

Knut Sindre Mølmen

Kan kroppens totale energiomsetning påvirke de muskulære tilpasningene til utholdenhetstrening?

Treningstilpasninger etter 5 ukers kneekstensjonstrening med eller uten samtidig trening av armene

Masteroppgave i idrettsvitenskap

Seksjon for fysisk prestasjonsevne

Norges idrettshøgskole, 2015

Sammendrag

Formål: Formålet med denne studien var å undersøke om de muskulære tilpasningene til utholdenhetstrening påvirkes av kroppens totale energiomsetning.

Metode: Elleve moderat utholdenhetstrete personer (52 ± 6 ml·kg⁻¹·min⁻¹; 27 ± 5 år) ble rekruttert og fullførte studien. Forsøkspersonene trente ettbeins kneekstensjoner (1KE) med venstre og høyre bein separat. Det ene beinet (randomisert) trente samtidig med dette armsykling (1B2A), mens overkroppen var i ro når det andre beinet trente (1B). Begge beina trente 20-30 min submaksimal 1KE tre-fire g/uka i 5 uker med identisk treningsbelastning. Før og etter treningsperioden ble det gjennomført maksimale og submaksimale tester med 1KE (henholdsvis $1KE_{maks}$ og $1KE_{submaks}$) i tillegg til maksimale tester med kun armsykling og ordinær ergometersykling. Det maksimale/høyeste oksygenopptaket per tidsenhet (ergometersykling: $\dot{V}O_{2maks}$; 1KE og armsykling: $\dot{V}O_{2peak}$) ble målt pulmonært. Etter treningsperioden ble biopsier tatt av forsøkspersonenes bein. Disse ble seinere analysert for kapillarisering og konsentrasjon av oksidative enzymer.

Resultater: Treningen gav økning i 1KE $\dot{V}O_{2peak}$ for 1B2A-beinet ($8\% \pm 10\%$; $p < 0,05$; $ES=0,39$), men ingen signifikant endring for 1B-beinet ($4\% \pm 9\%$; $p=0,11$; $ES=0,24$). Det var imidlertid ingen forskjell i endring mellom beina ($p=0,41$; $ES=0,12$). I tillegg økte $\dot{V}O_{2peak}$ ved armsykling ($8\% \pm 8\%$; $p < 0,01$; $ES=0,27$) og $\dot{V}O_{2maks}$ ved ergometersykling ($3\% \pm 3\%$; $p < 0,01$; $ES=0,15$). Ved $1KE_{submaks}$ gav treningen redusert laktat (La^-), hjertefrekvens (HF) og $\dot{V}O_2$ (bedret arbeidsøkonomi).

Under 1B2A-treningen var total aerob energiomsetning og katekolaminrespons større enn ved 1B-trening. Dette førte imidlertid ikke til større økning i $\dot{V}O_{2peak}$, høyeste oppnådde effekt eller tid til utmattelse (TTU) ved $1KE_{maks}$ og gav ikke forskjell i reduksjon av La^- , HF eller $\dot{V}O_2$ ved $1KE_{submaks}$. Etter treningsperioden var det heller ingen forskjell i kapillarisering eller konsentrasjon av oksidative enzymer mellom beina.

Konklusjon: Fem ukers 1KE-trening med og uten samtidig trening av armene gav samme treningsrespons til tross for at den totale aerobe energiomsetningen og katekolaminresponsen var forskjellig mellom treningsøvelsene.

Nøkkelord: ettbeins kneekstensjoner, armsykling, treningstilpasning, katekolaminer, systemisk stress, oksygenopptak, kapillarisering, oksidative enzymer

Innhold

Sammendrag	III
Innhold.....	V
Forord	7
1. Innledning	8
1.1 Problemstilling	9
2. Teori.....	10
2.1. Hva bestemmer utholdenhetsprestasjonen?	10
2.1.1. $\dot{V}O_2$ maks.....	10
2.1.2. Utnyttingsgrad	11
2.1.3. Arbeidsøkonomi	11
2.2. Treningstilpasning	11
2.2.1. Sentrale faktorer.....	11
2.2.2. Lokale faktorer	12
2.3. Muskelens metabolske kapasitet	13
2.4. Hva gir lokale tilpasninger i muskulaturen?.....	14
2.4.1. Systemisk stress – mulig påvirkning?.....	16
2.4.2. Trening av helkropp og med liten aktiv muskelmasse	17
3. Metode	21
3.1. Forsøkspersoner	21
3.2. Eksperimentelt design	21
3.3. Forsøksprotokoll	23
3.3.1. Tilvenning.....	23
3.3.2. Treningen.....	25
3.3.3. Måling av maksimalt oksygenopptak	26
3.3.4. Måling av katekolaminer og arbeidsøkonomi	29
3.3.5. Muskelbiopsier	29
3.4. Muskelanalyser	30
3.4.1. Snitting av muskelbiopsier	30
3.4.2. Immunhistokjemi.....	31
3.4.3. Mikroskopi.....	32
3.4.4. Kvantifisering av muskelfibre, muskelfibertype og kapillarisering	32
3.4.5. Homogenisering.....	36
3.4.6. Proteinmåling.....	36
3.4.7. Western Blot	37

3.5. Pilotstudier	38
3.5.1. Near-infrared spectroscopy.....	39
3.6. Statistikk	39
4. Resultater	41
4.1. Treningen.....	41
4.2. Resultater fra $1KE_{maks}$	42
4.3. Resultater fra $1KE_{submaks}$	43
4.4. Biopsidata	45
4.4.1. Muskelfiberareal og muskelfibertetthet.....	45
4.4.2. Muskelfibertype.....	45
4.4.3. Kapillarisering	46
4.4.4. Oksidative enzymer	46
4.5. $\dot{V}O_2$ under armsykling og ergometersykling.....	47
5. Diskusjon	48
5.1. Systemisk stress.....	48
5.2. Hvorfor var ikke treningsresponsen forskjellig?	48
5.3. Katekolaminrespons	50
5.4. Tilpasninger som følge av treningen	50
5.4.1. Ettbeins kneekstensjon.....	50
5.4.2. Muskelanalyser	52
5.4.3. Armsykling	53
5.4.4. Sentrale faktorer.....	54
5.5. Konklusjon	55
6. Perspektiver	56
Referanser	58
Tabelloversikt.....	67
Figuroversikt	68
Forkortelser og akronymer	69
Vedlegg.....	71

Forord

Jeg ønsker først å takke mine veiledere Bjarne og Jostein for meget solid oppfølging underveis i prosjektet. Det har vært veldig lærerikt og spennende å jobbe sammen med dere!

Våre forsøkspersoner; tusen takk for at dere tok dere tid i en travel jobb- og skolehverdag for å være med i et ganske sært treningsopplegg. Takk for innsatsen! Håper dere med tiden vil få et normalt forhold til kneekstensjoner igjen!

Takk til Svein, Ingrid, Hege og Kristoffer for god opplæring på de ulike laboratoriene. En stor takk også til Sigve og Amund for gode innspill og hjelp på laben.

Må også få takke biopsiteamet som gjorde en glimrende jobb og stilte opp på forsøkspersonenes foretrukne tidspunkt. Da går det an å koordinere et forskningsprosjekt!

Carlo, takk for god hjelp med blodprøvetakingen og for å ha utvidet mitt italienske vokabular de gangene NIRS-programvaren nektet å samarbeide!

Vil også takke avdeling for spesialisert endokrinologi ved Oslo Universitetssykehus for et flott samarbeid.

Til slutt vil jeg takke opptil flere kull med medstudenter for et bra studentmiljø og til quizlaget på Kringsjø Pub og Høydehuset fordi de hadde lyst til å bli nevnt her.

Når du nå har lest deg gjennom forordet, kan du liksågodt lese litt videre. God fornøyelse!

Knut Sindre Mølmen

Sognsvann, oktober 2015

1. Innledning

Utholdenhetsprestasjon bestemmes av både sentrale og lokale faktorer i menneskekroppen, der sentrale faktorer avgjør O₂-leveransen til organer og vev og lokale faktorer bestemmer hvor stor andel av denne O₂-leveransen som blir tatt opp og omsatt til energi (Bassett & Howley, 2000; Saltin, 1988). De sentrale faktorene synes å være den dominerende begrensningen for det maksimale oksygenopptaket per tidsenhet ($\dot{V}O_{2\text{maks}}$), mens lokale faktorer hovedsakelig bestemmer utnyttingsgraden (Bassett & Howley, 2000; Joyner & Coyle, 2008; Saltin & Calbet, 2006). Imidlertid kan både sentrale og lokale faktorer påvirkes med systematisk utholdenhetstrening (Jones & Carter, 2000).

At $\dot{V}O_{2\text{maks}}$ er begrenset av sentrale faktorer betyr at det kardiovaskulære systemet kun kan forsyne en viss størrelse aktiv muskelmasse under intensivt arbeid (<10 kg) uten at blodgjennomstrømningen, og derigjennom O₂-opptaket per kilo aktiv muskel, må reduseres (Andersen & Saltin, 1985; Richardson, Kennedy, Knight, & Wagner, 1995; Secher, Clausen, Klausen, Noer, & Trap-Jensen, 1977). Dette forklarer hvorfor maksimale ettbeins kneekstensjoner (1KE; ~2-2,5 kg aktiv muskelmasse) gir ~3 ganger høyere massespesifikk energiomsetning lokalt i den arbeidende muskulaturen enn maksimal ergometersykling (~20-25 kg aktiv muskelmasse). Det betyr også at ved submaksimale treningsbelastninger vil den lokale, massespesifikke energiomsetningen være høyere ved 1KE enn ved sykling (Knight *et al.*, 1992; Krustrup, Jones, Wilkerson, Calbet, & Bangsbo, 2009).

Selv om man kunne tenke seg at en høy muskulær aerob energiomsetning er viktig for hvor mye musklene tilpasser seg trening, ser dette imidlertid ikke ut til å være avgjørende siden både trening av helkropp og trening med liten aktiv muskelmasse synes å gi omtrent de samme adaptasjonene hvis treningsperioden er lik (Andersen & Henriksson, 1977; Blomstrand *et al.*, 2011; Desplanches *et al.*, 1996; Kiens, Essen-Gustavsson, Christensen, & Saltin, 1993). Det kan derfor se ut til at andre faktorer enn den massespesifikke aerobe energiomsetningen *per se* bestemmer tilpasningene til treningen. En hypotese kan være at kroppens totale energiomsetning påvirker den lokale treningstilpasningen. Mekanismene bak dette kan være knyttet til at økt total energiomsetning øker det lokale metabolske stresset ved at den muskulære O₂-

metningen blir redusert grunnet økt konkurranse om O_2 -leveransen. Et annet alternativ er at arbeid på en høyere relativ andel av kroppens $\dot{V}O_2$ maks gir høyere systemisk stress og derigjennom høyere konsentrasjoner av for eksempel stresshormoner og at dette kan påvirke den lokale, muskulære tilpasningen til trening.

Vi ønsket derfor å undersøke om effekten av utholdenhetstrening i en muskelgruppe ble påvirket av kroppens totale energiomsetning. Forsøkspersonene trente derfor 1KE og adderte samtidig trening av armene kun for det ene beinet (henholdsvis 1B- og 1B2A-trening). På denne måten gjennomførte hvert av beina likt ytre arbeid med likt energikrav, mens den totale energiomsetningen, og dermed det systemiske stresset, var høyere når de utførte armtrening samtidig med trening av beina.

1.1 Problemstilling

Vil de muskulære tilpasningene til utholdenhetstrening påvirkes av kroppens totale energiomsetning?

Operasjonell problemstilling

Vil 1B2A-trening gi større tilpasninger enn 1B-trening på beinets arbeidskapasitet i form av større økning i 1KE $\dot{V}O_2$ peak og tid til utmattelse, større endringer av fysiologiske variabler ved submaksimale belastninger eller større kapillarisering og konsentrasjon av oksidative enzymer etter en treningsperiode på 5 uker?

2. Teori

2.1. Hva bestemmer utholdenhetsprestasjonen?

Hvor fort man klarer å forflytte seg over en gitt distanse bestemmes i hovedsak av den totale energiomsetningen og hvor effektivt denne energien overføres til ytre mekanisk effekt (Capelli, 1999; di Prampero, 2003; Hallén, 2002). Energiomsetningen bestemmes av organismens maksimale evne til å ta opp og omsette oksygen per tidsenhet ($\dot{V}O_2$ maks), hvor stor andel av denne man kan utnytte over den gitte distansen (utnyttingsgrad; % $\dot{V}O_2$ maks) og anaerob energiomsetning. Siden det relative bidraget fra anaerobe energikilder blir mindre med økt arbeidsvarighet (Capelli, 1999; Hallén, 2002) er de viktigste faktorene som bestemmer utholdenhetsprestasjonen $\dot{V}O_2$ maks, dens utnyttingsgrad og arbeidsøkonomi.

2.1.1. $\dot{V}O_2$ maks

$\dot{V}O_2$ maks definerer en øvre grense for den aerobe energiomsetningen per tidsenhet og kan beskrives med Ficks ligning (Bassett & Howley, 2000):

$$\dot{V}O_2\text{maks} = M\dot{V}_{\text{maks}} \times a\text{-}vO_2\text{differanse}_{\text{maks}}$$

hvor $M\dot{V}_{\text{maks}}$ er hjertets maksimale minuttvolum per tidsenhet ($M\dot{V}^1$) og $a\text{-}vO_2\text{differanse}_{\text{maks}}$ er den maksimale forskjellen i blodets O_2 -konsentrasjon mellom arterie- og blandet veneblod. $\dot{V}O_2$ maks bestemmes av sentrale og lokale faktorer. De sentrale faktorene avgjør O_2 -leveransen til organer og vev, mens de lokale faktorene medvirker til hvor stor andel av denne O_2 -leveransen som blir tatt opp og omsatt til energi (Bassett & Howley, 2000; Saltin, 1988). Dette inkluderer henholdsvis lungenes diffusjonskapasitet, hjertets $M\dot{V}$, blodets O_2 -bærende kapasitet, musklenes kapillærtetthet og konsentrasjon av oksidative enzymer². I forskningsmiljøet er det nå stor enighet om at $\dot{V}O_2$ maks ved helkroppsarbeid i all hovedsak er sentralt begrenset og at hjertets $M\dot{V}$ er den enkeltfaktor som predikerer $\dot{V}O_2$ maks best (Bassett & Howley, 2000; Saltin & Calbet, 2006).

¹ $M\dot{V}$; hjertets slagvolum (SV) x hjertefrekvens (HF)

² Enzymer som medvirker i enten sitronsyresyklusen, elektrontransportkjeden eller ved β -oksidasjon av fettsyrer.

2.1.2. Utnyttingsgrad

Siden man kun klarer å opprettholde en arbeidsbelastning tilsvarende $\dot{V}O_2$ maks <10 min, vil den aerobe energiomsetningen ved arbeid over en viss varighet ikke bare være bestemt av $\dot{V}O_2$ maks, men også dens utnyttingsgrad (Hallén, 2002). Utnyttingsgraden påvirker derfor utholdenhetsprestasjonen i økende grad ved økende arbeidsvarighet (Coetzer *et al.*, 1993). Hvilke fysiologiske egenskaper som bestemmer denne faktoren er imidlertid ikke fullstendig kartlagt. Likevel er de fleste enig i at begrensningen befinner seg lokalt i arbeidende muskulatur og er relatert til dens oksidative kapasitet (Bassett & Howley, 2000; Joyner & Coyle, 2008; Saltin, 1986).

2.1.3. Arbeidsøkonomi

Den mekaniske effektiviteten beskriver størrelsen på den ytre effekten (watt; $J \cdot sek^{-1}$) i forhold til den totale energiomsetningen i kroppen (Bassett & Howley, 2000; Hallén, 2002). Med unntak av enkelte ergometere er nøyaktig kvantifisering av effektivitet vanskelig. Derfor blir ofte arbeidsøkonomi, i form av $\dot{V}O_2$ for en gitt hastighet eller tilbakelagt distanse, benyttet som mål på effektivitet. Ulik arbeidsøkonomi vil sammen med utnyttingsgrad forklare det meste av forskjellen i utholdenhetsprestasjon for utøvere med lik $\dot{V}O_2$ maks (Bassett & Howley, 2000; Conley & Krahenbuhl, 1980).

2.2. Treningstilpasning

$\dot{V}O_2$ maks, utnyttingsgrad og arbeidsøkonomi er altså bestemmende for den aerobe utholdenhetsprestasjonen. Disse faktorene kan i større eller mindre grad påvirkes gjennom systematisk utholdenhetstrening og med det forbedre prestasjonen.

Tilpasningene skjer både sentralt og lokalt i menneskekroppen.

2.2.1. Sentrale faktorer

Som nevnt er $\dot{V}O_2$ maks i all hovedsak sentralt begrenset. Derfor vil økt O_2 -leveranse ha størst påvirkning på den treningsinduserte økningen av $\dot{V}O_2$ maks.

Det er ikke vanlig å se økning i maksimal hjertefrekvens (HF_{maks}) etter utholdenhetstrening (Bassett & Howley, 2000; Jones & Carter, 2000). Ut fra Ficks ligning er det derfor ikke overraskende at en økning i hjertets SV må til for å øke hjertets $M\dot{V}$. Ved utholdenhetstrening økes hjertets SV gjennom en større ventrikulær fylling i diastolen (Starlings hjertelov; Saltin, 1986). Dette skjer hovedsakelig på grunn

av et økt blodvolum som muliggjør raskere fylling av ventriklene gjennom økt venøs tilbakestrømning til hjertet, men også på grunn av treningsindusert hypertrofi av hjertet (Hallén, 2001). Det økte blodvolumet, sammen med at hemoglobinkonsentrasjonen holdes relativt stabilt grunnet økt erythropoiese, gjør at den totale hemoglobinmengden i blodet øker. Denne faktoren har vist seg å korrelere godt med $\dot{V}O_2$ maks ($r=0,79-0,97$; Schmidt & Prommer, 2008; Schmidt & Prommer, 2010).

2.2.2. Lokale faktorer

Selv om økning i hjertets SV er hovedgrunnen til den treningsinduserte økningen av $\dot{V}O_2$ maks, skjer det også en forbedring av O_2 -ekstraksjonen i muskelvevet som påvirker $\dot{V}O_2$ maks ved å øke a- vO_2 differansen (Bassett & Howley, 2000; Holloszy & Coyle, 1984). Mest sannsynlig skjer dette som følge av en treningsindusert økning i kapillærtetthet som muliggjør at blodcellene kan være lik eller lengre tid i kapillærene (mean transit-tid; MTT) selv med økt blodstrøm til arbeidende muskulatur.

