn (Karabulut et al., 2011), ved flerleddsøvelser, og på muskelgrupper som ikke er under okklusjon (Abe et al., 2012). Dette vil imidlertid ikke bli diskutert nærmere i denne oppgaven, da fokus er økning i styrke og muskelvolum i musklene som er under okklusjon.

Tabell 2.1. Oversikt over studier som har studert effekten av okklusjonstrening på muskelstyrke og muskelvekst for kneekstensorer. KE: kneekstensjon/kneekstensorer, QF: quadriceps femoris, MB CSA: muscle-bone cross sectional area.

Ref.	Kjønn (N)	Alder (år)	Treningsstatus	Øvelse	Frekvens	Intensitet	Serier	Reps (per serie)	Pauser	Styrkeøkning	Muskelvekst	Kommentar
Shinohara et al. (1998)	M (5)	23,2	Utrente	Isometrisk kneekstensjon m/ okkl	3x/uke, 4 uker	40% MVC	2s	kontraksjon, 3s pause, i 3 min	MVC90°: 126%	Ikke målt	8cm cuff, >250 mmHg	
	M (5)	23,2	Utrente	Isometrisk kneekstensjon u/ okkl	3x/uke, 4 uker	40% MVC	2s	kontraksjon, 3s pause, i 3 min	Ikke sign.	Ikke målt	FP-er trente 1 bein m/ og 1 bein u/okkl.	
Takarada et al. (2002)	M (6)	25,3±0,8	Elite rugby spillere	Kneekstensjon (bilateral) m/ okkl	2x/uke, 8 uker	~50% 1RM	4	Til utmattelse	30 s (m/okkl)	Isokin: 114,3%	KE (MRJ): 112,3%	33mm trykk-mansjett, 196±5,7 mmHg
	M (6)	26,5±0,7	Elite rugby spillere	Kneekstensjon (bilateral) u/ okkl	2x/uke, 8 uker	~50% 1RM	4	Matchet m/ okkl-gruppe	30 s	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	
	M (5)	25,4±0,8	Elite rugby spillere	-	-	-	-	-	-	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	
Takarada et al. (2004)	M (6)	21,3±0,6	Ungde atleter	Kneekstensjon (bilateral) m/okkl	2x/uke, 8 uker	10-20% 1RM	5	Til utmattelse	1 min	Isokin: 119,2%	KE (MRJ): 110,3%	90mm cuff, 218±8,1 mmHg
	M (6)	21,8±0,8	Ungde atleter	Kneekstensjon (bilateral) u/okkl	2x/uke, 8 uker	10-20% 1RM	5	Matchet m/ okkl-gruppe	1 min	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	
	M (6)	22,2±0,8	Ungde atleter	-	2x/uke, 8 uker	-	-	-	-	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	Kun okkl. (ca. 10 min)
Abe et al. (2005)	M (9)	-	Friidrettsutøvere	Squat og Leg curl (+sprint/hopp-trening)	2x/dag, 8 dager	20% 1RM 20% 1RM	3	15	30 s	1RM leg press: 119,6%	QF (UL): 115,9% MB CSA (UL): 114,5%	160-240 mmHg, m/okkl under hele økta.
	M (6)	-	Friidrettsutøvere	Kun sprint/hopp-trening	-	-	-	-	-	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	

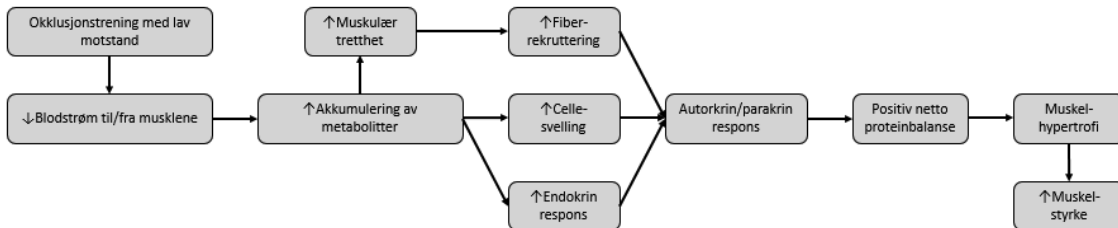
Ref.	Kjønn (N)	Alder (år)	Treningsstatus	Øvelse	Frekvens	Intensitet	Serier	Reps (per serie)	Pauser (m/okkl)	Styrkeøkning	Muskelvekst	Kommentar
Abe et al. (2005b)	M (9)	23,6±6,5	Aktive, ikke styrketrente	Squat og Leg curl (m/okkl)	2x/dag, 6dg/uke, 2 uker	20% 1RM	3	15	30 s (m/okkl)	1RM squat: ↑16,8% 1RM leg curl: ↑22,6%	MB CSA (UL): 19% QF (MRD): ↑17,7%	160-240 mmHg
	M (7)	23,6±6,5	Aktive, ikke styrketrente	Squat og Leg curl (u/ okkl)	2x/dag, 6dg/uke, 2 uker	20% 1RM	3	15	30 s	1RM squat: ↑18,9%	Ikke sign.	
Kubo et al. (2006)	M (9)	25±2	Ung menn	Kneekstønsjon (unilateral) m/okkl	3x/uke, 12 uker	20% 1RM	4	25-18-15-12	30 s	MVC80°: ↑17,8%	QF (MRD): ↑15,9%	Samme FP-er, 1 bein i hver gruppe
	M (9)	25±2	Ung menn	Kneekstønsjon (unilateral) u/okkl	3x/uke, 12 uker	80% 1RM	4	10	1 min	MVC80°: ↑16,8%	QF (MRD): ↑17,4%	1RM justert hver 4. uke
Fujita et al. (2008)	M (8)	22,3±2,9	Aktive unge menn	Kneekstønsjon (bilateral) m/okkl	2x/dag, 6 dager	20% 1RM	4	75 (totalt)	m/okkl	1RM: ↑16,7%	MB CSA (UL): ↑12,4% QF (MRD): ↑13,0%	160-220 mmHg
	M (8)	21,1±3,2	Aktive unge menn	Kneekstønsjon (bilateral) u/okkl	2x/dag, 6 dager	20% 1RM	4	75 (totalt)	u/okkl	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	
Madarama et al (2008)	M (8)	21,6±2,4	Urente	Kneekstønsjon og knefleksjon m/ okkl	2x/uke, 10 uker	30% 1RM	3	30-15-15	30 s (m/ okkl)	↑1RM (KE) ↑MVC80° (KE)	(Ikke sign.)	4cm cuff, 160-260 mmHg
	M (7)	21,9±4,2	Urente	Kneekstønsjon og knefleksjon u/ okkl	2x/uke, 10 uker	30% 1RM	3	30-15-15	30 s	↑1RM (KE) (Ikke sign.)	(Ikke sign.)	Begge grupper trente også albuefleksjon

Ref.	Kjønn (N)	Alder (år)	Treningsstatus	Øvelse	Frekvens	Intensitet	Serier	Reps (per serie)	Pauser (m/okkl)	Styrkeøkning (KE)	Muskelvekst	Kommentar
Karabulut et al. (2010)	M (13)	55,9±1,0	Eldre	Leg press, leg extension	3x/uke, 6 uker	20% 1RM	3	30 - 15 - 15	1 min (m/okkl)	1RM (KE): ↑19,1%	Ikke målt	205,4±4,3 mmHg
	M (13)	57,5±0,8	Eldre	Leg press, leg extension	3x/uke, 6 uker	80% 1RM	3	8	1 min	1RM (KE): ↑31,2%	Ikke målt	
	M (11)	57,0±1,1	Eldre	-	-	-	-	-	-	1RM(KE):↑	Ikke målt	
Laurentino et al. (2012)	M (10)	20,0±4,5	Fysisk aktive	Kneekstensjon (bilateral) m/okkl	2x/uke, 8 uker	20% 1RM	3-4	15	1 min (m/okkl)	1RM (KE): ↑40,1%	QF (MRD): ↑6,3%	175 mm cuff, 94,8±10,3 mmHg
	M (10)	20,3±4,2	Fysisk aktive	Kneekstensjon (bilateral) u/okkl	2x/uke, 8 uker	20% 1RM	3-4	15	1 min	1RM (KE): ↑20,7%	(Ikke sign.)	
	M (9)	23,6±6	Fysisk aktive	Kneekstensjon (bilateral) u/okkl	2x/uke, 8 uker	80% 1RM	3-4	8	1 min	1RM (KE): ↑36,2%	QF (MRD): ↑6,1%	
Nielsen et al. (2012)	M (10)	22,8±2,3	Ikke styrke-trente	Kneekstensjon (unilateral) m/okkl	23 økter / 19 dager	20% 1RM	4	Til utmattelse	30 s (m/okkl)	MVC70°: ↑10,6%	MFA: ↑31% type-I ↑32% type-II (Ikke sign.)	150mm trykk-mansjett, 100 mmHg
	M (8)	21,9±3,0	Ikke styrke-trente	Kneekstensjon (unilateral) u/okkl	23 økter / 19 dager	20% 1RM	4	Tilsvarende som okkl-gruppe	30 s (m/okkl)	(Ikke sign.)		
Yasuda et al. (2014)	M (3) K (6)	71,3±7,1	Eldre	Kneekstensjon, leg press (bilateral) m/okkl	2x/uke, 12 uker	20% 30%	4	30-20-15-10	30 s (m/okkl)	1RM (KE): ↑26,1% 1RM (leg press) ↑33,4%	QF (MRD): ↑8,0%	50 mm cuff, 120-270 mmHg
	M (2) K (8)	67,7±6,0	Eldre	-	-	-	-	-	-	(Ikke sign.)	(Ikke sign.)	

Økning i styrke og muskelvolum henger tett sammen da muskelgruppes tverrsnittsareal (CSA) er viktigste bestemmende faktor hvor stor kraft som kan utvikles ved langsomme forkortningshastigheter (Raastad, Paulsen, Refsnes, Ronnestad, & Wisnes, 2010). Okklusjonstrening (20 % 1RM) og tung styrketrening (80 % 1RM) har resultert i samme økning i CSA av *m. quadriceps femoris* og isometrisk dreiemoment ved kneekstensjon (tendens til lavere økning for okklusjon enn tung styrketrening), mens relativ styrke (1RM/CSA) av *m. vastus lateralis* og stivhet av sene-aponeurose komplekset i kneekstensorene kun økte ved tung styrketrening (Kubo et al., 2006). I flere andre studier er det heller ikke observert endring i relativ styrke (1RM/CSA) ved okklusjonstrening med lav treningsmotstand (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008). Dette tyder på at økt styrke ved okklusjonstrening hovedsakelig er grunnet muskelvekst. I neste del vil jeg gå inn på potensielle mekanismer som er foreslått som årsaker til at okklusjonstrening fører til muskelvekst.

2.2 Mekanismene bak muskelvekst ved okklusjonstrening

Mekanisk strekk og metabolsk stress er to primære mekanismer for muskelvekst ved styrketrening (Pearson & Hussain, 2015). Mekanisk strekk er av mange sett på som viktigste stimuli for muskelvekst (Schoenfeld, 2013), men rollen til mekanisk strekk i muskelvekst ved okklusjonstrening er antagelig begrenset grunnet den lave treningsmotstanden som benyttes.



Figur 2.1. Figur som gir oversikt over noen av de mest sannsynlige mekanismene bak muskelveksten som er observert ved okklusjonstrening. Modifisert etter Scott et al (2014) og Pearson og Hussain (2015).

2.2.1 Metabolsk stress

Metabolsk stress sammen med tradisjonell styrketrening skjer som et resultat av at trening avhenger av anaerob glykolyse for ATP-produksjon (Schoenfeld, 2013). Dette fører blant annet til kortvarige endringer i en rekke metabolitter; redusert ATP, tømming av kreatinfosfat (CrP), økt inorganisk fosfat (Pi), økt ADP/ATP ratio, økt AMP produksjon, redusert intramuskulær pH og akkumulering av laktat (Pope et al., 2013; Schoenfeld, 2013). Det er tydelig at metabolsk stress ved trening kan bidra til muskelvekst (Schoenfeld, 2013), og det har også blitt spekulert i at akkumulering av metabolitter er viktigere enn høy kraftutvikling for å optimalisere hypertrofi i respons til trening (Shinohara et al., 1998). Som eksempel ble det observert ulike adaptasjoner mellom to treningsintervensjoner med samme ytre belastning (3-5 serier x 10 reps på 75% 1RM), hvor den ene ble gjennomført med en 30 sekunders pause i midten av hver serie og den andre ikke (Goto, Ishii, Kizuka, & Takamatsu, 2005). Gruppen som trente uten pause i midten hadde, i motsetningen til gruppen som trente med pause i midten, en økning i metabolsk stress (laktat, veksthormon (GH), adrenalin og noradrenalin), noe som resulterte i større økning i styrke, utholdenhet og muskelmasse.

På grunn av den lave treningsmotstanden som benyttes har hypertrofi ved okklusjonstrening i stor grad blitt kreditert økt metabolsk stress (Loenneke, Fahs, Wilson, & Bemben, 2011; Pearson & Hussain, 2015). Blant annet fører okklusjonstrening til tømning av CrP (Suga et al., 2009; Suga et al., 2012), økt inorganisk fosfat (P_i) (Takada et al., 2012), redusert pH (Suga et al., 2009) og akkumulering av laktat (Fujita et al., 2008; Reeves et al., 2006; Takarada, Nakamura, et al., 2000). Det metabolske stresset er høyere ved okklusjonstrening med lav treningsmotstand enn ved tilsvarende trening uten okklusjon (Suga et al., 2009; Takarada, Nakamura, et al., 2000). Suga et al (2009) viste imidlertid at det metabolske stresset ved okklusjonstrening med lav treningsmotstand ikke var like høyt som ved tung styrketrening. En årsak til dette kan være at det ble benyttet bare én serie. Når det i en senere studie (Suga et al., 2012) ble gjennomført 3 serier var metabolsk stress ved okklusjonstrening, med okklusjonen i pausene, like høyt som ved tung styrketrening. Metabolsk stress (P_i og intramuskulær pH) har vist korrelasjon med økning i både CSA og styrke etter perioder med okklusjonstrening (20% 1RM) (Takada et al., 2012). Det metabolske stresset kan stimulere muskelvekst gjennom og påvirke sekundære faktorer som blant annet muskelfiberrekruttering, økning i systemiske hormoner og celledvelling, som senere stimulerer autokrine og/eller parakrine prosesser (Pearson & Hussain, 2015).

2.2.2 Muskelfiberrekruttering

Ved styrketrening blir motoriske enheter rekruttert i et rekrutteringshierarki, hvor små motoriske enheter bestående av trege, utholdende muskelfibre (slow-twitch, type I fibre) blir rekruttert ved lav kraftutvikling, mens større motoriske enheter bestående av raske, mindre utholdende muskelfibre (fast-twitch, type II fibre) blir rekruttert ved økende kraft (Henneman, Somjen, & Carpenter, 1965). Kun muskelfibre som er aktivert under trening vokser som resultat av styrketrening (Wernbom et al., 2008). For å øke muskelmasse og styrke er derfor aktivering av type II muskelfibre viktig, da disse har større potensiale for hypertrofi (McCall, Byrnes, Dickinson, Pattany, & Fleck, 1996). På grunn av dette er det tidligere foreslått at styrketrening må gjennomføres med høye treningsmotstander (>60 % 1RM) for å oppnå muskelvekst og økt styrke (Kraemer et al., 2002; Pearson & Hussain, 2015; Wernbom et al., 2008). Ved utmattende arbeid med submaksimal treningsmotstand ser det imidlertid ut til at terskelen for rekruttering av motorisk enheter synker, og at det er en økt rekruttering av type II fibre når utmattelse

nærmer seg (Houtman, Stegeman, Van Dijk, & Zwarts, 2003; Wernbom et al., 2008). Dette skyldes sannsynligvis utvikling av muskeltretthet, som gjør at de motoriske enhetene som i utgangspunktet ble rekruttert ikke lenger er i stand til å opprettholde den samme kraften, og nye, større motoriske enheter derfor må rekrutteres for å opprettholde arbeidet (Houtman et al., 2003).

Flere studier tyder på rekruttering av type II muskelfibre ved okklusjonstrening med lav treningsmotstand (Suga et al., 2009; Takada et al., 2012; Takarada et al., 2000), og dette har blitt foreslått å være årsaken til muskelveksten og styrkeøkningen som blir observert etter denne typen trening (Meyer, 2006). Okklusjonstrening med lav motstand til utmattelse/nær utmattelse har vist høyere fyringsfrekvens målt ved elektromyografi (EMG), noe som kan indikere høyere aktivering av type II fibre, sammenlignet med tilsvarende trening uten okklusjon (Manini et al., 2011; Takarada, Nakamura, et al., 2000; Takarada et al., 2000; Yasuda et al., 2009). Når trening med lav treningsmotstand har blitt utført til utmattelse med og uten okklusjon er det imidlertid ikke vist forskjell i EMG-aktivitet (Kacin & Strazar, 2011; Wernbom, Järrebring, Andreasson, & Augustsson, 2009). Det virker derfor ikke som okklusjonstrening øker muskelaktivering utover det som blir sett ved styrketrening til utmattelse uten okklusjon, men okklusjonen gjør at utmattelse inntreffer tidligere (Wernbom et al., 2009). Okklusjonstrening med lav treningsmotstand rekrutterer imidlertid ikke nødvendigvis like mange type II muskelfibre som tung styrketrening (S. B. Cook, Murphy, & Labarbera, 2013; Suga et al., 2009). Suga et al (2009) gjennomførte imidlertid bare en serie på 20 % av 1RM. Senere studier fra samme gruppe har vist at når okklusjonstrening ble gjennomført med ≥ 30 % 1RM var resultatene lignende som ved tung styrketrening (Suga et al., 2010) og det samme når det ble gjennomført 3 serier med okklusjonstrening hvor okklusjonen ble opprettholdt mellom seriene (Suga et al., 2012). Kort oppsummert viser flere studier at type II muskelfibre blir aktivert ved okklusjonstrening med lav motstand, antagelig på grunn av muskulær tretthet. Rekrutteringen er ikke nødvendigvis like stor som ved vanlig tung styrketrening, men det er likevel sannsynlig at rekruttering av type II fibre er ansvarlig for noe av den hypertrofiske effekten som ses ved okklusjonstrening (Pearson & Hussain, 2015).

Økning i fiberareal for type I muskelfibre ser ut til å være større ved okklusjonstrening enn ved tung styrketrening (Nielsen et al., 2012). Nielsen et al (2012) observerte lik

økning i muskelfiberareal for type I og type II fibre, på tross av at type II fibre normalt har større potensial for hypertrofi (McCall et al., 1996). Basert på EMG-resultater er det foreslått at type I fibre gjør mesteparten av jobben i de første repetisjonene, men at type II fibre gradvis blir rekruttert når det utvikles muskulær tretthet (Wernbom et al., 2009). I tillegg er det vist at stressresponsen ved okklusjonstrening er større i type I fibre enn i type II fibre (Cumming, Paulsen, Wernbom, Ugelstad, & Raastad, 2014), noe som muligens kan være en forklaring på den store effekten på type I fibre i Nielsen et al (2012).

2.2.3 Systemiske og lokale vekstfaktorer

Okklusjonstrening med lav treningsmotstand har ført til økning av flere anabole/systemiske hormoner, spesielt veksthormon (GH) (Kim et al., 2014; Madarame, Sasaki, & Ishii, 2010; Reeves et al., 2006; Takano et al., 2005; Takarada, Nakamura, et al., 2000; Takarada et al., 2004). Responsen av GH kan i noen tilfeller være kraftigere ved okklusjonstrening med lav treningsmotstand enn ved tradisjonell tung styrketrening (Manini et al., 2012; Takarada, Nakamura, et al., 2000; Takarada et al., 2004). Noen studier har vist at hypertrofi (økning i MFA og CSA) korrelerer med akutte eller absolutte endringer av GH (Goto et al., 2005; McCall, Byrnes, Fleck, Dickinson, & Kraemer, 1999), mens andre ikke har funnet noen slike sammenhenger (Mitchell et al., 2013). Korrelasjon mellom hormoner og hypertrofi betyr ikke nødvendigvis at det er en kausal sammenheng, og det har blitt stilt spørsmål rundt rollen til systemiske hormoner siden hypertrofi kan skje uavhengig av treningsinduserte endogene systemiske hormoner (Mitchell et al., 2013; West & Phillips, 2010; Wilkinson, Tarnopolsky, Grant, Correia, & Phillips, 2006). Okklusjonstrening kombinert med gange har også vist muskelvekst og økning i styrke på tross av liten økning i GH (Abe et al., 2006), og okklusjon ved immobilisering har hindret atrofi og reduksjon i styrke uten endringer i GH (Kubota et al., 2008). Antageligvis er systemiske faktorer mindre viktig enn lokale faktorer for muskelvekst, men de systemiske faktorene kan muligens ha en forsterkende effekt på de lokale faktorene (Wernbom et al., 2008). Det fins imidlertid studier både for (C. J. Cook, Kilduff, & Beaven, 2014; Ronnestad, Nygaard, & Raastad, 2011) og imot (West et al., 2010; West et al., 2009) en forsterkende effekt av en systemisk respons på lokale tilpasninger i styrke og hypertrofi.

Lokale vekstfaktorer bidrar sannsynligvis til hypertrofi ved styrketrening (Loenneke et al., 2011; Pearson & Hussain, 2015). Mechano-growth factor (MGF), en isoform av Insulin-like growth factor 1 (IGF-1), ser ut til å bli lokalt aktivert av mekanisk stimuli og cellulær skade (Loenneke et al., 2011). I forbindelse med okklusjonstrening er det imidlertid ikke sett endringer i IGF-1 og MGF mRNA verken tre (Drummond et al., 2008) eller åtte timer etter trening (Manini et al., 2011). En del studier har sett på IGF-1 konsentrasjon i blodet etter okklusjonstrening, men dette gir lite informasjon om den lokale påvirkningen på muskelen.

2.2.4 Muskelsvelling

Intracellulær svelling er observert i flere studier på okklusjonstrening, og er foreslått som en potensiell mekanisme for å skape muskelvekst (Abe et al., 2012; Fujita et al., 2008; Loenneke, Fahs, Rossow, Abe, & Bembien, 2012; Schoenfeld, 2013). Økt akkumulering av metabolitter ved okklusjon skaper en trykkgradient som fremmer innstrømming av vann inn i muskelcellene for å ekvilibrere den osmotiske gradienten (Loenneke, Fahs, Rossow, Abe, et al., 2012). Den påfølgende svellingen kan true den strukturelle integriteten til cellemembranen og få cellen til å initiere en signalrespons som fører til forsterkning av ultrastrukturen (Schoenfeld, 2010). Intracellulær svelling kan øke proteinsyntese og redusere proteinnedbrytning (Berneis, Ninnis, Haussinger, & Keller, 1999; F. Lang et al., 1998). For å undersøke om muskelsvelling var en årsak til stimuleringen av muskelproteinsyntese ved okklusjonstrening ble okklusjonstrening sammenlignet med tilsvarende styrketrening med lav treningsmotstand (20 % 1RM), hvor hyperemi ble stimulert via farmakologisk vasodilatasjon (Gundermann et al., 2012). Her økte hastigheten på muskelproteinsyntesen i gruppa som drev okklusjonstrening, men ikke i vasodilatasjonsgruppa. Det var også økt MURF1 mRNA ekspresjon kun i okklusjonstreningsgruppa. Den hyperemiske responsen var imidlertid ikke lik i de to gruppene og det er mulig at vasodilatasjonsgruppa ikke nådde terskelen som kreves for anabol stimulering.

2.2.5 Oppsummering

I tillegg til mekanismene som er diskutert her har også flere andre faktorer blitt foreslått som mulige stimuli for muskelvekst ved okklusjonstrening med lav motstand. Ischemi og påfølgende reperfusjon kan øke produksjonen av frie radikaler (Reactive oxygen species: ROS) (Clanton, 2007; Korthuis, Granger, Townsley, & Taylor, 1985), og dette har derfor blitt foreslått som en mulig mekanisme (Pearson & Hussain, 2015). Det er imidlertid ikke sett økning i markører for ROS etter okklusjonstrening (Goldfarb et al., 2008; Takarada, Nakamura, et al., 2000). Okklusjonstrening varer som regel ikke lenger enn 5-10 minutter og øker derfor muligens ikke ROS nivåer i samme grad som lengre stimuli (Pearson & Hussain, 2015). I tillegg har blant annet endringer i blodstrøm, varmestress, hypoksi-hyperoksi og nitrogenmonoksid blitt foreslått som mulige stimuli ved okklusjonstrening (Wernbom et al., 2008). Adaptasjonen til trening er antagelig avhengig av integrasjon av flere ulike faktorer, og flere av faktorene som er nevnt over bidrar muligens til muskelveksten som blir observert etter okklusjonstrening (Wernbom et al., 2008). For å føre til muskelvekst må imidlertid disse faktorene stimulere cellesignalering som påvirker proteinbalansen.