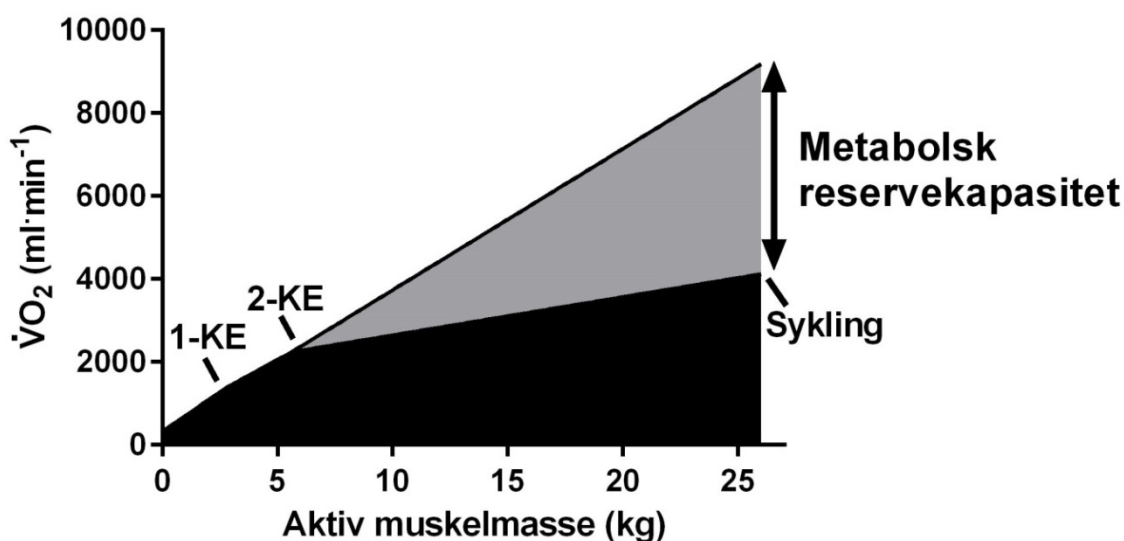
Utnyttingsgraden forbedres også ved trening, men mekanismene bak dette er ikke fullstendig kartlagt (Bassett & Howley, 2000; Joyner & Coyle, 2008). Det er imidlertid ganske stor enighet om at dette er assosiert med endringer lokalt i den arbeidende muskulaturen (Joyner & Coyle, 2008; Saltin, 1986). En mulig forklaring går ut på at en treningsindusert høyere oksidativ kapasitet, i form av økt mitokondrielt volum og større konsentrasjon av oksidative enzymer i muskelfibrene gjør at metabolitter³ som adenosin difosfat, uorganisk fosfat (P_i) og laktat (La^-) opphopes i muskulaturen på en høyere relativ andel av $\dot{V}O_2$ maks. I tillegg er det påvist høyere opptak av frie fettsyrer (FFA) fra blodbanen til arbeidende muskulatur etter en treningsperiode (Henriksson, 1977). Også dette skjer muligens på grunn av en treningsindusert økt kapillærtetthet (Saltin, 1986). Med stor sannsynlighet vil dette føre til et økt relativt bidrag fra β -oksidasjon på den totale energiomsetningen ved et gitt submaksimalt arbeid, siden overføring av FFA til mitokondrien neppe er begrensende (Saltin, 1986). Dette kan spare glykogenlagrene i leveren og musklene og på den måten føre til en høyere utnyttingsgrad ved aktivitet over en viss varighet.

³ Metabolitter er en fellesbetegnelse på alle stoff som blir dannet under energifrigjøringen.

Generelt ser det ut til at utholdenhetstrening gir tilpasninger både sentralt og lokalt, men at trening på høy intensitet (>70% av $\dot{V}O_2$ maks) er fordelaktig for å forbedre de sentrale faktorene og med det $\dot{V}O_2$ maks, spesielt hos allerede trente personer (Jones & Carter, 2000; Midgley, McNaughton, & Wilkinson, 2006).

2.3. Muskelens metabolske kapasitet

Det som av mange regnes som det sterkeste funnet på at $\dot{V}O_2$ maks er sentralt begrenset ble gjort så seint som i 1985. Ved å benytte den dynamiske øvelsen 1KE, som kun involverer en aktiv muskelmasse på ~2-2,5 kg, og den nye termodilusjonsteknikken kunne Andersen & Saltin (1985) måle blodstrøm og lokalt $\dot{V}O_2$ mye mer presist enn tidligere. De fant at kneekstensorene kunne oppnå en blodgjennomstrømning på 2,5 L·kg⁻¹·min⁻¹ og en metabolsk kapasitet (1KE $\dot{V}O_2$ peak/aktiv muskelmasse) på 0,35 L·kg⁻¹·min⁻¹. Disse resultatene indikerer en vesentlig «metabolsk reservekapasitet» ved helkroppsarbeid, som vil si at ved denne type arbeid har den arbeidende muskulaturen kapasitet til mye større aerob energiomsetning enn den får anledning til (figur 2.1.).



Figur 2.1: Svart felt viser $\dot{V}O_2$ ved maksimal 1KE, 2KE (tobeins kneekstensjoner) og ergometersykling, mens det grå feltet viser muskulaturens metabolske reservekapasitet, ekstrapolert fra 2KE-verdiene. Data fra Rud & Hallén (2009).

Eksempelvis må man holde arbeidende muskelmasse under omtrent 10 kg for å opprettholde samme høye perfusjon som i Andersen & Saltin (1985) sin studie. Dette forklarer hvorfor det lokale $\dot{V}O_2$ per kilo aktiv muskelmasse er ~3 ganger høyere ved maksimal 1KE sammenlignet med maksimal ergometersykling (Knight *et al.*, 1993; Richardson, Knight, *et al.*, 1995). Dette forklarer også hvorfor trening på submaksimale belastninger med 1KE gir høyere lokal, massespesifikk energiomsetning enn ved

sykling (Knight *et al.*, 1992; Krstrup, Jones, Wilkerson, Calbet, & Bangsbo, 2009) Det ser derfor ut til at mennesket kun kan utnytte muskulaturens fulle metabolske kapasitet ved øvelser med liten aktiv muskelmasse. Funnene til Andersen & Saltin (1985) er reproduisert i nyere studier (Richardson, Kennedy, et al., 1995; Richardson, Leigh, Wagner, & Noyszewski, 1999; Richardson *et al.*, 1993; Rowell, Saltin, Kiens, & Christensen, 1986; Rådegran, Blomstrand, & Saltin, 1999). Det er imidlertid observert lavere O₂-ekstraksjon i vevet ved 1KE-arbeid sammenliknet med helkroppsarbeid (Richardson, Grassi, *et al.*, 1999) noe som indikerer at økt blodstrøm og lavere MTT gjennom kapillærene kan gi en viss overperfusjon av arbeidende muskulatur ved arbeid med liten aktiv muskelmasse.

Secher, Clausen, Klausen, Noer, & Trap-Jensen (1977) fant at blodstrøm til beina ble redusert når armsykling ble lagt til submaksimal ergometersykling slik at arbeidsintensiteten ble ~80% av $\dot{V}O_{2\text{maks}}$. Derimot er det ikke funnet en signifikant reduksjon i blodstrøm når armsykling har blitt tillagt submaksimal 1KE eller tobeins kneekstensjoner (arbeidsintensitet <71% av $\dot{V}O_{2\text{maks}}$; Richardson, Kennedy, *et al.*, 1995; Savard *et al.*, 1989). Dette indikerer at submaksimalt 1KE-arbeid med addering av armsykling ikke er sentralt begrenset, selv om dette medfører en addering av aktiv muskelmasse på ~6 kg sammenliknet med kun 1KE (Boushel & Saltin, 2013).

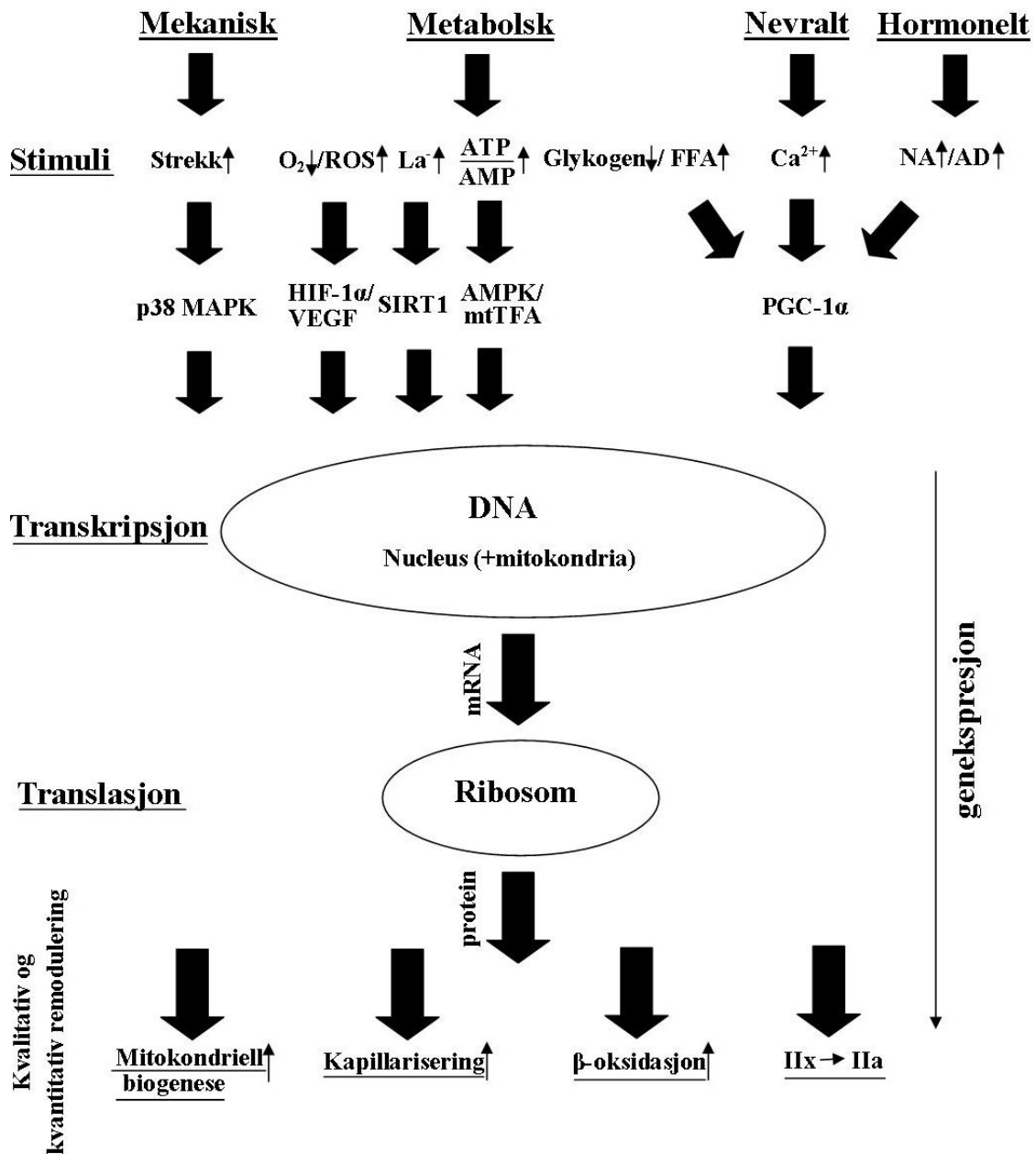
2.4. Hva gir lokale tilpasninger i muskulaturen?

Muskulaturen utnytter altså sin metabolske kapasitet ulikt ved treningsøvelser med ulik aktiv muskelmasse. Man kan spørre seg om dette er av betydning for de lokale tilpasningene til utholdenhetstrening.

De muskulære adaptasjonene til trening er som regel meget spesifikke til hvilken type, intensitet og varighet arbeidet er utført med (Coyle, 2000). Hvilke signaler og stimuli som fører til disse adaptasjonene og hvordan disse mekanismene fungerer er i ferd med å bli avdekket (Flück, 2006). De viktigste stimuliene ser ut til å være av mekanisk eller metabolsk karakter (Flück & Hoppeler, 2003; Flück, 2006; figur 2.2.). Altså hvor stor «strekk⁴» eller spenning det er i muskulaturen under aktivitet og i hvilken grad arbeidet

⁴ Med «strekk» menes i denne sammenheng et økt drag i muskelstrukturer som følge av muskelaktivering.

fører til opphopning av metabolitter. I tillegg ser hormonelle og nevrale faktorer ut til å spille vesentlige roller (Flück & Hoppeler, 2003; Flück, 2006).



Figur 2.2: Forenklet modell over de viktigste stimuli som kan gi muskulær utholdenhetsadaptasjon. ROS; reaktive oksygenradikaler, La⁻; laktat, ATP; adenosin trifosfat, AMP; adenosin monofosfat, FFA; frie fettsyrer, Ca²⁺; kalsiumioner, NA; noradrenalin, AD; adrenalin, p38 MAPK; p38 mitogenaktivert protein kinaser, HIF-1α; Hypoxia-Inducible factor-1α, VEGF; vascular endothelial growth factor, SIRT1; Sirtuin 1, AMPK; AMP-aktivert protein kinase, mtTFA; mitokondriell transkripsjonsfaktor A, PGC-1α; Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α, DNA; deoksyribonukleinsyre; mRNA; budbringer-ribonukleinsyre. Informasjon hentet fra Baar (2014), Flück (2006), Wagner (2011), Fay et al. (2006) og Schiaffino & Reggiani (2011).

Metabolsk og mekanisk stress virker å være viktige stimuli for muskulær utholdenhetsadaptasjon. I studiene til Norrbom *et al.* (2004) og Gustafsson *et al.* (2005) ble 45 min submaksimalt 1KE-arbeid gjennomført på lik absolutt effekt, med og uten okklusjon av blodstrøm til beina. På denne måten ble det metabolske stresset manipulert. Dette medførte akutt større ekspresjon av Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α)– og Vascular endothelial growth factor–mRNA i okkludert-, sammenliknet med ikke-okkludert bein. Det må imidlertid nevnes at ekspresjon av mRNA ikke nødvendigvis fører til translasjon og dannelse av proteiner (Vogel & Marcotte, 2012). Betydningen av mekanisk stress *per se* er ikke alltid like enkelt å ta høyde for, siden en økning ved vanlige treningsøvelser som regel vil bli fulgt av oppregulering av de andre adaptasjonsbestemmende faktorene også. Muskler som har blitt utsatt for strekk som eneste stimuli har imidlertid fått en hypertrofierespons (Vandenburgh, 1987) og bekrefter med dette at mekanisk stress er et viktig stimuli for treningsadaptasjon.

2.4.1. Systemisk stress – mulig påvirkning?

Ved fysisk aktivitet skjer det en rekke kardiovaskulære tilpasninger for å møte energikravet til arbeidende muskulatur og sikre et stabilt blodtrykk (Fadel & Raven, 2012; Secher, Kagaya, & Saltin, 1999). I denne sammenheng spiller katekolaminene⁵ adrenalin (AD) og noradrenalin (NA) en viktig rolle som signalstoff for det autonome nervesystemet. Sekresjon av disse hormonene fra henholdsvis kromaffinceller i binyremargen og ved nerveendene til sympatiske nervefibre, fører til økt sympatisk aktivitet ved at disse binder seg til adrenerge reseptorer i hjerte og karsystem (Zouhal, Jacob, Delamarche, & Gratas-Delamarche, 2008). Dette medfører blant annet økning av hjertets SV, HF og vasodilatasjon av blodårer som igjen fører til økt blodstrøm til den aktive muskelmassen (Zouhal *et al.*, 2008). Katekolaminkonsentrasjonen i blodplasma er derfor et mål på kroppens systemiske, sympatiske aktivitet (Secher *et al.*, 1999).

Det kan se ut til at stimuli som skal føre til fysiologisk tilpasning bør forstyrre homeostasen lokalt i vevet. Det er imidlertid en diskusjon om systemiske variabler også har en innvirkning på adaptasjonsresponsen. Et eksempel fra styrketreningsmiljøet er om trening med forhøyede endogene blodnivåer av hormoner som testosteron og

⁵ Katekolaminer er en fellesbetegnelse på hormoner og nevrotransmittere som dannes ved at aminosyren tyrosin omdannes til dopamin, noradrenalin og adrenalin (Berg, 2009).

veksthormon fører til større styrkeadaptasjoner. Resultatene er sprikende (Rønnestad, Nygaard, & Raastad, 2011; West & Phillips, 2012). Et annet eksempel er at Baar (2014) i sin oversiktsartikkel konkluderer med at man kan oppmuntre idrettsutøvere som ønsker å forbedre sin utholdenhetsprestasjon til å benytte treningsmetoder som vil gi høy systemisk katekolaminrespons. Eksempelvis trening på høy intensitet, ved glykogenetømming eller i varmt klima. Han henviser til dyremodeller (Chinsomboon *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2007) hvor tilskudd av den β -adrenerge agonisten clenbuterol så ut til å aktivere transkripsjonen av PGC-1 α . Det er også funnet at slike tilskudd kan opprettholde eller øke aktiviteten til oksidative enzymer som Citrate synthase (CS) og Succinate dehydrogenase hos langtidssengeliggende mennesker (Flück & Hoppeler, 2003). I kontrast med disse funnene er det imidlertid ikke funnet effekt av infusjon av β -agonisten isoproterenol hos menneske (Robinson *et al.*, 2010).

2.4.2. Trening av helkropp og med liten aktiv muskelmasse

Siden det ser ut til at trening på en høy relativ intensitet (% $\dot{V}O_2$ maks) er vesentlig for å forbedre sentrale faktorer og øke $\dot{V}O_2$ maks (Jones & Carter, 2000; Midgley *et al.*, 2006) kan man tenke seg at trening som utfordrer en stor del av den metabolske kapasiteten er viktig for nettopp å øke den metabolske kapasiteten. $\dot{V}O_2$ i aktiv muskulatur er som kjent ~3 ganger høyere ved maksimal 1KE sammenlignet med maksimal ergometersykling (Knight *et al.*, 1993; Richardson, Knight, *et al.*, 1995). Hvis størrelsen på den aerobe energiomsetningen i den aktive muskulaturen medvirker til hvor store de lokale tilpasningene til utholdenhetstrening blir, kunne man muligens forvente at trening med liten aktiv muskelmasse gav større tilpasninger enn helkroppstrening.

I tabell 2.1. og 2.2. vises en oversikt over studier vi har kjennskap til som har undersøkt lokale tilpasninger til henholdsvis helkroppstrening (ergometersykling og løping) og trening med liten aktiv muskelmasse (1KE og ettbeins sykling).

2. Teori

Tabell 2.1: Helkroppss treningsstudier (ergometersykling og løping) som har undersøkt lokale tilpasninger

Studie	n	Variighet	Trening	Treningsint. (% maks)	Funn	ES
Gollnick <i>et al.</i> (1973)	6 ♂	5 mnd.	EMS. 1t/dag; 4g/uka	75-90% ($\dot{V}O_{2max}$)	SDH: 95%↑	3,84 (stor)
Henriksson & Reitman (1977)	13 ♂	8-10 uker	EMS. 20-40 min/dag; 4g/uka	75-89% ($\dot{V}O_{2max}$)	SDH: 32%↑ COX: 35%↑	-
Andersen & Henriksson (1977)	5 ♂	8 uker	EMS. 40 min/dag; 4g/uka	80% ($\dot{V}O_{2max}$)	C/F: 47%↑ CD: 20%↑ SDH: 42%↑ COX: 42%↑	4,09 (stor) 2,68 (stor) 3,22 (stor) 2,91 (stor)
Ingier (1979)	7 ♀	24 uker	L. 45 min/dag; 3g/uka	50-100% ($\dot{V}O_{2max}$)	C/F: 29%↑ CD: 26%↑	2,52 (stor) 1,17 (stor)
Fourrier <i>et al.</i> (1982)	6 ♂	3 mnd.	L. 25-65 min/dag	60-90% (HF_{maks})	SDH: 42%↑	1,35 (stor)
Svedenhag, Henriksson, & Sylven (1983)	8 ♂	8 uker	EMS. 40 min/dag; 4g/uka	60-75% ($\dot{V}O_{2max}$)	CS: 47%↑ SDH: 48%↑ COX: 74%↑	1,61 (stor) 1,48 (stor) 2,62 (stor)
Hoppeler <i>et al.</i> (1985)	10 ♀/♂	6 uker	EMS. 30 min/dag; 5g/uka	>90% (HF_{maks})	C/F: 26%↑ CD: 29%↑ Mitovol.: 40%↑	4,58 (stor) 4,00 (stor) 6,73 (stor)
Denis <i>et al.</i> (1986)	8 ♂	20 uker	EMS. 1t/dag; 4g/uka	70-80% ($\dot{V}O_{2max}$)	CD: 25%↑	1,90 (stor)
Hamel, Simoneau, Lortie, Boulay, & Bouchard (1986)	12 ♀/♂	15 uker	EMS. 30-45 min/dag; 3-5 g/uka	60-85% (HF_{maks})	HADH: 59%↑	2,71 (stor)
Tremblay, Simoneau, & Bouchard (1994)	10 ♀/♂	15 uker	EMS. ≤30 min/dag; 4g/uka. Langkjøring/kortint./langint	70-100% (HF_{maks})	HADH: 60%↑	2,76 (stor)
Suter <i>et al.</i> (1995)	12 ♂	6 mnd.	L. 30 min/dag; 4g/uka. NB: Uten oppfølging	75% ($\dot{V}O_{2max}$)	C/F: 3%↔ CD: 4%↔ Mitovol.: 20%↑	0,25 (liten) 0,23 (liten) 0,90 (stor)
Phillips, Green, Tarnopolsky, Heigenhauser, & Grant (1996)	7 ♂	31 dager	EMS. 2t/dag; 5-6 g/uka	59% ($\dot{V}O_{2max}$)	SDH: 42%↑ HADH: 24%↑	0,86 (stor) 1,89 (stor)
Desplanches <i>et al.</i> (1996)	10 ♂	6 uker	EMS. 30 min/dag; 5g/uka	70% ($\dot{V}O_{2max}$)	C/F: 26%↑ CD: 17%↑ CS: 45%↑ HAD: 20%↔ Mitovol.: 43%↑	1,67 (stor) 1,17 (stor) 1,42 (stor) 0,37 (liten) 1,51 (stor)
McPhee <i>et al.</i> (2010)	53 ♀	6 uker	EMS. 45 min/dag; 3g/uka	75-90% (HF_{maks})	1-S $\dot{V}O_{2peak}$: 10%↑	0,50 (moderat)

Alle resultater er endring fra pre- til posttest. E_S: effektsvørrelse (Cohen's d), ♀; kvinner, ♂; menn, EMS: ergometersykling, L: løping, SDH: Succinate dehydrogenase, COX: Cytochrome c oxidase, CS: Citrate synthase, HADH: Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, C/F: kapillærettet, mitovol.: mitokondrielt volum, 1-S $\dot{V}O_{2peak}$: høyeste oppnådde O_2 -opptak ettbens sykling, ↑: signifikant økning fra pretest (<0,05), ↔: ikke signifikant endring fra pretest.