2.3 Muskelvekst

Regulering av muskelstørrelse styres av balansen mellom proteinsyntese og proteinnedbrytning. Spesielt balansen mellom syntese og nedbrytning av funksjonelle og strukturelle proteiner i cellen regulerer størrelsen på vevet (Marcotte et al., 2015). Om netto proteinbalanse er positiv eller negativ over tid vil dette føre til henholdsvis muskelvekst (hypertrofi) eller muskeltap (atrofi) (Marcotte et al., 2015). Muskelmasse reguleres av både fysisk aktivitet, metabolisme og hormoner (Sandri, 2013), men denne oppgaven vil ha hovedfokus på styrketrening sin påvirkning. Styrketrening øker muskelproteinsyntese og, i mindre grad, muskelproteinnedbrytning i fastende tilstand (Biolo, Maggi, Williams, Tipton, & Wolfe, 1995; Biolo, Williams, Fleming, & Wolfe, 1999; Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997). Treningsstatus ser ut til å påvirke proteinnedbrytning da styrketrening har økt hastigheten på proteinnedbrytning hos utrente, men ikke trente (Phillips, Tipton, Ferrando, & Wolfe, 1999).

Effekten av trening på muskelproteinnedbrytning etter trening er dårlig beskrevet, antagelig på grunn av metodiske vanskeligheter (Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010). For å få et helhetlig bilde av prosessene som skjer ved muskelvekst er det viktig

og også studere muskelproteinnedbrytning. Redusert muskelproteinnedbrytning vil i utgangspunktet forbedre den anabole effekten i og med at netto proteinbalanse blir mer positiv. Det virker imidlertid som en viss form for proteinnedbrytning er nødvendig for å drive proteinsyntese og forbedre muskelstørrelse og –kvalitet (remodellering) (Goldberg, 2003; Marcotte et al., 2015).

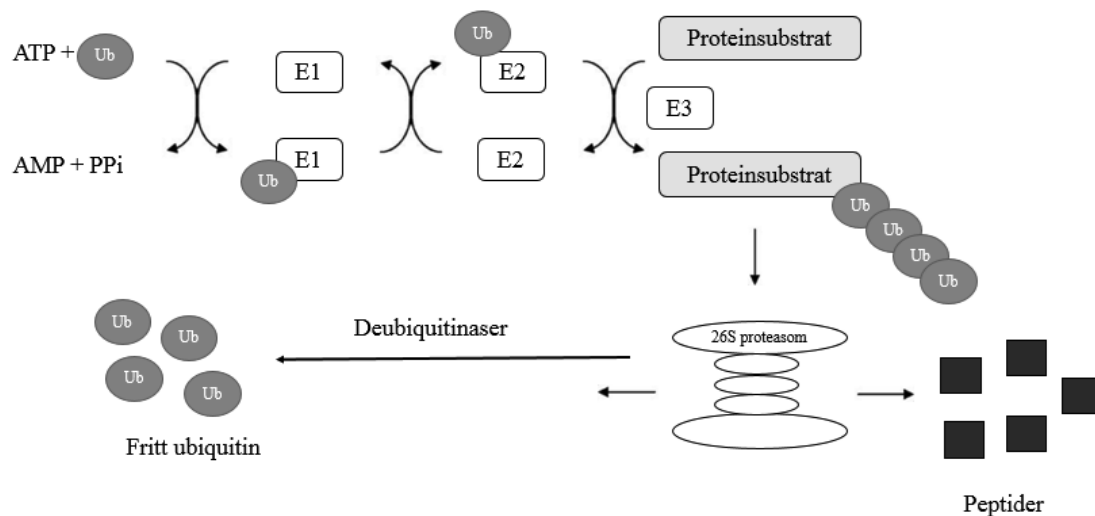
Hensikten med denne oppgaven er å studere muskelproteinnedbrytning etter okklusjonstrening, og fokuset i resten av dette kapitlet vil derfor ligge på proteinnedbrytning og ikke proteinsyntese. Mye av det vi vet om muskelproteinnedbrytning stammer fra studier på atrofi, og disse vil nødvendigvis tas med for å kunne forklare mekanismene bak proteinnedbrytning. Det er begrenset med forskning som er gjort på muskelproteinnedbrytning i sammenheng med okklusjonstrening, derfor vil andre former for styrketrening også trekkes inn.

2.3.1 Muskelproteinnedbrytning

Fire forskjellige systemer er hovedsaklig ansvarlig for cellulær proteinnedbrytning i eukaryote celler; autofag/lysosomal systemet, calpainsystemet, caspasesystemet og ubiquitin-proteasom systemet (UPS) (Murton, Constantin, & Greenhaff, 2008; Nader, 2005). I skjelettmuskler er UPS ansvarlig for mesteparten av intracellulær proteinnedbrytning (Glickman & Ciechanover, 2002). UPS kan imidlertid ikke bryte ned intakte myofibriller, og det er foreslått at både calpainer og caspaser kan ha en rolle i å gjøre myofibrillære proteiner tilgjengelig for ubiquitinering (Jackman & Kandarian, 2004). Lysosomal systemet ser ikke ut til å bryte membranproteiner og ikke myofibrillære proteiner, men det er foreslått at det også er en samhandling mellom UPS og lysosomal nedbrytning (Jackman & Kandarian, 2004). Denne oppgaven vil imidlertid fokusere på UPS. Nedbrytning av proteiner via UPS involverer to steg. I ubiquitineringsprosessen blir utvalgte proteiner merket for nedbrytning med kovalent binding av kjeder med ubiquitinmolekyler (Reid, 2005). Ubiquitinerte proteiner blir så gjenkjent og degradert til små peptider av 26S proteasome komplekset (Reid, 2005).

2.3.2 Ubiquitineringsprosessen

Tre klasser proteiner regulerer ubiquitineringsprosessen: ubiquitin-aktiverende enzymer (E1), ubiquitin-konjugerende enzymer (E2), og ubiquitin ligaser (E3) (Bodine & Baehr, 2014). I mennesker eksisterer bare en type E1 (Pickart, 2001), ca. 40 E2 (Bodine & Baehr, 2014) og over 600 E3 (Bodine & Baehr, 2014). E3 ubiquitin ligasene blir delt inn i to hovedklasser, HECT (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus) E3 ubiquitin ligaser og RING (Really Interesting New Gene) E3 ubiquitin ligaser, hvor RING familien er den klart største (Bodine & Baehr, 2014; Metzger, Hristova, & Weissman, 2012). Ubiquitineringsprosessen begynner med ATP-avhengig aktivering av ubiquitin ved E1, som skaper en høy-energetisk thiolesterbinding mellom ubiquitin og E1 (Reid, 2005). Det aktiverte ubiquitin blir deretter overført til en E2 ligase, hvor det også skapes en thiolesterbinding (Bodine & Baehr, 2014). Til slutt blir ubiquitin fra E2 overført til et proteinsubstrat via en E3 ligase (Bodine & Baehr, 2014), hvor det blir festet med en kovalent binding til proteinsubstratet (Glickman & Ciechanover, 2002). For HECT E3 ligaser blir ubiquitin overført fra E2 til E3 hvor det skapes en ny høy-energetisk thiolesterbinding, før det blir overført til proteinsubstratet som er bundet til ligasen (Glickman & Ciechanover, 2002). RING E3 ligaser derimot katalyserer en direkte overføring av den aktiverte ubiquitin enheten til proteinsubstratet som er bundet til E3 (Glickman & Ciechanover, 2002). For å bli effektivt degradert av proteasomet må substratet bindes til et polyubiquitin degraderingssignal som består av minst fire ubiquitin enheter (Thrower, Hoffman, Rechsteiner, & Pickart, 2000). Dette skjer ved at ubiquitineringsprosessen blir gjentatt og at E2/E3 partnerne fester flere ubiquitin enheter sammen for å skape en polyubiquitinkjede (Reid, 2005). Proteinsubstratet med polyubiquitinkjeden blir så gjenkjent av 26S proteasome komplekset og degradert til små peptider ved en ATP-avhengig prosess (Reid, 2005). Ubiquitin blir ikke brutt ned, men blir regenerert av deubiquitinaser for å opprettholde cellulære nivåer av fritt ubiquitin (Pickart, 2004). Dette er viktig for å ha tilstrekkelig med ubiquitin-enheter for videre ubiquitineringsprosessen av proteiner (Wing, 2013). Ubiquitineringsprosessen trenger ikke nødvendigvis å føre til nedbrytning i proteasomet (Komander, 2009), men kun rollen knyttet til nedbrytning av proteiner vil bli gjennomgått i denne oppgaven.



Figur 2.2. Figur som beskriver ubiquitineringsprosessen og nedbrytningen av proteiner av 26S proteasom komplekset.

2.3.3 E3 ubiquitin ligaser

E3 ubiquitin ligaser blir betegnet som nøkkelenzymet i ubiquitineringsprosessen fordi det gjenkjenner det spesifikke proteinsubstratet, og deretter katalyserer overføringen av aktivert ubiquitin til proteinet (Lecker, Goldberg, & Mitch, 2006). I 2001 ble det oppdaget at to E3 ubiquitin ligaser var transkripsjonelt oppregulert ved ulike modeller for atrofi (Bodine et al., 2001; Gomes, Lecker, Jagoe, Navon, & Goldberg, 2001). Hos Bodine et al (2001) var genekspressjon av MURF1 og MAFbx oppregulert ved alle atrofimodellene som ble undersøkt. Det samme observerte Gomes et al (2001) for en E3 ligase de kalte atrogen-1. MAFbx og atrogen-1 viste seg å være den samme E3 ligasen, og vil bli omtalt som atrogen-1 i resten av denne oppgaven. Både MURF1 og atrogen-1 er spesifikt uttrykt i tverrstripet muskel og er uttrykt på relativt lavt nivå i skjelettmuskler ved hvile (Bodine & Baehr, 2014). Flere studier har bekreftet at MURF1 og atrogen-1 er oppregulert ved en rekke modeller for atrofi, i både dyr (Clarke et al., 2007; C. H. Lang, Huber, & Frost, 2007; Lecker et al., 2004; Sacheck et al., 2007) og mennesker (Jones et al., 2004).

Bodine et al (2001) viste også at knockout av MURF1 og atrogen-1 beskyttet mot denervasjonsindusert muskelatrofi i mus. Senere er det vist at MURF1 knockout demper muskelatrofi ved immobilisering av bakbenene i mus (Labeit et al., 2010) og at

inhibering av atrogen-1 demper muskeltap induert av faste (Cong, Sun, Liu, & Tien, 2011). Ved 14 dagers dexamethasone behandling førte sletting av MURF1, men ikke atrogen-1, til redusert muskeltap (Baehr, Furlow, & Bodine, 2011). Dette tyder på at atrogen-1 og MURF1 er viktige regulatorer av muskelatrofi, mest sannsynlig gjennom regulering av nedbrytning av viktige muskelproteiner (Bodine et al., 2001).

Proteinsubstratene for atrogen-1 ser ut til å være relatert til vekstrelaterte prosesser (Sandri, 2013). Atrogen-1 promoterer degradering av MyoD, en viktig muskeltranskripsjonsfaktor (Lagirand-Cantaloube et al., 2009; Tintignac et al., 2005), og eIF3-f, en viktig aktivator for proteinsyntese (Csibi, Leibovitch, Cornille, Tintignac, & Leibovitch, 2009; Lagirand-Cantaloube et al., 2008). Dette indikerer at atrogen-1 fremmer muskelsvinn ved å hemme proteinsyntese og muskelregenerering (Lokireddy et al., 2012). MURF1 derimot fremskynder muskeltap ved å merke myofibrillære proteiner for degradering gjennom UPS (Lokireddy et al., 2012). Myosin heavy chains (Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007), aktin (Polge et al., 2011), myosin binding protein C (MyBP-C) og myosin light chains 1 (MyLC1) og 2 (MyLC2) (Cohen et al., 2009), samt troponin I i hjertemusklene (Kedar et al., 2004), har alle vist seg å være proteinsubstrater for MURF1.

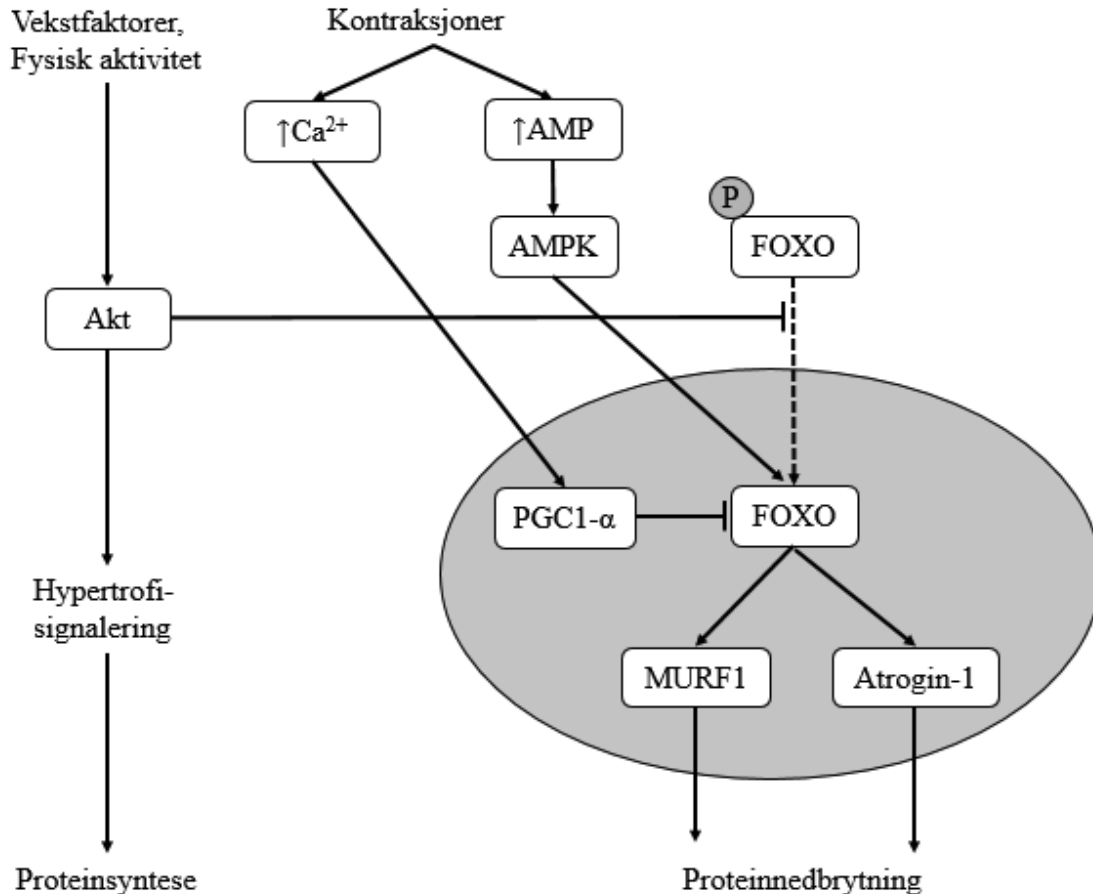
2.3.4 Transkripsjonsfaktorer

At MURF1 og atrogen-1 er transkripsjonelt oppregulert sammen under flere modeller for atrofi kan tyde på at de to E3 ligasene blir regulert av samme transkripsjonsfaktor(er) (Bodine & Baehr, 2014). Forkhead box (FOX) proteiner er en familie transkripsjonsfaktorer, og fire isoformer av klasse O FOX proteiner er uttrykt i skjelettmuskler; FOXO1, FOXO3a, FOXO4 (Bodine & Baehr, 2014) og FOXO6 (Jacobs et al., 2003). FOXO i sin aktive form er lokalisert i kjernen, hvor den er defosforylert og bundet til DNA (Nader, 2005). Akt (også kjent som Protein Kinase B), et signalprotein som også har en viktig rolle i hypertrofisignalering, kan inaktivere FOXO ved fosforylering (Brunet et al., 1999). Fosforylering gjør FOXO transkripsjonelt inaktiv, da det hindrer translokasjon fra cytosol til kjernen (Brunet et al., 1999). Ekspresjon av både FOXO1 og FOXO3a øker ved ulike modeller for atrofi (Cho, Fournier, Da, & Lewis, 2010; Lecker et al., 2004; Sackey et al., 2007; Senf, Dodd, & Judge, 2010). Ulike modeller for atrofi har også vist redusert mengde fosforylert FOXO1 (Sandri et al., 2004) og FOXO3a (Sandri et al., 2004; Senf et al.,

2010). Det er foreslått at FOXO3a er det dominerende FOXO-proteinet i muskler (Braun & Gautel, 2011)

FOXO kan regulere ekspresjon av både MURF1 (Stitt et al., 2004) og atrogin-1 (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). Akt blokkerte atrofi induisert av dexamethasone ved å fosforylere FOXO, og dermed hindre translokasjon til kjernen (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004). Oppregulering av både MURF1 (Stitt et al., 2004) og atrogin-1 (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004) var avhengig av FOXO. I tillegg er det vist at IGF-1, gjennom IGF-1/PI3K/Akt-signalveien, kan hemme transkripsjon av MURF1 og atrogin-1 (Sacheck, Ohtsuka, McLary, & Goldberg, 2004), og ekspresjon av atrogin-1 er økt når PI3K aktivitet i muskelceller undertrykkes (Lee et al., 2004). Den nære sammenhengen mellom Akt og FOXO tyder på at regulering av MURF1 og atrogin-1 ekspresjon skjer i tett sammenheng med regulering muskelproteinsyntese (Nader, 2005). Ved økt muskelproteinsyntese (f.eks etter styrketrening) burde derfor MURF1 og atrogin-1 mRNA ekspresjon være redusert. Det skal imidlertid nevnes at denne sammenhengen er noe usikker på mennesker (Foletta, White, Larsen, Leger, & Russell, 2011; Murton et al., 2008). Ekspresjon av MURF1 og atrogin-1 kan også reguleres på andre måter enn Akt/FOXO. I tillegg til Akt reguleres FOXO av blant annet peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) (Sandri et al., 2006) og AMP-aktivert protein kinase (AMPK) (Greer et al., 2007), som begge påvirkes under trening.

Transkripsjon av MURF1 og atrogin-1 kan også reguleres av mekanismer som er uavhengig av FOXO. Blant annet øker Tumor necrosis factor- α (TNF- α) atrogin-1 ekspresjon gjennom p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) (Li et al., 2005) og FOXO4 (Moylan, Smith, Chambers, McLoughlin, & Reid, 2008). MURF1 transkripsjon, men ikke atrogin-1, økes av NF- κ B (Cai et al., 2004). Disse er imidlertid forbundet med immunrespons og inflammasjon og er muligens ikke så viktig i regulering av MURF1 og atrogin-1 i forbindelse med trening. Myostatin kan også øke ekspresjon av atrogin-1, og i mindre grad MURF1 (Lokireddy et al., 2011; Lokireddy et al., 2012).



Figur 2.3. Oversikt over signalveier som muligens kan regulere ekspresjon av MURF1 og atrogin-1 ved trening. Prikket linje indikerer translokasjon av FOXO til kjernen. (P) indikerer fosforylering. Modifisert etter Sandri (2007) og Glass (2005).

2.3.5 Styrketrening og proteolytiske markører

Atrogin-1, MURF1, FOXO1 og FOXO3a er alle uttrykt i normal skjelettmuskel, noe som kan tyde på at de spiller en rolle i vedlikehold av muskelhomeostase (Stefanetti, Lamou, Rahbek, et al., 2014). Trening fører til tilpasninger i skjelettmuskler og de underliggende cellulære adaptasjoner krever selektiv degradering av eksisterende proteiner, en prosess som i hovedsak kontrolleres av UPS (Glickman & Ciechanover, 2002). Endret aktivitet for markører i UPS som følge av trening, ser ut til å være avhengig av intensitet og varighet av treningsintervensjonen som blir benyttet (Reid, 2005). De fleste studiene som har sett på proteolytiske markører sammen med trening har studert endringer på mRNA nivå. Økt transkripsjon av E3 ubiquitin ligasene vil potensielt føre til økt ubiquitineringskapasitet. Transkripsjonell oppregulering på mRNA nivå fører imidlertid ikke nødvendigvis til økt proteininnhold (Sandri, 2013).

Etter 8 uker med trening var mRNA nivå for MURF1 og atrogen-1 økt (Leger et al., 2006). Nivåene ble redusert til baseline etter 8 uker uten trening. Proteinnivå for atrogen-1 var også økt etter 8 uker trening og redusert til baseline etter 8 uker uten trening (Leger et al., 2006). Forfatterne foreslo at etter styrketrening var det en større mengde strukturelle proteiner, og for å opprettholde er normalt nivå med proteindegradering behøvdes en større mengde MURF1 og atrogen-1. Proteininnhold av FOXO1, men ikke FOXO3a, i kjernen var redusert etter treningsperioden (Leger et al., 2006). I en annen studie førte 10 uker med styrketrening til økt mRNA nivå av atrogen-1, FOXO1 og FOXO3a, men ikke MURF1 mRNA og FOXO3a protein (Stefanetti, Lamon, Wallace, et al., 2014)

Etter ulike protokoller med eksentrisk trening er det observert økning i mRNA og proteinnivå for ubiquitin (Willoughby, Taylor, & Taylor, 2003), ubiquitinerte proteiner (Stupka, Tarnopolsky, Yardley, & Phillips, 2001), fritt og bundet ubiquitin (Thompson & Scordilis, 1994). Det er foreslått at repetert trening kan hemme signalveiene i UPS (Reid, 2005). Når samme økt ble utførte to ganger med tre ukers mellomrom var økningen i mRNA og proteinnivå for ubiquitin større ved første økt enn ved andre (Willoughby et al., 2003). Stupka et al (2001) viste imidlertid at økningen i ubiquitinerte proteiner var større etter andre økt enn første, da de gjennomførte to økter eksentrisk trening separert med 5,5 uker.

MURF1 mRNA ser ut til å øke 1-4 timer etter tradisjonell tung styrketrening (Fry et al., 2013; Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010; Louis, Raue, Yang, Jemiolo, & Trappe, 2007; Mascher et al., 2008; Raue, Slivka, Jemiolo, Hollon, & Trappe, 2007; Reitelseder et al., 2014; Stefanetti, Zacharewicz, et al., 2014; Yang, Jemiolo, & Trappe, 2006), og i en studie var også MURF1 proteininnhold økt 1 time etter trening (Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010). Noen studier har imidlertid ikke sett signifikant endring av MURF1 mRNA i timene etter tung styrketrening (Churchley et al., 2007; Dalbo, Roberts, Hassell, & Kerksick, 2013; Greig et al., 2011). mRNA-nivåene for MURF1 ser ut til å returnere til basalnivåer etter 24 timer (Fry et al., 2013; Louis et al., 2007; Yang et al., 2006). Når to økter ble gjennomført med to dagers mellomrom var økningen i MURF1 mRNA 30% lavere ved andre økt sammenlignet med første (Mascher et al., 2008). Det ser også ut som ekspresjon av MURF1 er større i slow-twitch enn i fast-twitch muskelfibre (Yang et al., 2006).

Atrogin-1 ser ut til å respondere annerledes på styrketrening enn MURF1. Tidlig etter tung styrketrening (1-6 timer) har mRNA for atrogin-1 vært både uendret (Fry et al., 2013; Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010; Hulmi et al., 2009; Yang et al., 2006), økt (Stefanetti, Zacharewicz, et al., 2014) og redusert (Reitelseder et al., 2014). Åtte og 12 timer etter trening er det observert en reduksjon i atrogin-1 mRNA (Louis et al., 2007), mens nivåene er tilbake/fortsatt på basalnivå etter 24 (Fry et al., 2013; Louis et al., 2007; Yang et al., 2006) og 48 timer (Hulmi et al., 2009).

For at FOXO skal kunne være aktiv i kjernen må den defosforyleres (Brunet et al., 1999). Én og 2 timer etter tung styrketrening ble det imidlertid ikke observert redusert mengde fosforylert FOXO3a (Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010). Fem timer etter eksentrisk styrketrening er det derimot observert redusert mengde fosforylert FOXO1, men ikke FOXO3a (Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014). Konsentrisk trening førte imidlertid ikke til endringer i fosforylering av verken FOXO1 eller FOXO3a (Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014).

Flere av studiene nevnt over, samt andre, har sett på supplementering av protein og karbohydrater etter treningsøktene, men har ikke funnet noen effekt av dette på mRNA og totalprotein for FOXO, MURF1 eller atrogin-1 (Dalbo et al., 2013; Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010; Glynn, Fry, Drummond, Timmerman, et al., 2010; Hulmi et al., 2009; Reitelseder et al., 2014; Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014). En studie rapporterte imidlertid at inntak av forgrenede aminosyrer (BCAA) reduserte atrogin-1 mRNA og hindret økning av MURF1 totalprotein ved trening (Borgenvik, Apro, & Blomstrand, 2012).

Ulike kontraksjonstyper regulerer mRNA og proteinnivåer for proteolytiske markører forskjellig (Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014). Blant annet førte eksentrisk trening til større nedgang i atrogin-1 og FOXO3a mRNA enn konsentrisk trening, mens konsentrisk trening førte til større økning i MURF1 mRNA og økning i FOXO1 mRNA enn eksentrisk trening (Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014).

Ekspresjon av MURF1 og atrogen-1, og fosforylering FOXO er indikatorer på hva som skjer i deler av UPS, men for et fullstendig bilde på muskelproteinnedbrytning er det nødvendig å måle nedbrytningshastighet. Få studier er gjort på muskelproteinnedbrytning etter okklusjonstrening, men etter 4 serier med kneekstensjon med okklusjon var hastigheten på proteinnedbrytning uendret fra baseline 3, 6 og 24 timer etter trening (Gundermann et al., 2014). Tre timer etter okklusjonstrening med lav treningsmotstand er det observert økt mRNA for MURF1, men ikke atrogen-1 (Drummond et al., 2008; Gundermann et al., 2012). Den ene studien indikerte at dette var grunnet treningen og ikke okklusjonen, siden det ikke var noen forskjell mellom gruppene som trente med og uten okklusjon (Drummond et al., 2008). I en annen studie var FOXO3a, MURF1 og atrogen-1 mRNA redusert 8 timer etter trening for en gruppe som trente med okklusjon, men ikke for gruppen som trente uten (Manini et al., 2011). Ingen endring i fosforylering av FOXO3a ble observert 1 og 3 timer etter okklusjonstrening (Fry et al., 2010).

2.3.6 Lokalisering av MURF1

Det er vist at MURF1 har en direkte interaksjon med titin i M-linje regionen av sarkomeren (Centner et al., 2001). MURF2 og MURF3 er to andre proteiner som har vist høy homologi med MURF1 (Centner et al., 2001), og disse har også vist lokasjon i M-linjen av sarkomeren (Bodine & Baehr, 2014). MURF1 ser imidlertid ut til å være eneste MURF medlemmet som har en direkte interaksjon med titin (Centner et al., 2001). MURF2 og MURF3 kan muligens være assosiert med titin indirekte via MURF1 (Gregorio, Perry, & McElhinny, 2005). Det er foreslått at interaksjonen mellom titin og MURF1 kan regulere og/eller stabilisere strukturen til M-linje regionen av sarkomeren (Gregorio et al., 2005). I tillegg har MURF1 og MURF3 blitt funnet ved Z-linjene (Centner et al., 2001; McElhinny, Kakinuma, Sorimachi, Labeit, & Gregorio, 2002). Selv om MURF1 binder til titin virker ubiquitinerings av titin å være regulert uavhengig av MURF1 (Witt, Granzier, Witt, & Labeit, 2005).

MURF1 og MURF 2 har også blitt observert i kjernen (Lange et al., 2005; McElhinny et al., 2002; Pizon et al., 2002). I kjernen kan MURF1 påvirke transkripsjonsfaktorene Serum response factor (SRF) (Willis et al., 2007) og glucocorticoid modulatory element binding protein-1 (GMEB-1) (McElhinny et al., 2002). MURF1 translokasjon til kjernen fører til at SRF eksporteres ut av kjernen og at SRF blir transkripsjonelt

undertrykt (Braun & Gautel, 2011). SRF er en transkripsjonsfaktor som regulerer ekspresjon av gener involvert i muskelvekst, proliferasjon, differensiering og organisering av cytoskjelett (Jin et al 2011). Effekten av MURF1 på SRF kan derfor bidra til å forsterke det transkripsjonelle atrofiprogrammet (Braun & Gautel, 2011). GMEB-1 er et protein i kjernen som muligens har en viktig rolle i utvikling og differensiering (McElhinny et al., 2002; Zeng, Kaul, & Simons, 2000).

Ved immobilisering dissosierer titin-komplekset og MURF1 og MURF2 translokeres til cytoplasma og kjernen (Lange et al., 2005; Ochala et al., 2011). Det har blitt foreslått at i belastet muskel er MURF1 bundet til titin, og at det ved immobilisering blir frigjort for å indusere proteolyse (Ottenheijm, van Hees, Heunks, & Granzier, 2011). At MURF1 binder i nærheten av titin kinase kan muligens støtte at rollen til MURF1 kan påvirkes av mekanisk strekk (Ottenheijm et al., 2011). Lokaliseringene av MURF i sarkomerer (titin binding) og i kjernen tyder på at den intracellulære lokaliseringen kan være viktig for å koordinere de ulike funksjonene for regulering av proteinomsetningen (Braun & Gautel, 2011). Titin kan muligens virke som en aktivitetsavhengig brems på proteindegradering ved å redusere tilgjengeligheten eller stabiliteten av MURF (Braun & Gautel, 2011), mens funksjonen i kjernen muligens kan være å hemme transkripsjon av anabole gener (McElhinny et al., 2002).

2.3.7 Oppsummering

Nedbrytning av muskelproteiner skjer hovedsakelig gjennom UPS, som ubiquitinerer proteiner som deretter blir gjenkjent og degradert av 26S proteasom komplekset. Intracellulær signalering i UPS i respons til trening er imidlertid dårlig beskrevet i litteraturen. De studiene som har sett på MURF1 og atrogen-1 i respons til trening har stort sett vært gjort på mRNA-nivå. Det er imidlertid foreslått at den intracellulære lokaliseringen av MURF1 også er viktig. Ekspresjon av MURF1 kontrolleres blant annet av transkripsjonsfaktoren FOXO som er aktiv når den er lokalisert i kjernen og inaktiv i cytosol. For å undersøke hvordan okklusjonstrening kan påvirke UPS har vi derfor valgt å undersøke mengde og lokalisering av MURF1, FOXO3a og ubiquitin.

3. Metode

Datainnsamlingen til denne masteroppgaven var en del av prosjektet «Okklusjon 3» ved Norges idrettshøgskole. Dette prosjektet ble startet høsten 2013. Frafall gjorde imidlertid at antall forsøkspersoner ble lavere enn det som ble beregnet for tilstrekkelig statistisk styrke, derfor ble det også kjørt høsten 2014 med nye forsøkspersoner.

3.1 Studiedesign

Tilvenning og pretester ble gjennomført uken i forkant av treningsintervensjonen. Det ble deretter gjennomført to treningsuker, med en ti dagers hvileperiode mellom treningsukene. Hver treningsuke bestod av syv økter med okklusjonstrening, fordelt over fem dager (Tabell 3.1) og alle treningsøktene ble gjennomført til tilnærmet samme tid hver dag. Når det var to økter på en dag skilte det minst fire timer mellom øktene.

Tabell 3.1. Oversikt over treningsøktene under intervensjonen.

	Pretester	Treningsuke 1					Hvileuke	Treningsuke 2					Posttester
Trening:		↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	
					↓	↓					↓	↓	
Dag:	-7	1	2	3	4	5	9	15	16	17	18	19	22 - 39

3.1.1 Utvalg

I første runde meldte 12 forsøkspersoner seg frivillig til å være med i studien, hvorav 3 trakk seg i løpet av intervensjonsperioden på grunn av smerte i forbindelse med biopsitakning og ekstrem støyhet i etterkant av trening. I andre runde meldte 4 forsøkspersoner seg frivillig, hvor alle gjennomførte hele intervensjonen.

Tabell 3.2. Antropometriske data for forsøkspersonene (gjennomsnitt \pm SD).

	Menn (n = 9)	Kvinner (n = 4)
Alder (år):	24 \pm 2	22 \pm 2
Høyde (cm):	182 \pm 6	171 \pm 5
Vekt (kg):	84 \pm 10	65 \pm 5

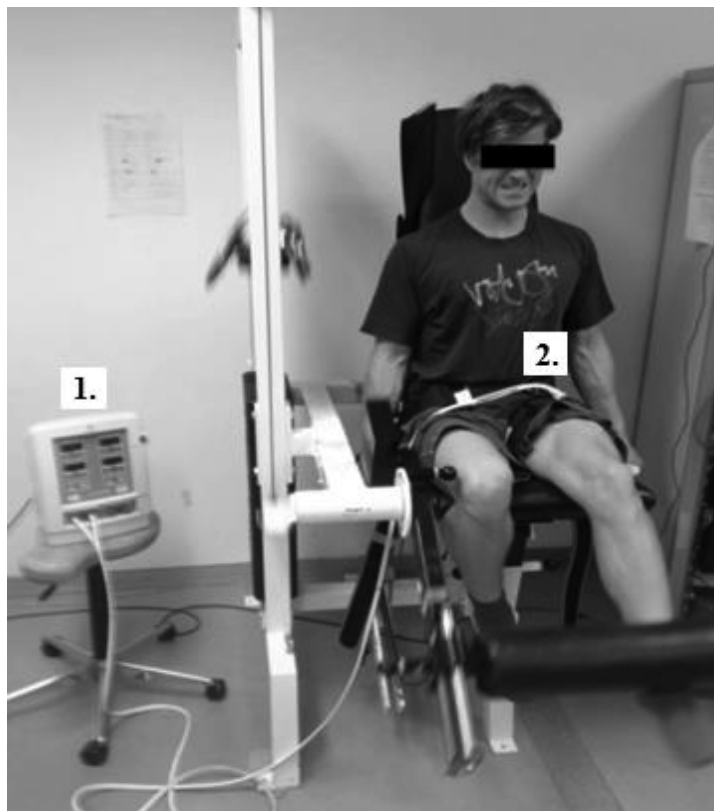
Rekruttering ble utført på vitenskapelige institusjoner i Oslo, ved bruk av sosiale medier, studentmail, informasjon i forelesninger og plakater. Forsøkspersonene måtte være 20-35 år og kunne ikke ha trent styrke på lårmusklene regelmessig (≤ 1 økt hver annen uke) de siste 6 månedene. Skader i muskel-skjelettapparatet som kunne hindre gjennomføring av trening førte til eksklusjon. Under gjennomføringen av studien kunne ikke forsøkspersonene bruke noen form for medikamenter eller kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin o.l.). Alle forsøkspersonene fikk informasjonsskriv om studien (Vedlegg 1) og deltok på et informasjonsmøte, før de skrev under på et samtykkeskjema (Vedlegg 1). Studien var godkjent av Regional Etisk Komite (REK) og ble gjennomført i henhold til Helsinki-deklarasjonen.

3.1.2 Treningsprotokoll

Treningsøktene bestod av unilateral kneekstensjon med et bevegelsesutslag fra 90° til 10° (0° er full kneekstensjon), utført i kneekstensjonsapparat (GYM2000 Gym Equipment, Geithus, Norge). Forsøkspersonene gjennomførte en kort oppvarming (15 reps, 20% 1RM) uten okklusjon, før de fikk en 150 mm bred pneumatisk trykkmansjett (9-7350-003, Delfi Medical, Vancouver BC, Canada) plassert proksimalt på låret. Trykkmansjetten var koblet opp til et datastyrt torniquetsystem (Zimmer A.T.S. 2000, USA) som kontrollerte at trykket ble holdt tilnærmet konstant under gjennomføring av treningen. Treningen ble gjennomført med et trykk på 100 mmHg for menn og 90 mmHg kvinner. Når torniquetsystemet ble slått på, og trykket hadde stabilisert seg ble det gjennomført fire serier på 20% av 1RM. Alle seriene ble gjennomført til utmattelse, med 30 sekunder pause mellom seriene. Trykket ble opprettholdt i pausene og sluppet opp umiddelbart etter fjerde serie. Høyre ben ble alltid trent før venstre ben, og deltagerne fikk 5 minutters pause fra de hadde fullført trening av høyre ben til de startet oppvarming av venstre ben. Frekvensen på muskelaksjonene ble styrt av en metronom (KORG METRONOME MA-30. Kina), ett sekund i konsentrisk fase og ett sekund i eksentrisk fase. All trening ble utført under tilsyn fra kvalifisert personell, og samtlige deltagere gjennomførte alle de 14 treningsøktene. Det ble registrert stølhet (DOMS-VAS) før, og smerte (Borg CR10) og opplevd anstrengelse (Borg-skala) etter hver treningsøkt.

Reduksjon i blodstrøm ved okklusjon ble målt med et dopplersystem (Vivid 7. GE Vingmed Ultrasound, Horten). Det var ingen forskjell i reduksjon før og etter

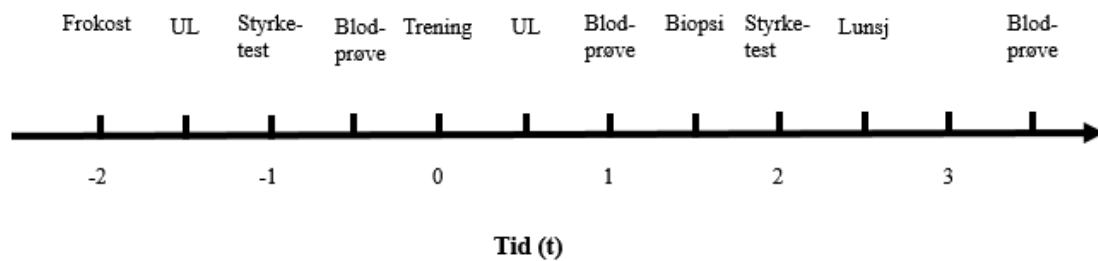
intervensjonen, henholdsvis $63 \pm 18\%$ og $56 \pm 19\%$. Blodstrømmen ble målt like distalt for trykkmansjetten i *a.femoralis* og *a.superficialis* med og uten okklusjonstrykket deltagerne brukte under treningsintervensjonen.



Figur 3.1. Oppsettet under okklusjonstrening (1. Datastyrt tourniquetsystem. 2. 150 mm bred pneumatisk trykkmansjett).

3.2 Akuttdager

Den første dagen i hver treningsuke ble det gjennomført akuttforsøk (Figur 3.2). På disse dagene kom deltagerne inn fastende på morgenen og fikk servert en standardisert frokost. Deretter ble det tatt ultralyd, blodprøver, test av isokinetisk og isometrisk styrke (i beinet som ikke ble tatt biopsi av), gjennomført en okklusjonstreningsøkt og tatt muskelbiopsi. På første akuttdag ble det tatt biopsi av høyre lår og testet styrke på venstre, og motsatt på andre akuttdag. Biopsien ble tatt 1 time etter at økten med okklusjonstrening var fullført.



Figur 3.2. Tidsforløpet ved gjennomføring av akuttdager. UL: ultralyd.

Tabell 3.3. Oversikt over tidspunkter for all testing og trening i studien. Styrketest: test av maksimalt isokinetisk og isometrisk dreiemoment.

Tester	Pre	Treningsuke 1					Hvile	Treningsuke 2					Post			
Bloodflow	↓												↓			
MR	↓												↓			
1RM	↓						↓						↓	↓	↓	
Styrketest	↓	↓					↓	↓					↓	↓	↓	
		↓						↓								
Ultralyd	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
		↓						↓								
Blodprøver		↓	↓	↓	↓	↓	↓									
		↓														
Trening		↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓				
					↓	↓					↓	↓				
Biopsi, h.	↓	↓					↓						↓			
Biopsi, v.	↓				↓			↓						↓		
Dag:		1	2	3	4	5	9	15	16	17	18	19	22	23	29	39

3.3 Styrketester

Styrketester ble gjennomført før, under og etter treningsintervensjonen (Tabell 3.3). Under tilvenning og pretester ble styrkeapparatene stilt inn etter den individuelle forsøkspersonens anatomi, og disse innstillingene var de samme ved alle styrketester. Deltagerne fikk ikke drive hard fysisk aktivitet to dager i forkant av styrketesting (med mindre det var del av intervensjonen). I forkant av styrketesting ble det gjennomført en 5 minutters oppvarming på sykkel med standardisert wattbelastning. Deretter ble det testet isokinetisk og isometrisk styrke, samt 1RM kneekstensjon. Det beste resultatet fra pre og tilvenning for 1RM ble brukt for å beregne treningsmotstanden i treningsperioden, og som baselineverdi for senere analyser av styrketestene.

3.3.1 Isokinetisk og isometrisk styrke

Styrkedynamometer (HUMAC 2009NOMR CSMi. Testing and Rehabilitation System. USA) ble benyttet for å teste maksimalt isokinetisk dreiemoment ved 60°/s (95° - 0°) og maksimalt isometrisk dreiemoment ved 70°, 80° og 90°. En spesifikk oppvarming ble gjennomført i forkant av testingen. Høyre bein ble alltid testet før venstre, bortsett fra på akutt dager da kun beinet som ikke skulle tas biopsi av ble testet. Verbal oppmuntring og visuell feedback på kraftutviklingen ble gitt under testingen. Forsøkspersonene utførte 3 maksimale repetisjoner i kneekstensjon ved 60°/s (95° - 0°) og to maksimale repetisjoner som ble holdt i 5 sekunder på både 70°, 80° og 90° under de isometriske testene. Høyeste målte dreiemoment ble brukt for videre analyser for både den isokinetiske og de isometriske testene.



Figur 3.3. Test av maksimalt isokinetisk og isometrisk dreiemoment i styrkedynamometer.

3.3.2 1RM i kneekstensjon

1 repetisjon maksimum (1RM) i kneekstensjon ble testet i kneekstensjonsapparat (GYM2000 Gym Equipment, Geithus, Norge), rett i etterkant av testen av isokinetisk og isometrisk styrke. Seterygg og fotpute ble individuelt justert. Forsøkspersonene ble festet til apparatet med en sikkerhetssele og instruert til å holde armene langs sidene.

Det ble gjennomført en spesifikk oppvarming hvor forsøkspersonene tok 10, 6, 3 og 1 repetisjon, med to minutters pause mellom hver serie. Første forsøk på 1RM ble lagt litt under forventet maks, for å sikre at forsøkspersonen fikk flere forsøk på å oppnå sin reelle 1RM. Motstanden ble økt med 1,25-5,0 kg til 1RM var oppnådd.

Kneekstensjonen ble utført med et bevegelsesutslag på 90°-10° (hvor 0° er full kneekstensjon). Verbal oppmuntring ble gitt under testingen.

3.4 Blodprøver

Det ble tatt venøse blodprøver under første treningsuke. I første gjennomføring av studien ble det også tatt blodprøver i hvileuken, andre treningsuke og ved Post 3 og Post 10. Serumprøvene ble sentrifugert ved 2100 g i 10 minutter i 4°C, og deretter oppbevart i -80°C før videre analyser. CK og myoglobin i serum ble analysert ble utført ved Rikshospitalet (Avdeling for medisinsk biokjemi, Oslo universitetssykehus Rikshospitalet, Oslo). Analyseplattform Modular Analyser P800 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) ble benyttet for analyser på CK og analyseplattform Modular Analyser E170 (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) for analyser på myoglobin.

3.5 Ultralyd

Ultralyd (Philips HD11XE Ultrasound system) ble benyttet for å måle muskeltykkelse av *m. vastus lateralis* og tverrsnittareal av *m. rectus femoris*. Ultralydmålinger ble gjennomført før, under og etter treningsintervensjonen (Tabell 3.3). Under målingene lå forsøkspersonene avslappet på en undersøkelsesbenk med en plastboks festet med borrelås mellom føttene for å få så reproducerbare målinger som mulig. Målingene ble utført på 40% av distansen fra festet til *m. vastus lateralis* (funnet med ultralyd) til trochanter major (palpert). Kjennetegn som kneskjell (patella), føflekker, arr, samt punktene hvor ultralydmålingene ble utført ble tegnet på et transparent ark ved første måling. Dette ble benyttet ved senere tester for å sikre reliable målepunkter. Bildene ble analysert med OsiriX (Pixmeo, Bernex, Switzerland [v.5.8.2]).

3.6 Biopsier

Forsøkspersonene måtte avstå fra hard fysisk aktivitet to dager før biopsitagning (med mindre det var del av intervensjonen) og inntok et standardisert måltid 3 timer i forkant av hver biopsi. Under intervensjonen ble det tatt åtte biopsier fra *m.vastus lateralis* (fire fra hvert bein), ved syv ulike tidspunkter (Tabell 3.3).

Biopsiområdet ble lokalbedøvd (Xylocain Adrenaline, 10 mg*ml⁻¹+ 5 µg*ml⁻¹, AstraZeneca, Södertälje, Sverige), og vasket med desinfiserende væske, før det ble laget et snitt (15-20 mm) gjennom hud og muskelfascie med skalpell. Snittene ble komprimert med tupfere for å hindre forurensing av blodsøl i prøvematerialet. Ved hver biopsi ble 200-300 mg muskelvev hentet ut med en 6 mm steril Bergstrømsnål koblet til en 50 ml sprøyte (for å få undertrykk). Den delen av biopsibiten med de mest rette og parallelle muskelfibrene ble kuttet vinkelrett på fibrene, lagt i en form med stabiliserende lim (Tissue-tec, O.C.T. compound, Sakura, Nederland), og nedfryst i forhåndskjølt (-140°C) isopentan, for senere analyser med immunohistokjemi. Det øvrige muskelvevet ble skylt i iskaldt isotonisk saltvann (9mg NaCl/ml i sterilt vann), før blodkoagler, fettvev og bindevev ble skjært bort. Muskelvevet ble deretter fordelt til senere analyser. 50-60 mg muskelvev, som senere skulle analyseres for fosforylering, ble overført raskt til cryorør og fryst i flytende nitrogen (-200°C). Samme mengde muskelvev ble fryst i isopentan nedkjølt på tørris (-78°C), overført til cryorør og oppbevart i tørris, før begge prøvene ble lagret i biofryser (-80°C). Vev som skulle analyseres for mRNA (~20 mg) ble overført til cryorør med RNAlater®Solution (AM7020, Ambion, USA) og oppbevart i kjøleskap frem til nedfrysing (-20°C).

3.6.1 Homogenisering

Helhomogenat

Ved homogenisering av helhomogenat ble det benyttet OMNI-knivhomogenisator og en homogeniseringsbuffer som bestod av 1 milliliter Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER, cat# 78510, Thermo scientific, Rockford, IL, USA), 20 µl Halt TM Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) og 20 µl EDTA (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) per 50 µg muskel i henhold til protokoll. Etter tilsetning av homogeniseringsbuffer ble prøvene homogenisert i tre ganger fem sekunder, eller til alt muskelvevet var løst opp. Prøvene ble deretter lagt på svak risting i 30 minutter ved 4°C, før det ble sentrifugert i fem minutter ved 10.000 G i en

temperatur på 4°C. Supernatantet ble overført til 1,5 ml rør og prøvene ble sentrifugert på samme måte på nytt. Det nye supernatantet ble også overført til samme rør, og prøvene ble ristet. Prøvene ble så aliquotert med 25 µl i rør på 0,2 ml og lagret i biofryser ved -80°C.

Fraksjonering

Ved homogenisering ble Extraction Buffer (EB) I, II, III og IV, Benzonase®, Protease inhibitor cocktail (PINC), fra ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Cat# 539790, Calbiochem, USA) benyttet. 0.5 ml prekjølt Extraction Buffer I (EB I) og 5 µl PINC (ekvilibrert til romtemperatur) ble tilsatt til vevsrøret. Muskelen ble homogenisert med OMNI-knivhomogenisator i 3x5 sekunder eller til alt vev var homogenisert. Deretter ble prøvene fraksjonert i cytosol-, membran-, nukleær- og cytoskjelettfraksjoner i henhold til prosedyre og aliquotert og lagret i biofryser ved -80°C.

3.7 Muskelanalyser

3.7.1 Totalproteinmåling

For å måle proteininnholdet i muskelbiopsiene ble detergentkompatibelt Protein Assay kit (BioRad, cat# 500-0121, Hercules, CA, USA) benyttet. Bovine γ -globulin med et spekter fra 0,125 til 1,5 mg*ml⁻¹ ble brukt som standardprotein. Prøvene måtte fortynnes så de var innenfor målbart spekter. Fraksjonene ble fortynnet med ultrarent vann på følgende måte før totalproteinmåling: cytosol 1:2, nukleær 1:2, cytoskjelett 1:8, helhomogenat 1:4. Triplikater av standardene og prøvene ble applisert (3x5µL) i en mikroplate (Cat# 655101, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Tyskland). Platen ble inkubert mørkt i romtemperatur i 15 minutter før det ble målt i et filter photometer (Expert 96, Hitech, UK) og analysert med den medfølgende programvaren (Kim, ver. 5.45.0.1, Daniel Kittrich). CV<10% på triplikatene ble brukt som krav for at proteinmålingen skulle være godkjent.