2. Teori

Tabell 2.2: Treningsstudier med IKE og ettbeins sykling som har undersøkt lokale tilpasninger

Studie	n	Variighet	Trening	Treningsint. (% maks)	Forskjell	Funn	ES
Davies & Sargeant (1975)	7 pers.	5-6 uker	1-S. 30 min/dag. 3g/uka	80% ($\dot{V}O_2$ peak)	Pre-post	1-S $\dot{V}O_2$ peak (P): 16% ↑ SDH: 33% ↑	0,89 (stor)
Saltin <i>et al.</i> (1976)	5 ♂	4 uker	1-S. 35-45 min/dag. 5g/uka	75% ($\dot{V}O_2$ peak)	Pre-post	1-S $\dot{V}O_2$ peak (P): 20% ↑	2,20 (stor)
Henriksson (1977)	6 ♂	8 uker	1-S. 45 min/dag. 3g/uka	70% ($\dot{V}O_2$ peak)	Kont.-interv.	SDH: 27% ↑ 1-S $\dot{V}O_2$ peak (P): 7% ↑	0,33 (liten)
Klausen <i>et al.</i> (1982)	6 ♂	8 uker	1-S. 30 min/dag. 3g/uka	–	Pre-post	1-S $\dot{V}O_2$ peak (P): 19% ↑ HADH: 38% ↑ CS: 25% ↑ C/F: 24% ↑ CD: 22% ↑	1,52 (stor)
Kiens, Essen-Gustavsson, Christensen, & Saltin (1993)	7 ♂	8 uker	IKE. 0,5-2t/dag. 3-4g/uka	65% (E_{peak})	Kont.-interv.	IKE $\dot{V}O_2$ peak (P): 24% ↑ Muskelglykogen: 56% ↑	–
Pilegaard <i>et al.</i> (1999)	7 ♂	8 uker	IKE. ~45-75 min/dag. Kortint.: 30-60 sek innsats. 3-5g/uka	–	Kont.-interv.	HADH: 17% ↑ CS: 18% ↔ C/F: 2% ↔ CD: 0% ↔	0,88 (stor) 1,67 (stor) 0,07 (ubetydelig) 0,00 (ubetydelig)
Krustrup, Hellsten, & Bangsbo (2004)	6 ♂	7 uker	IKE. 1t/dag. Kortint.: 1 min innsats, 3 min p. 3-5 g/uka	150% ($\dot{V}O_2$ peak)	Pre-post	HADH: 12% ↔ CS: 25% ↑	0,59 (moderat)
Jensen, Bangsbo, & Hellsten (2004; studie I)	6 ♂	7 uker	IKE. 1t/dag. Kortint.: 1 min innsats, 3 min p. 3-5 g/uka	150% ($\dot{V}O_2$ peak)	Pre-post	C/F: 36% ↑ CD: 17% ↑	2,53 (stor) 1,49 (stor)
Jensen <i>et al.</i> (2004; studie II)	7 ♂	6 uker	IKE. ~1t/dag. Kortint.: 1 min innsats, 30sek p. 3g/uka	90% ($\dot{V}O_2$ peak)	Pre-post	IKE $\dot{V}O_2$ peak (P): 24% ↑ C/F: 42% ↑	1,55 (stor) 3,59 (stor)
Mourtzakis <i>et al.</i> (2004)	6 ♂	5 uker	IKE. 1t/dag. 5g/uka	70% (E_{peak})	Kont.-interv.	CD: 2% ↔ IKE $\dot{V}O_2$ peak (TD): 27% ↑	0,11 (ubetydelig) 0,77 (moderat)
Hansen <i>et al.</i> (2005)	7 ♂	10 uker	IKE. 1t x 2/dag. 2-3g/uka	75% (E_{peak})	Pre-post	CS: ↑ HADH: ↑ CD: 8% ↔	– – 1,02 (stor)
Helge <i>et al.</i> (2007)	13 ♂	4 uker	IKE. 1-2t/dag. 4-5g/uka	70-100% (E_{peak})	Kontr.-interv.	CS: 15% ↑ HADH: ↔	– –
Blomstrand <i>et al.</i> (2011)	14 pers.	5-7 uker	IKE. 1t/dag. 3 gr.: I: Langkjøring. II: 1 min innsats, 30 sek p. III: 1 min innsats, 3 min p. 5g/uka	70-150% ($\dot{V}O_2$ peak)	Kont.-interv.	ODH: 22% ↑ SDH: 18% ↑ CS: 23% ↑ CD: 28% ↑	– – – 0,73 (stor)
Rud, Foss, Krustrup, Secher, & Hallén (2012)	12 pers.	7 uker	1-S. 40-100 min/dag. 4g/uka	59-90% (HF_{maks})	Kont.-interv.	IKE $\dot{V}O_2$ peak (TD): 32% ↑ CS: 30% ↑ HADH: ↔ 1-S $\dot{V}O_2$ peak (P): 6% ↑	– – – 0,31 (liten)

ES; effektstørrelse, kont.-interv.; forskjell kontroll-intervensjonsbein, ♀; kvinner, ♂; menn 1-S; ettbeins sykling, IKE; ettbeins kneekstensjoner, $\dot{V}O_2$ peak; høyeste oppn. O_2 -opptak, E_{peak} ; høyeste oppn. effekt. P; pulmonært, TD; termodilusjon, SDH; Succinate dehydrogenase, CS; Citrate synthase, HADH; Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, ODH; Oxoglutarate dehydrogenase, C/F; kapillærer per fiber, CD; kapillærtetthet, ↑; sign. økning/forskjell fra pretest/kontrollbein (<0,05), ↔; ikke sign. endring/forskjell fra pretest/ kontrollbein.

Av studiene i tabell 2.1. og 2.2. framgår det at både trening av helkropp og øvelser med liten aktiv muskelmasse kan føre til lokale tilpasninger i muskulaturen, selv om den aktive muskulaturen utnytter den metabolske kapasiteten i ulik grad. Dette indikerer at musklens massespesifikke aerobe energiomsetning *per se* er mindre viktig for adaptasjonene til treningen. Det er imidlertid vanskelig å dra noen konklusjoner fra disse studiene siden designet av dem er meget forskjellig. Eksempelvis kan det se ut til at 3-5 ukentlige treningsøkter over en periode på 6-8 uker vil gi omtrent samme effekt på kapillarisering og oksidative enzymer ved submaksimal ergometersykling (Andersen & Henriksson, 1977; Desplanches *et al.*, 1996) som 1KE-trening, gjennomført som submaksimal- (Kiens *et al.*, 1993) eller HIIT-trening⁶ (Blomstrand *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2004). Imidlertid kan det av tabellene også se ut til at trening av helkropp kan gi enda større treningseffekt enn dette (Svedenhag *et al.*, 1983) selv om treningsperioden er den samme (8 uker) og at 1KE-trening gir mindre (Pilegaard *et al.*, 1999). Det er derfor ut fra disse tabellene vanskelig å si hva som gir størst muskulær utholdenhetsadaptasjon.

Den eneste studien som har sammenliknet lokale tilpasninger til trening med liten og stor muskelmasse er, etter vår kjennskap, Abbiss *et al.* (2011) med sin randomiserte kryssoverstudie. Forsøkspersonene ble randomisert til å trene seks økter på 21 dager med enten ett- eller tobeins ergometersykling. Etter en washout-periode på 42 dager byttet de treningsøvelse. Treningsvarigheten var lik mellom begge beina i begge øvelsene, men gjennomsnittlig effekt per bein var høyere ved ettbeins sykling (13%). Treningen medførte en signifikant større Cytochrome c Oxidase (COX) subenhet 2 og 4-, samt glukosetransportør 4 (GLUT4)-proteinkonsentrasjon i *m. vastus lateralis* etter ettbeins sykling sammenliknet med tobeins sykling. Man kan imidlertid tenke seg at siden beinet som trente ettbeins sykling trente på en høyere effekt, kan dette ha ført til et ulikt mekanisk stress mellom treningsøvelsene og være medvirkende til funnene de gjorde.

I denne studien vil vi prøve å manipulere det systemiske stresset gjennom en høyere total energiomsetning ved 1B2A- sammenliknet med 1B-trening. På denne måten kan vi studere om dette påvirker de lokale adaptasjonene i den aktive muskulaturen og muligens komme et skritt nærmere svaret på hva som bestemmer denne tilpasningen.

⁶ Høy-intensiv intervalltrening

3. Metode

3.1. Forsøkspersoner

Vi rekrutterte 11 friske, moderat utholdenhetstrente kvinner (♀; n=2) og menn (♂; n=9) mellom 20-37 år med $\dot{V}O_2$ maks på 40-61 ml·kg⁻¹·min⁻¹. Inkludering fant sted etter at egenerklæringen var utfylt, skriftlig informert samtykke var underskrevet (vedlegg VI) og $\dot{V}O_2$ maks-test på ergometersyssel var gjennomført. Eksklusjonskriterier til studien var bruk av blodfortynnende medikamenter eller om forsøkspersonen hadde allergiske eller hypersensitive reaksjoner på bedøvelse. Prosjektet var informert til Regionale komitéer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) avdeling sør-øst før oppstart (referansenr. 2013/1238).

Etter $\dot{V}O_2$ maks-testen ble forsøkspersonenes bein (høyre eller venstre) randomisert til treningsøvelse. Begge beina skulle trene ettbeins kneekstensjoner (1KE), men treningen skulle gjennomføres med og uten samtidig trening av armene for hvert av beina (henholdsvis 1B2A og 1B). Karakteristikk av forsøkspersonene framstilles i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Karakteristikk av forsøkspersonene (n=11) ved pretest

Variabel	Snitt ± SD
Alder (år)	27 ± 5
Høyde (cm)	179 ± 8
Vekt (kg)	80 ± 11
Kroppsmasseindeks (KMI)	25 ± 2
$\dot{V}O_2$ maks ergometersykling (ml·min ⁻¹)	4214 ± 921
$\dot{V}O_2$ maks ergometersykling (ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	52 ± 6

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik.

3.2. Eksperimentelt design

Før pretesting gjennomførte forsøkspersonene tilvenning til ergometersykling, 1B og 1B2A. Pretestene som ble gjennomført var submaksimale og maksimale effekter med 1KE (henholdsvis 1KE_{submaks} og 1KE_{maks}) på begge bein, samt maksimal test i armsykkelerergometer.

3. Metode

Treningsperioden var på 17 økter fordelt på 5 uker. Hvilket bein forsøkspersonene benyttet under treningsøvelsene ble randomisert og counterbalansert. De var derfor sin egen kontroll og antall forsøkspersoner kunne holdes relativt lavt. Alle forsøkspersonene trente både 1B og 1B2A i hver treningsøkt.

Underveis i treningsperioden ble det to ganger gjennomført midttester, mens det i treningsperiodens siste del ble tatt blodprøver for analyse av katekolaminer, samt målt $\dot{V}O_2$ for kvantifisering av arbeidsøkonomi under 1B- og 1B2A-trening. Intensiteten på treningsøktene ble justert individuelt for hver forsøksperson basert på individuell progresjon og dagsform.

Etter treningsperioden ble testene som ble utført før treningsperioden gjentatt med samme prosedyrer og samme testleder. I tillegg ble det tatt biopsi av *m. vastus lateralis* i begge bein.

Forsøkspersonene ble oppfordret til å opprettholde sitt normale kosthold og aktivitetsnivå under prosjektet. Før testene og treningene ble forsøkspersonene også oppfordret til å unngå alkohol og andre rusmidler de siste 24 timene. Det ble i tillegg anbefalt å innta et lett måltid ca. 1 time før test og trening.

Tabell 3.2: Det eksperimentelle designet satt i tidsperspektiv

Tilvenning ergometersykling	x								
$\dot{V}O_2$ maks ergometersykling	x							x	
Tilvenning 1B og 1B2A	x	x							
Tester 1KE og armsykling		x						x	
1KE midttester				x		x			
Katekolaminkonsentrasjon								x	
$\dot{V}O_2$ trening			x					x	
Biopsi								x	
		Pretest		Intervensjon				Posttest	
		↔		←—————→					
Uke		-2	-1	1	2	3	4	5	6

1KE-treningen ble utført i et modifisert sparkeergometer (Andersen & Saltin, 1985; Hallén, Saltin, & Sejersted, 1996; Rud & Hallén, 2009) ved ekstensjon av kneleddet med en frekvens på 60 spark/omdreininger i minuttet (RPM). Under 1B2A ble det kombinert med 1KE utført armsykling med begge armene i et armergometer plassert foran sparkeergometeret (Excalibur Sport; Lode B.V., Groningen, Nederland).

3.3. Forsøksprotokoll

3.3.1. Tilvenning

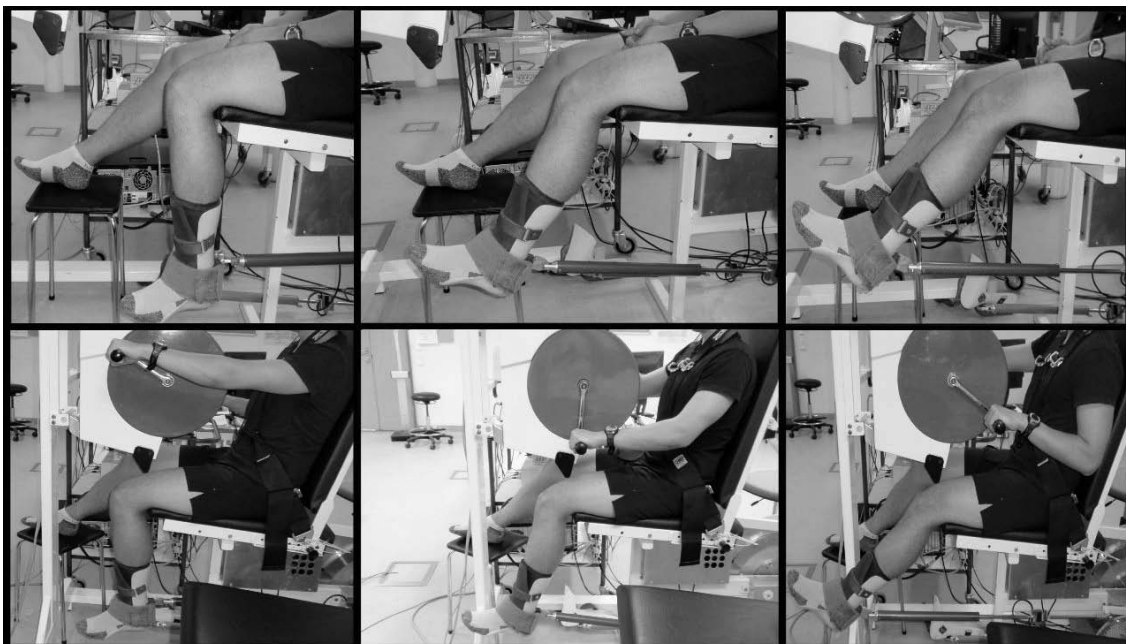
Det ble minimum gjennomført fire separate tilvenningsøkter før pretestene. En før $\dot{V}O_2$ maks-testen på ergometersykkel og tre-fem økter med 1B- og 1B2A-trening før 1KE-testene og test av maksimal armsykling. En subjektiv vurdering fra testlederen avgjorde når forsøkspersonene var på et tilstrekkelig teknisk nivå til å gjennomføre pretestene.

Ergometersykling

Ved første gangs oppmøte ved laboratoriet på Norges Idrettshøgskole (NIH) gjennomførte forsøkspersonene en tilvenningsøkt på ergometersykkel. Sete- og styrehøyde, samt setets og styrets innstilling i lengderetning ble notert for å kunne reproducere innstillinger ved seinere tester. Etter ~15 min oppvarming ble flere drag (~3) på 5 min med økende effekt gjennomført. Til slutt ble det utført noen korte drag med varighet på 30-60 sekunder, for å få en indikasjon på maksimal effekt under $\dot{V}O_2$ maks-testen.

1KE med og uten samtidig arbeid med armene

Ved 1KE er kneekstensorene (*m. quadriceps femoris*) bare belastet under ekstensjon av kneleddet (~90-170°) og muskelarbeidet er begrenset til denne muskelgruppen (Andersen & Saltin, 1985; Richardson *et al.*, 1993; Rådegran, Blomstrand, & Saltin, 1999; figur 3.1.). Knefleksorene holdes passive under fleksjonsfasen og foten bringes tilbake for nytt spark ved hjelp av tyngdekraften og svinghjulets momentum. For å unngå bruk av stabiliserende muskulatur ble det benyttet en firepunkts sele til å feste forsøkspersonen i stolen. Ved 1B2A kombineres 1KE med armsykling (figur 3.1) ved at beina og armene arbeider med samme frekvens (60 RPM). Gjennomført samtidig er disse to øvelsene kompliserte og krever tilvenning.

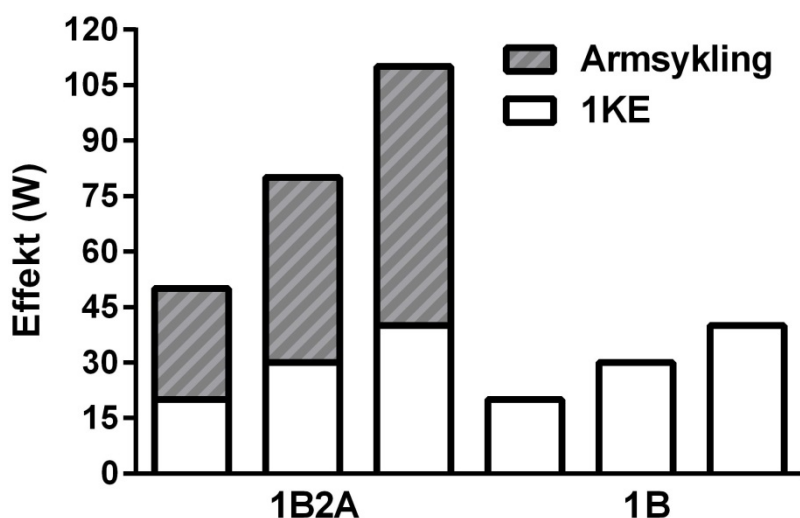


Figur 3.1: Treningsøvelsene 1B (øverst) og 1B2A (nederst).

Forsøkspersonene startet med å øve på å holde en sparkerfrekvens på 60 RPM. Når de behersket dette, ble armsykling addert til 1KE. En monitor plassert foran forsøkspersonen gav visuell tilbakemelding om sparke- og armsyklingsfrekvens samt tilbakemelding om eventuell aktiv bruk av knefleksorene (fra kraftceller festet i stang mellom krankarmer og beina).