3.7.2 Western-Blot

Basert på totalproteinmålingene ble prøvene fortynnet med ultrarent vann så alle prøvene som ble kjørt i samme boks hadde samme konsentrasjon. De fortynnede prøvene ble det tilsatt 7 µl Reducing Agent Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) som reduserende stoff, 17,5 µl LDS Sample Buffer (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) til

denaturering, og varmebehandlet på 70 grader Celcius i 10 min. Prøvene ble deretter applisert i NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Gelene var montert i XCell SureLocke® Mini Cell-apparat (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), hvor indre kammer var fylt med kald MOPS SDS Running buffer (NuPAGE MOPS SDS Cat# NP0001, Invitrogen, CA, USA) med tilsatt antioksidant (Invitrogen, CA, USA, Cat# NP0005), og ytre kammer var 2/3 fylt med kald MOPS SDS Running buffer. Prøver fra de åtte biopsiene fra hver forsøksperson ble applisert med et loading volum på 33uL og kjørt på samme gel. I ytterste brønn på hver side av gelene ble det applisert 5 uL Gene-On molekylvektmarkør. Det ble kjørt duplikater av alle geler i samme Mini Cell-apparat. Proteinene ble separert ved elektroforese, som ble kjørt i ca. 65 minutter med en spenning på 200V.

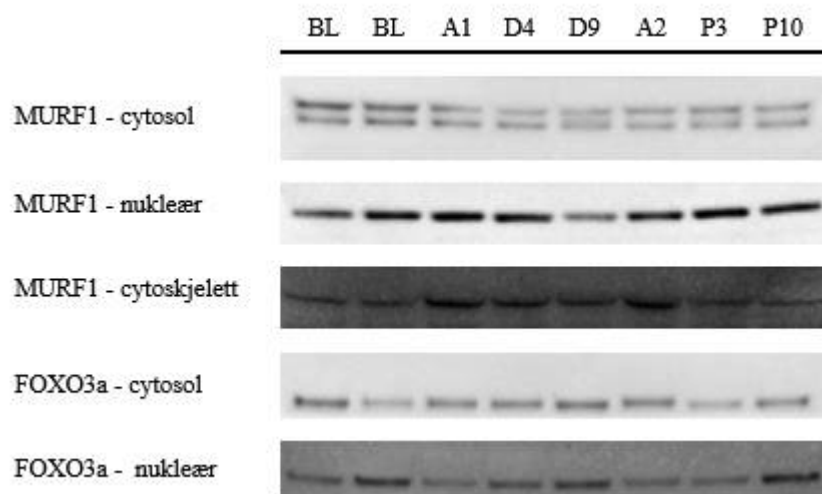
Etter elektroforesen ble proteinene overført til polyvinylidene difluorie (PVDF)-membraner (Immuno-blot, Cat# 162-0177, Bio-Rad, CA, USA) ved blotting i XCell IITM Blot Modul (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) i Mini Cell-apparat. Under blottingen var blottemodulen fylt med transferbuffer (Nupage Cat# NP0006-1, Transfer Buffer (20x) Invitrogen, CA, USA) og antioksidant, og Mini-Cell apparatet var 2/3 fylt med kaldt ultrarent vann. Blottingen ble kjørt på 30 V i 90 minutter.

Membranene ble så blokkert i 5% melkeløsning (Skim milk, Cat# 1.15363.0500, Merck, Tyskland) i tris-buffered saline (TBS; 10xTBS, Cat# 170-6435, Bio-Rad, CA, USA) med 0,1 % Tween-20 (VWR International, PA, USA, Cat# 437082Q) (TBS-T), og kontinuerlig rystet i 2 timer i romtemperatur. Etter blokkering ble membranene skylt i TBS-T, først to ganger raskt og deretter 2x2 minutter, før det ble inkubert i primært antistoff (tabell 4) over natt i 4 grader Celsius med kontinuerlig svak rysting.

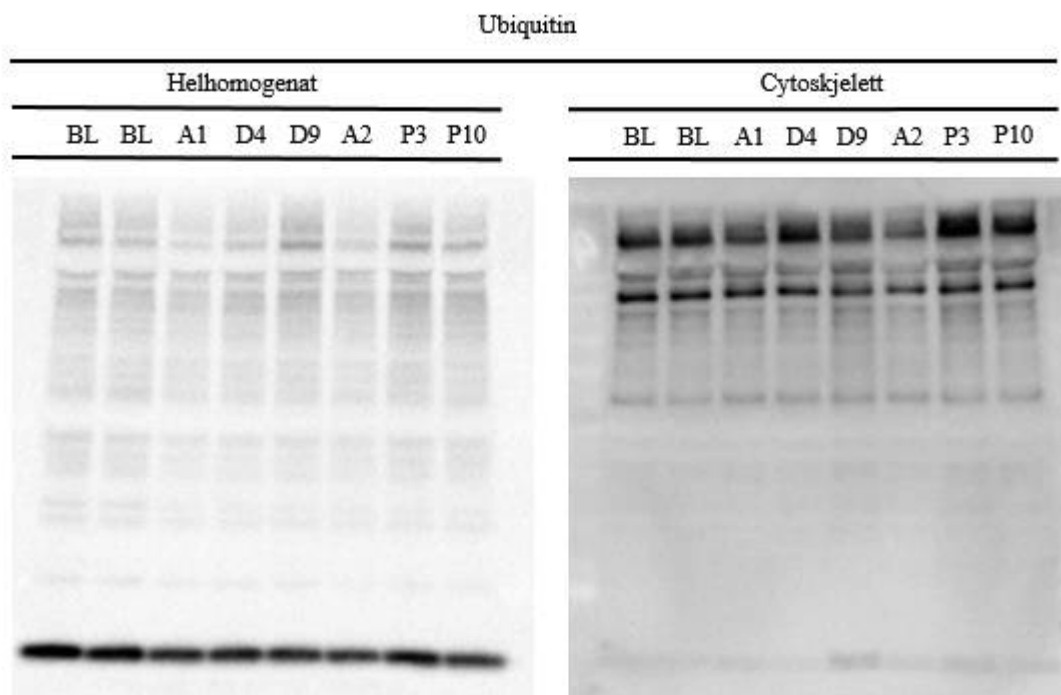
Når membranene ble tatt ut av primært antistoff ble det skylt kjapt i TBS-T to ganger, vasket 1x15 min i TBS-T, 3x5 min i TBS og inkubert i sekundært antistoff (tabell 4) i 1 time med kontinuerlig rysting i romtemperatur. Deretter ble membranene vasket på samme måte en gang til, før det ble inkubert med Chemiluminescence Substrate SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific Cat# 34076, Rockford, IL, USA) og tatt bilde av med Bio-Rad ChemiDoc™ MP System #170-8280 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Image Lab™ Software (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, USA) ble brukt for å analysere bildene og kvantifisere intensiteten på båndene.

Prøvene fra cytoskjelett og helhomogenat ble først analysert for ubiquitin, og deretter analysert for FOXO3a og MURF1. I disse tilfellene ble membranene skylt i TBS-T 3x30 sek etter billedtagningen, strippet i Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i 10 min, skylt 5x1 min i TBS, 3x5 min i TBS og blokkert i 5% melkeløsning i 2 timer med kontinuerlig rysting i romtemperatur. Etter blokkering ble membranene skylt i TBS-T i 2x30 sek, og deretter 2x2 min, før det ble inkubert i primært antistoff (tabell 4) over natt i 4 grader Celsius med kontinuerlig svak rysting. Neste dag ble det tatt bilder av membranene på nytt. Prosedyren for vasking, inkubering i sekundært antistoff og billedtagning var den samme som beskrevet i forrige avsnitt. Når membranene var ferdig analysert, ble de tørket og lagret i lynlåsposer i fryser ved -80 grader celsius (for full protokoll, se vedlegg 2).



Figur 3.4. Representative Western Blot for MURF1 og FOXO3a i de ulike fraksjonene.



Figur 3.5. Representative Western Blot for ubiquitin i helhomogenat og cytoskjelett.

Tabell 3.4. Oversikt over primære og sekundære antistoffer benyttet ved Western-Blot analyser.

Primære:	Produsent:	Fortynning:	Kat. nr:	Batch:	Source:
Ubiquitin	Cell Signalling	1 : 500	3933	4	Rabbit (polykl.)
FOXO3a	Cell Signalling	1 : 400	2497	6	Rabbit (monokl.)
MURF1	ECM Biosciences	1 : 500	MP3401	4	Rabbit (polykl.)
Sekundært:	Produsent:	Fortynning:	Kat. nr:	Batch:	Source:
Anti-rabbit IgG	Cell Signalling	1 : 3000	7074	24	Goat

3.7.3 Muskelfiberareal

For å kvantifisere snittene fra biopsiene ble det benyttet et lysmikroskop (Olympus BX61, Japan) tilkoblet en fluoriserende lyskilde (EXFO, XI120PC-Q, Canada). Et digitalt kamera (Olympus DP72, Japan) var også tilkoblet mikroskopet for å ta bilder av snittene. Kamera og mikroskop ble styrt av Cell^F (Olympus, Japan) software for Windows XP (Microsoft, USA). Snittene ble merket mot myosin heavy chain II (SC-71) og dystrofin. Bildene ble invertert i Cell^F og videre behandlet med bildeprogramvaren TEMA (ChekVision, Hadsund, Danmark). Muskelfiberarealet ble analysert ved at programmet regnet ut arealet innenfor dystrofinmerkingen, og intensiteten på SC-71 merkingen analysert for å bestemme fibertype. For mer utfyllende protokoll se Bækken, Masteroppgave (upublisert).

3.8 Statistikk

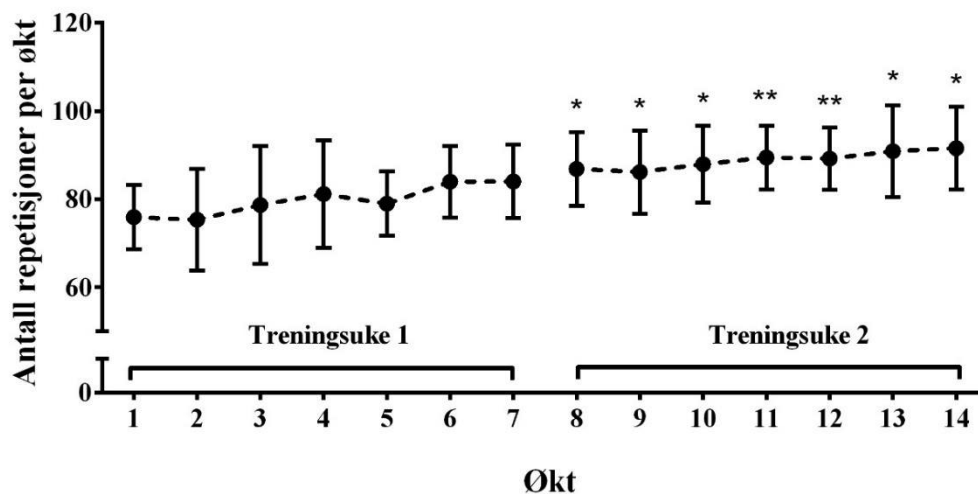
Enveis ANOVA for repeterte målinger ble brukt i analyser av trening, styrketester og signalering. Tukey's range test og Dunnett's test ble brukt for post-hoc analyser. En feil ved lagring av biopsiene på dag 4 i andre runde førte til ødeleggelse på biopsiene fra fire forsøkspersoner. I tillegg ble en forsøksperson forhindrede fra å ta post 3 biopsi. De manglende verdiene ved signalering er fylt inn med den gjennomsnittlige relative endringen fra baseline for å kunne utføre ANOVA. I analyser av signalering ble gjennomsnittet av de to pre-biopsiene brukt som baselineverdi og forskjell i signalering ble uttrykt som endring fra baseline (%). Det ble kjørt duplikater under alle Western-Blot analysene og gjennomsnittet av disse ble benyttet. I sammenligning mellom to tidspunkter ble parede T-test benyttet.

Signifikansnivået ble satt til $p < 0,05$ for både t-test og ANOVA. Statistisk tendens er definert som $p < 0,10$. Verdier er gitt som gjennomsnitt \pm standardavvik der annet ikke er oppgitt. Statistiske analyser ble utført i Microsoft Excel 2011 (Microsoft Excel [computer software], Redmond, WA, USA) og Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

4. Resultater

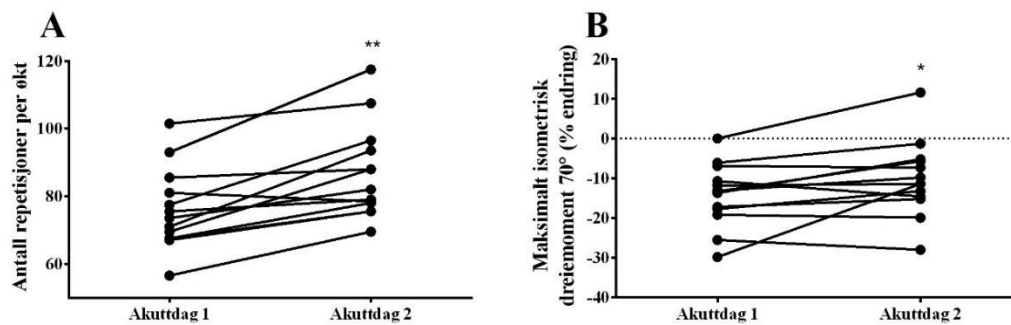
4.1 Trening

Over hele treningsperioden utførte forsøkspersonene gjennomsnittlig 50 ± 8 , 14 ± 4 , 11 ± 3 og 10 ± 3 repetisjoner i henholdsvis første, andre, tredje og fjerde serie. Totalt utgjorde dette 84 ± 15 repetisjoner per økt. Antall repetisjoner per økt økte fra treningsuke 1 (80 ± 16) til treningsuke 2 (89 ± 14) ($p < 0,001$). Det ble tatt flere repetisjoner på samtlige treningsøkter i andre treningsuke sammenlignet med første treningsøkt (Figur 4.1). Treningsvolumet økte proporsjonelt med antall repetisjoner utført, da treningsmotstanden og bevegelsesutslaget var det samme under hele intervensjonen.



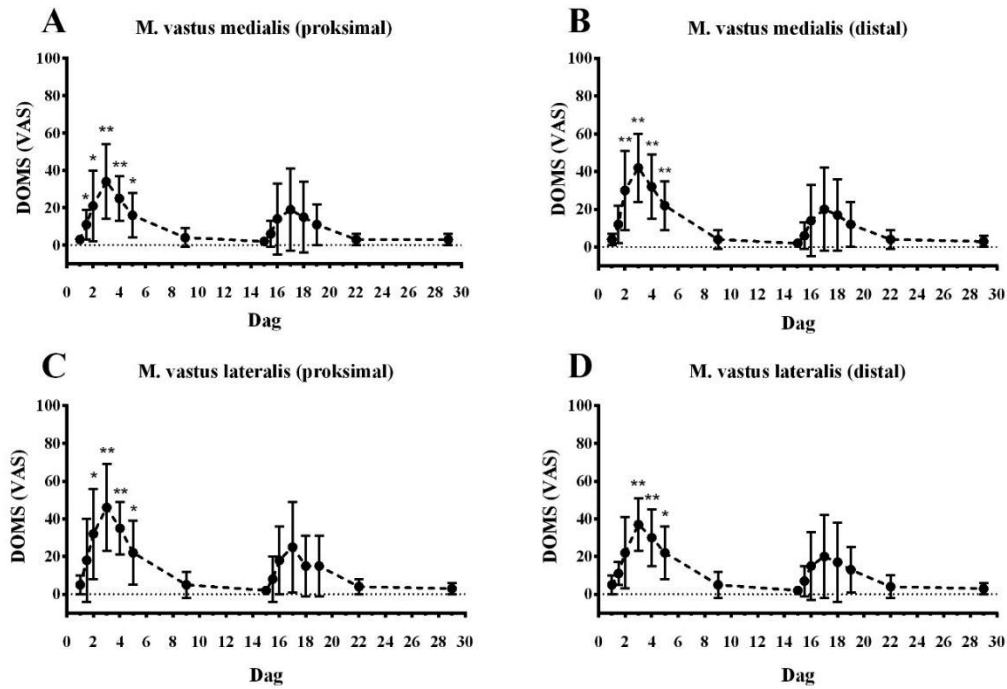
Figur 4.1. Totalt antall repetisjoner (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) for hver enkelt treningsøkt. Treningsuke 1 og 2 var separert med 10 dager hvile. Forskjeller fra første treningsøkt: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Antall repetisjoner under treningsøkten var høyere på akuttdag 2 (87 ± 14 , $P \leq 0.01$) enn akuttdag 1 (76 ± 12) (Figur 4.2A). Maksimalt isometrisk dreiemoment ved 70 grader i kneleddet var redusert etter treningsøkten ved både akuttdag 1 og 2 og den relative reduksjonen var større ved akuttdag 1 ($-14,2 \pm 8,0$ %) enn ved akuttdag 2 ($-10,1 \pm 9,5$ %, $P < 0,05$) (Figur 4.2B).

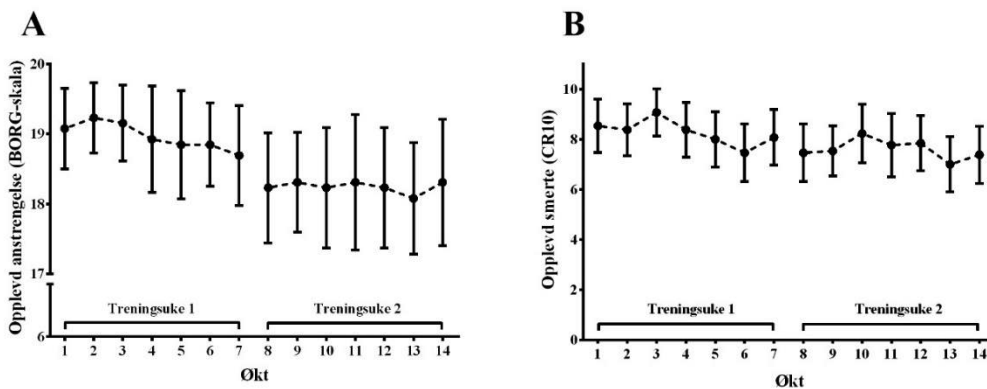


Figur 4.2. A) Totalt antall repetisjoner på akuttdag 1 og 2 for hver enkelt FP. B) Relativ nedgang i maksimalt isometrisk dreiemoment i kneekstansjon fra pre til post på akuttdag 1 og 2 for hver enkelt FP. Forskjeller mellom akuttdag 1 og 2: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

DOMS i *m. vastus lateralis* og *m. vastus medialis* økte i første treningsuke og nådde en topp ved tredje treningsdag (ca. 40 mm). Ved dag 9, alle treningsdagene i andre treningsuke og posttester var DOMS ikke forskjellig fra første måling (Figur 4.3). Opplevd anstrengelse (BORG) og opplevd smerte (CR10) lå høyt gjennom hele treningsperioden (hhv. 19 ± 1 og 8 ± 2), og endret seg ikke fra første treningsøkt til noen av de øvrige øktene (Figur 4.4).



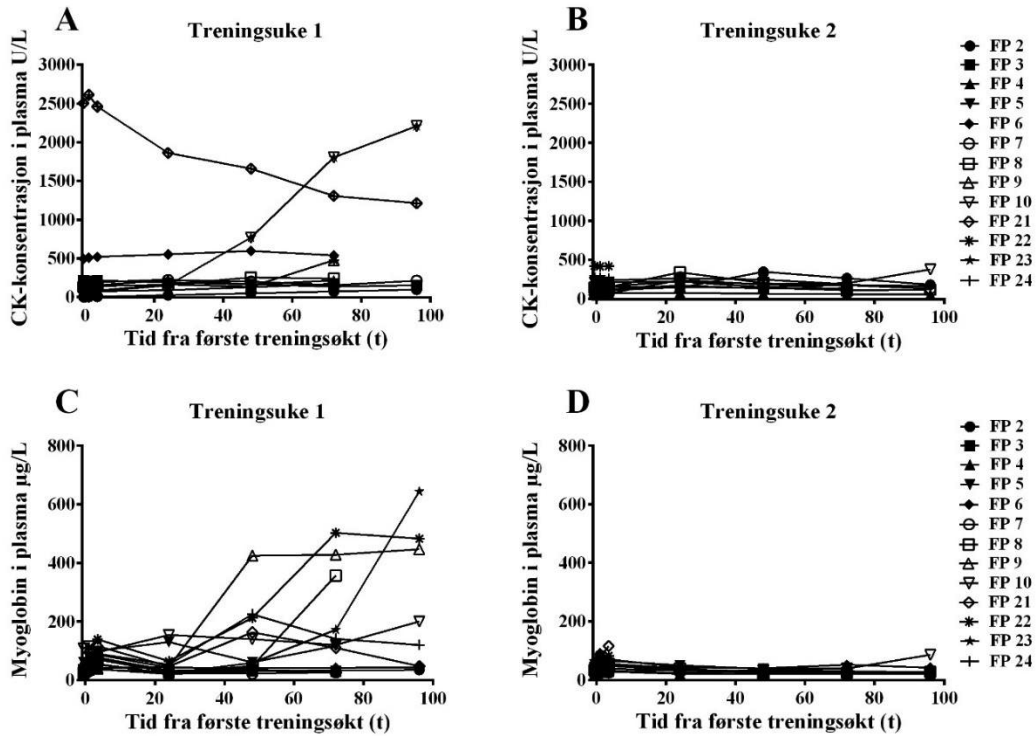
Figur 4.3. Muskelstølhhet (DOMS) målt ved Visuell Analog Skala (VAS) fra 0-100 mm for A) proksimale del av m. vastus medialis, B) distale del av m. vastus medialis, C) proksimale del av m. vastus lateralis, D) distale del av m. vastus lateralis (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). Forskjeller fra før første treningsøkt: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.



Figur 4.4. A) Opplevd anstrengelse målt ved BORG-skala (6-20) og B) opplevd smerte målt ved Borg CR10 (0-10) etter hver enkelt treningsøkt (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). Treningsuke 1 og 2 er separert med 10 dager hvile.

4.2 Blodanalyser

På gruppenivå var det ingen forskjeller i CK-konsentrasjon i plasma ved noe tidspunkt. Myoglobin i plasma økte fra første til andre ($P \leq 0.01$) og tredje blodprøvetagning ($P \leq 0.01$) på akuttdag 1, og fra andre til tredje blodprøve ($P \leq 0.05$) på akuttdag 1, men var uforandret de resterende dagene.



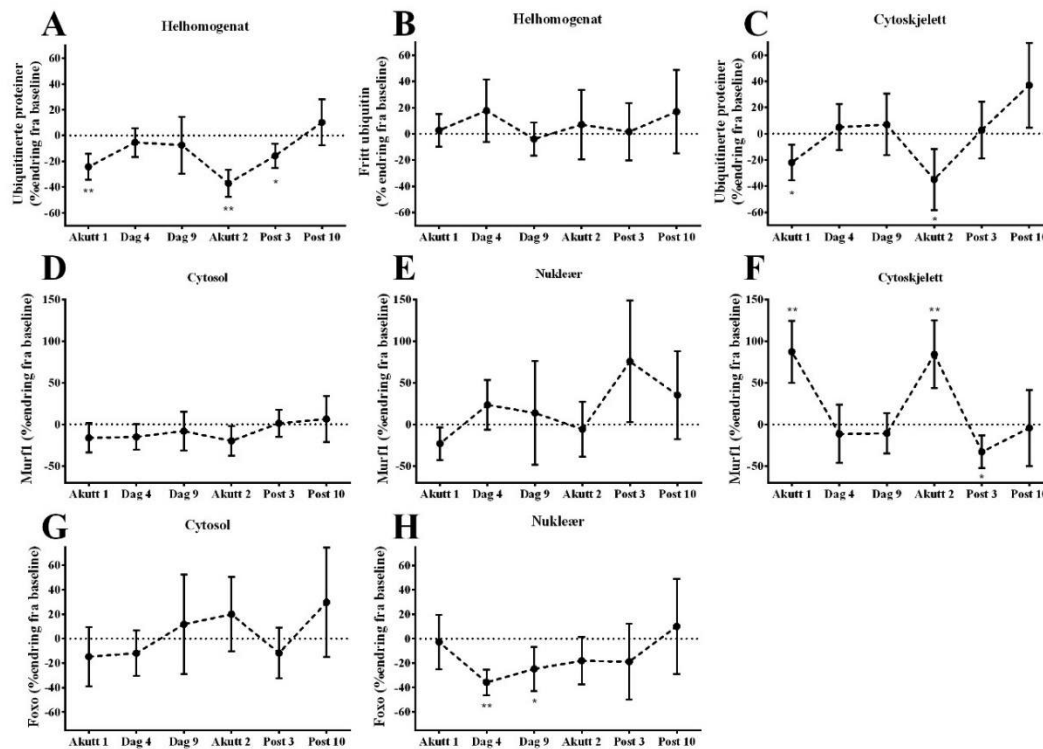
Figur 4.5. CK- og myoglobin-konsentrasjon i plasma under treningsuke 1 (A, C) og 2 (B, D) for hver enkelt forsøksperson.