Etter denne sekvensen gjennomførte forsøkspersonene tre submaksimale drag á 6 min med 2 min pause mellom. Samlet ytre effekt for bein og armer under dragene var 50, 80 og 110W (20, 30 og 40W for beina og 30, 50 og 70W for armene; figur 3.2.). Effekten ble justert hvis forsøkspersonen ikke klarte å opprettholde frekvensen. Etter 1B2A ble samme protokoll utført med 1B. De påfølgende tilvenningsøktene ble gjennomført på samme vis, men startøvelsen ble rullert på.

Ved 1B2A er det tidligere vist at variasjonen i kadens reduseres og at arbeidsøkonomien forbedres de to-tre første tilvenningsøktene for deretter å endre seg lite (bacheloroppgave ved NIH, 2014). Ved behov ble det imidlertid gjennomført flere tilvenningsøkter.



Figur 3.2: Protokoll for tilvenningsøktene til 1B2A og 1B. Effekten ble imidlertid individuelt justert og startøvelsen på øktene ble rullert på. W; watt.

3.3.2. Treningen

Alle forsøkspersonene fullførte treningsperioden med $17,3 \pm 1,7$ treningsøkter. To forsøkspersoner gjennomførte 15 økter, én gjennomførte 16 økter, tre gjennomførte 17 økter, fire gjennomførte 18 økter, mens én gjennomførte 21 økter. Treningsprogrammet hadde en progresjon i treningsbelastning i form av både økt varighet, ytre effekt og hyppighet på øktene (tabell 3.3).

Tabell 3.3: Veiledende treningsprogram for forsøkspersonene

Uke	Varighet treningsøvelse (min)		Økter per uke
	1B	1B2A	
1-2	20	20	3
3	25	25	3
4	25-30	25-30	4
5	30	30	4

I hver treningsøkt ble det gjennomført 1B- og 1B2A-trening, kun avbrutt av ~10 min pause mellom øvelsene. Forsøkspersonene vekslet mellom hvilken øvelse de begynte øktene med.

Av annen trening utenom prosjektet oppgav fire forsøkspersoner at de trente <2 timer, 2 stk mellom 2 og 5 timer, 3 stk mellom 5 og 10 timer, mens 2 stk trente ≥ 10 timer per uke.

Midttester

Under treningsperioden ble det gjennomført to midttester etter samme protokoll som $1KE_{maks}$ (kap. 3.3.4.). Hver av disse ble utført i forbindelse med to treningsøkter, før økt nr. ~4-5 og ~10-11. Treningsøkten bestod av 5 min oppvarming, etterfulgt av 2 min pause før $1KE_{maks}$ -protokollen. Deretter gjennomførte forsøkspersonene dagens treningsøkt.

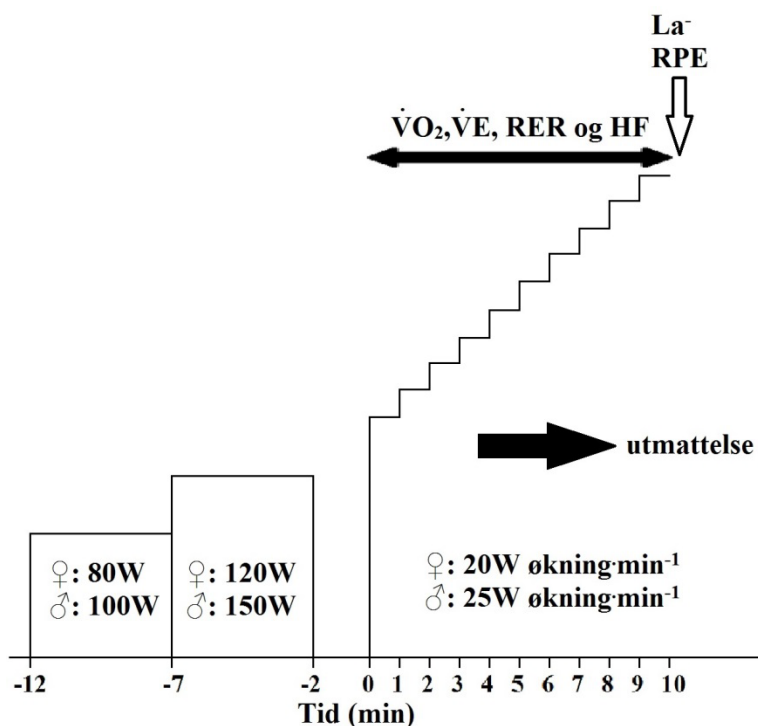
3.3.3. Måling av maksimalt oksygenopptak

$\dot{V}O_2$ -målinger ble gjennomført med et helautomatisk ergospirometrisystem med miksekammer (JAEGER Oxycon PROTM; Carefusion GmbH, Höchberg, Tyskland) hvor forsøkspersonene pustet gjennom en treveis ventil med påmontert munnstykke (Hans Rudolph Inc., Shawnee, OK, USA), mens en neseklype (Hans Rudolph Inc., Shawnee, OK, USA) hindret ventilasjon gjennom nesen. Kalibreringen ble utført i henhold til instruksjonsmanualen ved at volumet manuelt ble kalibrert med en treliters kalibreringspumpe (Calibration Syringe, 5530 series; Hans Rudolph Inc., Shawnee, OK, USA), mens gassanalysatorene for O_2 og karbondioksid (CO_2) ble kalibrert opp mot romluft og gass med kjente konsentrasjoner av O_2 (15%), CO_2 (6%) og nitrogen (79%) (AGA Gas AB, Oslo, Norge). Kontinuerlig måling av $\dot{V}O_2$, ventilasjon per tidsenhet ($\dot{V}E$), respiratorisk utvekslingskvotient (RER) og HF (Polar Electro Oy; Kempele, Finland) ble utført under testene. Registrering av opplevd anstrengelse (RPE; Borg's Rating of Perceived Exertion) og analyse av La^- i kapillært helblod ved fingerstikk (YSI 1500 Sport; Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH, USA) ble utført umiddelbart etter testene, med unntak av La^- -måling etter de maksimale testene som ble tatt 1 min etter avsluttet test. JAEGER Oxycon PROTM med miksekammer er ved NIH tidligere validert opp mot Douglas bag-metoden som regnes som gullstandarden for måling av $\dot{V}O_2$ med avvik $<1,1\%$ (Foss & Hallén, 2005).

Test av $\dot{V}O_{2maks}$ på ergometersykkkel

Oppvarmingen til $\dot{V}O_{2maks}$ -testen på ergometersykkkel (Excalibur Sport; Lode B.V., Groningen, Nederland) bestod av 10 min ergometersykling på lav til moderat effekt (♀; 5+5 min ~80 og 120W, ♂; 5+5 min ~100 og 150W) etterfulgt av 2 min pause. Testen ble gjennomført som en trappetrinnsprotokoll hvor effekten økte hvert minutt (20 og $25W \text{ min}^{-1}$ for henholdsvis ♀ og ♂; figur 3.3.) og avsluttet når forsøkspersonen ikke klarte å opprettholde en tråkkfrekvens på 80 RPM. Det ble gjort målinger av $\dot{V}O_2$, $\dot{V}E$,

RER og HF kontinuerlig underveis i testene og kapillær La^- -prøve og RPE etter hver test. $\dot{V}\text{O}_2$ maks ble regnet som høyeste gjennomsnittlige $\dot{V}\text{O}_2$ over 60 sek. Tid til utmattelse (TTU) ble også notert (ss.).



Figur 3.3: $\dot{V}\text{O}_2$ maks-test på ergometersykkel.

Testen ble gjennomført på en separat dag uten øvrige tester og forsøkspersonen ble instruert til å ikke utføre hardt, fysisk arbeid de siste 24 timene før test.

1KE_{submaks}, 1KE_{maks} og maksimal armsykling

På en separat dag gjennomførte forsøkspersonene tester med 1KE_{submaks}, 1KE_{maks} og maksimal armsykling (figur 3.4.). Under testene ble det gjort målinger av $\dot{V}\text{O}_2$, $\dot{V}\text{E}$, RER og HF, mens det ble tatt kapillær La^- -prøve og registrert RPE etter hver test. Pre- og posttestene ble gjennomført identisk for hver forsøksperson.

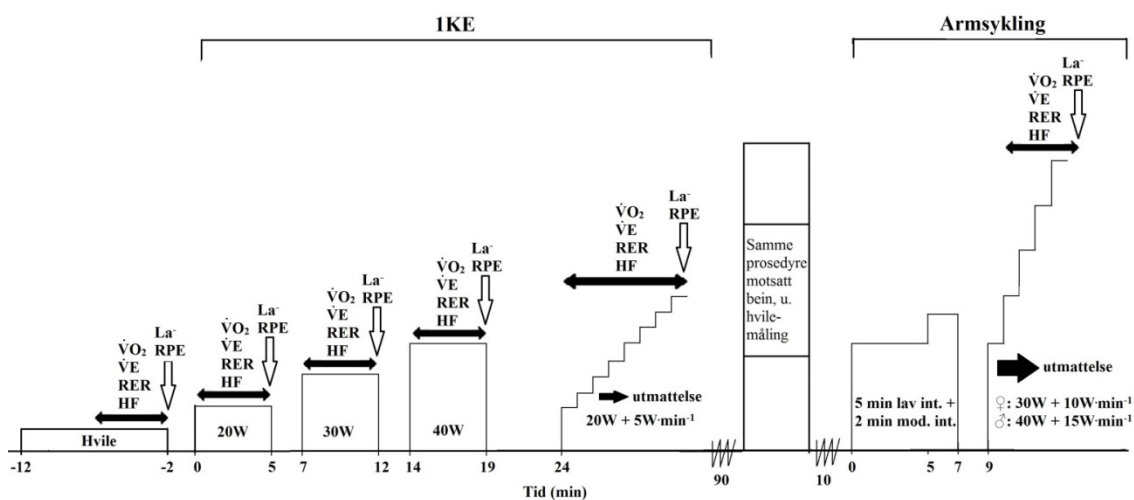
Testdagen startet med 10 min hvile sittende i sparkeergometeret hvor det ble utført $\dot{V}\text{O}_2$ -måling de siste 5 min. Deretter ble det gjennomført standardiserte, 5 min 1KE_{submaks}-effekter med samme bein på 20, 30 og 40W med 2 min pause mellom innsatsperiodene. Lavere effekt ble benyttet hos enkelte forsøkspersoner. Det ble sikret at like mange forsøkspersoner startet testdagen med sitt 1B2A- som 1B-bein.

3. Metode

Forsøkspersonene fikk deretter 5 min pause før $1KE_{maks}$ -testen på samme bein. Denne testen ble utført som en trappetrinnsprotokoll hvor man startet på 20W og økte effekten med $5W \cdot min^{-1}$ inntil utmattelse, definert som $RPM < 57$.

Etter $1KE_{submaks}$ og $1KE_{maks}$ på det ene beinet var det 1,5 times pause før samme protokoll ble gjennomført med det andre beinet.

Etter siste 1KE-test var det 10 min pause før oppvarming til test av maksimal armsykling. Oppvarmingen var 7 min (5 min lav effekt [♀ ; 30W, ♂ ; 40W] + 2 min moderat effekt [♀ ; 35W, ♂ ; 50W]) etterfulgt av 2 min pause før testen startet. Testen ble gjennomført som en trappetrinnsprotokoll hvor kvinnene startet på 30W og mennene på 40W. Effekten økte hvert minutt (10 og $15W \cdot min^{-1}$ for henholdsvis ♀ og ♂) inntil de nådde utmattelse ($RPM < 57$).



Figur 3.4: Tester med $1KE_{submaks}$ og $1KE_{maks}$ på begge bein, samt maksimal armsykling.

Alle testene ble utført i samme laboratorium, med samme ergospirometrisystem og laktatanalysator.

Databehandling

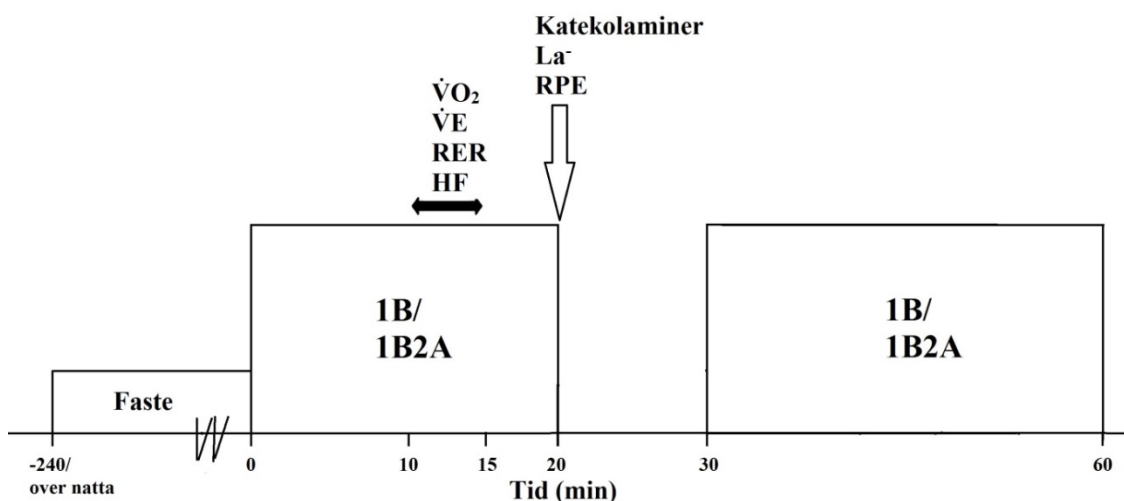
Ved $1KE_{submaks}$ ble snittverdier for de siste 2 min av testene benyttet. Hvileverdier ble utregnet som gjennomsnitt av siste minutt, mens $\dot{V}O_{2peak}$ ved armsykling ble regnet ut fra det høyeste $\dot{V}O_{2}$ -snittet over 30 sek. Siden forholdet mellom $\dot{V}O_{2}$ og effekt gjerne øker eksponentielt mot slutten av $1KE_{maks}$ -testene, ble $\dot{V}O_{2peak}$ -verdiene justert ved å ekstrapolere $\dot{V}O_{2}$ fra submaksimale effekter (Andersen, Adams, Sjøgaard, Thorboe, &

Saltin, 1985; Rud & Hallén, 2009). Justerte 1KE $\dot{V}O_2$ peak-verdier er i oppgaven omtalt som 1KE $\dot{V}O_2$ peak. Ikke-justerte verdier finnes i vedlegg III.

3.3.4. Måling av katekolaminer og arbeidsøkonomi

I forbindelse med to treningsøkter på ulike dager i siste halvdel av treningsperioden (etter andre midtttest) ble det tatt blodprøver for analyse av AD- og NA-konsentrasjon i venøst blodplasma. Forsøkspersonene fastet og avsto fra koffein og nikotin i minst 4 timer før treningen. Treningsøkten var 20 min med enten 1B eller 1B2A (counterbalansert), hvor det underveis (fra 10-15 min) ble utført måling av $\dot{V}O_2$, $\dot{V}E$, RER og HF (kap. 3.3.3.). Umiddelbart etter treningen ble blodprøven tatt ved venepunksjon i albuen (*fossa cubitalis*) av sertifisert helsepersonell. I tillegg ble det tatt kapillær La^- -prøve og RPE ble registrert (figur 3.5.). Neste treningsøkt og prøvetaking fulgte samme design, men med motsatt rekkefølge på treningsøvelsene.

Det ble benyttet Vacutainerglass tilsatt EGTA-Glutathion til blodprøvene for analyse av katekolaminene. Disse ble forbehandlet på avdeling for spesialisert endokrinologi ved Oslo Universitetssykehus (Rikshospitalet, Oslo) og seinere analysert på samme sted. Glassene ble lagret i kjøleskap og skjermet for lys (vedlegg VII).



Figur 3.5: Treningsøkt med inkludert måling av $\dot{V}O_2$ og katekolaminer. Etter testingen med den ene treningsøvelsen fullførte forsøkspersonene treningsøkten ved å trene den andre treningsøvelsen også.

3.3.5. Muskelbiopsier

Punktbiopsier av venstre og høyre *m. vastus lateralis* ble gjennomført mellom 24 og 48 timer etter siste test. Én forsøksperson gjennomførte imidlertid biopsi seks dager etter siste test. Forsøkspersonene unngikk hard, fysisk aktivitet de siste 24 timene før inngrepet.

I forkant av snitting og påfølgende muskelbiopsi ble huden desinfisert med klorhexidin, før lokalbedøvelse (xylocain med AD; $10 \text{ mg ml}^{-1} + 5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) ble satt i underhuden og muskelfascien (AstraZeneca, Södertälje, Sverige). Bedøvelsen virket i 10 min før den ble testet med en prikketest. Deretter ble det utført et snitt på ~10 mm gjennom hud og fascien rundt muskelbuken med skalpell før en steril 6 mm Bergström-nål (Pelomi, Albertslund, Danmark) ble ført inn i muskelen. En vakuumpumpe ble benyttet for å trekke muskelvevet inn i nålen. Det ble totalt tatt ut ~200 mg vev per bein. Til slutt ble snittet stripset med sårlukningstape og dekket med sårbandasje. Vevet ble fordelt for ulike analyser før det umiddelbart ble nedkjølt og oppbevart i ultrafryser ved -80°C . Vevsbiter som hadde mest parallelle og rette fibre ble brukt til å lage snitt. Her ble bitene først bearbeidet slik at eventuelt binde- og fettvev ble dissekert bort, før de ble skåret vinkelrett med barberblad og lagt i en form med stabiliserende lim (Tissue-tek, O.C.T. Compound, Sakura, Nederland). Deretter fulgte en umiddelbar nedfrysning av muskelbiten i forhåndskjølt isopetan ($\sim -140^{\circ}\text{C}$) før lagring i ultrafryser ($\sim -80^{\circ}\text{C}$). Det ble også gjort klart prøver til homogenisering (én hovedprøve + én med restbiter) som også umiddelbart ble nedkjølt og lagret ved $\sim -80^{\circ}\text{C}$.

3.4. Muskelanalyser

Alle muskelanalyser ble utført blindet.

3.4.1. Snitting av muskelbiopsier

Muskelbiopsiene ble tatt ut av ultrafryser (-80°C) og lagt i kryostat (-22°C) (CM1950, Leica Microsystems, Nußloch, Tyskland) i ~45 min. Vevsbiten ble så festet til en kutteskruer med O.C.T-medium (Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound, Sakura, Nederland) før kutteskruen ble montert til kryostatens objekthode. Snittene ble kuttet med en tykkelse på $8 \text{ } \mu\text{m}$ og montert på Superfrost Ultra Plus[®]-objektivglass (Menzel-Gläzer, Brounschweig, Tyskland). To snitt fra forsøkspersonens venstre og høyre bein ble montert på samme glass slik at disse gjennomgikk nøyaktig samme behandling. Det ble tilsammen laget 15 objektivglass med nabosnitt per forsøksperson. Disse ble individuelt pakket inn i linsepapir og aluminiumsfolie og lagret ved -80°C .

3.4.2. Immunhistokjemi

For å kunne identifisere ulike strukturer på snittene ble det benyttet spesifikke antistoff (tabell 3.4.).

Merkeprosessen startet med at objektivglassene ble tatt ut av fryseren og lagt i romtemperatur i 30 min. Deretter ble det tegnet en ring rundt alle snittene med lipidpenn (Super^{HT} PAP-Pen, Biotium Inc., Hayward, CA, USA), etterfulgt av inkubering i bovint serumalbumin (BSA)-blokkingsløsning (10% BSA i phosphate-buffered saline [PBS]; utblandet 1:6 i ultrareint vann [dH₂O]); Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i 30 min. Biopsiene ble så merket immunhistokjemisk med følgende trinn:

1. Inkubering av primært antistoff mot kapillærer (anti-CD31) over natt ved 4°C.
2. Vaskeprosess: 3x10 min i PBS-løsning med 0,05% Tween 20 (0,05% PBS-t).
3. Inkubering av sekundært antistoff (Alexa 488) i 60 min i romtemperatur.
4. Vaskeprosess: 3x10 min i 0,05% PBS-t.
5. Bildetagning av CD31 i lysmikroskop.
6. Inkubering av primært antistoff mot cellemembran (anti-dystrofin) og fibertype II (SC71) i 60 min i romtemperatur.
7. Vaskeprosess: 3x10 min i 0,05% PBS-t.
8. Inkubering av sekundære antistoff (Alexa 488 og Alexa 594) i 60 min i romtemperatur.
9. Vaskeprosess: 3x10 min i 0,05% PBS-t.

Til slutt ble monteringsmediet Prolong[®] Gold Antifade Mountant (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) lagt på snittene og dekkglass (VWR[®] International, Radnor, PA, USA) påmontert. Glassene stod så lysfritt i romtemperatur over natten før de ble lagret i kjøleskap (4°C) for videre analyse. For en mer detaljert oversikt over prosedyren, se vedlegg IX.

Tabell 3.4: Primær- og sekundærantistoff benyttet under immunhistokjemianalysene

<u>Primærantistoff</u>	<u>Produsent</u>	<u>Vertsydyr</u>	<u>Fortynning</u>	<u>Kat.nr.</u>	<u>Lot.nr.</u>
Anti-CD31	Dako	Mus, MC	1:100	M0823	20017556
Anti-SC71	DSHB	Mus, MC	1:100	-	-
Anti-dystrofin	Abcam	Kanin, PC	1:500	ab15277	GR42138-1
<u>Sekundærantistoff</u>					
Goat-anti-mouse IgG Alexa 488	Biotium	Geit	1:200	20010	14C1013
Goat-anti-rabbit IgG Alexa 594	Biotium	Geit	1:200	20112	14C0916

MC: Monoklonal. PC: Polyklonal

3.4.3. Mikroskopi

Ved bildetagning av de merkede snittene ble det benyttet et lysmikroskop (Olympus BX61, Tokyo, Japan) tilkoblet en fluoriserende lyskilde (EXFO X-Cite[®] 120PC-Q, Ontario, Canada). Bildene ble tatt med et digitalt kamera (Olympus DP72, Tokyo, Japan) tilkoblet mikroskopet. Ulike filtere (Texas-Red og FITC) gjorde det mulig å identifisere de sekundære antistoffene som hadde bundet seg til det primære antistoffet. Både kameraet og mikroskopet ble styrt av programvaren cell[^]F 3.4. (Olympus, Tokyo, Japan).

Av hvert snitt ble det tatt tre bilder; av CD31, dystrofin og SC71. Alle bildene ble tatt i gråtoner med 10x forstørrelse.

3.4.4. Kvantifisering av muskelfibre, muskelfibertype og kapillarisering

Kvantifisering av muskelfibernes antall, areal og muskelfibertype, samt antall kapillærer ble gjennomført i programvaren TEMA 1.04. (CheckVision, Hadsund, Danmark) med inverterte gråtonerbilder (figur 3.6. og 3.7.).

Muskelfibre som ikke ble ekskludert (tabell 3.5.) ble videre analysert. Av hvert snitt ønsket vi å inkludere 50 muskelfibre fra hver muskelfibertype (muskelfibertype I og II), siden McCall, Byrnes, Dickinson, & Fleck (1998) viste at dette gav et valid mål på kapillarisering. To forsøkspersoner ble ekskludert av denne grunn. I analysene ble $52 \pm$

3. Metode

12 (variasjonsbredde: 39-70) muskelfibertype I og 79 ± 17 (variasjonsbredde: 56-102) muskelfibertype II inkludert for 1B2A-beinet, mens de respektive verdiene for 1B-beinet var 61 ± 24 (variasjonsbredde: 40-113) og 76 ± 28 (variasjonsbredde: 35-122).

Tabell 3.5: Eksklusjonskriterier for muskelfibre

Eksklusjon av muskelfibre

Fibre hvor det var brudd på membranen

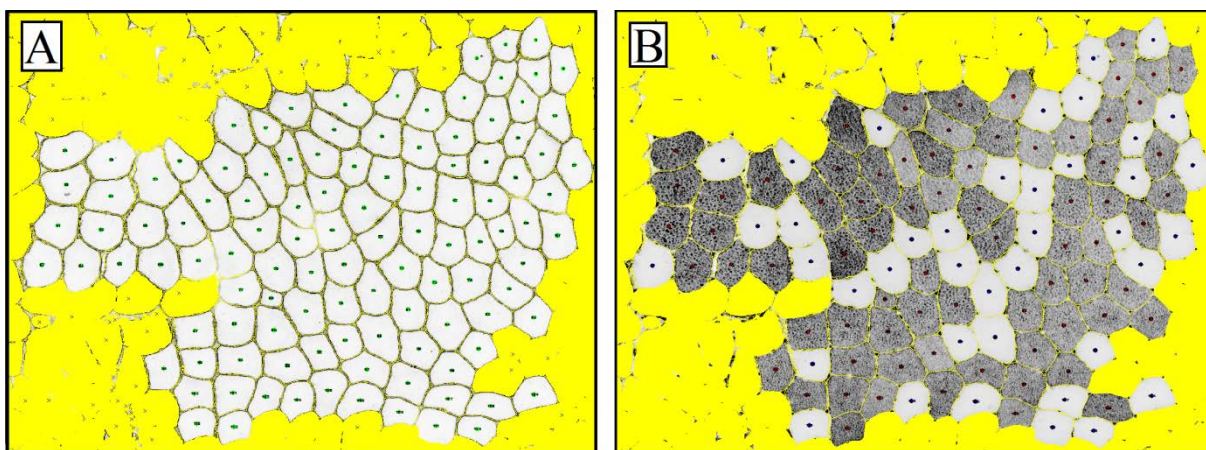
Fibre hvor snittet var brettet

Fibre med unormal form (avlange/skarpe kanter)

Skadde fibre (eks. frostskafer)

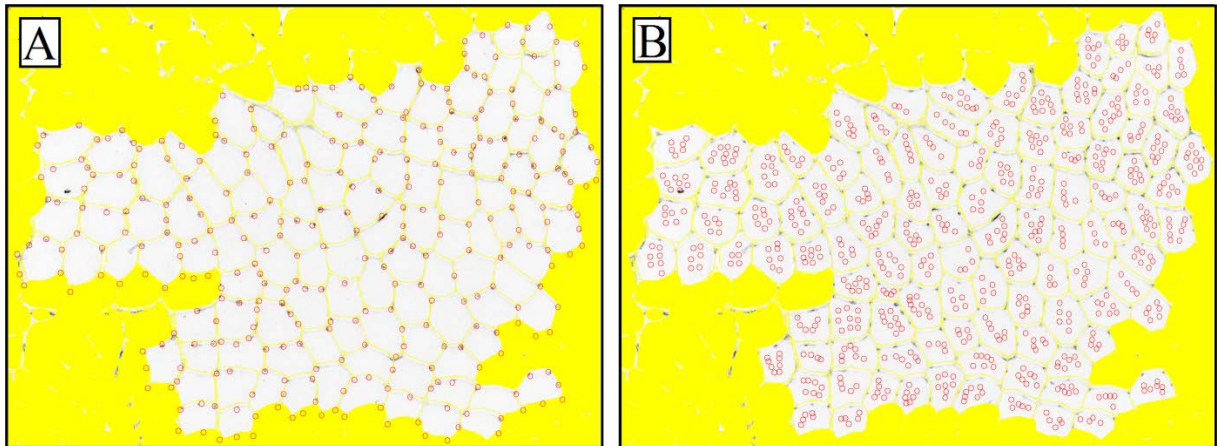
Fibre som lå langs kanten av snittet

Fibre som grenset til arterioler/venoler/støy



Figur 3.6: Beregning av muskelfibertverrsnittareal (A) og muskelfibertype (B) i TEMA.

Beregning av muskelfibertype og -tverrsnittareal ble gjennomført (figur 3.6.). Deretter ble kapillærer som grenset til inkluderte muskelfibre telt i to omganger; én hvor det absolute antallet av kapillærer per snitt ble talt (figur 3.7A) og en gang hvor antall kapillærer i kontakt med hver muskelfiber ble talt (CAF; figur 3.7B). Denne prosessen ble gjort manuelt.



Figur 3.7: Eksempel på telling av absolutt antall kapillærer (A) og kapillærer rundt hver muskelfiber (CAF; B).

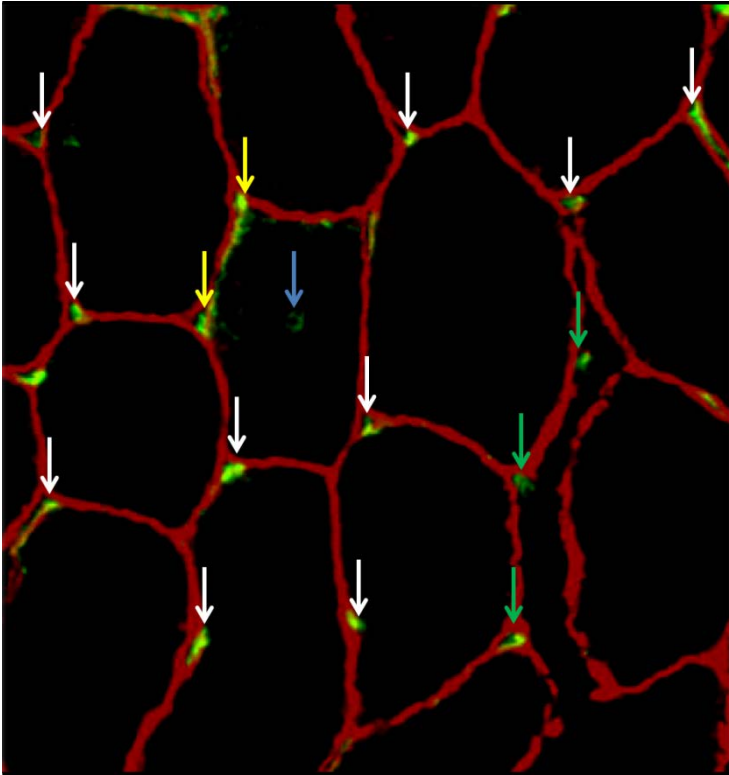
Reliabiliteten på kapillærtellingen ble kontrollert ved at to personer vurderte de samme snittene. Det ble benyttet følgende tellekriterier (tabell 3.6 og figur 3.8.):

Tabell 3.6: Kapillærtellekriterier

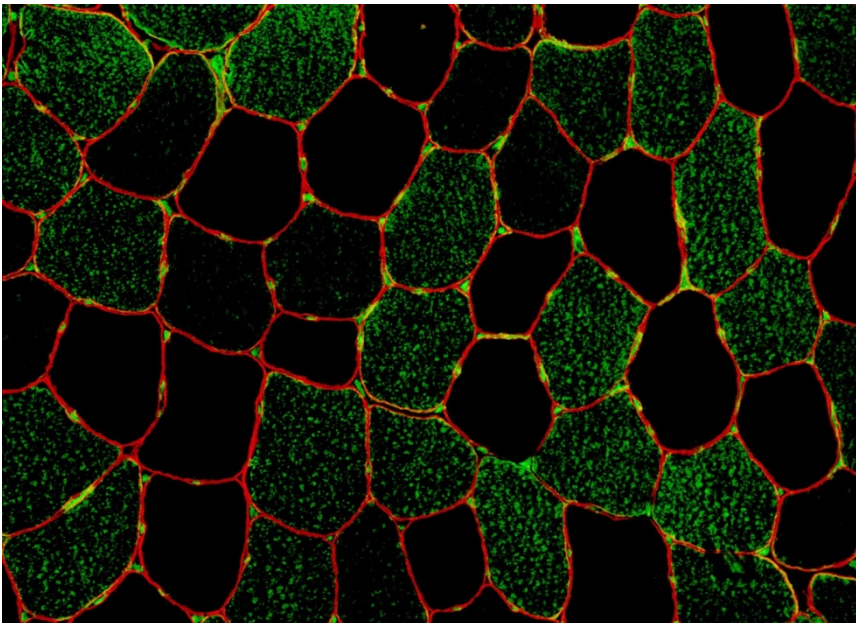
Kapillæren måtte ligge i nær tilknytning til dystrofinkanten

Kapillærmerking i lengderetning av snittet ble konsekvent telt som én kapillær, hvis det ikke var en vesentlig nyanseforskjell i merkingen

Der det kunne se ut til at muskelfibre var blitt dratt fra hverandre ble allikevel ikke kapillærer regnet for å grense til disse fibre, hvis de ikke lå i umiddelbar nærhet



Figur 3.8: Eksempelbilde av kapillærtellekriteriene. Hvite piler viser kapillærer som uten tvil ble telt som én. Blå pil viser kapillær som ikke ble telt, siden den ikke ligger i nærheten av cellemembranen. Gule piler er et eksempel på avlang kapillærmerking som ble telt som to kapillærer, siden det var en klar nyanseforskjell i merkingen. Grønne piler viser kapillærer som ble regnet til de muskelfibrene de visuelt ligger inntil. De ble ikke regnet for å grense til muskelfiberen til høyre for pilene selv om det kan se ut til at disse opprinnelig har ligget inntil hverandre.



Figur 3.9: Eksempelbilde som viser de tre merkingene mot cellemembran, muskelfibertype II og kapillærer. Rød er dystrofinmerkingen (cellemembran), grønne fibre er merket med SC71 (fibertype II), mens grønn merking som ligger i tilknytning til dystrofinmerkingen er CD31 (kapillærer). Bildet er tatt med 20x forstørring.

I databearbeidelsen ble disse variablene kvantifisert: C/F; ratio mellom antall kapillærer og antall muskelfibre i et område, CD; kapillærtetthet (kapillærer/mm²), CAF; gjennomsnittlig antall kapillærer rundt hver muskelfiber, CAFA; kapillærer rundt hver muskelfiber relatert til dens tverrsnittsareal (CSA). CAFA ble regnet ut ved hjelp av formelen CAF/CSA (i μm^2) $\times 1000$ for hver individuelle muskelfiber (Song, Forsgren, Liu, Yu, & Stål, 2014).

3.4.5. Homogenisering

Western Blot-analysene krevde forarbeid i form av homogenisering og kvantifisering av totalt proteininnhold i prøvene.

Muskelbiopsiene ble oppbevart ved -80°C inntil homogenisering. Under homogeniseringen ble det brukt 1 ml T-PER[®] (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) og 10 μl Calbiochem[®] Protease Inhibitor Cocktail Set IV (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) per ~ 50 mg muskelvev.

Hver muskelprøve ble homogenisert i 2 x 3-5 sekunder med Omni TH-02 (Omni International, Kennesaw, GA, USA) med tilhørende engangskniver, eller til alt vev var løst opp. Etter homogeniseringen lå prøvene til risting i kjøleskap (4°C) i 30 min før de ble sentrifugert ved 10 000G i 10 min ved 4°C . Supernatanten ble deretter overført til nye 1,5 ml rør før 25 μl -prøver ble aliquotert over i 0,2 ml rør. Etter aliquoteringen ble prøvene sortert og frosset ned til -80°C .

3.4.6. Proteinmåling

Totalt proteininnhold i prøvene ble bestemt ved hjelp av RC/DC[™] Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Som standardprotein ble bivine γ -globulin benyttet, med et spekter fra 0,125 til 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Prøvene ble fortynnet 1:4, slik at proteinkonsentrasjonen skulle falle innenfor standardkurven definert av standardproteinene. Det ble pipetert triplikater á 5 μl av hver enkelt prøve i en 96-brønns mikrotiterplate (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Østerrike). Etter å ha pipetert prøvene ble det tilsatt 25 μl reagens A*S og 200 μl reagens B i hver brønn. Prøvene sto deretter lysfritt i minimum 15 min før de ble avlest med ASYS Expert 96 (Biochrom Ltd., Cambridge, Storbritannia).

Proteinkonsentrasjonene ble beregnet i KIM Immunochemical Processing Software 32

(ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Østerrike). Gyldig prøve ble satt til duplikater med CV <10%.

3.4.7. Western Blot

Basert på totalproteinmålingene ble prøvene fortynnet med dH₂O slik at de hadde samme proteinkonsentrasjon. 5M DTT reducing agent og 4x Laemmli Sample Buffer (1:25) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ble tilsatt prøvene i et forhold på 1:4 av det totale prøvevolumet. Prøvene ble deretter satt på varmeblokk (70°C) i 10 min for denaturering for deretter å bli applisert med et loading volum på 30 µl og en proteinmengde på 35 µg over på en Mini-PROTEAN[®] TGX Stain-Free[™] gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Prøvene fra én forsøksperson ble applisert på samme gel og det ble satt duplikater i hver kjøring.

Elektroforesen ble utført med 200 volt (V) i ~31 min (Mini-PROTEAN Tetra Cell og PowerPac[™] HC, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) før det ble tatt bilder av UV-aktivert gel med ChemiDoc[™] MP og programvaren Image Lab[™] 5.1. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Deretter ble proteinene overført fra gel til PVDF-membran (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) i løpet av blottingen. Blottingen ble utført med 100V i 30 min (Criterion[™] Blotter, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) før membranene ble tatt bilder av med ChemiDoc[™] MP. Disse bildene ble benyttet som loading control i de endelige utregningene. Denne loading control-metoden har vist seg å være bedre enn tradisjonelle metoder som bruk av referanseproteiner som α -tubulin, β -aktin og GADPH (Vigelsø *et al.*, 2015).

Blokkering av membranene ble utført i 5% melkeløsning (i tris-buffered saline-løsning med 0,1% Tween 20; TBS-t) i 2 timer på ristevekt i romtemperatur. Neste steg var å kutte membranene etter proteinenes molekylvekt og inkubere disse i primært antistoff. Antistoff for Cytochrome c Oxidase subenhet 4 (COX4), Hydroxyacyl-coenzyme A Dehydrogenase (HADH) og Citrate synthase (CS) ble inkubert over natt ved 4°C og svak risting. Neste dag ble membranene vasket i 15 min med TBS-t og 3x5 min med tris-buffered saline (TBS) før de ble inkubert i sekundært antistoff i 1 time på ristevekt i romtemperatur, etterfulgt av en ny, identisk vaskerunde. Bilder ble så tatt etter at membranene hadde blitt inkubert med SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i ~2 min. For en mer detaljert

3. Metode

oversikt over prosedyren, se vedlegg VIII. For oversikt over benyttede antistoffer, se tabell 3.7.

Tabell 3.7: Primær- og sekundærantistoff benyttet under Western Blot-analysene

<u>Primærantistoff</u>	<u>Produsent</u>	<u>Vertsdyr</u>	<u>Fortynning</u>	<u>Kat.nr.</u>	<u>Lot.nr.</u>
Anti-COX4	Abcam	Mus, MC	1:1 000	ab14744	GR109839-13
Anti-CS	Abcam	Kanin, PC	1:2 000	ab96600	GR134613-9
Anti-HADH	Abcam	Kanin, PC	1:8 000	ab154088	GR113495-49
<u>Sekundærantistoff</u>					
Goat-anti-mouse IgG	Thermo Scientific	Geit	1:30 000	31430	IK1106742
Goat-anti-rabbit IgG	Cell Signaling	Geit	1:3 000	7074S	25

MC: Monoklonal. PC: Polyklonal

Databehandling

Forskjell mellom 1B- og 1B2A-beinet ble beregnet ved å dividere lysintensiteten på antistoffaktivert protein med totalproteinbildet tatt etter blottingen. En differanse mellom duplikater av venstre og høyre bein på <20% ble regnet som godkjente verdier. Gjennomsnittet av duplikatene av venstre og høyre bein ble så brukt i beregningene. Etter at analysene var utført ble 1B-beinet satt som kontroll og 100%.

3.5. Pilotstudier

Før oppstart av prosjektet ble det gjennomført en pilotstudie med to forsøkspersoner. Deltakerne gjennomførte $19 \pm 2,8$ treningsøkter med 1B- og 1B2A-trening. I tillegg gjennomførte de et fullt testbatteri med pre- og posttester av $1KE_{\text{submaks}}$ og $1KE_{\text{maks}}$ på begge bein, samt maksimal armsykling og ergometersykling. Én av forsøkspersonene ble det også tatt biopsi av etter treningsperioden i begge beins *m. vastus lateralis*.

Pilotstudien gav oss god trening i gjennomføring av treningsprogram og tester. Siden det endelige studiedesignet var tilnærmet likt, ble dataene fra pilotstudien inkludert i de endelige analysene.