4.3 Effekter på ubiquitin-proteasom systemet

Mengden ubiquitinerte proteiner i helhomogenat var redusert fra baseline på akutt dag 1 ($-24 \pm 17 \%$), akutt dag 2 ($-37 \pm 17 \%$) og ved Post 3 ($-16 \pm 16 \%$). Dag 4 ($-14 \pm 13 \%$), dag 9 ($-7 \pm 37 \%$) og Post 10 ($10 \pm 29 \%$) viste ingen signifikante endringer fra baseline. Fritt ubiquitin i helhomogenat endret seg ikke signifikant fra baseline til noen av testtidspunktene. I cytoskjelettfraksjonen var mengden ubiquitinerte proteiner redusert fra baseline på akutt dag 1 ($-22 \pm 22 \%$) og akutt dag 2 ($-35 \pm 38 \%$). På Dag 4 ($5 \pm 29 \%$), Dag 9 ($7 \pm 39 \%$), Post 3 ($3 \pm 36 \%$) og Post 10 ($37 \pm 54 \%$) var det ingen signifikante endring.

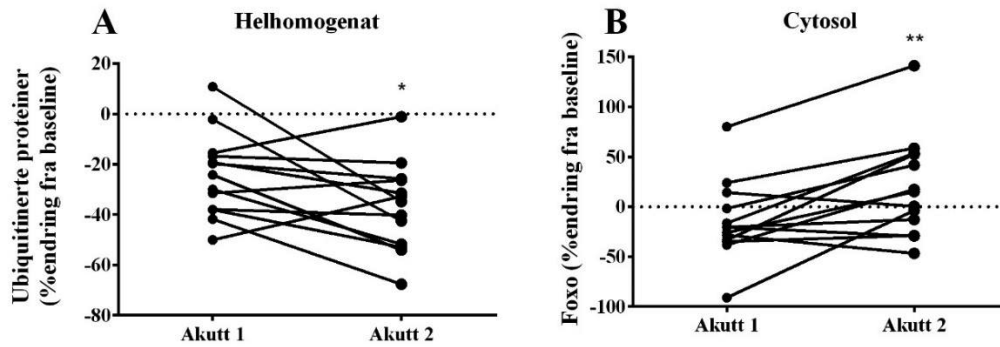
MURF1 økte fra baseline på akutt dag 1 ($87 \pm 62 \%$) og 2 ($84 \pm 67 \%$), og var redusert ved Post 3 ($-33 \pm 33 \%$) i cytoskjelettfraksjonen. Dag 4 ($-30 \pm 50\%$), Dag 9 ($-11 \pm 40 \%$), og Post 10 ($-4 \pm 76 \%$) viste ingen signifikante endringer. I cytosol og nukleær var det ingen signifikante endringer fra baseline på noe tidspunkt for MURF1.

I nukleærfraksjonen var FOXO redusert ved dag 4 ($-36 \pm 18 \%$) og dag 9 ($-25 \pm 30 \%$). Ved akutt dag 1 ($-3 \pm 37 \%$), akutt dag 2 ($-18 \pm 32 \%$), Post 3 ($-19 \pm 51 \%$) og Post 10 ($10 \pm 64 \%$) ble det ikke observert signifikante endring fra baseline. I cytosolfraksjonen var det ingen signifikante endringer for FOXO ved noen av tidspunktene sammenlignet med baseline.



Figur 4.6. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) for A) Ubiquitinerte proteiner i helhomogenat, B) Fritt ubiquitin i helhomogenat, C) Ubiquitinerte proteiner i cytoskjelett, D) MURF1 i cytosol, E) MURF1 i nukleær, F) MURF1 i cytoskjelett, G) FOXO i cytosol, H) FOXO i nukleær. Forskjeller fra baseline: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Det var større reduksjon i ubiquitinerte proteiner i helhomogenat 1 time etter treningsøkten ved akutt dag 1 ($-24 \pm 17\%$) enn ved akutt dag 2 ($-37 \pm 17\%$) ($P < 0,05$). I cytosol var det i utgangspunktet ingen signifikant endringer på FOXO nivåene ved akutt dag 1 og 2, men det var likevel signifikant forskjell i responsen mellom akutt dag 1 ($-15 \pm 40\%$) og akutt dag 2 ($20 \pm 50\%$) ($P < 0,01$). De resterende proteinene/fraksjonene viste ingen forskjell mellom de to akuttdagene.

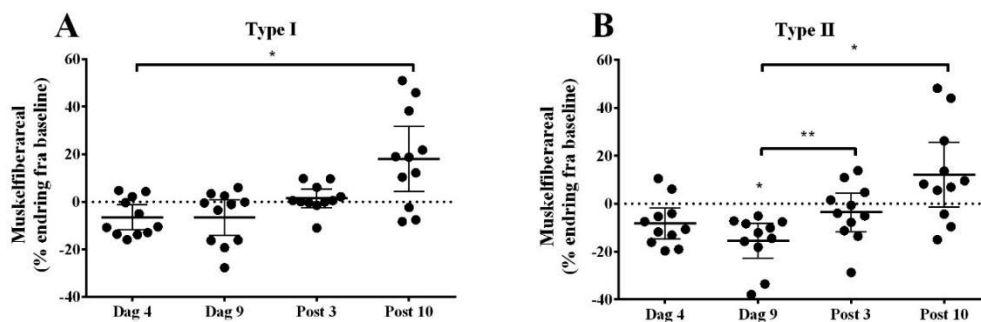


Figur 4.7. Endring fra baseline ved akutt dag 1 og 2 for A) mengden ubiquitinererte proteiner i helhomogenat, og B) mengden FOXO i cytosol. Respons ved akutt 1 forskjellig fra akutt 2: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

4.4 Muskelvekst

4.4.1 Muskelfiberareal

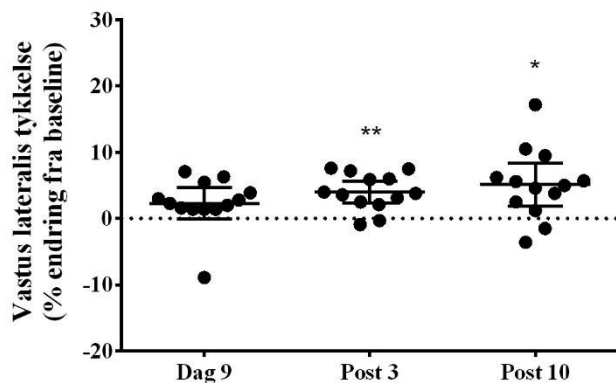
Muskelfiberareal for type I-muskelfibre endret seg ikke fra baseline til noen av testtidspunktene. Det var imidlertid en økning fra Dag 4 til Post 10 ($P \leq 0.05$) (figur 4.8A). For type II muskelfibre var muskelfiberareal redusert fra baseline til Dag 9 ($-15 \pm 11\%$, $P \leq 0.05$), men ingen endringer ble observert til de andre tidspunktene. Fra Dag 9 var det en økning til både Post 3 ($P \leq 0.01$) og Post 10 ($P \leq 0.05$) (figur 4.8B).



Figur 4.8. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) i muskelfiberareal for A) type I muskelfibre og B) type II muskelfibre. Hver enkelt FP markert med sirkel ($n = 11$). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

4.4.2 Muskeltykkelse

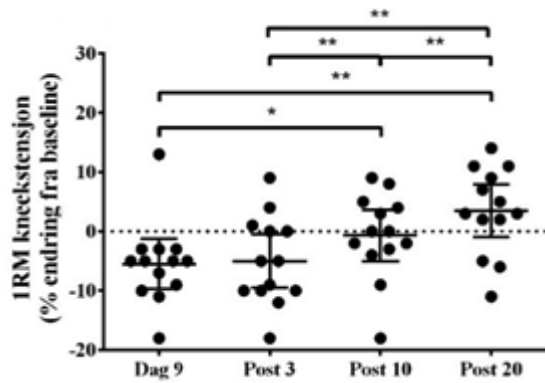
M. vastus lateralis tykkelse målt med ultralyd økte fra baseline til Post 3 ($4,0 \pm 2,8 \%$, $P \leq 0.01$) og Post 10 ($5,2 \pm 5,3 \%$, $P \leq 0.05$), men ikke til Dag 9 ($2,3 \pm 3,9 \%$) (figur 4.9). Fra før til etter treningsøkten ved akuttdag 2 var det en økning i muskeltykkelse for *m. vastus lateralis* ($7,3 \pm 7,8 \%$, $P < 0,01$). Neste treningsdag var muskeltykkelse redusert tilbake på samme nivå som før treningsøkten ved akuttdag 2.



Figur 4.9. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) i muskeltykkelse for *m. vastus lateralis*. Hver enkelt FP markert med sirkel. Forskjell fra baseline: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

4.5 Styrke

Det var ingen signifikante endring fra baseline til verken Dag 9 ($-5 \pm 7\%$), Post 3 ($-5 \pm 7\%$), Post 10 ($-1 \pm 7\%$) eller Post 20 ($4 \pm 7\%$) for 1 RM i kneekstensjon. Det var imidlertid en økning fra Dag 9 til Post 10 ($P \leq 0.05$) og post 20 ($P \leq 0.01$), fra Post 3 til Post 10 ($P \leq 0.01$) og Post 20 ($P \leq 0.001$), og fra Post 10 til Post 20 ($P \leq 0.01$) (figur 4.10).



Figur 4.10. Relative endringer fra baseline for 1RM kneekstensjon (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

5. Diskusjon

Okklusjonstrening førte til en reduksjon i ubiquitinerte proteiner og økning av MURF1 i cytoskjelett en time etter trening. Vi så ingen endring i lokalisering av FOXO3a en time etter okklusjonstrening, men det var redusert mengde FOXO3a i kjernen ved dag 4 og dag 9. Okklusjonstrening gjennomført i starten av andre treningsuke, etter ti dager hvile, førte til større reduksjon i ubiquitinerte proteiner og en større mengde FOXO3a i cytosol sammenlignet med første treningsøkt. Alle målte variabler i UPS var normalisert ved siste måling. Intervensjonen førte noe overraskende ikke til signifikant økning i muskelfiberareal eller 1RM kneekstensjon.

5.1 Trening

Våre forsøkspersoner tok 84 ± 15 repetisjoner per økt, noe som er betydelig høyere enn 66 ± 11 repetisjoner per økt som ble utført i et tidligere studie med identisk protokoll (Nielsen et al., 2012). Dette på tross av at begge studiene brukte forsøkspersoner som ikke hadde trent styrke en lang periode i forkant av studien. Dette får oss til å spekulere i at vi har presset våre forsøkspersoner hardere enn Nielsen et al (2012) gjorde. Vi observerte flere ganger at ved siste serie av treningen hadde flere av forsøkspersonene problemer med den første repetisjonen. Disse fikk hjelp på første repetisjon for å komme i gang, og klarte deretter ofte å ta 5-10 repetisjoner. Nielsen et al (2012) derimot registrerte null repetisjoner ved samme tilfeller (personlig kommunikasjon), noe som kan være med å underbygge vår påstand om at forsøkspersonene har blitt presset hardere i vår studie. Andre mulige årsaker til forskjellen kan være at Nielsen et al (2012) kan ha hatt strengere krav for hva som var godkjent repetisjon enn oss, og evt. forskjeller i treningsapparat og/eller bevegelsesutslag som ble benyttet. Både trykkmansjett, applisert trykk, treningsmotstand og hvileperiode var lik i begge studiene så dette bør ikke ha hatt noen innvirkning. Andre studier på okklusjonstrening med høy frekvens på øktene har også benyttet færre repetisjoner enn oss, total 45 (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005) eller 75 repetisjoner (Fujita et al., 2008). Disse har imidlertid gjennomført to økter per dag, og det er også forskjeller i bredden på trykkmansjett, applisert trykk og treningsøvelser som gjør det vanskeligere å sammenligne. Det virker likevel som om vår protokoll har vært noe tøffere enn det tidligere studier på høyfrekvent okklusjonstrening har benyttet, noe som sannsynligvis har innvirkning på de videre resultatene.

I likhet med Nielsen et al (2012) så vi at antall repetisjoner økte underveis i treningsperioden. På samtlige økter i andre treningsuke var antallet repetisjoner høyere enn ved første økt i treningsuke 1. Nielsen et al (2012) så at antall repetisjoner økte fra første til andre og tredje treningsuke.

Én til to timer etter okklusjonstrening var maksimalt isometrisk dreiemoment ved 70° redusert både ved akutt dag 1 ($-14,2 \pm 8,0$ %) og akutt dag 2 ($-10,1 \pm 9,5$ %). Dette stemmer godt overens med tidligere studier som har vist reduksjon i MVC ved 90° 1 time (Loenneke, Thiebaud, et al., 2013) og 4 timer (Wernbom, Paulsen, Nilsen, Hisdal, & Raastad, 2012) etter okklusjonstrening. I vår studie var reduksjonen større på akutt dag 1 enn akutt dag 2 ($P < 0,05$), på tross av at treningsvolumet var større ved akutt dag 2. Dette kan muligens være på grunn av at forsøkspersonene i større grad er tilvent treningen ved andre akutt dag. Flere studier har vist en såkalt «repeated bout» effekt, hvor blant annet fall i styrke etter en treningsøkt er større ved første gjennomføring enn når samme økt blir gjennomført senere (Meneghel et al., 2014; Stupka et al., 2001). Den akutte nedgangen i styrke etter trening bør imidlertid tolkes med forsiktighet. Blant annet øker maksimalt isometrisk dreiemoment med 12% to timer etter en utmattende okklusjonstrening på akutt dag 2 for en forsøksperson. Samme forsøksperson viste ingen endring fra før til etter okklusjonstreningen ved akutt dag 1. Det er derfor mulig at forsøkspersonen ikke har tatt i maksimalt ved pre-test for å spare seg til den senere treningen og testingen, eller at det har blitt gjort en feil i utførelsen av testen.

5.2 Blodanalyser

Det har tidligere blitt foreslått at okklusjonstrening med lav treningsmotstand ikke fører til muskelskade (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014). På gruppenivå var det ingen signifikant økning av CK-konsentrasjon i blodet ved noen av treningsukene, noe som også er vist tidligere (Takarada, Nakamura, et al., 2000). Myoglobin-konsentrasjon i blodet var økt i timene etter okklusjonstrening ved første akutt dag, men viste ingen endringer fra baseline ved noe annet tidspunkt. Enkelte forsøkspersoner viste imidlertid stor økning i CK og myoglobin under første treningsuke. En forsøksperson, som er ekskludert fra analysene, trakk seg grunnet ekstrem stølhøhet etter trening. Denne forsøkspersonen hadde CK-verdi på over 4000 U/L ved treningsdag 4 (ikke vist her), og ble senere diagnostisert med rbdomyolyse. Det har også tidligere blitt rapportert om

enkeltilfeller av raddomyolyse etter okklusjonstrening (Iversen & Rostad, 2010). Dette kan indikere at treningsprotokollen har ført til muskelskade hos enkelte forsøkspersoner. En forsøksperson hadde CK-verdier på ca. 2500 U/L ved første dag av intervensjonen noe som kan tyde på at han hadde gjort et hardt anstrengende arbeid før oppstart av intervensjonen på tross av at de fikk beskjed om å ta det med ro to dager før oppstarten. I andre treningsuke var det ingen økning i verken CK eller myoglobin for noen av forsøkspersonene som gjennomførte første runde av intervensjonen. På grunn av dette ble det ikke tatt blodprøver i treningsuke 2 ved andre gjennomføring av intervensjonen. Når to like økter med styrketrening har blitt gjennomført med noen ukers mellomrom har økningen i CK vært mindre ved andre treningsøkt enn ved første (Doma et al., 2015; Meneghel et al., 2014; Stupka et al., 2001), og det kan derfor tenkes at den reduserte responsen som observeres hos enkelte forsøkspersoner i andre treningsuke skyldes en tilvenning til okklusjonstrening.

5.3 Subjektive målinger

DOMS økte fra baseline i første, men ikke andre treningsuke. Økt DOMS etter okklusjonstrening har blitt sett i flere tidligere studier (Umbel et al., 2009; Wernbom et al., 2009; Wernbom et al., 2012). At DOMS ikke er høyere sammenlignet med baseline i andre treningsuke kan muligens også forklares med en tilvenning til treningen, da det tidligere også er det vist redusert DOMS etter tilvenning til trening (Doma et al., 2015; Meneghel et al., 2014). Wernbom et al (2008) rapporterte, i samsvar med våre observasjoner, at DOMS reduseres etter noen økter med okklusjonstrening, og også de tilskriver dette tilvenning til treningen. De foreslår også at med en gradvis tilvenning til okklusjonstrening kan DOMS muligens unngås. Opplevd anstrengelse og smerte endret seg ikke gjennom treningsperioden. Dette kan muligens være fordi forsøkspersonene trente til utmattelse hver gang. At de etter hvert ble tilvent treningen resulterte i at de tok flere repetisjoner og dette kan muligens forklare at disse parameterne ikke endret seg. Tidligere er det observert reduksjon i opplevd anstrengelse etter noen økter med okklusjonstrening, og dette har blitt kompensert for med å øke okklusjonstrykket (Karabulut et al., 2010). Den nevnte studien benyttet imidlertid et satt antall repetisjoner, som kan være en forklaring på denne forskjellen.

5.4 Effekter på ubiquitin-proteasom systemet

5.4.1 Ubiquitin

Tidligere er det sett økt mengde ubiquitinerte proteiner (Stupka et al., 2001; Thompson & Scordilis, 1994) og fritt ubiquitin (Thompson & Scordilis, 1994) etter eksentrisk styrketrening. Disse studiene har imidlertid sett på biopsier som er tatt 1-2 dager etter treningen. Den akutte responsen etter trening er imidlertid dårlig beskrevet. I vår studie så vi at mengden ubiquitinerte proteiner i helhomogenat og cytoskjelett var redusert 1 time etter okklusjonstreningsøkten både ved akutt dag 1 og 2. I helhomogenat var mengden ubiquitinerte proteiner også redusert ved Post 3. En reduksjon i ubiquitinerte proteiner kan potensielt bety to ting; en redusert ubiquitinering av proteiner eller en raskere nedbrytning av de ubiquitinerte proteinene. I en tidligere studie så man ingen endring i hastighet på proteinnedbrytning etter okklusjonstrening (Gundermann et al., 2014). Med bakgrunn i dette kan det tyde på at våre resultater er grunnet en redusert ubiquitinering av proteiner. Hvis en redusert mengde ubiquitinerte proteiner var årsaken ville det imidlertid vært logisk å se en økt mengde fritt ubiquitin, med mindre det samtidig har skjedd en reduksjon i total mengde ubiquitin. Dette kan muligens peke mot at en raskere nedbrytning av ubiquitinerte proteiner er årsaken. Når vi ikke har målt hastigheten på proteinnedbrytning kan vi imidlertid ikke si dette sikkert. At vi observerer en reduksjon i MFA for type II fibre kan også tyde på at det er en økt proteinnedbrytning. For å bli gjenkjent av proteasomet må en kjede på minst fire ubiquitin-enheter bindes til proteinet (Thrower et al., 2000). Ubiquitineringen av proteiner trenger derfor ikke nødvendigvis å være for å merke proteiner for nedbrytning (Komander, 2009).

Ved akutt dag 2 var reduksjonen i mengden ubiquitinerte proteiner i helhomogenat større enn ved akutt dag 1, noe som kan tyde på at det er en endret respons etter hvileuken. Tidligere har det blitt observert en endret respons i ubiquitinerte proteiner etter tilvenning til trening. Når to like økter med tung eksentrisk styrketrening ble utført med noen ukers mellomrom var økningen i ubiquitinerte proteiner større ved andre treningsøkt enn ved første (Stupka et al., 2001). I vår studie er det imidlertid viktig å ta hensyn til at det ble tatt flere repetisjoner ved akutt dag 2 enn akutt dag 1. Det er derfor mulig at redusert mengde ubiquitinerte proteiner ved akutt dag 2 er grunnet forskjellen i treningsbelastning, og ikke grunnet en tilvenningseffekt. Heller ikke her er det mulig å

fastslå om reduksjonen er på grunn av redusert mengde ubiquitinerte proteiner eller raskere nedbrytning av de ubiquitinerte proteinene.

5.4.2 FOXO3a

Det var ingen endring i FOXO3a verken i cytosol eller i kjernen ved noen av akutt dagene, noe som kan tyde på at det ikke skjedde en translokasjon av FOXO3a til kjernen akutt etter okklusjonstrening. Dette kan stemme overens med funnene til Fry et al (2010), som ikke så noen endring i fosforylert FOXO3a verken 1 eller 3 timer etter okklusjonstrening. Tidligere er det vist at fosforylering av FOXO3a er uendret også 1 time etter en omfattende og tung kneekstensjonsøkt (10 x 10 reps på 70 % 1RM) (Glynn, Fry, Drummond, Dreyer, et al., 2010). Etter konsentrisk og eksentrisk muskelarbeid blir endringer i proteinnivå og fosforylering av FOXO sett først 5 timer etter trening, og ikke etter 1 og 3 timer (Stefanetti, Lamon, Rahbek, et al., 2014). Det er derfor mulig at vårt biopsitidspunkt én time etter treningsøkten ikke er optimalt for å undersøke den akutte responsen til FOXO3a.

Tre, 6 og 24 timer etter en tung kneekstensjonsøkt er det observert en nedregulering av fosforylert FOXO3a (Fry et al., 2013). Dette tyder på en økt translokasjon til kjernen, hvor FOXO3a er aktiv og kan øke transkripsjon av MURF1 og atrogen-1.

Nedreguleringen i fosforylert FOXO3a 24 timer etter treningsøkten (Fry et al., 2013) står i kontrast til våre resultater ved Dag 4. Biopsien ved Dag 4 i vår studie er tatt 22 timer etter treningsøkten dagen før, og viser redusert mengde FOXO3a i kjernen. Fry et al (2013) trente imidlertid tradisjonell styrketrening med tung motstand (8 x 10 reps på 70% 1RM), mens vi gjennomførte okklusjonstrening med lav treningsmotstand. Det kan tenkes at den tunge treningsmotstanden ved tradisjonell styrketrening kan føre til muskelskader og at det derfor vil være et økt behov for muskelproteinnedbrytning. På grunn av den lave treningsmotstanden er det foreslått at okklusjonstrening ikke fører til muskelskade (Loenneke, Thiebaud, & Abe, 2014) og dette kan muligens tyde på at det ikke vil være et økt behov for muskelproteinnedbrytning. En annen mulig grunn til forskjellen som er sett mellom oss og Fry et al (2013) kan være at forsøkspersonene fastet 6 timer etter økten hos Fry et al (2013), mens hos oss fikk de lov å spise rett etter trening. Også ved Dag 9 er mengden FOXO3a i kjernen redusert, noe som tyder på at FOXO3a er mindre aktiv enn ved baseline underveis i treningsintervensjonen og i hvileuken. Det er imidlertid ingen endring i mengden FOXO3a i cytosol ved

tidspunktene vi observerer økning av FOXO3a i kjernen, så vi kan ikke si med sikkerhet om det skjer en translokasjon fra cytosol til kjernen.

Selv om det ikke var noen endringer fra baseline i mengden FOXO i cytosol ved noe tidspunkt, var det forskjell mellom akuttdag 1 (-15 ± 40 % fra baseline) og akuttdag 2 (20 ± 50 % fra baseline). Mer FOXO i cytosol tyder på at mer FOXO er inaktivt (såfremt det ikke er økt totalmengde FOXO). Det kan derfor spekuleres i at muskelproteinnedbrytning er redusert i andre treningsuke sammenlignet med første. Siden det ikke er noen endringer sammenlignet med baseline ved noen av disse tidspunktene må man imidlertid være forsiktig med å tolke disse resultatene.