3.5.1. Near-infrared spectroscopy

Near-infrared spectroscopy (NIRS) ble benyttet til å vurdere lokale forandringer i O_2 -leveranse og –metning.

Fire av forsøkspersonene ($\dot{V}O_{2\text{maks}}$: $58,7 \pm 6,2 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) gjennomførte en treningsøkt med 10 min 1B og 10 min 1B2A med omtrent lik ytre effekt som under treningsperioden, i tillegg til baseline-målinger á 3 min med 1KE og armsykling uten ytre effekt. Under forsøket hadde forsøkspersonene montert en PortaMon (Artinis Medical Systems, Elst, Nederland) til *m. vastus lateralis* og *m. biceps brachii* som målte deoxyhemoglobin (HHb) og totalt hemoglobin (tHb) intramuskulært (figur 3.10.). Disse ble kledd i plastfolie og skjermet for lys under forsøket.



Figur 3.10: Plassering av PortaMon-sensorene for analyse av O_2 -metning under treningsøvelsene, her; 1B2A.

Ved utregning av HHb og tHb ble det benyttet delta-verdier (Δ) av snittverdiene oppnådd under siste minutt av 1B2A- eller 1B-trening, subtrahert med snittverdien under siste minutt med ubelastet arbeid. Verdiene ble avlest i programvaren Oxysoft 3.0.53. (Artinis Medical Systems, Elst, Nederland).

3.6. Statistikk

Alle rådata ble testet for normalfordeling med Kolmogorov-Smirnov-test og Shapiro-Wilk-test ($p < 0,05$). Som spredningsmål på gjennomsnittsverdier er standardavvik (SD) benyttet i alle tabeller, figurer og tekst. Forskjell mellom beina ble undersøkt med tosidig uparet, Student's t-test, mens endring fra pre- til posttest for et bein ble

3. Metode

undersøkt med tosidig paret Student's t-test. På rådata som på én eller begge normalitetstestene ikke ble karakterisert som normalfordelte ble det i tillegg til parametriske tester gjennomført ikke-parametriske tester (avhengige utvalg; Wilcoxon signed-rank test, uavhengige utvalg; Mann-Whitney U-test). Signifikansnivået ble satt til 5% ($p < 0,05$).

Forskjell mellom beina, endring fra pre- til posttest, samt forskjell i endring mellom beina ble også utregnet ved hjelp av effektstørrelse (ES; Cohen's d). I noen av disse utregningene ble sammenslått standardavvik (P-SD) benyttet.

$$P\text{-}SD = \sqrt{\frac{(n_{1B2A} - 1)V_{1B2A} + (n_{1B} - 1)V_{1B}}{n_{1B2A} + n_{1B} - 2}}$$

$$\text{Forskjell mellom beina} = \frac{\bar{X}_{1B2A} - \bar{X}_{1B}}{P\text{-}SD}$$

$$\text{Endring fra pre- til posttest} = \frac{\bar{X}_{\text{post}} - \bar{X}_{\text{pre}}}{SD_{\text{pre}}}$$

$$\text{Forskjell i endring fra pre- til posttest} = \frac{\bar{X}_{\Delta 1B2A} - \bar{X}_{\Delta 1B}}{P\text{-}SD}$$

Der n ; antall bein, V ; varians (SD), \bar{x} ; gjennomsnitt, Δ ; differansen mellom verdier fra post- og pretest.

ES ble klassifisert som ubetydelig ($ES < 0,2$), liten ($ES < 0,5$), moderat ($ES < 0,8$) og stor ($ES \geq 0,8$) (Cohen, 1988, sitert av Vincent & Weir, 2012, s. 165). ES ble kun regnet ut på variabler med absolutte verdier. Derfor ble ikke ES utregnet for western blot-, NIRS- og fibertypedata.

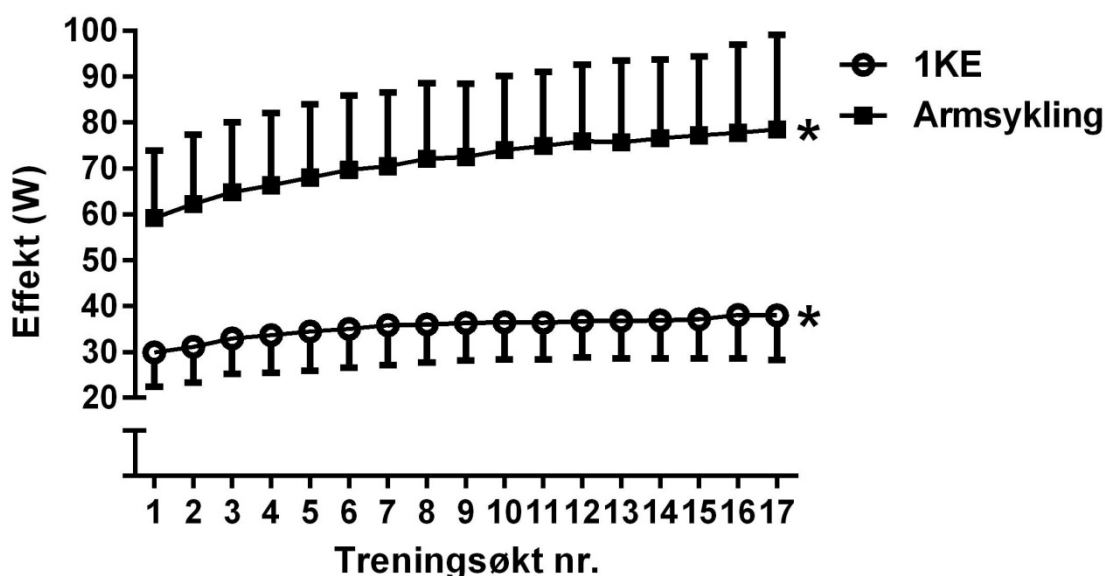
Databehandlingen ble gjennomført i Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) og IBM SPSS Statistics 21.0 (International Business Machines, New York, NY, USA).

4. Resultater

4.1. Treningen

1B- og 1B2A-beinet gjennomførte det samme arbeidet (50 ± 17 kilojoule per treningsøkt).

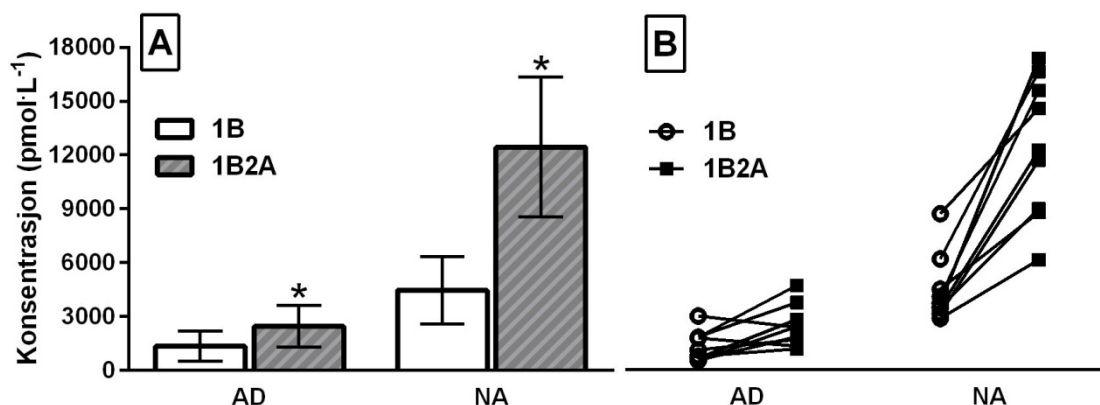
Den ytre effekten under treningen for 1B- og 1B2A-beinet var identisk og økte $21\% \pm 10\%$ ($p < 0,01$; $ES = 0,77$) fra første til siste treningsuke. Effekten ved armsykling økte $28\% \pm 10\%$ ($p < 0,01$; $ES = 1,10$; figur 4.1.).



Figur 4.1: Effekt under treningsøktene for beina (1B og 1B2A) og armene (1B2A) ($n = 11$). For de som gjennomførte flere enn 17 økter, er snitteffekt på de øktene satt som økt nr. 17. W; watt. Asterisk (*) indikerer signifikant endring fra pre- til posttest ($p < 0,01$). Feilfelt er 1 SD.

$\dot{V}O_2$ under 1B2A-trening var i gjennomsnitt $112\% \pm 11\%$ høyere enn ved 1B ($p < 0,01$; $ES = 2,79$) og tilsvarende var HF, $\dot{V}E$ og La^- høyere ($p < 0,01$; vedlegg I). RPE var imidlertid lik for de to treningsøvelsene ($14,4 \pm 1,6$ og $14,4 \pm 1,2$ for henholdsvis 1B og 1B2A; $p = 1,00$; $ES = 0,00$).

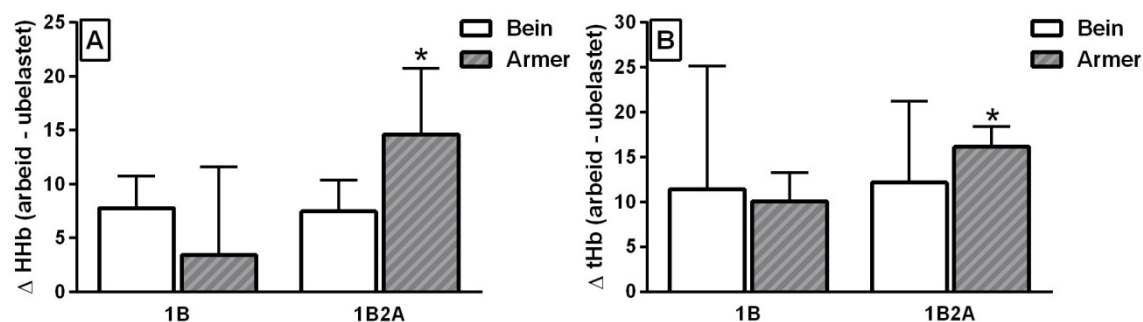
AD og NA i venøst blodplasma var under 1B2A henholdsvis $139\% \pm 144\%$ ($p < 0,05$; $ES: 1,11$) og $197\% \pm 101\%$ ($p < 0,01$; $ES = 2,61$) høyere enn under 1B (figur 4.2.).



Figur 4.2: Katekolaminkonsentrasjon i blodplasma i gjennomsnitt (A) og individuelle verdier (B) under treningsøkt med 1B og 1B2A ($n=9$). AD; adrenalin, NA; noradrenalin, $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$; pikomol per liter. Asterisk (*) indikerer signifikant forskjell fra 1B ($p<0,05$). Feilfelt er 1 SD.

For de fire forsøkspersonene vi testet HHb i *m. vastus lateralis* under 1B2A var det ingen signifikant forskjell sammenlignet med 1B ($p=0,39$; figur 4.3A).

Heller ikke for tHb fant vi signifikant forskjell mellom beina ($p=0,84$; figur 4.3B).

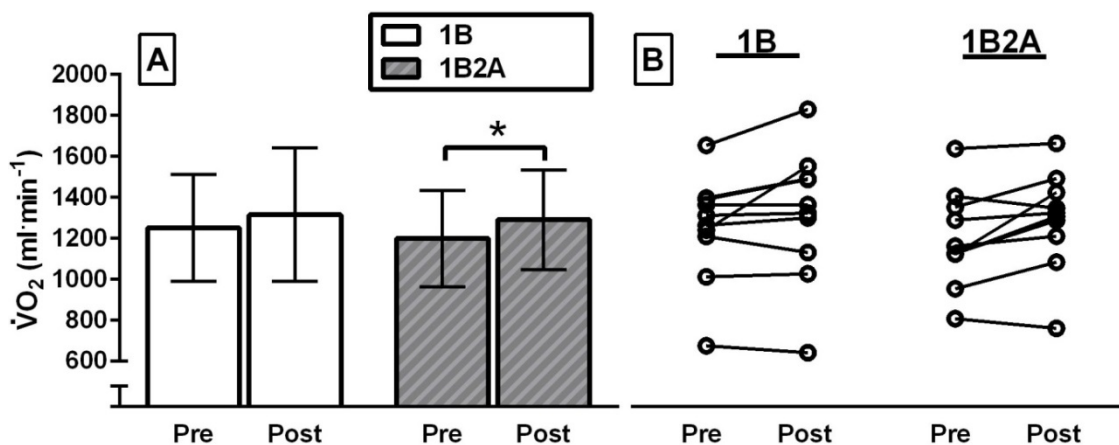


Figur 4.3: HHb (A) og tHb (B) under 1B- og 1B2A-trening subtrahert med tilsvarende arbeid uten ytre effekt (0W) ($n=4$). Asterisk (*) indikerer signifikant forskjell fra 1B ($p<0,05$). Feilfelt er 1 SD.

4.2. Resultater fra $1KE_{maks}$

Ved pretest var det ingen signifikante forskjeller mellom beina for noen av variablene ved $1KE_{maks}$.

$1KE \dot{V}O_2$ peak økte ved trening ($p<0,05$; $ES=0,32$). Økningen var signifikant for 1B2A-beinet ($8,0\% \pm 10,1\%$, $p<0,05$; $ES=0,39$), men ikke for 1B-beinet ($4,3\% \pm 9,0\%$; $p=0,11$; $ES=0,24$) (figur 4.4.). Økningen var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom beina ($p<0,58$; $ES=0,12$).



Figur 4.4: Gjennomsnittlige verdier (A) og individuelle verdier (B) av 1KE $\dot{V}O_2$ peak for 1B- og 1B2A-beinet ved pre- og posttest ($n=10$). Asterisk (*) indikerer signifikant forskjell fra pretest ($p<0,05$). Feilfelt er 1 SD.

Høyeste oppnådde effekt ved $1KE_{maks}$ økte ved trening ($p<0,01$; $ES=0,61$). Økningen var signifikant for både 1B2A- ($15\% \pm 9\%$, $p<0,01$; $ES=0,58$) og 1B-beinet ($17\% \pm 7\%$, $p<0,01$; $ES=0,64$). Økningen var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom beina ($p=0,57$; $ES= -0,09$; vedlegg II).

1KE TTU økte ved trening ($p<0,01$; $ES=0,61$). Økningen var signifikant for både 1B2A- ($21\% \pm 9\%$, $p<0,01$; $ES=0,59$) og 1B-beinet ($18\% \pm 8\%$, $p<0,01$; $ES=0,61$). Økningen var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom beina ($p=0,96$; $ES=0,01$; vedlegg II).

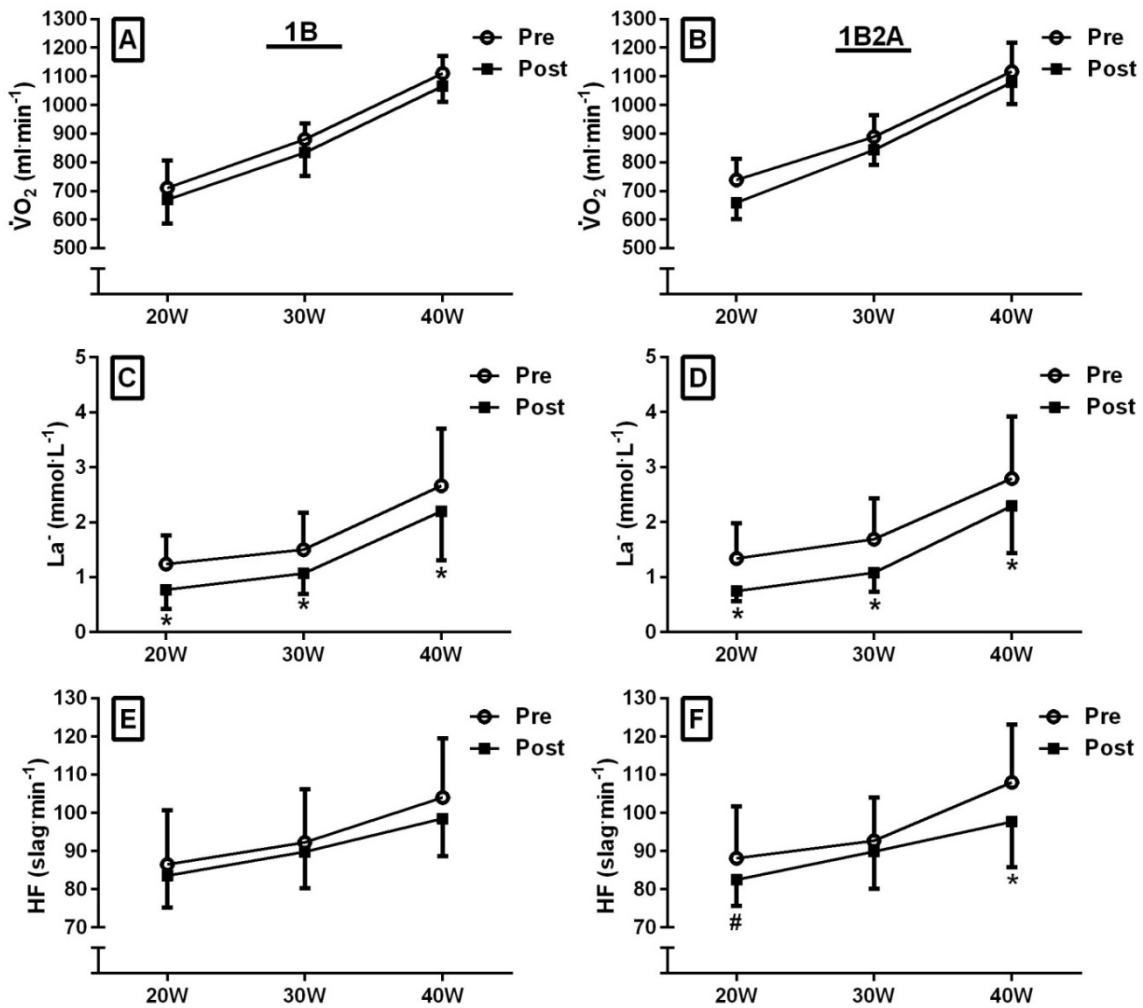
Det var heller ingen signifikante endringer mellom 1B- og 1B2A-beinet i høyeste oppnådde RER ($p=0,47$; $ES= -0,31$), HF ($p=0,66$; $ES= -0,14$), $\dot{V}E$ ($p=0,32$; $ES=0,34$), La^- ($p=0,71$, $ES=0,18$) eller RPE ($p=0,51$; $ES=0,25$; vedlegg II).

4.3. Resultater fra $1KE_{submaks}$

Ved pretest var det ingen signifikante forskjeller mellom beina for noen av variablene ved $1KE_{submaks}$.

$1KE_{submaks}$ $\dot{V}O_2$ ble redusert ved trening ($-6\% \pm 10\%$; $p<0,01$; $ES= -0,24$) når verdiene fra de tre submaksimale effektene ble slått sammen, men det var imidlertid ingen forskjell i endring mellom beina ($p=0,93$; $ES= -0,02$). For enkelteffektene (20, 30 og 40W) var det derimot ingen signifikant endring for verken 1B2A- eller 1B-beinet (figur 4.5A-B).

4. Resultater



Figur 4.5: Pre- og postverdier for $\dot{V}O_2$ (A-B), La^- (C-D) og HF (E-F) for 1B- og 1B2A-beinet (n=8). Asterisk (*) indikerer signifikant endring fra pretest ($p < 0,05$). #; tendens til endring fra pretest ($p < 0,1$). Feilfelt er 1 SD.

$1KE_{\text{submaks}}$ La^- ble signifikant redusert ved trening ($-22\% \pm 20\%$; $p < 0,01$; $ES = -0,49$) når verdiene for de tre submaksimale effektene ble slått sammen. Dette gjaldt også ved alle enkelteffektene til 1B2A- og 1B-beinet ($p < 0,05$) (figur 4.5C-D). Det var imidlertid ingen signifikant forskjell i endring mellom beina ($p = 0,25$; $ES = 0,15$).

$1KE_{\text{submaks}}$ HF ble signifikant redusert ved trening ($-5\% \pm 10\%$; $p < 0,01$; $ES = -0,34$) når verdiene for de tre submaksimale effektene ble slått sammen, men det var imidlertid ingen signifikant forskjell i endring mellom beina ($p = 0,58$; $ES = 0,08$). For enkelteffektene var det kun 1B2A-beinet ved 40W som endret seg signifikant ($p < 0,01$; $ES = -0,68$; figur 4.5E-F).