5.4.3 MURF1

Det er foreslått at den intracellulære lokalisering av MURF1 kan ha betydning for koordinering av ulike funksjoner i reguleringen av proteinturnover (Braun & Gautel, 2011). Det er imidlertid lite kunnskap på dette området, så resultatene er vanskelig å tolke. Vi observerer en robust økning i MURF1 i cytoskjelett 1 time etter treningsøkten ved både akuttdag 1 og 2. MURF1 har tidligere vist å ha en interaksjon med titin i M-linje regionen av sarkomeren (Centner et al., 2001), så det er mulig at en økt interaksjon med titin er bakgrunnen for våre resultater. Det er foreslått at interaksjonen mellom titin og MURF1 kan regulere og/eller stabilisere strukturen til M-linje regionen av sarkomeren (Gregorio et al., 2005). Titin kan muligens virke som en aktivitetsavhengig bremse på proteindegradering ved å redusere tilgjengeligheten eller stabiliteten av MURF (Braun & Gautel, 2011). Muligens vil MURF1 ikke være aktiv i å ubiquitinere proteiner når den interagerer med titin, noe som kan føre til redusert ubiquitinering via MURF1. Om akkumuleringen av MURF1 i cytoskjelett var for å ubiquitinere proteiner ville det resultert i en økt mengde ubiquitinerte proteiner, forutsatt at nedbrytningen av ubiquitinerte proteiner skjedde med samme hastighet. Våre resultater viser imidlertid en redusert mengde ubiquitinerte proteiner i cytoskjelett, som muligens kan tyde på at det er redusert ubiquitinering av proteiner. Dette forblir imidlertid kun spekulasjoner, da det er mulig at reduksjonen i ubiquitinerte proteiner også kan skyldes økt hastighet på nedbrytning av proteiner.

I utgangspunktet er det trodd at calpainer og caspaser er nødvendig for å gjøre myofibrillære proteiner tilgjengelig for nedbrytning av UPS (Jackman & Kandarian,

2004). MyBP-C, MyLC1, and MyLC2, som er viktig for stabilisering av tykke filamenter i myofibrillen, blir imidlertid brutt ned av en MURF1 avhengig mekanisme og kan bli ubiquitinert av MURF1 selv i inntakte myofibriller (Cohen et al., 2009). Forfatterne spekulerer i at dette muligens kan øke mottageligheten for MURF1-avhengig nedbrytning for andre myofibrillære komponenter (Cohen et al., 2009). Økningen i MURF1 i cytoskjelett kan derfor også muligens indikere økt nedbrytning. Som nevnt tidligere ser vi en reduksjon i ubiquitinerte proteiner i cytoskjelett, men er usikre på om dette er grunnet redusert ubiquitinering av proteiner eller økt hastighet på nedbrytningen av ubiquitinerte proteiner. Vi ser ingen akutte endringer av MURF1 i verken cytosol og kjernen ved bruk av ANOVA, men ved analyser med t-test er det en tendens til reduksjon i cytosol ved akutt dag 1 ($p < 0,10$) og en signifikant reduksjon ved akutt dag 2 ($p < 0,05$).

Ved Post 3 er MURF1 i cytoskjelett redusert fra baseline. Tidligere er det rapportert at det ved mekanisk arrest skjer en translokasjon av MURF1 fra cytoskjelett til kjernen. Det er ingen signifikant økning av MURF1 i kjernen ved post 3 ved ANOVA, men det ser ut til at det kan være en tendens. Med bruk av t-test blir endringen fra baseline til Post 3 signifikant ($p < 0,05$). I kjernen kan MURF1 påvirke transkripsjonsfaktorene Serum response factor (SRF) (Willis et al., 2007) og GMEB-1 (McElhinny et al., 2002).

5.5 Muskelvekst

Resultatene for MFA er i sterk kontrast til Nielsen et al (2012). Mens vi så en reduksjon i MFA for type II-fibre etter den første treningsuka, og ellers ikke observerte signifikante endringer fra baseline for verken type I eller type II fibre, viste Nielsen et al (2012) en enorm økning i MFA for både type I og type II-fibre allerede etter første treningsuke (38%) som vedvarte 3 (35-37%) og 10 dager (31-32%) etter intervensjonen. Vi spekulerer i at vi har trent våre deltagere for hardt og oppnådd en overreaching effekt³ (diskuteres nærmere i neste avsnitt), og at dette kan være grunnen til reduksjonen i MFA for type II-fibre. Den store økningen observert allerede etter første treningsuke hos Nielsen et al (2012) er imidlertid ikke nødvendigvis grunnet akkumulering av myofibrillære proteiner. Også kontrollgruppen som gjennomførte tilsvarende trening uten okklusjon fikk en stor økning i MFA etter første treningsuke,

³ For mye treningsbelastning på for kort tid.

men denne var redusert til baseline etter treningsperioden. Forfatterne spekulerer i at celledvelling som følge av treningen er en medvirkende årsak til den store økningen som blir observert etter første treningsuke. Celledvelling er imidlertid ikke en sannsynlig årsak til økt MFA etter treningsperioden for okklusjonsgruppen (Nielsen 2012), da de også viser økning i styrke.

På grunn av en feil ved tining ble biopsitene som skulle analyseres for MFA fra to forsøkspersoner utsatt for fryseskader. Dette førte til at de måtte ekskluderes fra analyser av muskelfiberareal og gjorde at antall forsøkspersoner ble redusert til 11. Dette var lavere enn det som ble beregnet som nødvendig og det er derfor mulig at dette er grunnen til at vi ikke observerer signifikant økning i MFA etter treningsperioden. Om en ser nærmere på tallene kan det se ut som det er en økning i MFA fra baseline til Post 10 for både type I ($18 \pm 20\%$) og type II-fibre ($12 \pm 20\%$), men på grunn av den individuelle variasjonen i responsen og det lave antallet forsøkspersoner blir ikke endringene signifikante med ANOVA. Med bruk av t-test blir det en signifikant økning i MFA fra baseline til Post 10 for type I fibre ($p < 0,05$) og en tendens til økning for type II fibre ($p < 0,10$). Økningen er imidlertid uansett betydelig mindre enn det Nielsen et al (2012) oppnådde. Det ser også ut som det kan være en økning fra Post 3 til Post 10 for både type I og type II fibre. Med bruk av t-test er økningen i MFA signifikant fra Post 3 til Post 10 for både type I ($p < 0,05$) og type II fibre ($p < 0,05$) noe som kan underbygge på at forsøkspersonene trengte tid på å restituere seg etter treningen. At 1RM kneekstensjon øker fra Post 10 til Post 20 støtter også dette, og det er mulig at MFA fortsatte å øke etter siste biopsitidspunkt.

Muskeltykkelse av *m.vastus lateralis* økte fra baseline til Post 3 og Post 10, henholdsvis 4,0 % og 5,2 %. Andre studier har ikke sett på tykkelse av kun *m.vastus lateralis*, men et har sett på muskeltykkelse av hele quadriceps. Denne viste en økning på 5,9 % etter en uke med høyfrekvent okklusjonstrening (Abe, Kawamoto, et al., 2005). At det ikke er noen økning i MFA burde ført til at det heller ikke var noen økning i muskeltykkelse. Som diskutert er det imidlertid mulig at for lav statistisk styrke er grunnen til at vi ikke finner signifikant økning i MFA. I analysene av muskeltykkelse er det inkludert to forsøkspersoner mer enn i analysene av MFA. Om MFA økte for begge disse forsøkspersonene er det mulig at det hadde blitt en signifikant økning i MFA og da ville

resultatene stemt overens. En annen mulig forklaring kan være at biopsien ikke nødvendigvis er representativ for hele *m. vastus lateralis*.

Oppsummert kan vi si at det ser ut som vår studie viser mindre muskelvekst enn lignende studier har vist tidligere. Dette kan muligens være på grunn av at vi har presset forsøkspersonene våre for hardt og oppnådd en overreaching effekt, som gjorde at forsøkspersonene trengte tid på å restituere seg.

5.6 Styrke

På tross av at vår studie viser mindre muskelvekst enn Nielsen et al 2012, har vi en lignende økning i maksimalt isometrisk dreiemoment ved 70°. Mens Nielsen ved post 5 og post 12 viser økning på henholdsvis 7% og 11%, økte våre forsøkspersoner med 6%, 12% og 15% på 3, 10 og 20 dager etter siste treningsøkt. Vi så imidlertid ingen endring fra baseline ved noe tidspunkt for 1RM i kneekstensjon. Tidligere har korte perioder høyfrekvent okklusjonstrening med lav treningsmotstand økt 1RM i knebøy (Abe, Yasuda, et al., 2005) og beinpress (Abe, Kawamoto, et al., 2005) med henholdsvis 17% og 10%. Dette kan muligens forklares med at knebøy og beinpress er mer teknisk avansert enn kneekstensjon, og forbedring av teknikk etter treningsperioden derfor vil kunne bidra til økt styrke i større grad enn ved kneekstensjon. Kneekstensjon vil dermed gi et bedre bilde på den faktiske økningen i muskelstyrke. Tidligere studier har imidlertid også vist økt 1RM i kneekstensjon etter okklusjonstrening, noe som er i kontrast til våre resultater. 2 og 3 dager etter siste treningsøkt av intervensjoner med okklusjonstrening to ganger om dagen var 1RM kneekstensjon økt med henholdsvis 7% (Fujita et al., 2008) og 23% (Abe, Yasuda, et al., 2005). I tidligere studier har økningen i 1RM vært grunnet økning i CSA, da 1RM/CSA ikke har endret seg (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008). Vi fant ingen endring i tverrsnittsareal for hele quadriceps med bruk av MR (data ikke vist), noe som samsvarer godt med at vi ikke finner noen endring i 1RM.

I studier der de har benyttet et høyt treningsvolum for å skape en overreaching-effekt er det observert at 1RM i knebøy og benkpress er redusert etter første treningsuke, for deretter å øke gradvis (Kraemer et al., 2006; Volek et al., 2004). Dette kan stemme delvis overens med resultatene vi ser for 1RM kneekstensjon. Kraemer et al (2006) så imidlertid en økning i CK etter første treningsuke, og CK-konsentrasjonen var negativt

korrelert med 1RM knebøy. Vi fant ingen økning i CK på gruppenivå, men enkeltpersoner i vår studie hadde imidlertid 2-5 ganger forhøyet CK- og myoglobin-konsentrasjoner i slutten av første treningsuke. Våre forsøkspersoner var utrent og gikk rett inn i et veldig intensivt treningsprogram uten noe tilvenning i forkant. Dette har tidligere likevel resultert i økt styrke (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008; Nielsen et al., 2012). Tre av de tidligere studiene har imidlertid benyttet en submaksimal protokoll (Abe, Kawamoto, et al., 2005; Abe, Yasuda, et al., 2005; Fujita et al., 2008), mens Nielsen et al (2012), som diskutert tidligere, også benyttet et lavere treningsvolum enn i vår studie. Det kan derfor tenkes at treningsbelastningen har blitt for stor for våre deltagere og at det har resultert i en overreaching effekt. I og med at 1RM knekestensjon øker fra Post 10 til Post 20 kan vi ikke utelukke at det er en videre økning etter dette tidspunktet som etter hvert ville resultert i en økning fra baseline.

5.7 Svakheter

Studien var ikke blindet da samme personer var ansvarlig for trening, testing, laboratoriearbeid, dataanalyser og tolkninger. Grunnet for lav rekruttering ble ingen kontrollgruppe inkludert i studien. Dette er en svakhet da en ikke kan utelukke at noen av endringene skjedde grunnet forhold som ikke var knyttet til treningsintervensjonen. Blant annet hadde intervensjonen et omfattende testbatteri, som potensielt kan ha ført til en treningseffekt i seg selv. At studien ble gjennomført i to omganger, med ulike personer ansvarlig for testing og trening, er en mulig svakhet ved studien. Potensielt kan testingen og treningen ha blitt gjennomført litt ulikt i de to omgangene.

Treningsprotokoll, testprotokoll og opplæring i bruk av utstyr og apparater for trening og testing var imidlertid den samme så antagelig har ikke dette hatt veldig stor påvirkning på resultatene. At en forsøksperson går opp i maksimalt isometrisk dreiemoment ved 70° en time etter en utmattende okklusjonstreningsøkt tyder imidlertid på at det enten er blitt gjort feil ved testing, eller at vi ikke har klart å få forsøkspersonen til å yte maksimalt på testen.

Feil ved tining av biopsier gjorde at to forsøkspersoner måtte ekskluderes ved analyser av muskelfiberareal, og gjorde at utvalget ble lavere enn det som var beregnet som nødvendig for statistisk power. Under lagring av biopsier for fire forsøkspersoner ved Dag 4 ble det gjort en feil som gjorde at resultater for signalering for disse biopsiene

ikke kunne brukes. For disse ble gjennomsnittlig endring fra baseline for de 9 andre forsøkspersonene fylt inn for å kunne utføre ANVOVA-analyser. For å få et bedre bilde av de akutte effektene på de målte variablene i UPS kunne det blitt tatt flere biopsier i forbindelse med akuttdagene. Akuttdagene ble imidlertid gjennomført som en del av et større forskningsprosjekt hvor det ble tatt 8 biopsier av deltagerne, derfor ble det begrenset til en biopsi ved akuttdagene. En svakhet ved Western Blot-analysene er at antistoffene som benyttes for MURF1 virker å kryssreagere med andre proteiner, noe som også er rapportert tidligere (Bodine & Baehr, 2014). I våre analyser av MURF1 fikk vi to bånd i alle fraksjoner, men analyserte kun det båndet som korresponderte med den rapporterte molekylvekten for MURF1 (41kDa). I en del av analysene av MURF1 var båndene veldig svake, spesielt i cytoskjelettfraksjonen. Protokollen vi benyttet ved Western Blot er optimalisert for analyser på heat-shock proteiner, og det er mulig at justeringer av denne protokollen ville resultert i bedre bånd og mindre bakgrunnsstøy.

6. Konklusjon

Vi fant at okklusjonstrening førte til en akutt respons på variabler i UPS. Én time etter okklusjonstrening var det en reduksjon i ubiquitinerte proteiner og en økning av MURF1 i cytoskjelett ved begge akuttdagene. Reduksjonen i ubiquitinerte proteiner kan muligens bety at det er mindre proteiner som blir merket for nedbrytning, men det kan også være et tegn på en økt hastighet på nedbrytningen av proteiner i proteasomet. For å kunne fastslå dette må imidlertid hastigheten på proteinnedbrytning måles. Økningen av MURF1 i cytoskjelett kan være grunnet binding til titin og dette kan muligens virke som en aktivitetsavhengig brems på proteindegradering. Det er imidlertid også vist at MURF1 kan ubiquitinere enkelte myofibrillære proteiner og at dette muligens kan øke mottageligheten for MURF1-avhengig nedbrytning for andre myofibrillære komponenter. Det ble ikke sett noen akutte effekter på lokaliseringen til FOXO3a én time etter trening, men det er mulig at dette er grunnet biopsitidspunktet. Mengden FOXO3a i kjernen var redusert ved dag 4 og dag 9 av intervensjonen, noe som kan tyde på mindre transkripsjonell aktivitet og dermed redusert ekspresjon av MURF1. Ved siste biopsi var det ingen signifikante forskjeller for lokalisering av noen av markørene sammenlignet med baseline.

Treningsintervensjonen førte ikke til økning i muskelfiberareal i *m.vastus lateralis* eller i tverrsnittsareal av quadriceps, noe som også forklarer at vi ikke ser noen økning i styrke. Disse resultatene er i sterk kontrast til tidligere studier som har sett på okklusjonstrening med lav treningsmotstand. Vår treningsprotokoll virker imidlertid å ha vært noe tøffere enn det som har blitt benyttet ved tidligere studier. Vi spekulerer derfor i at treningsbelastningen har blitt for stor for forsøkspersonene og at det har oppstått en overreaching effekt. Dette kan muligens ha hatt en innvirkning på de målte variablene i UPS.

Referanser

- Abe, T., Kawamoto, K., Yasuda, T., Kearns, C. F., Midorikawa, T., & Sato, Y. (2005). Eight days KAATSU-resistance training improved sprint but not jump performance in collegiate male track and field athletes. *Int. J. KAATSU Training Res.*, *1*(1), 19-23.
- Abe, T., Kearns, C. F., & Sato, Y. (2006). Muscle size and strength are increased following walk training with restricted venous blood flow from the leg muscle, Kaatsu-walk training. *J Appl Physiol* (1985), *100*(5), 1460-1466. doi: 10.1152/jappphysiol.01267.2005
- Abe, T., Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Thiebaud, R. S., & Bembien, M. G. (2012). Exercise intensity and muscle hypertrophy in blood flow-restricted limbs and non-restricted muscles: a brief review. *Clin Physiol Funct Imaging*, *32*(4), 247-252. doi: 10.1111/j.1475-097X.2012.01126.x
- Abe, T., Yasuda, T., Midorikawa, T., Sato, Y., Kearns, C. F., Inoue, K., . . . Ishii, N. (2005). Skeletal muscle size and circulating IGF-1 increased after two weeks of twice daily “Kaatsu” resistance training. *International Journal of KAATSU Training Research*, *1*(1), 6-12.
- Baehr, L. M., Furlow, J. D., & Bodine, S. C. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J Physiol*, *589*(Pt 19), 4759-4776. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212845
- Berneis, K., Ninnis, R., Haussinger, D., & Keller, U. (1999). Effects of hyper- and hypoosmolality on whole body protein and glucose kinetics in humans. *Am J Physiol*, *276*(1 Pt 1), E188-195.
- Biolo, G., Maggi, S. P., Williams, B. D., Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (1995). Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*, *268*(3 Pt 1), E514-520.
- Biolo, G., Williams, B. D., Fleming, R. Y., & Wolfe, R. R. (1999). Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. *Diabetes*, *48*(5), 949-957.
- Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogenin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *307*(6), E469-484. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2014
- Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K., Nunez, L., Clarke, B. A., . . . Glass, D. J. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, *294*(5547), 1704-1708. doi: 10.1126/science.1065874

- Borgenvik, M., Apro, W., & Blomstrand, E. (2012). Intake of branched-chain amino acids influences the levels of MAFbx mRNA and MuRF-1 total protein in resting and exercising human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *302*(5), E510-521. doi: 10.1152/ajpendo.00353.2011
- Braun, T., & Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(6), 349-361. doi: 10.1038/nrm3118
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., . . . Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, *96*(6), 857-868.
- Cai, D., Frantz, J. D., Tawa, N. E., Jr., Melendez, P. A., Oh, B. C., Lidov, H. G., . . . Shoelson, S. E. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, *119*(2), 285-298. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.027
- Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., . . . Labeit, S. (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, *306*(4), 717-726. doi: 10.1006/jmbi.2001.4448
- Cho, J. E., Fournier, M., Da, X., & Lewis, M. I. (2010). Time course expression of Foxo transcription factors in skeletal muscle following corticosteroid administration. *J Appl Physiol (1985)*, *108*(1), 137-145. doi: 10.1152/jappphysiol.00704.2009
- Churchley, E. G., Coffey, V. G., Pedersen, D. J., Shield, A., Carey, K. A., Cameron-Smith, D., & Hawley, J. A. (2007). Influence of preexercise muscle glycogen content on transcriptional activity of metabolic and myogenic genes in well-trained humans. *J Appl Physiol (1985)*, *102*(4), 1604-1611. doi: 10.1152/jappphysiol.01260.2006
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, *102*(6), 2379-2388. doi: 10.1152/jappphysiol.01298.2006
- Clark, B. C., Fernhall, B., & Ploutz-Snyder, L. L. (2006). Adaptations in human neuromuscular function following prolonged unweighting: I. Skeletal muscle contractile properties and applied ischemia efficacy. *J Appl Physiol (1985)*, *101*(1), 256-263. doi: 10.1152/jappphysiol.01402.2005
- Clarke, B. A., Drujan, D., Willis, M. S., Murphy, L. O., Corpina, R. A., Burova, E., . . . Glass, D. J. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, *6*(5), 376-385. doi: 10.1016/j.cmet.2007.09.009

- Cohen, S., Brault, J. J., Gygi, S. P., Glass, D. J., Valenzuela, D. M., Gartner, C., . . . Goldberg, A. L. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*, 185(6), 1083-1095. doi: 10.1083/jcb.200901052
- Cong, H., Sun, L., Liu, C., & Tien, P. (2011). Inhibition of atrogen-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum Gene Ther*, 22(3), 313-324. doi: 10.1089/hum.2010.057
- Cook, C. J., Kilduff, L. P., & Beaven, C. M. (2014). Improving strength and power in trained athletes with 3 weeks of occlusion training. *Int J Sports Physiol Perform*, 9(1), 166-172. doi: 10.1123/ijsp.2013-0018
- Cook, S. B., Murphy, B. G., & Labarbera, K. E. (2013). Neuromuscular function after a bout of low-load blood flow-restricted exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 45(1), 67-74.
- Crenshaw, A. G., Hargens, A. R., Gershuni, D. H., & Rydevik, B. (1988). Wide tourniquet cuffs more effective at lower inflation pressures. *Acta Orthop Scand*, 59(4), 447-451.
- Csibi, A., Leibovitch, M. P., Cornille, K., Tintignac, L. A., & Leibovitch, S. A. (2009). MAFbx/Atrogen-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *J Biol Chem*, 284(7), 4413-4421. doi: 10.1074/jbc.M807641200
- Cumming, K. T., Paulsen, G., Wernbom, M., Ugelstad, I., & Raastad, T. (2014). Acute response and subcellular movement of HSP27, alphaB-crystallin and HSP70 in human skeletal muscle after blood-flow-restricted low-load resistance exercise. *Acta Physiol (Oxf)*, 211(4), 634-646. doi: 10.1111/apha.12305
- Dalbo, V. J., Roberts, M. D., Hassell, S., & Kerksick, C. M. (2013). Effects of pre-exercise feeding on serum hormone concentrations and biomarkers of myostatin and ubiquitin proteasome pathway activity. *Eur J Nutr*, 52(2), 477-487. doi: 10.1007/s00394-012-0349-x
- Doma, K., Schumann, M., Sinclair, W. H., Leicht, A. S., Deakin, G. B., & Hakkinen, K. (2015). The repeated bout effect of typical lower body strength training sessions on sub-maximal running performance and hormonal response. *Eur J Appl Physiol*. doi: 10.1007/s00421-015-3159-z
- Drummond, M. J., Fujita, S., Abe, T., Dreyer, H. C., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2008). Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. *Med Sci Sports Exerc*, 40(4), 691-698. doi: 10.1249/MSS.0b013e318160ff84

- Fahs, C. A., Loenneke, J. P., Rossow, L. M., Thiebaud, R. S., & Bemben, M. G. (2012). Methodological considerations for blood flow restricted resistance exercise. *Journal of Trainology, 1*(1), 14-22.
- Fielitz, J., Kim, M. S., Shelton, J. M., Latif, S., Spencer, J. A., Glass, D. J., . . . Olson, E. N. (2007). Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest, 117*(9), 2486-2495. doi: 10.1172/jci32827
- Foletta, V. C., White, L. J., Larsen, A. E., Leger, B., & Russell, A. P. (2011). The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch, 461*(3), 325-335. doi: 10.1007/s00424-010-0919-9
- Fry, C. S., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2013). Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 68*(5), 599-607. doi: 10.1093/gerona/gls209
- Fry, C. S., Glynn, E. L., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., Fujita, S., Abe, T., . . . Rasmussen, B. B. (2010). Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. *J Appl Physiol (1985), 108*(5), 1199-1209. doi: 10.1152/jappphysiol.01266.2009
- Fujita, T., Brechue, W. F., Kurita, K., Sato, Y., & Abe, T. (2008). Increased muscle volume and strength following six days of low-intensity resistance training with restricted muscle blood flow. *Int. J. KAATSU Training Res., 4*(1), 1-8.
- Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev, 82*(2), 373-428. doi: 10.1152/physrev.00027.2001
- Glynn, E. L., Fry, C. S., Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Dhanani, S., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2010). Muscle protein breakdown has a minor role in the protein anabolic response to essential amino acid and carbohydrate intake following resistance exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 299*(2), R533-540. doi: 10.1152/ajpregu.00077.2010
- Glynn, E. L., Fry, C. S., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., Dhanani, S., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2010). Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J Nutr, 140*(11), 1970-1976. doi: 10.3945/jn.110.127647
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature, 426*(6968), 895-899. doi: 10.1038/nature02263

- Goldfarb, A. H., Garten, R. S., Chee, P. D., Cho, C., Reeves, G. V., Hollander, D. B., . . . Kraemer, R. R. (2008). Resistance exercise effects on blood glutathione status and plasma protein carbonyls: influence of partial vascular occlusion. *Eur J Appl Physiol*, *104*(5), 813-819. doi: 10.1007/s00421-008-0836-1
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(25), 14440-14445. doi: 10.1073/pnas.251541198
- Goto, K., Ishii, N., Kizuka, T., & Takamatsu, K. (2005). The impact of metabolic stress on hormonal responses and muscular adaptations. *Med Sci Sports Exerc*, *37*(6), 955-963.
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*, *282*(41), 30107-30119. doi: 10.1074/jbc.M705325200
- Gregorio, C. C., Perry, C. N., & McElhinny, A. S. (2005). Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, *26*(6-8), 389-400. doi: 10.1007/s10974-005-9021-x
- Greig, C. A., Gray, C., Rankin, D., Young, A., Mann, V., Noble, B., & Atherton, P. J. (2011). Blunting of adaptive responses to resistance exercise training in women over 75y. *Exp Gerontol*, *46*(11), 884-890. doi: 10.1016/j.exger.2011.07.010
- Gundermann, D. M., Fry, C. S., Dickinson, J. M., Walker, D. K., Timmerman, K. L., Drummond, M. J., . . . Rasmussen, B. B. (2012). Reactive hyperemia is not responsible for stimulating muscle protein synthesis following blood flow restriction exercise. *J Appl Physiol* (1985). *112*(9), 1520-1528.
- Gundermann, D. M., Walker, D. K., Reidy, P. T., Borack, M. S., Dickinson, J. M., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2014). Activation of mTORC1 signaling and protein synthesis in human muscle following blood flow restriction exercise is inhibited by rapamycin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *306*(10), E1198-1204. doi: 10.1152/ajpendo.00600.2013
- Henneman, E., Somjen, G., & Carpenter, D. O. (1965). FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CELL SIZE IN SPINAL MOTONEURONS. *J Neurophysiol*, *28*, 560-580.
- Houtman, C. J., Stegeman, D. F., Van Dijk, J. P., & Zwarts, M. J. (2003). Changes in muscle fiber conduction velocity indicate recruitment of distinct motor unit populations. *J Appl Physiol* (1985), *95*(3), 1045-1054. doi: 10.1152/jappphysiol.00665.2002

- Hulmi, J. J., Kovanen, V., Selanne, H., Kraemer, W. J., Hakkinen, K., & Mero, A. A. (2009). Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression. *Amino Acids*, 37(2), 297-308. doi: 10.1007/s00726-008-0150-6
- Ishii, N., Madarame, H., Odagiri, K., Naganuma, M., & Shinoda, K. (2005). Circuit training without external load induces hypertrophy in lower-limb muscles when combined with moderate venous occlusion. *Int. J. KAATSU Training Res.*, 1(1), 24-28.
- Iversen, E., & Rostad, V. (2010). Low-load ischemic exercise-induced rhabdomyolysis. *Clin J Sport Med*, 20(3), 218-219. doi: 10.1097/JSM.0b013e3181df8d10
- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287(4), C834-843. doi: 10.1152/ajpcell.00579.2003
- Jacobs, F. M., van der Heide, L. P., Wijchers, P. J., Burbach, J. P., Hoekman, M. F., & Smidt, M. P. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem*, 278(38), 35959-35967. doi: 10.1074/jbc.M302804200
- Jones, S. W., Hill, R. J., Krasney, P. A., O'Conner, B., Peirce, N., & Greenhaff, P. L. (2004). Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb j*, 18(9), 1025-1027. doi: 10.1096/fj.03-1228fje
- Kacin, A., & Strazar, K. (2011). Frequent low-load ischemic resistance exercise to failure enhances muscle oxygen delivery and endurance capacity. *Scand J Med Sci Sports.*, 21(6), e231-241.
- Karabulut, M., Abe, T., Sato, Y., & Bembem, M. G. (2010). The effects of low-intensity resistance training with vascular restriction on leg muscle strength in older men. *Eur J Appl Physiol*, 108(1), 147-155. doi: 10.1007/s00421-009-1204-5
- Karabulut, M., Bembem, D. A., Sherk, V. D., Anderson, M. A., Abe, T., & Bembem, M. G. (2011). Effects of high-intensity resistance training and low-intensity resistance training with vascular restriction on bone markers in older men. *Eur J Appl Physiol*, 111(8), 1659-1667. doi: 10.1007/s00421-010-1796-9
- Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H. H., Rockman, H. A., & Patterson, C. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(52), 18135-18140. doi: 10.1073/pnas.0404341102

- Kim, E., Gregg, L. D., Kim, L., Sherk, V. D., Bembien, M. G., & Bembien, D. A. (2014). Hormone responses to an acute bout of low intensity blood flow restricted resistance exercise in college-aged females. *J Sports Sci Med*, *13*(1), 91-96.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*, *37*(Pt 5), 937-953. doi: 10.1042/bst0370937
- Korthuis, R. J., Granger, D. N., Townsley, M. I., & Taylor, A. E. (1985). The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ Res*, *57*(4), 599-609.
- Kraemer, W. J., Adams, K., Cafarelli, E., Dudley, G. A., Dooly, C., Feigenbaum, M. S., . . . Triplett-McBride, T. (2002). American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*, *34*(2), 364-380.
- Kraemer, W. J., Ratamess, N. A., Volek, J. S., Hakkinen, K., Rubin, M. R., French, D. N., . . . Dioguardi, F. S. (2006). The effects of amino acid supplementation on hormonal responses to resistance training overreaching. *Metabolism*, *55*(3), 282-291. doi: 10.1016/j.metabol.2005.08.023
- Kubo, K., Komuro, T., Ishiguro, N., Tsunoda, N., Sato, Y., Ishii, N., . . . Fukunaga, T. (2006). Effects of low-load resistance training with vascular occlusion on the mechanical properties of muscle and tendon. *J Appl Biomech*, *22*(2), 112-119.
- Kubota, A., Sakuraba, K., Sawaki, K., Sumide, T., & Tamura, Y. (2008). Prevention of disuse muscular weakness by restriction of blood flow. *Med Sci Sports Exerc*, *40*(3), 529-534. doi: 10.1249/MSS.0b013e31815ddac6
- Labeit, S., Kohl, C. H., Witt, C. C., Labeit, D., Jung, J., & Granzier, H. (2010). Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *J Biomed Biotechnol*, *2010*, 693741. doi: 10.1155/2010/693741
- Lagirand-Cantaloube, J., Cornille, K., Csibi, A., Batonnet-Pichon, S., Leibovitch, M. P., & Leibovitch, S. A. (2009). Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS One*, *4*(3), e4973. doi: 10.1371/journal.pone.0004973
- Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M. P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L. A., . . . Leibovitch, S. A. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo j*, *27*(8), 1266-1276. doi: 10.1038/emboj.2008.52
- Lang, C. H., Huber, D., & Frost, R. A. (2007). Burn-induced increase in atrogen-1 and MuRF-1 in skeletal muscle is glucocorticoid independent but downregulated by

IGF-I. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(1), R328-336. doi: 10.1152/ajpregu.00561.2006

Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., & Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 78(1), 247-306.

Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., . . . Gautel, M. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, 308(5728), 1599-1603. doi: 10.1126/science.1110463

Laurentino, G., Ugrinowitsch, C., Aihara, A. Y., Fernandes, A. R., Parcell, A. C., Ricard, M., & Tricoli, V. (2008). Effects of strength training and vascular occlusion. *Int J Sports Med*, 29(8), 664-667. doi: 10.1055/s-2007-989405

Laurentino, G. C., Ugrinowitsch, C., Roschel, H., Aoki, M. S., Soares, A. G., Neves, M., Jr., . . . Tricoli, V. (2012). Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression. *Med Sci Sports Exerc*, 44(3), 406-412. doi: 10.1249/MSS.0b013e318233b4bc

Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*, 17(7), 1807-1819. doi: 10.1681/asn.2006010083

Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., . . . Goldberg, A. L. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb j*, 18(1), 39-51. doi: 10.1096/fj.03-0610com

Lee, S. W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J., & Mitch, W. E. (2004). Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol*, 15(6), 1537-1545.

Leger, B., Cartoni, R., Praz, M., Lamon, S., Deriaz, O., Crettenand, A., . . . Russell, A. P. (2006). Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol*, 576(Pt 3), 923-933. doi: 10.1113/jphysiol.2006.116715

Li, Y. P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D. L., & Reid, M. B. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb j*, 19(3), 362-370. doi: 10.1096/fj.04-2364com

Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Abe, T., & Bemben, M. G. (2012). The anabolic benefits of venous blood flow restriction training may be induced by

muscle cell swelling. *Med Hypotheses*, 78(1), 151-154. doi: 10.1016/j.mehy.2011.10.014

Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Sherk, V. D., Thiebaud, R. S., Abe, T., . . . Bemben, M. G. (2012). Effects of cuff width on arterial occlusion: implications for blood flow restricted exercise. *Eur J Appl Physiol*, 112(8), 2903-2912. doi: 10.1007/s00421-011-2266-8

Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Thiebaud, R. S., Mattocks, K. T., Abe, T., & Bemben, M. G. (2013). Blood flow restriction pressure recommendations: a tale of two cuffs. *Front Physiol*, 4, 249. doi: 10.3389/fphys.2013.00249

Loenneke, J. P., Fahs, C. A., Wilson, J. M., & Bemben, M. G. (2011). Blood flow restriction: the metabolite/volume threshold theory. *Med Hypotheses*, 77(5), 748-752. doi: 10.1016/j.mehy.2011.07.029

Loenneke, J. P., Thiebaud, R. S., & Abe, T. (2014). Does blood flow restriction result in skeletal muscle damage? A critical review of available evidence. *Scand J Med Sci Sports*, 24(6), e415-422. doi: 10.1111/sms.12210

Loenneke, J. P., Thiebaud, R. S., Abe, T., & Bemben, M. G. (2014). Blood flow restriction pressure recommendations: the hormesis hypothesis. *Med Hypotheses*, 82(5), 623-626. doi: 10.1016/j.mehy.2014.02.023

Loenneke, J. P., Thiebaud, R. S., Fahs, C. A., Rossow, L. M., Abe, T., & Bemben, M. G. (2013). Blood flow restriction does not result in prolonged decrements in torque. *Eur J Appl Physiol*, 113(4), 923-931. doi: 10.1007/s00421-012-2502-x

Lokireddy, S., McFarlane, C., Ge, X., Zhang, H., Sze, S. K., Sharma, M., & Kambadur, R. (2011). Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol Endocrinol*, 25(11), 1936-1949. doi: 10.1210/me.2011-1124

Lokireddy, S., Wijesoma, I. W., Sze, S. K., McFarlane, C., Kambadur, R., & Sharma, M. (2012). Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(5), C512-529. doi: 10.1152/ajpcell.00402.2011

Louis, E., Raue, U., Yang, Y., Jemiolo, B., & Trappe, S. (2007). Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 103(5), 1744-1751. doi: 10.1152/jappphysiol.00679.2007

Madarame, H., Sasaki, K., & Ishii, N. (2010). Endocrine responses to upper- and lower-limb resistance exercises with blood flow restriction. *Acta Physiol Hung*, 97(2), 192-200. doi: 10.1556/APhysiol.97.2010.2.5

- Manini, T. M., Vincent, K. R., Leeuwenburgh, C. L., Lees, H. A., Kavazis, A. N., Borst, S. E., & Clark, B. C. (2011). Myogenic and proteolytic mRNA expression following blood flow restricted exercise. *Acta Physiol (Oxf)*, *201*(2), 255-263. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02172.x
- Manini, T. M., Yarrow, J. F., Buford, T. W., Clark, B. C., Conover, C. F., & Borst, S. E. (2012). Growth hormone responses to acute resistance exercise with vascular restriction in young and old men. *Growth Horm IGF Res*, *22*(5), 167-172. doi: 10.1016/j.ghir.2012.05.002
- Marcotte, G. R., West, D. W., & Baar, K. (2015). The molecular basis for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *Calcif Tissue Int*, *96*(3), 196-210. doi: 10.1007/s00223-014-9925-9
- Mascher, H., Tannerstedt, J., Brink-Elfegoun, T., Ekblom, B., Gustafsson, T., & Blomstrand, E. (2008). Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *294*(1), E43-51. doi: 10.1152/ajpendo.00504.2007
- McCall, G. E., Byrnes, W. C., Dickinson, A., Pattany, P. M., & Fleck, S. J. (1996). Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *J Appl Physiol (1985)*, *81*(5), 2004-2012.
- McCall, G. E., Byrnes, W. C., Fleck, S. J., Dickinson, A., & Kraemer, W. J. (1999). Acute and chronic hormonal responses to resistance training designed to promote muscle hypertrophy. *Can J Appl Physiol*, *24*(1), 96-107.
- McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., & Gregorio, C. C. (2002). Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol*, *157*(1), 125-136. doi: 10.1083/jcb.200108089
- Meneghel, A. J., Verlengia, R., Crisp, A. H., Aoki, M. S., Nosaka, K., da Mota, G. R., & Lopes, C. R. (2014). Muscle damage of resistance-trained men after two bouts of eccentric bench press exercise. *J Strength Cond Res*, *28*(10), 2961-2966. doi: 10.1519/jsc.0000000000000494
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., & Weissman, A. M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci*, *125*(Pt 3), 531-537. doi: 10.1242/jcs.091777
- Meyer, R. A. (2006). Does blood flow restriction enhance hypertrophic signaling in skeletal muscle? *J Appl Physiol (1985)*, *100*(5), 1443-1444. doi: 10.1152/jappphysiol.01636.2005

- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., Bellamy, L., Parise, G., Baker, S. K., & Phillips, S. M. (2013). Muscular and systemic correlates of resistance training-induced muscle hypertrophy. *PLoS One*, 8(10), e78636. doi: 10.1371/journal.pone.0078636
- Moylan, J. S., Smith, J. D., Chambers, M. A., McLoughlin, T. J., & Reid, M. B. (2008). TNF induction of atrogin-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-Foxo1/3 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(4), C986-993. doi: 10.1152/ajpcell.00041.2008
- Murton, A. J., Constantin, D., & Greenhaff, P. L. (2008). The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1782(12), 730-743. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.011
- Nader, G. A. (2005). Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(10), 1985-1996. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.026
- Nakajima, T., Kurano, M., Iida, H., Takano, H., Oonuma, H., Morita, T., . . . Nagata, T. (2006). Use and safety of KAATSU training: Results of a national survey. *Int. J. KAATSU Training Res.*, 2(1), 5-13.
- Nielsen, J. L., Aagaard, P., Bech, R. D., Nygaard, T., Hvid, L. G., Wernbom, M., . . . Frandsen, U. (2012). Proliferation of myogenic stem cells in human skeletal muscle in response to low-load resistance training with blood flow restriction. *J Physiol*, 590(Pt 17), 4351-4361. doi: 10.1113/jphysiol.2012.237008
- Ochala, J., Gustafson, A. M., Diez, M. L., Renaud, G., Li, M., Aare, S., . . . Larsson, L. (2011). Preferential skeletal muscle myosin loss in response to mechanical silencing in a novel rat intensive care unit model: underlying mechanisms. *J Physiol*, 589(Pt 8), 2007-2026. doi: 10.1113/jphysiol.2010.202044
- Ogasawara, R., Kobayashi, K., Tsutaki, A., Lee, K., Abe, T., Fujita, S., . . . Ishii, N. (2013). mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 114(7), 934-940. doi: 10.1152/jappphysiol.01161.2012
- Ottenheijm, C. A., van Hees, H. W., Heunks, L. M., & Granzier, H. (2011). Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300(2), L161-166. doi: 10.1152/ajplung.00288.2010
- Ozaki, H., Sakamaki, M., Yasuda, T., Fujita, S., Ogasawara, R., Sugaya, M., . . . Abe, T. (2011). Increases in thigh muscle volume and strength by walk training with leg blood flow reduction in older participants. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 66(3), 257-263. doi: 10.1093/gerona/glq182

- Pearson, S. J., & Hussain, S. R. (2015). A review on the mechanisms of blood-flow restriction resistance training-induced muscle hypertrophy. *Sports Med*, 45(2), 187-200. doi: 10.1007/s40279-014-0264-9
- Phillips, S. M. (2009). Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3), 403-410. doi: 10.1139/h09-042
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Aarsland, A., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1997). Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), E99-107.
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Ferrando, A. A., & Wolfe, R. R. (1999). Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), E118-124.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70, 503-533. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.503
- Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell*, 116(2), 181-190.
- Pizon, V., Iakovenko, A., Van Der Ven, P. F., Kelly, R., Fatu, C., Furst, D. O., . . . Gautel, M. (2002). Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci*, 115(Pt 23), 4469-4482.
- Polge, C., Heng, A. E., Jarzaguet, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., . . . Taillandier, D. (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb j*, 25(11), 3790-3802. doi: 10.1096/fj.11-180968
- Pope, Z. K., Willardson, J. M., & Schoenfeld, B. J. (2013). Exercise and blood flow restriction. *J Strength Cond Res*, 27(10), 2914-2926. doi: 10.1519/JSC.0b013e3182874721
- Raastad, T., Paulsen, G., Refsnes, P. E., Ronnestad, B. R., & Wisnes, A. R. (2010). *Styrketrening - i teori og praksis*. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
- Raue, U., Slivka, D., Jemiolo, B., Hollon, C., & Trappe, S. (2007). Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62(12), 1407-1412.
- Reeves, G. V., Kraemer, R. R., Hollander, D. B., Clavier, J., Thomas, C., Francois, M., & Castracane, V. D. (2006). Comparison of hormone responses following light resistance exercise with partial vascular occlusion and moderately difficult

- resistance exercise without occlusion. *J Appl Physiol* (1985), 101(6), 1616-1622. doi: 10.1152/jappphysiol.00440.2006
- Reid, M. B. (2005). Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(6), R1423-1431. doi: 10.1152/ajpregu.00545.2004
- Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I. C., Schjerling, P., van Hall, G., . . . Holm, L. (2014). Positive muscle protein net balance and differential regulation of atrogene expression after resistance exercise and milk protein supplementation. *Eur J Nutr*, 53(1), 321-333. doi: 10.1007/s00394-013-0530-x
- Rønnestad, B. R., Nygaard, H., & Raastad, T. (2011). Physiological elevation of endogenous hormones results in superior strength training adaptation. *Eur J Appl Physiol*, 111(9), 2249-2259. doi: 10.1007/s00421-011-1860-0
- Sacheck, J. M., Hyatt, J. P., Raffaello, A., Jagoe, R. T., Roy, R. R., Edgerton, V. R., . . . Goldberg, A. L. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb j*, 21(1), 140-155. doi: 10.1096/fj.06-6604com
- Sacheck, J. M., Ohtsuka, A., McLary, S. C., & Goldberg, A. L. (2004). IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(4), E591-601. doi: 10.1152/ajpendo.00073.2004
- Sandri, M. (2013). Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2121-2129. doi: 10.1016/j.biocel.2013.04.023
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z. P., Lecker, S. H., . . . Spiegelman, B. M. (2006). PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16260-16265. doi: 10.1073/pnas.0607795103
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., . . . Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
- Sato, Y. (2005). The history and future of KAATSU Training. *International Journal of KAATSU Training Research*, 1(1), 1-5.
- Schoenfeld, B. J. (2010). The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res*, 24(10), 2857-2872. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181e840f3

- Schoenfeld, B. J. (2013). Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. *Sports Med*, 43(3), 179-194. doi: 10.1007/s40279-013-0017-1
- Scott, B. R., Slattery, K. M., Sculley, D. V., & Dascombe, B. J. (2014). Hypoxia and resistance exercise: a comparison of localized and systemic methods. *Sports Med*, 44(8), 1037-1054. doi: 10.1007/s40279-014-0177-7
- Senf, S. M., Dodd, S. L., & Judge, A. R. (2010). FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(1), C38-45. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2009
- Shinohara, M., Kouzaki, M., Yoshihisa, T., & Fukunaga, T. (1998). Efficacy of tourniquet ischemia for strength training with low resistance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 77(1-2), 189-191.
- Stefanetti, R. J., Lamon, S., Rahbek, S. K., Farup, J., Zacharewicz, E., Wallace, M. A., . . . Vissing, K. (2014). Influence of divergent exercise contraction mode and whey protein supplementation on atrogen-1, MuRF1, and FOXO1/3A in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 116(11), 1491-1502. doi: 10.1152/jappphysiol.00136.2013
- Stefanetti, R. J., Lamon, S., Wallace, M., Vendelbo, M. H., Russell, A. P., & Vissing, K. (2014). Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflugers Arch*. doi: 10.1007/s00424-014-1587-y
- Stefanetti, R. J., Zacharewicz, E., Della Gatta, P., Garnham, A., Russell, A. P., & Lamon, S. (2014). Ageing has no effect on the regulation of the ubiquitin proteasome-related genes and proteins following resistance exercise. *Front Physiol*, 5, 30. doi: 10.3389/fphys.2014.00030
- Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W. O., . . . Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 14(3), 395-403.
- Stupka, N., Tarnopolsky, M. A., Yardley, N. J., & Phillips, S. M. (2001). Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol (1985)*, 91(4), 1669-1678.
- Suga, T., Okita, K., Morita, N., Yokota, T., Hirabayashi, K., Horiuchi, M., . . . Tsutsui, H. (2010). Dose effect on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol (1985)*, 108(6), 1563-1567. doi: 10.1152/jappphysiol.00504.2009

- Suga, T., Okita, K., Morita, N., Yokota, T., Hirabayashi, K., Horiuchi, M., . . . Tsutsui, H. (2009). Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol (1985)*, *106*(4), 1119-1124.
- Suga, T., Okita, K., Takada, S., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Yokota, T., . . . Tsutsui, H. (2012). Effect of multiple set on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *Eur J Appl Physiol*, *112*(11), 3915-3920. doi: 10.1007/s00421-012-2377-x
- Takada, S., Okita, K., Suga, T., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Sato, T., . . . Tsutsui, H. (2012). Low-intensity exercise can increase muscle mass and strength proportionally to enhanced metabolic stress under ischemic conditions. *J Appl Physiol (1985)*, *113*(2), 199-205. doi: 10.1152/jappphysiol.00149.2012
- Takano, H., Morita, T., Iida, H., Asada, K., Kato, M., Uno, K., . . . Nakajima, T. (2005). Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. *Eur J Appl Physiol*, *95*(1), 65-73. doi: 10.1007/s00421-005-1389-1
- Takarada, Y., Nakamura, Y., Aruga, S., Onda, T., Miyazaki, S., & Ishii, N. (2000). Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. *J Appl Physiol (1985)*, *88*(1), 61-65.
- Takarada, Y., Sato, Y., & Ishii, N. (2002). Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *Eur J Appl Physiol*, *86*(4), 308-314.
- Takarada, Y., Takazawa, H., & Ishii, N. (2000). Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc*, *32*(12), 2035-2039.
- Takarada, Y., Takazawa, H., Sato, Y., Takebayashi, S., Tanaka, Y., & Ishii, N. (2000). Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *J Appl Physiol (1985)*, *88*(6), 2097-2106.
- Takarada, Y., Tsuruta, T., & Ishii, N. (2004). Cooperative effects of exercise and occlusive stimuli on muscular function in low-intensity resistance exercise with moderate vascular occlusion. *Jpn J Physiol*, *54*(6), 585-592.
- Thompson, H. S., & Scordilis, S. P. (1994). Ubiquitin changes in human biceps muscle following exercise-induced damage. *Biochem Biophys Res Commun*, *204*(3), 1193-1198. doi: 10.1006/bbrc.1994.2589
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., & Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo j*, *19*(1), 94-102. doi: 10.1093/emboj/19.1.94

- Tintignac, L. A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M. P., & Leibovitch, S. A. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, *280*(4), 2847-2856. doi: 10.1074/jbc.M411346200
- Umbel, J. D., Hoffman, R. L., Dearth, D. J., Chleboun, G. S., Manini, T. M., & Clark, B. C. (2009). Delayed-onset muscle soreness induced by low-load blood flow-restricted exercise. *Eur J Appl Physiol*, *107*(6), 687-695. doi: 10.1007/s00421-009-1175-6
- Volek, J. S., Ratamess, N. A., Rubin, M. R., Gomez, A. L., French, D. N., McGuigan, M. M., . . . Kraemer, W. J. (2004). The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *Eur J Appl Physiol*, *91*(5-6), 628-637. doi: 10.1007/s00421-003-1031-z
- Wernbom, M., Augustsson, J., & Raastad, T. (2008). Ischemic strength training: a low-load alternative to heavy resistance exercise? *Scand J Med Sci Sports*, *18*(4), 401-416. doi: 10.1111/j.1600-0838.2008.00788.x
- Wernbom, M., Augustsson, J., & Thomee, R. (2006). Effects of vascular occlusion on muscular endurance in dynamic knee extension exercise at different submaximal loads. *J Strength Cond Res*, *20*(2), 372-377. doi: 10.1519/r-16884.1
- Wernbom, M., Järrebring, R., Andreasson, M. A., & Augustsson, J. (2009). Acute effects of blood flow restriction on muscle activity and endurance during fatiguing dynamic knee extensions at low load. *J Strength Cond Res.*, *23*(8), 2389-2395.
- Wernbom, M., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Hisdal, J., & Raastad, T. (2012). Contractile function and sarcolemmal permeability after acute low-load resistance exercise with blood flow restriction. *Eur J Appl Physiol*, *112*(6), 2051-2063. doi: 10.1007/s00421-011-2172-0
- West, D. W., Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R., Staples, A. W., Holwerda, A. M., . . . Phillips, S. M. (2010). Elevations in ostensibly anabolic hormones with resistance exercise enhance neither training-induced muscle hypertrophy nor strength of the elbow flexors. *J Appl Physiol (1985)*, *108*(1), 60-67. doi: 10.1152/jappphysiol.01147.2009
- West, D. W., Kujbida, G. W., Moore, D. R., Atherton, P., Burd, N. A., Padzik, J. P., . . . Phillips, S. M. (2009). Resistance exercise-induced increases in putative anabolic hormones do not enhance muscle protein synthesis or intracellular signalling in young men. *J Physiol*, *587*(Pt 21), 5239-5247. doi: 10.1113/jphysiol.2009.177220

- West, D. W., & Phillips, S. M. (2010). Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. *Phys Sportsmed*, 38(3), 97-104. doi: 10.3810/psm.2010.10.1814
- Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Grant, E. J., Correia, C. E., & Phillips, S. M. (2006). Hypertrophy with unilateral resistance exercise occurs without increases in endogenous anabolic hormone concentration. *Eur J Appl Physiol*, 98(6), 546-555. doi: 10.1007/s00421-006-0300-z
- Willis, M. S., Ike, C., Li, L., Wang, D. Z., Glass, D. J., & Patterson, C. (2007). Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res*, 100(4), 456-459. doi: 10.1161/01.res.0000259559.48597.32
- Willoughby, D. S., Taylor, M., & Taylor, L. (2003). Glucocorticoid receptor and ubiquitin expression after repeated eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 35(12), 2023-2031. doi: 10.1249/01.mss.0000099100.83796.77
- Wing, S. S. (2013). Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol*, 45(10), 2130-2135. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.002
- Witt, S. H., Granzier, H., Witt, C. C., & Labeit, S. (2005). MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 350(4), 713-722. doi: 10.1016/j.jmb.2005.05.021
- Yang, Y., Jemiolo, B., & Trappe, S. (2006). Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol (1985)*, 101(5), 1442-1450. doi: 10.1152/jappphysiol.00438.2006
- Yasuda, T., Brechue, W. F., Fujita, T., Shirakawa, J., Sato, Y., & Abe, T. (2009). Muscle activation during low-intensity muscle contractions with restricted blood flow. *J Sports Sci.*, 27(5), 479-489.
- Yasuda, T., Fukumura, K., Fukuda, T., Uchida, Y., Iida, H., Meguro, M., . . . Nakajima, T. (2014). Muscle size and arterial stiffness after blood flow-restricted low-intensity resistance training in older adults. *Scand J Med Sci Sports*, 24(5), 799-806. doi: 10.1111/sms.12087
- Zeng, H., Kaul, S., & Simons, S. S., Jr. (2000). Genomic organization of human GMEB-1 and rat GMEB-2: structural conservation of two multifunctional proteins. *Nucleic Acids Res*, 28(8), 1819-1829.