Alle data fra $1KE_{\text{submaks}}$ i vedlegg III.

4.4. Biopsidata

4.4.1. Muskelfiberareal og muskelfibertetthet

Ved posttest var det ingen signifikant forskjell i muskelfibrenes tverrsnittsareal mellom 1B2A- og 1B-beinet for fibertype I, II eller alle fibre slått sammen. Det var heller ingen forskjell i muskelfibertetthet mellom beina (tabell 4.1.).

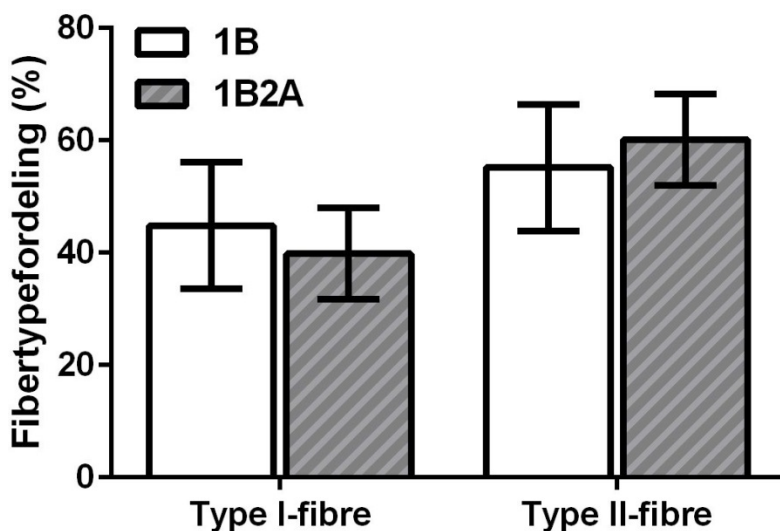
Tabell 4.1: Muskelfiberareal og muskelfibertetthet for 1B2A- og 1B-beinet

	1B2A (n=8)	1B (n=8)	Sammenligning		
			Snitt \pm SD	Snitt \pm SD	Forskjell (% snitt \pm SD)
CSA fibertype I (μm^2)	4251 \pm 1238	5075 \pm 1209	-14 \pm 21	0,20	-0,67 (moderat)
CSA fibertype II (μm^2)	4936 \pm 1642	5347 \pm 1433	-5 \pm 29	0,60	-0,27 (liten)
CSA alle fibre (μm^2)	4638 \pm 1438	5225 \pm 1280	-9 \pm 25	0,40	-0,43 (liten)
MFT (fibre/mm ²)	230 \pm 53	202 \pm 51	17 \pm 33	0,31	0,53 (moderat)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, forskjell; prosent forskjell fra 1B-beinet, P; p-verdi, CSA; muskelfibertverrsnittsareal, MFT; muskelfibertetthet.

4.4.2. Muskelfibertype

Ved posttest hadde 1B2A-beinet en muskelfibertypefordeling på 40% \pm 8% type I- og 60% \pm 8% type II-fibre, mens 1B-beinet hadde en fordeling på henholdsvis 45% \pm 11% og 55% \pm 11% type I- og II-fibre (figur 4.6.). Det var ingen signifikant forskjell mellom beina.



Figur 4.6: Prosentvis fordeling av muskelfibertype i m. vastus lateralis for 1B- og 1B2A-beinet (n=8). Feilfelt er 1 SD.

4.4.3. Kapillarisering

Ved posttest var det ingen signifikante forskjeller mellom 1B2A- og 1B-beinet i C/F, CD, CAF eller CAFA (tabell 4.2. og vedlegg V).

Tabell 4.2: Ulike kapillariseringsparametre for 1B2A- og 1B-beinet

	1B2A (n=8)	1B (n=8)	Sammenligning		
	Snitt ± SD	Snitt ± SD	Forskjell (% snitt ± SD)	P	Effektstørrelse (Cohen's <i>d</i>)
C/F	2,43 ± 0,53	2,49 ± 0,47	-2 ± 15	0,81	-0,13 (ubetydelig)
CAF fibertype I	5,2 ± 1,1	5,6 ± 1,1	-7 ± 11	0,44	-0,40 (liten)
CAF fibertype II	5,1 ± 1,0	5,2 ± 0,8	-2 ± 11	0,87	-0,08 (ubetydelig)
CD (kapillærer/mm ²)	540 ± 100	494 ± 120	13 ± 29	0,42	0,41 (liten)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, forskjell; prosent forskjell fra 1KE-beinet, P; p-verdi, C/F; ratio mellom antall kapillærer og antall muskelfibre i et område, CAF; gjennomsnittlig antall kapillærer rundt hver muskelfiber, CD; kapillærtetthet.

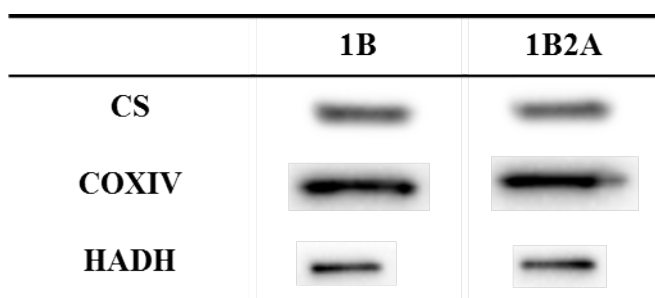
4.4.4. Oksidative enzymer

Proteinkonsentrasjonen av enzymene CS, COX4 og HADH var ved posttest ikke signifikant forskjellig mellom beina (tabell 4.3. og figur 4.7.).

Tabell 4.3: Oksidative enzymer for 1B2A- i prosent av 1B-beinet

	1B2A (% av 1B; n=10) Snitt ± SD	P-verdi
CS	100 ± 25	0,99
COX4	92 ± 23	0,34
HADH	96 ± 13	0,31
Slått sammen (n=30)	96 ± 21	0,30

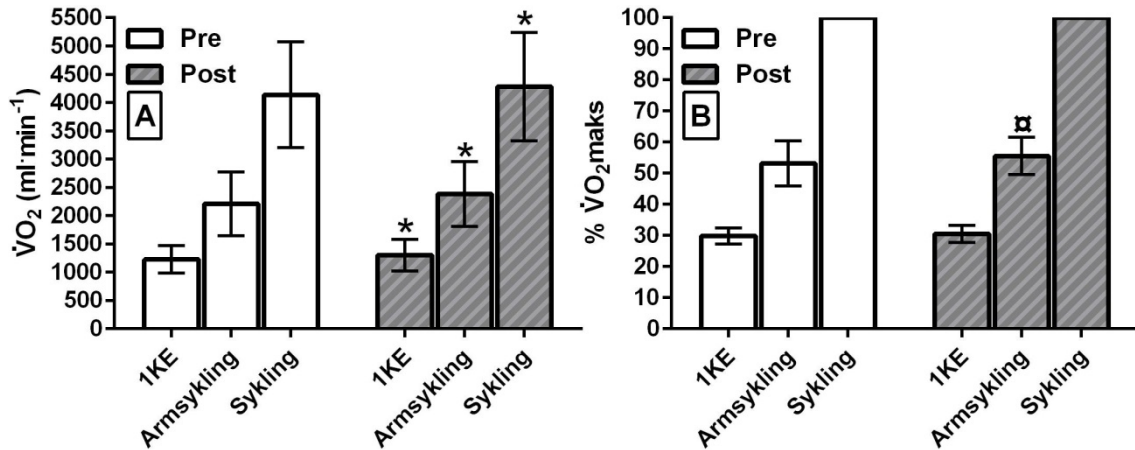
Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, CS; Citrate Synthase, COX4; Cytochrome c Oxidase subenhet 4, HADH; Hydroxyacyl-coenzyme A Dehydrogenase



Figur 4.7: Representative western blot for proteinene som ble studert.

4.5. $\dot{V}O_2$ under armsykling og ergometersykling

$\dot{V}O_2$ peak ved armsykling økte $8,3\% \pm 7,8\%$ ($p < 0,01$; $ES = 0,27$), mens $\dot{V}O_2$ maks ved ergometersykling økte $3,4\% \pm 3,3\%$ ($p < 0,01$; $ES = 0,15$) fra pre- til posttest (figur 4.8A).



Figur 4.8: $\dot{V}O_2$ peak 1KE og armsykling, samt $\dot{V}O_2$ maks ergometersykling i absolutte (A) og relative verdier av $\dot{V}O_2$ maks sykling (B) ($n = 10$). Asterisk (*) indikerer signifikant endring fra pretest ($p < 0,05$). ‡; Tendens til endring fra pretest ($p < 0,1$). Feilfelt er 1 SD.

Når $\dot{V}O_2$ maks ved ergometersykling ble satt til 100% og de andre øvelsene som relative verdier av det, fant vi en tendens til endring fra pre- til posttest på $2,4\% \pm 3,4\%$ for maksimal armsykling ($p < 0,1$), men ikke for $1KE_{\text{maks}}$ (figur 4.8B).

Oversikt over alle data fra de maksimale testene med armsykling og ergometersykling i vedlegg IV.

5. Diskusjon

Hovedfunn i denne studien er lik treningsrespons uavhengig av om 1KE-treningen ble gjennomført med eller uten samtidig trening av armene.

1B2A-trening medførte et betydelig høyere systemisk stress sammenliknet med 1B-trening. Likevel førte ikke 5 uker med de to treningsøvelsene til ulik økning i $\dot{V}O_2$ peak, TTU eller høyeste oppnådde effekt ved $1KE_{maks}$ og det var ingen forskjell i reduksjon av $\dot{V}O_2$, HF eller La^- ved $1KE_{submaks}$. Etter treningsperioden var det heller ingen forskjell mellom beina i kapillarisering eller konsentrasjon av oksidative enzymer. Vi fant imidlertid en økning i $1KE \dot{V}O_2$ peak fra pre- til posttest kun for 1B2A-beinet, men dette gav ikke forskjell i $\dot{V}O_2$ peak mellom beina ved posttest.

5.1. Systemisk stress

Under 1KE-arbeid er muskelarbeidet begrenset til *m. quadriceps femoris* som er ~2-2,5 kg (Boushel & Saltin, 2013; Richardson *et al.*, 1993). Ved 1B2A adderes armsykling, noe som gir et tillegg i aktiv muskelmasse på ~6 kg (Boushel & Saltin, 2013). I denne studien har vi vist at addering av muskelmasse ved 1B2A-trening gav et større systemisk stress enn 1B-trening på en rekke variabler. 1B2A-trening gav 112% høyere $\dot{V}O_2$, 197% høyere NA-konsentrasjon, 139% høyere AD-konsentrasjon og 48% høyere HF enn 1B-trening. Effekten av treningen var imidlertid lik mellom beina. Dette står i kontrast med funnene til Abbiss *et al.* (2011) som fant en større forbedring i oksidativt potensial (COX- og GLUT4-konsentrasjon) ved trening med liten muskelmasse, sammenliknet med stor muskelmasse. Det er imidlertid verdt å merke seg at de sammenliknet trening med ettbeins- og tobeins sykling hvor treningen ved sistnevnte mest sannsynlig var sentralt begrenset siden gjennomsnittlig effekt per bein var lavere (13%). Dette førte mest sannsynlig til et større mekanisk stimuli ved ettbeins sykling, som kan være en medvirkende årsak til resultatet. I vår studie var det mekaniske stimuliet likt mellom beina og vi kan derfor konkludere med at forskjellig systemisk stress *per se* ikke gav ulike adaptasjoner til treningen.

5.2. Hvorfor var ikke treningsresponsen forskjellig?

De viktigste stimuliene bak muskulær tilpasning til utholdenhetstrening ser ut til å være av metabolsk eller mekanisk karakter, men hormonelle og nevralfaktor spiller trolig

også vesentlige roller (Flück & Hoppeler, 2003; Flück, 2006). Trolig gir 1KE-arbeid på en gitt effekt et likt mekanisk og nevralt stimuli (intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon) for kneekstensorene om treningen gjennomføres med eller uten samtidig trening av armene. Disse faktorene bidro derfor trolig ikke til et ulikt lokalt stress mellom beina.

Det metabolske stresset, i form av opphopning av metabolitter som La^- , P_i og hydrogenioner lokalt i arbeidende muskulatur, øker ved en mer anaerob energiomsetning som følge av utilstrekkelig O_2 -leveranse til arbeidende muskulatur (Pope, Willardson, & Schoenfeld, 2013; Schoenfeld, 2010). Tidligere studier har imidlertid ikke funnet en redusert blodstrøm til arbeidende muskulatur ved 1KE med tillagt armsykling sammenlignet med kun 1KE-arbeid (Richardson, Kennedy, *et al.*, 1995; Savard *et al.*, 1989). Dette indikerer en lik O_2 -leveranse til arbeidende muskulatur. I vår studie støttes dette av ingen forskjell i HHb og tHb i *m. vastus lateralis* ved trening med 1B og 1B2A, samt lik RPE. Det metabolske stresset i beina var derfor trolig relativt likt mellom treningsøvelsene, selv om vi ikke direkte har målt dette i studien.

Den systemiske hormonresponsen, målt som katekolaminkonsentrasjon, var forhøyet ved 1B2A-, sammenliknet med 1B-trening i vår studie. Funnene til Savard *et al.* (1989) indikerer at det også var en høyere lokal konsentrasjon av katekolaminer i arbeidende muskulatur (NA spillover) ved 1B2A.

Med unntak av den hormonelle responsen kan det se ut til at det lokale stresset i beina var tilnærmet likt, selv om det systemiske stresset var ulikt. Dette kan være med å forklare hvorfor treningsresponsen ikke var forskjellig slik Abbiss *et al.* (2011), Norrbom *et al.* (2004) og Gustafsson *et al.* (2005) fant i sine studier. Disse og denne studien indikerer at den lokale tilpasningen til utholdenhetstrening muligens i større grad bestemmes av forskjeller i metabolsk og mekanisk stress enn den totale energiomsetningen og katekolaminresponsen under trening.

Det bør nevnes at vi ikke kan utelate om et større treningsvolum eller et annet studiedesign ville ført til et annet resultat. Vårt studiedesign tar f.eks. ikke høyde for en mulig cross transfer-effekt mellom beina, slik andre studier har observert (Kannus *et al.*, 1992; Saltin *et al.*, 1976).

5.3. Katekolaminrespons

Den økte systemiske katekolaminkonsentrasjonen vi fant ved 1B2A er i overenstemmelse med Savard *et al.* (1989) sin studie. De gjennomførte 1KE-arbeid, med og uten armsykling, hvor NA- og AD-konsentrasjonen under 1B-trening var henholdsvis 28% og 55% av verdiene ved 1B2A-trening. I vår studie var de respektive relative verdiene 36% og 55%. De absolutte katekolaminkonsentrasjonene kan imidlertid være forhøyet sammenlignet med resten av treningsøktene siden blodprøvene ble gjennomført fastende. En liten reduksjon i plasma glukose- eller insulinkonsentrasjon har vist seg å øke katekolaminresponsen (Kjær, Secher, & Galbo, 1987). Imidlertid var prosedyren lik ved blodprøvetaking etter 1B- og 1B2A-treningen, noe som vil si at den relative forskjellen mellom beina neppe ble forstyrret.

5.4. Tilpasninger som følge av treningen

5.4.1. Ettbeins kneekstensjon

1KE $\dot{V}O_2$ peak økte med trening ($p < 0,05$), men var kun signifikant for 1B2A-beinet (8%, $p < 0,05$) *versus* 4% ($p = 0,11$) for 1B-beinet. Høyeste oppnådde effekt økte også ved trening ($p < 0,01$) og var på 15% ($p < 0,01$) og 17% ($p < 0,01$) for henholdsvis 1B2A- og 1B-beinet. Økningen i $\dot{V}O_2$ peak og høyeste oppnådde effekt var imidlertid signifikant forskjellig ($p < 0,01$). Denne diskrepansen kan se ut til å være mindre i andre studier, selv om resultatene spriker noe (Kiens *et al.*, 1993; Mourtzakis *et al.*, 2004). Vi tror imidlertid ikke det er grunn til å tvile på den økte arbeidskapasiteten på grunn av rettlinjetheten i forholdet mellom effekt og $\dot{V}O_2$ under testene.

Økningen i $\dot{V}O_2$ peak må sies å være i underkant av hva andre 1KE-treningsintervensjonsstudier har funnet (Blomstrand *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2004; Kiens *et al.*, 1993; Mourtzakis *et al.*, 2004). Alle disse fant en forskjell i 1KE $\dot{V}O_2$ peak mellom intervensjonsbein og kontrollbein på $>20\%$ etter treningen. Det er imidlertid flere forhold som skiller disse studiene fra vår studie. Den største forskjellen er nok at treningsvolumet var betydelig høyere i de nevnte studiene. I tillegg benyttet alle studiene ulike testprotokoller, samt at $\dot{V}O_2$ -målingene ble utført med forskjellige metoder (pulmonært og termodilusjon). Noe av forskjellen kan muligens også tilskrives mengden tilvenning. I de nevnte studiene er det kun Kiens *et al.* (1993) som spesifikt har nevnt at forsøkspersonene gjennomførte tilvenning. Dette kan ha ført til en læringseffekt for treningsbeinet som er vanskelig å skille fra de fysiologiske

tilpasningene man ønsker å sammenligne med kontrollbeinet. En siste grunn kan være en høyere treningstilstand hos våre forsøkspersoner ved rekruttering til studien og dermed mindre potensial for treningsadaptasjoner. Våre forsøkspersoner hadde en gjennomsnittlig $\dot{V}O_2$ maks på $52 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, mens de andre studiene hadde et tilsvarende snitt på $45\text{-}50 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ og inkluderte kun menn.

At det kun var 1B2A-beinet som forbedret sin 1KE $\dot{V}O_2$ peak fra pre- til posttest kan muligens tilskrives en ikke-signifikant forskjell ved pretest (1B2A; $1198 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, 1B; $1252 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $p=0,64$). Dette kunne i teorien ført til at 1B2A-beinet trente på en noe høyere relativ effekt av $\dot{V}O_2$ peak enn 1B-beinet. Det er imidlertid lite som tyder på at dette var avgjørende siden høyeste oppnådde effekt og TTU ved 1KE_{maks} endret seg like mye for begge bein fra pre- til posttest.

Ved 1KE_{submaks} ble La^- og HF signifikant redusert ved trening når verdiene fra de tre submaksimale effektene ble slått sammen. Dette er ikke ukjente effekter av helkroppss utholdenhetstrening (Ekblom, Åstrand, Saltin, Stenberg, & Wallström, 1968; Saltin, Hartley, Kilbom, & Åstrand, 1969).

I vår studie ble La^- mest sannsynlig redusert på grunn av en redusert anaerob energiomsetning etter treningsperioden. $\dot{V}O_2$ ble også redusert ved trening, noe som ikke er spesielt vanlig å se i den tidlige adaptasjonen til utholdenhetstrening (Jones & Carter, 2000; Joyner & Coyle, 2008). Redusert $\dot{V}O_2$ indikerer en mer økonomisk muskulatur, muligens grunnet et bedret samspill mellom kneekstensorer og knefleksorer. Dette kan indikere at det skjedde en videre teknikkutvikling under treningsperioden selv om forsøkspersonene gjennomførte en solid tilvenning før pretestene. Imidlertid vil dette være med å forklare den reduserte HF ved submaksimale effekter etter treningsperioden. Saltin *et al.* (1976) og Klausen *et al.* (1982) fant også en redusert HF etter ettbeins trening (ettbeins sykling) og spekulerte i om dette kunne skyldes en redusert sympatisk aktivering. Dette virker plausibelt siden katekolaminresponsen på en gitt absolutt effekt ser ut til å reduseres etter trening (Zouhal *et al.*, 2008).

5.4.2. Muskelanalyser

Det ble kun gjennomført biopsier etter treningsperioden, ikke ulikt studiedesignet til Slettaløkken *et al.* (2011). En forutsetning for å vurdere treningsadaptasjoner er derfor at beina var like ved pretest. Lik oppnådd 1KE $\dot{V}O_2$ peak, lik arbeidsøkonomi og like submaksimale La^- -verdier mellom beina ved pretest støtter antakelsen om et likt utgangspunkt.