Tabelloversikt

Tabell 2.1. Oversikt over studier som har studert effekten av okklusjonstrening på muskelstyrke og muskelvekst for kneekstensorer. KE: kneekstensjon/kneekstensorer, QF: quadriceps femoris, MB CSA: muscle-bone cross sectional area.....	16
Tabell 3.1. Oversikt over treningsøktene under intervensjonen.....	36
Tabell 3.2. Antropometriske data for forsøkspersonene (gjennomsnitt \pm SD).....	36
Tabell 3.3. Oversikt over tidspunkter for all testing og trening i studien. Styrketest: test av maksimalt isokinetisk og isometrisk dreiemoment.....	40
Tabell 3.4. Oversikt over primære og sekundære antistoffer benyttet ved Western-Blot analyser.....	47

Figuroversikt

Figur 2.1. Figur som gir oversikt over noen av de mest sannsynlige mekanismene bak muskelveksten som er observert ved okklusjonstrening. Modifisert etter Scott et al (2014) og Pearson og Hussain (2015).	20
Figur 2.2. Figur som beskriver ubiquitineringsprosessen og nedbrytningen av proteiner av 26S proteasom komplekset.	28
Figur 2.3. Oversikt over signalveier som muligens kan regulere ekspresjon av MURF1 og atrogen-1 ved trening. Prikket linje indikerer translokasjon av FOXO til kjernen. (P) indikerer fosforylering. Modifisert etter Sandri (2007) og Glass (2005).	31
Figur 3.1. Oppsettet under okklusjonstrening (1. Datastyrt torniquetsystem. 2. 150 mm bred pneumatisk trykkmansjett).	38
Figur 3.2. Tidsforløpet ved gjennomføring av akuttdager. UL: ultralyd.....	39
Figur 3.3. Test av maksimalt isokinetisk og isometrisk dreiemoment i styrkedynamometer.	41
Figur 3.4. Representative Western Blot for MURF1 og FOXO3a i de ulike fraksjonene.	46
Figur 3.5. Representative Western Blot for ubiquitin i helhomogenat og cytoskjelett. .	47
Figur 4.1. Totalt antall repetisjoner (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) for hver enkelt treningsøkt. Treningsuke 1 og 2 var separert med 10 dager hvile. Forskjeller fra første treningsøkt: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	49
Figur 4.2. A) Totalt antall repetisjoner på akuttdag 1 og 2 for hver enkelt FP. B) Relativ nedgang i maksimalt isometrisk dreiemoment i kneekstensjon fra pre til post på akuttdag 1 og 2 for hver enkelt FP. Forskjeller mellom akuttdag 1 og 2: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	50
Figur 4.3. Muskelstølhhet (DOMS) målt ved Visuell Analog Skala (VAS) fra 0-100 mm for A) proksimale del av m. vastus medialis, B) distale del av m. vastus medialis, C) proksimale del av m. vastus lateralis, D) distale del av m. vastus lateralis (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). Forskjeller fra før første treningsøkt: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	51
Figur 4.4. A) Opplevd anstrengelse målt ved BORG-skala (6-20) og B) opplevd smerte målt ved Borg CR10 (0-10) etter hver enkelt treningsøkt (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). Treningsuke 1 og 2 er separert med 10 dager hvile.	51
Figur 4.5. CK- og myoglobin-konsentrasjon i plasma under treningsuke 1 (A, C) og 2 (B, D) for hver enkelt forsøksperson.	52
Figur 4.6. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) for A) Ubiquitinererte proteiner i helhomogenat, B) Fritt ubiquitin i helhomogenat, C) Ubiquitinererte proteiner i cytoskjelett, D) MURF1 i cytosol, E) MURF1 i nukleær, F)	

MURF1 i cytoskjelett, G) FOXO i cytosol, H) FOXO i nukleær. Forskjeller fra baseline: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	54
Figur 4.7. Endring fra baseline ved akutt dag 1 og 2 for A) mengden ubiquitinerte proteiner i helhomogenat, og B) mengden FOXO i cytosol. Respons ved akutt 1 forskjellig fra akutt 2: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	55
Figur 4.8. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) i muskelfiberareal for A) type I muskelfibre og B) type II muskelfibre. Hver enkelt FP markert med sirkel (n = 11). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	55
Figur 4.9. Relative endringer fra baseline (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall) i muskeltykkelse for m. vastus lateralis. Hver enkelt FP markert med sirkel. Forskjell fra baseline: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	56
Figur 4.10. Relative endringer fra baseline for 1RM kneekstensjon (gjennomsnitt \pm 95% konfidensintervall). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$	57

Vedlegg

Vedlegg 1: Informasjonsskriv og samtykkeskjema

Forespørsel om deltakelse som forsøksperson

Styrketrening med redusert blodstrøm og muskelhukommelse

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

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

Bakgrunn og hensikt med forsøket

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

Treningsmetoden med redusert blodstrøm kan ha viktige implikasjoner for en bred målgruppe, fra idrettsutøvere til eldre med kraftig redusert muskelmasse (sarkopeni) og

pasienter som skal gjennom en kneoperasjon.

Gjennomføringen av forsøket

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

For at vi skal kunne studere cellulære mekanismer i musklene, må vi ta prøver av musklene dine. Slike muskelprøver (biopsier) vil tas ved flere tidspunkt (se under). Vi vil ta 4 prøver fra hvert lår. Blodprøver vil også tappes fra en vene i armen (vanlig blodprøvetakning). Dette vil bli gjennomført etter oppmøte på hver treningsdag. Det er viktig at du møter opp fastende (ikke spist frokost).

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

Alt i alt vil du møte i laboratoriet vårt 12-15 ganger denne høsten.

Laboratorieoppmøtene for testing og prøvetakninger vil fordeles til før og etter treningsperioden. Vi gjør individuelle avtaler.

Før forsøket

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

Styrketrening med redusert blodstrøm

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

Treningsøkten består av 4 serier med 20 % av maksimal motstand til utmattelse i et kneekstensjonsapparat. Det vil være 30 sekunder pause mellom seriene. Denne trening gjennomføres med ett ben av gangen, og blodstrømmen til arbeidende muskulatur vil være begrenset med ca 50 % pga. trykkmansjetten.

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

Tester og undersøkelser

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

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

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

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

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

muskulaturen, på størrelse med et fyrstikkhode, tas ut.

- Snittet lukkes med tape.

Eventuelle ulemper ved å delta

- Deltakelse i prosjektet vil kreve mye tid og oppmerksomhet. Du må møte ved NIH på totalt 12-14 dager denne høsten
- Trening skal gjennomføres vil medføre en viss risiko for muskelskader, og følelse av sårhet/stølhets i muskulaturen vil du oppleve.
- Trening med redusert blodstrøm kan oppleves som meget ubehagelig, men det er ikke knyttet stor risiko til denne typen trening.
- Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet.
- Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.
- Blodprøvetakning (veneprobe) medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig.
- En MR-skanning medfører at du ligger inne i en trommel og støynivået er betydelig; selv om du har på deg hørselsvern, kan støynivået oppleves som noe ubehagelig.

Personvern

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

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

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

Biobank

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

Innsynsrett og oppbevaring av materiale

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

Informasjon om utfallet av studien

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

Forsikring

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

idrettshøgskole som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringselskap.

Finansiering

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

Publisering

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

Samtykke

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

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

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med

Thomas Bjørnsen på tlf: 98619299, eller

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

Vennlig hilsen

Thomas Bjørnsen (stipendiat)

Truls Raastad (Professor)

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

Vedlegg 2: Western Blot-protokoll

WESTERN BLOT - PROTOKOLL

DAG 0

4 bokser (sett i kjøleskap over natt):

Running buffer: 100 mL MOPS running buffer + 1900 mL ultrarent vann

50 mL MOPS running buffer + 950 mL ultrarent vann

Transfer buffer: 100 mL transfer buffer + 200 mL metanol + 1700 mL ultrarent vann

TBS: 200 mL TBS + 1800 mL ultrarent vann

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

Ultrarent vann: 3 L

Totalproteinmåling. Merk rør (evt. pipetter vann). Skriv ut «Sample preparation mal» (*SFP group -> analyselab -> SOP-prosedyrer*) og «NuPAGE ELFO WB»-skjema.

DAG 1

1. KLARGJØRING. BLANDE PRØVER

- Ta TBS og TBS-T ut av kjøleskapet.
- Sett varmeblokk på 62° C (faktisk temperatur: 70° C). Dobbeltsjekk at den faktisk er påslått, og at riktig blokk står i. Hent ut prøver fra fryseren.
- Bland all sample buffer og reducing agent du trenger i et felles 1,5 ml rør. Mer enn du trenger (x1,5) og multipliser opp med samme faktor for sample buffer og reducing agent!
- Bland prøve, vann, sample buffer og reducing agent i henhold til «sample preparation mal». «Sample preparation mal» finner man under *SFP group -> analyselab -> SOP-prosedyrer*.
- Sett merkede eppendorfrør på varmeblokk i 10 min ved 70°. Sett på stoppeklokke!

2. MENS PRØVEN STÅR PÅ VARMEBLOKK

- Finn fram:
 - 2 geler til hver boks som skal kjøres (4-12% Bis-Tris)
 - Running buffer og antioksidant (Tilsett 2,5 mL antioksidant i 1 L running buffer i egen flaske)
 - Elektroforeseboks (sjekk at de står stødig!)
 - GeneOn markør.
- Husk prøvene på varmeblokka! Prøvene skal spinnes og sentrifugeres kort når du tar de av varmeblokka.

Geler

- Klipp opp plasten på gelene. Tørk av. Ta av hvit tape og fjern kammen.
- Bruk pasteur-pipette til å skylle brønnene med running buffer + antioksidant.
- Sett gelene i boksen med teksten ut (brønnene inn mot midten). Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen.

3. ELEKTROFORESE

- Fyll indre kammer med running buffer + antioksidant til litt over «bjelken» (sjekk at det ikke lekker i ytre kammer).
- Spinn og sentrifuger prøvene. Pipettér i «motsatt rekkefølge» for å få det i riktig rekkefølge når du tar bilde. Før inn i skjema for «NuPAGE ELFO WB» fortløpende.
- Sett 5 uL markør i brønn 1 og 10 på begge sider (bruk 1-10 uL-pipette)
- Sett 33 uL prøve i de øvrige brønnene. (Bruk gul 10-100 uL-pipette)
- Ytre kammer fylles 2/3 fullt med running buffer uten antioksidant (kan være med antioksidant også...)
- Sett på lokk, monter ledninger (rød – rød, svart – svart), slå på og still inn volt (200 V) og trykk på start. Kjør i ca. 60 min – kommer an på. Kjør til den blå fargemarkøren nesten forsvinner.
- Sjekk strømstyrken (A) ved start og slutt. Skal være (ca.) likt. Sjekk også temp. Noteres ned på skjema for «NuPAGE ELFO & WB».
- *Elektroforesen kjøres på ett Brett med is for å hindre for høy temperatur (?)*.
- Sjekk at strømmen lager bobler i indre bufferkammer.

4. MENS ELEKTROFORESEN GÅR – AKTIVERE PVDF-MEMBRANENE

- Finn fram:
 - Transfer buffer og antioksidant (Tilsett 1 mL antioksidant i 1 L transfer buffer)
 - 2 PVDF-membraner per elektroforese-kammer (klipp etter mal). Legg disse i lyseblå boks. Skriv nummer (gel 1, gel 2) øverst i høyre hjørne av membranen.
 - 4 filterpapir og 3 pads per elektroforese-kammer.
- Pads legges i transfer buffer + antioksidant i lilla boks i >15 min (klem ut luftbobler).
- PVDF-membraner aktiveres på følgende måte (i en tilstrekkelig romslig boks):
 - 30 sek i metanol

- 30 sek i dH₂O
- 1-2 min i nytt dH₂O
- 10-15 min i transferbuffer + antioksidant
- Filterpapir legges i transferbuffer i lilla boks like før bruk (30 sek).

5. **BLOTTING**

- Finn frem:
 - blottedelen til boksene
 - lilla bokser
 - pinsett
 - spade, rulle
 - penn, tørkepapir, gul avfallsboks.
- Slå av elektroforeseapparatet, trekk ut ledninger. Ta ut en gel om gangen, og tørk av. Ta ut den fremste gelen først.
- Knekk opp med en spade. Løft av den minste platen fra motsatt side av buen.
- Dra av den øvre platen oppover (løft av fra nederst).
- Kutt av brønnene og kast i gul avfallsboks. Legg vått filterpapir på gelen, og klem lett sammen. Snu opp ned så du har filterpapiret i venstre hånda.
- Sett spaden loddrett ned i sporet (der teipen satt) og trykk lett slik at gelen løsner.
- Løft platen forsiktig opp, og se til at gelen nå sitter på filterpapiret. Hold gjerne en finger nederst på membranen for å sørge for at den sitter igjen på filterpapiret.
- Skjær av nedre del av gelen, og lag sandwich:
 - Pad
 - Filterpapir + Gel 1
 - Membran (bruk rulle for god kontakt)
 - Filterpapir
 - Pad
 - Filterpapir + Gel 2
 - Membran (bruk rulle for god kontakt)
 - Filterpapir
 - Pad
- Skyll elektroforesekammer i dH₂O, og monter sandwichen (i blottmodulen) i kammeret. Trykk godt ned og lukk klemmen. Tøm ut vann.
- Fyll indre kammer med transferbuffer opp til de hvite skruene (sjekk at det ikke lekker).
- Fyll ytre kammer 2/3 fullt med kaldt dH₂O.
- Sett på lokk, monter ledninger. Sjekk at elektrodene sitter i sporene slik de skal.
- Blotting: 30 V, 90 min (still inn tid på nedtelling!). Sjekk strømstyrken (A) ved start og slutt. Skal være (ca.) likt. Sjekk også temp. Noteres ned på skjema for «NuPAGE ELFO & WB».

6. NÅR BLOTTING ER IGANGSATT

- Rydd det som kan ryddes (la det stå igjen en lilla boks per boks du kjører)
- Lag 5 % melkeløsning: 10 g melkepulver + 200 mL TBS-T (røres med magnet).
- **60 min pause.**

7. NÅR BLOTTINGEN ER FERDIG: BLOKKERING

- Tøm 5 % melkeløsning i en lyseblå boks. Fyll dH₂O i en lilla boks.
- Slå av, trekk ut ledninger, ta ut og åpne blotmodulen over lilla plastboks.
- Legg pads i dH₂O (må ikke komme i kontakt med deconex). Filtrene kastes.
- Membraner legges i en boks med melkeløsning og settes på gyrorockeren i 2 timer (hastighet: 20). (kan stå over natt i kjøleskap...)
- Finn glassplate, kniv, linjal, blyant, pasteurpipette, markørvektskjema, og boks med TBS.
- Finn fram rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- Vask elektroforese-kamrene.
- **1 time pause. Ta en treningsøkt!**

8. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- Skyll 2 x 2 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- *Hvis du har blokkert over natt: 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).*

9. MENS DU VASKER - LAG PRIMÆRT ANTISTOFF

- Finn fram antistoff for de fosfoproteinene som skal studeres. Vortex og sentrifuger antistoffene før du bruker de. Noter ned hvilke antistoff du bruker.
- Lag 1 % melkeløsning: Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T i 50 ml rør. *(0,05 g skummet melk pulver + 5 ml TBS-T)*
- Antistoff tines og spinnes ned. Antistoff blandes med 1% melkeløsning.
 - FOXO (1 : 400); 10 mL + 25 uL
 - HSP70 (1 : 4.000); 10 mL + 2,5 uL
 - MURF (1 : 500); 10 mL + 20 uL
 - aB-Crystallin (1 : 4.000) ; 10 mL + 2,5 uL
- *Ubiquitin: 1:500 (ant. membraner x (5mL 1% melk + 10 uL antistoff)). Trenger ikke kutte etterpå hvis du kjører ubiquitin.*

Pipetter 5 mL 1 % melkeløsning i hvert rør, og pipetter primært antistoff i riktig rør.

10. KUTTING

- Bruk pasteurpipette til å fukte glassplaten med TBS fra boksen med TBS du har funnet frem.
- Legg membranen på glassplaten med proteinsiden opp, og bruk linjal og blyant for å tegne opp hvor det skal kuttes (Vær sikker på at du ser på riktig «kart»)
 - FOXO (ca. 75-85 kda - veldig nær HSP70! derav MOPS buffer)
 - HSP70 (70kda)
 - MURF (40 og 55 kda (to bånd))
 - α B-Crystallin (22kda)
- Skriv nytt navn til høyre på hver membrandel, og kutt i vei. Noter ned hvilke nr. som er hva.
- Legg den ferdigkuttete membranen i boksen med TBS.
- Ta membranene opp av boksen med TBS og rull dem med proteinsiden inn (tallet inn).
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7).
- Sett TBS, TBS-T, dH₂O og 5 % melkeløsning i kjøleskap, og vask opp. **Ferdig.**

DAG 2

10. VASKING

- Sjekk at Chemi Doc er påslått. Ta TBS, TBS-T og melkeløsning ut av kjøleskapet (TBS og TBS-T røres og varmes).
- Bruk pinsett for å ta membranene ut av rørene. Ta vare på rørene med antistoffer (Tilsett ProClin – 10uL / 5 mL).
- Skyll membranene 2x i TBS-T.
- 15 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

11. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF

- Lag 1 % melkeløsning: Bland 20 mL 5 % melkeløsning med 80 mL TBS-T med magnet. (0,15g skummet melk pulver + 15ml TBS-T)
- Finn frem sekundært antistoff. Noter ned hvilket antistoff du bruker. Vortex og sentrifuger.
- Tilsett 30 mL 1 % melkeløsning i 50ml rør, og tilsett 1 eller 10 µL sekundært antistoff
 - HSP70 og aB-C: goat-anti-mouse konjugat, (1 : 30.000); 30 mL + 1 uL
 - Ubiquitin, Foxo og Murf: Anti-rabbit IGg HRP-linked, (1 : 3.000); 30 mL + 10 uL
- Legg membranene i løsningen med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm. **60 min pause – spis litt**

12. VASKING

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

13. BILDER

- Mens membranene vaskes: Finn fram et lite rør (15ml) og pakk det inn i aluminiumsfolie.
- Bland substratvæske i røret (6ml + 6ml), vortex røret og sett i mørkt skap (omtrent 1 mL total mengde per bilde).
- Legg på membranene i maskina med proteinsida opp (la de være litt våte av TBS). Pass på at det ikke er noen luftbobler. Posisjoner membranene rett og midt i og ta vanlig bilde (> custom > membrane).
- Dekk membranene helt med substratvæske. Vent 2-3 minutter.
- Lag oppsett for billedtagningen. Velg: *new single channel* → *blots* → *chemi hi sensitivity*.

- Ta bilder med proteinsiden opp. Velg et bilde og lagre. Legg membranene i boks med TBS.

----- Tørk og frys ned membranene med mindre du skal strippe...

14. STRIPPING, VASKING OG BLOKKERING

- Skyll membranene 2-3 ganger i TBS-T.
- Strip membranene med «Restore PLUS Western blot stripping buffer» i 10 min på gyrorocker
- Skyll membranene 5 x 1 min i dH₂O. Benytt ny plastboks.
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Lag 5% melkeløsning og blokkér i 60 min.
- Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T (forberedelse til antistoff-inkubering)
- Finn fram rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- **45 min pause.**

15. VASKING

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

16. INKUBERING I PRIMÆRT ANTISTOFF (TOTAL-PROTEINER)

- Finn fram antistoff for de total-proteiner som skal studeres (se tidl.).
- Antistoff tines og spennes ned.
- Pipetter 5 mL eller 10 mL 1 % melkeløsning i hvert rør/boks, samt riktig primært antistoff.
- Ta membranene opp av TBS-T-løsningen og rull dem med proteinsiden inn (tallet inn).
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7).
- Sett TBS, TBS-T og 5 % melkeløsning i kjøleskap.
- Rydd/vask!
- **Ferdig for dagen!**

DAG 3

17. VASKING

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

18. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF

- Lag 1 % melkeløsning: Bland 20 mL 5 % melkeløsning med 80 mL TBS-T med magnet.
- Lag sekundært antistoff. Sjekk tidligere for blandingsforhold.
- Legg membranene i løsningen med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- **60 min pause.**

19. VASKING

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

20. BILDER

- Mens membranene vaskes: Finn fram et lite rør (15ml) og pakk det inn i aluminiumsfolie.
- Bland substratvæske i røret (6ml + 6ml), vend på røret og sett i mørkt skap (omtrent 1 mL total mengde per bilde).
- Legg på membranene i maskina med proteinsida opp (la de være litt våte av TBS). Pass på at det ikke er noen luftbobler. Posisjoner membranene rett og midt i og ta vanlig blide (> custom > membrane).
- Dekk membranene helt med substratvæske. Vent 2-3 minutter.
- Lag oppsett for billedtagningen. Velg: *new single channel* → *blots* → *chemi hi sensitivity*.
- Ta bilder med proteinsiden opp. Velg et bilde og lagre. Legg membranene i boks med TBS.
- Membraner det skal gjøres flere analyser på, vaskes og fryses ned.
- Rydd/vask!