Kapillarisering

Ved posttest var det ingen signifikante forskjeller mellom 1B2A- og 1B-beinet i C/F, CD, CAF eller CAFA. McCall, Byrnes, Dickinson, & Fleck (1998) konkluderte med at 50 muskelfibre fra hver muskelfibertype (type I og II) gav et valid mål på kapillarisering. Våre snitt ble inkludert hvis de inneholdt ≥ 35 muskelfibre og oppfylte dermed ikke dette kravet. Vi tror imidlertid ikke dette påvirket det endelige resultatet i stor grad, siden McCall *et al.* (1998) fant en korrelasjon $r > 0,80$ allerede ved inkludering av 25 muskelfibre.

Reliabiliteten i kapillærtellingen viste seg å være utfordrende siden merking av snittene gav støy som i noen tilfeller var vanskelig å skille fra faktiske kapillærer. Det var dessverre ikke tilstrekkelig med tid til å optimalisere metoden. Problemet ble løst ved at to personer telte snittene og sammen ble enige om tellekriteriene. Imidlertid er det mulig at det faktiske antallet kapillærer per snitt er ulikt det som ble telt, uten at dette hadde innvirkning på forskjellen mellom beina. Sammenlignet med studier som har sett på kapillarisering på utvalg med tilsvarende kondisjon og treningsopplegg (1KE-trening) som våre forsøkspersoner, stemmer verdiene godt (Blomstrand *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2004).

Kapillariseringsvariablene benyttet i vår studie gir et todimensjonalt (2D) estimat på kapillarisering. Konfokalmikroskopi gir imidlertid muligheten til å undersøke det tredimensjonelle (3D) kapillærnettverket rundt muskelfibrene. Čebašek *et al.* (2010) sammenlignet 2D-CAF med 3D-kapillær kontaktflate med muskelfiber (L_{cap}/L_{fib}) hos invertebrert og ikke-invertebrert *m. soleus* hos rotte. De fant at L_{cap}/L_{fib} i mye større grad enn CAF ble berørt av invertebrert muskulatur, noe som indikerer at dette er et bedre mål på det kapillære nettverket rundt muskelfiberen og at 2D-estimering av kapillarisering er mindre sensitiv for endringer enn 3D-estimerer. I vår studie ville imidlertid en forskjell i

endring mellom beina stride med alle andre parametre vi har testet. Derfor er det lite trolig at dette har forekommet.

Aerobe enzymer

Konsentrasjonen av enzymene CS, COX4 og HADH var ved posttest ikke signifikant forskjellig mellom beina. Ved å slå sammen verdiene for alle enzymene ser man at 1B2A- er 96% av 1B-beinet ($p=0,30$). Dette er omtrent likt som posttester av kapillariseringsvariabler og $\dot{V}O_2$ peak, TTU og høyeste oppnådde effekt målt ved $1KE_{maks}$. Tidligere 1KE-treningsstudier som har målt enzymaktivitet har imidlertid sett 15-40% større enzymaktivitet i trent bein sammenlignet med kontrollbein over treningsperioder på 5-10 uker (Blomstrand *et al.*, 2011; Hansen *et al.*, 2005; Kiens *et al.*, 1993; Krstrup *et al.*, 2004; Pilegaard *et al.*, 1999). Det er derfor rimelig å anta at våre forsøkspersoner hadde en økning i enzymkonsentrasjon, men at treningsadaptasjonen mellom beina var lik. CS, COX4 og HADH er markører for henholdsvis sitronsyresyklusen, elektrontransportkjeden og β -oksidasjon av fettsyrer. Resultatene våre indikerer derfor en lik oksidativ kapasitet mellom beina.

En forskjell på <20% mellom duplikater av høyre og venstre bein normalisert for totalprotein, ble regnet som godkjent i vår studie. Gjennomsnittet av disse ble brukt i utregningene. Dette er allmenn praksis på muskellaboratoriet ved NIH, men kan selvfølgelig diskuteres å gi en høy feilmargin. Imidlertid viser det seg å være vanskelig å reproducere western blots i større grad enn dette.

5.4.3. Armsykling

$\dot{V}O_2$ peak ved armsykling økte 8% ($p<0,01$) og høyeste oppnådde effekt med 14% ($p<0,01$) fra pre- til posttest. Få andre armsyklingstreningstudier på friske, unge personer er gjennomført. Imidlertid gjennomførte Pogliaghi, Terziotti, Cevese, Balestreri, & Schena (2006) en studie hvor friske, eldre menn (67 ± 5 år) trente kontinuerlig, submaksimal armsykling i 30 min 3g/uka i 12 uker. Dette medførte 23% økning i armsyklings- $\dot{V}O_2$ peak og 22% økning i høyeste oppnådde effekt. I tillegg gjennomførte Osawa *et al.* (2014) en studie hvor fem friske, unge menn gjennomførte 16 uker med intensiv armsykling og sykling (øvelsene ble trent separat). To g/uka i 16 uker trente de fire-seks 1 min-intervaller med intensitet >90% av $\dot{V}O_2$ peak med 1 min pause mellom, i tillegg til en liknende protokoll på sykkel. Dette medførte 25% økning i

høyeste oppnådde effekt. Disse to studiene fikk større endringer enn vi gjorde i vår studie, noe som trolig kan tilskrives et større treningsvolum. Forsøkspersonene i Osawa *et al.* (2014) sin studie trente i tillegg sykling. Dette førte til økt $\dot{V}O_2$ maks ved ergometersykling og hadde mest sannsynlig en innvirkning på armsyklingsprestasjonen.

I vår studie var pre- og posttest av $\dot{V}O_2$ peak ved armsykling henholdsvis 53% og 56% av $\dot{V}O_2$ maks ved sykling ($p < 0,1$). Dette er ~15% lavere enn hva andre studier har funnet på friske personer som ikke trener overkroppsmuskulatur regelmessig (Volianitis, Yoshiga, Nissen, & Secher, 2004; Åstrand & Saltin, 1961). Grunnen til denne diskrepansen er trolig bruk av forskjellig type utstyr. I vår studie ble forsøkspersonene stropet fast under armsyklingstesten for å hindre bruk av stabiliseringsmuskulatur og for at testøvelsen skulle likne mest mulig på treningsøvelsen. Dette kan ha ført til lavere $\dot{V}O_2$ peak ved armsykling.

5.4.4. Sentrale faktorer

$\dot{V}O_2$ maks og høyeste oppnådde effekt ved ergometersykling økte med henholdsvis 3% ($p < 0,01$) og 4% ($p < 0,01$) fra pre- til posttest, noe som ikke er vanlig å se ved treningsformer som involverer liten aktiv muskelmasse (Davies & Sargeant, 1975; Klausen *et al.*, 1982; Rud *et al.*, 2012), selv om det har forekommet (Miyachi *et al.*, 2001; Saltin *et al.*, 1976). Under 1B2A-trening var $\dot{V}O_2$ og HF henholdsvis $53\% \pm 3\%$ og $83\% \pm 6\%$ av de respektive maksimale verdiene under $\dot{V}O_2$ maks-testen på ergometersykel. Armsykling vil på en gitt submaksimal $\dot{V}O_2$ gi lavere SV og høyere HF enn sykling hos normaltrente personer (Miles, Cox, & Bomze, 1989; Pendergast, 1989). Dette skjer mest sannsynlig på grunn av høyere sympatisk stimulering ved overkroppsarbeid og siden den venøse tilbakestrømmingen av blod fra underekstremitetene er lav ved armsykling. Dette fører til et redusert endediastolisk volum og derfor lavere SV (jf. Starlings hjertelov) (Miles *et al.*, 1989). Dette kardiorespiratoriske stresset 1B2A-treningen gav kan derfor muligens forklare økningen i $\dot{V}O_2$ maks ved ergometersykling uten spesifikk sykkeltraining. Høyere $\dot{V}O_2$ maks etter trening kan også være en tilvenningseffekt, men både lik RER og HF_{maks} ved pre- og posttest støtter ikke dette. Det kan også spekuleres i om O_2 -ekstraksjonen ble forbedret av treningen. Selv om endringen i $\dot{V}O_2$ maks ved ergometersykling var signifikant bør det legges til at endringen kun gav en ubetydelig ES (0,15).

5.5. Konklusjon

De muskulære tilpasningene til utholdenhetstrening ble ikke påvirket av kroppens totale energiomsetning.

Fem ukers 1KE-trening med og uten samtidig trening av armene resulterte i samme økning i 1KE $\dot{V}O_2$ peak, samt reduksjon i La^- , HF og $\dot{V}O_2$ ved 1KE_{submaks} til tross for at den totale aerobe energiomsetningen og katekolinresponseren var høyere ved 1B2A-enn 1B-trening. Etter treningsperioden var det heller ingen forskjell i kapillarisering eller konsentrasjon av oksidative enzymer mellom beina.

6. Perspektiver

Layec & Richardson (2012) foreslår i sin perspektivartikkel at trening med liten aktiv muskelmasse er gunstig siden dette gir et større treningsstimuli for den trente muskulaturen. De mener dette kan forbedre faktorer som gir bedret utholdenhetsprestasjon i større grad enn ordinær utholdenhetstrening. De henviser til Abbiss *et al.* (2011) sin studie som fant større økning i oksidativ kapasitet ved trening med liten aktiv muskelmasse, men som verken fant forskjell i endring av $\dot{V}O_2$ maks eller TTU på ergometersykkel.

Våre funn og studiene i tabell 2.1. og 2.2. støtter ikke Layec & Richardson (2012) sitt syn. Trening med liten aktiv muskelmasse gir definitivt lokale endringer, men i kontrast med Abbiss *et al.* (2011) sin studie ser endringene ikke ut til å være større enn ved ordinær helkroppstrening hvor man i tillegg påvirker sentrale faktorer i større grad. Derfor vil helkroppstrening mest sannsynlig være en mer effektiv og tidsbesparende treningsform enn trening med liten aktiv muskelmasse, hvis målet med treningen er forbedret utholdenhetsprestasjon. Trening med liten aktiv muskelmasse kan likevel være gunstig for blant annet ulike pasientgrupper, eksempelvis ved kronisk obstruktiv lungesykdom eller for hjertesviktpasienter.

Hvorfor gir ikke trening hvor man utnytter en større del av muskelens metabolske kapasitet større treningsrespons? I denne studien prøvde vi å utforske dette ved å teste hypotesen at kroppens totale energiomsetning påvirker den lokale treningsresponsen. Med vårt design og målemetoder fant vi ingen slik effekt selv om trening på en høyere andel av kroppens $\dot{V}O_2$ maks (1B2A) gav høyere systemisk stress målt som økt katekolaminkonsentrasjon i blodet. Årsaken kan være at det systemiske stresset likevel var for lite og at en enda større total energiomsetning ville gitt en effekt, for eksempel som funksjon av enda større stresshormonrespons. En enda større total energiomsetning kunne muligens også gitt en større forskjell i lokalt metabolsk stress gjennom redusert muskulær O_2 -metning grunnet økt konkurranse om O_2 -leveransen og derigjennom ført til større utholdenhetstilpasninger.

Videre forskning bør muligens konsentrere seg om nettopp det metabolske stresset og hvordan dette påvirker de lokale tilpasningene etter en lengre treningsperiode. Den beste

tilnærmingen til dette er muligens treningsintervensjoner hvor beina trenes separat med likt ytre arbeid med likt energikrav, mens det metabolske stresset blir manipulert i det ene beinet (eksempelvis 1KE-trening med og uten okklusjon av lårmuskulaturen). Et annet mulig studiedesign kan være å sammenligne trening med ett- og tobeins sykling (eventuelt også med addert arbeid med armene ved tobeins trening) hvor det ytre arbeidet er likt per bein. Her vil trolig det metabolske stresset være forskjellig i treningsøvelsene, grunnet sentral begrensning ved tobeins sykling. Dette kan gjennomføres med to treningsgrupper (trening av ett- og tobeins sykling i hver sin gruppe) hvor beina trener på en lik relativ andel av maksimal effekt ved tobeins sykling. Eventuelt kan også et kryssoverdesign benyttes, med de styrker og svakheter det må medføre.

Referanser

- Abbiss, C. R., Karagounis, L. G., Laursen, P. B., Peiffer, J. J., Martin, D. T., Hawley, J. A., ... Martin, J. C. (2011). Single-leg cycle training is superior to double-leg cycling in improving the oxidative potential and metabolic profile of trained skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 110(5), 1248–1255. doi:10.1152/jappphysiol.01247.2010
- Andersen, P., Adams, R. P., Sjøgaard, G., Thorboe, A., & Saltin, B. (1985). Dynamic knee extension as model for study of isolated exercising muscle in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 59(5), 1647–1653.
- Andersen, P., & Henriksson, J. (1977). Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *The Journal of Physiology*, 270(3), 677–690.
- Andersen, P., & Saltin, B. (1985). Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *The Journal of Physiology*, 366(1985), 233–249.
- Baar, K. (2014). Nutrition and the adaptation to endurance training. *Sports Medicine*, 44(Suppl.1), S5–S12. doi:10.1007/s40279-014-0146-1
- Bassett, D. R., & Howley, E. T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(1), 70–84.
- Berg, J. P. (2009). katekolaminer – Store medisinske leksikon. Retrieved October 5, 2015, from <https://sml.snl.no/katekolaminer>
- Blomstrand, E., Krstrup, P., Søndergaard, H., Rådegran, G., Calbet, J. A. L., & Saltin, B. (2011). Exercise training induces similar elevations in the activity of oxoglutarate dehydrogenase and peak oxygen uptake in the human quadriceps muscle. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 462(2), 257–265. doi:10.1007/s00424-011-0978-6
- Boushel, R., & Saltin, B. (2013). Ex vivo measures of muscle mitochondrial capacity reveal quantitative limits of oxygen delivery by the circulation during exercise. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(1), 68–75. doi:10.1016/j.biocel.2012.09.024
- Capelli, C. (1999). Physiological determinants of best performances in human locomotion. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 80(4), 298–307. doi:10.1007/s004210050596
- Čebašek, V., Eržen, I., Vyhnal, A., Janáček, J., Ribarič, S., & Kubínová, L. (2010). The estimation error of skeletal muscle capillary supply is significantly reduced by 3D method. *Microvascular Research*, 79(1), 40–46. doi:10.1016/j.mvr.2009.11.005

- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R. K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G. C., ... Arany, Z. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(50), 21401–21406. doi:10.1073/pnas.09091311106
- Coetzer, P., Noakes, T. D., Sanders, B., Lambert, M. I., Bosch, A. N., Wiggins, T., & Dennis, S. C. (1993). Superior fatigue resistance of elite black South African distance runners. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *75*(4), 1822–1827.
- Conley, D. L., & Krahenbuhl, G. S. (1980). Running economy and distance running performance of highly trained athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *12*(5), 357–360. doi:10.1249/00005768-198012050-00010
- Coyle, E. F. (2000). Physical activity as a metabolic stressor. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(2 Suppl), 512S–20S.
- Davies, C. T., & Sargeant, A. J. (1975). Effects of training on the physiological responses to one- and two-leg work. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *38*(3), 377–375.
- Denis, C., Chatard, J. C., Dormois, D., Linossier, M. T., Geysant, A., & Lacour, J. R. (1986). Effects of endurance training on capillary supply of human skeletal muscle on two age groups (20 and 60 years). *Journal de Physiologie*, *81*(5), 379–83.
- Desplanches, D., Hoppeler, H., Tüscher, L., Mayet, M. H., Spielvogel, H., Ferretti, G., ... Favier, R. (1996). Muscle tissue adaptations of high-altitude natives to training in chronic hypoxia or acute normoxia. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *81*(5), 1946–1951.
- Di Prampero, P. E. (2003). Factors limiting maximal performance in humans. *European Journal of Applied Physiology*, *90*(3-4), 420–429. doi:10.1007/s00421-003-0926-z
- Eklblom, B., Åstrand, P. O., Saltin, B., Stenberg, J., & Wallström, B. (1968). Effect of training on circulatory response to exercise. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *24*(4), 518–528.
- Fadel, P. J., & Raven, P. B. (2012). Human investigations into the arterial and cardiopulmonary baroreflexes during exercise. *Experimental Physiology*, *97*(1), 39–50. doi:10.1113/expphysiol.2011.057554
- Fay, J., Varoga, D., Wruck, C. J., Kurz, B., Goldring, M. B., & Pufe, T. (2006). Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. *Arthritis Research & Therapy*, *8*(6), R189. doi:10.1186/ar2102
- Flück, M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The Journal of Experimental Biology*, *209*(Pt 12), 2239–2248. doi:10.1242/jeb.02149

- Flück, M., & Hoppeler, H. (2003). Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *146*, 159–216. doi:10.1007/s10254-002-0004-7
- Foss, Ø., & Hallén, J. (2005). Validity and stability of a computerized metabolic system with mixing chamber. *International Journal of Sports Medicine*, *26*(7), 569–575. doi:10.1055/s-2004-821317
- Fournier, M., Ricci, J., Taylor, A. W., Ferguson, R. J., Montpetit, R. R., & Chaitman, B. R. (1982). Skeletal muscle adaptation in adolescent boys: sprint and endurance training and detraining. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *14*(6), 453–456. doi:10.1249/00005768-198206000-00008
- Gollnick, P. D., Armstrong, R. B., Saltin, B., Saubert, C. W., Sembrowich, W. L., & Shepherd, R. E. (1973). Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *34*(1), 107–111.
- Gustafsson, T., Ameln, H., Fischer, H., Sundberg, C. J., Timmons, J. A., & Jansson, E. (2005). VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise, *98*(6), 2137–2146. doi:10.1152/jappphysiol.01402.2004.
- Hallén, J. (2001). Fysiologisk adaptasjon til utholdenhetstrening. In *artikkel til modulen “fysiologisk adaptasjon til utholdenhetstrening”*, Norges Idrettshøgskole.
- Hallén, J. (2002). Hva bestemmer prestasjonen i utholdenhetsaktiviteter? In *artikkel til modulen “fysiologisk adaptasjon til utholdenhetstrening”*, Norges Idrettshøgskole.
- Hallén, J., Saltin, B., & Sejersted, O. M. (1996). K⁺ balance during exercise and role of beta-adrenergic stimulation. *The American Journal of Physiology*, *270*(6 Pt 2), R1347–R1354.
- Hamel, P., Simoneau, J. A., Lortie, G., Boulay, M. R., & Bouchard, C. (1986). Heredity and muscle adaptation to endurance training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *18*(6), 690–696. doi:10.1056/NEJMoa011858
- Hansen, A. K., Fischer, C. P., Plomgaard, P., Andersen, J. L., Saltin, B., & Pedersen, B. K. (2005). Skeletal muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *98*(1), 93–99. doi:10.1152/jappphysiol.00163.2004
- Helge, J. W., Bentley, D., Schjerling, P., Willer, M., Gibala, M. J., Franch, J., ... Andersen, J. L. (2007). Four weeks one-leg training and high fat diet does not alter PPAR α protein or mRNA expression in human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, *101*(1), 105–114. doi:10.1007/s00421-007-0479-7
- Henriksson, J. (1977). Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *The Journal of Physiology*, *270*(3), 661–675.

- Henriksson, J., & Reitman, J. S. (1977). Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. *Acta Physiologica Scandinavica*, 99(1), 91–7. doi:10.1111/j.1748-1716.1977.tb10356.x
- Holloszy, J. O., & Coyle, E. F. (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*, 56(4), 831–8.
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindstedt, S. L., Claassen, H., Vock, P., & Weibel, E. R. (1985). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 59(2), 320–327.
- Ingjer, F. (1979). Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *The Journal of Physiology*, 294, 419–432.
- Jensen, L., Bangsbo, J., & Hellsten, Y. (2004). Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 557(Pt 2), 571–582. doi:10.1113/jphysiol.2003.057711
- Jones, A. M., & Carter, H. (2000). The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 29(6), 373–386. doi:10.2165/00007256-200029060-00001
- Joyner, M. J., & Coyle, E. F. (2008). Endurance exercise performance: the physiology of champions. *The Journal of Physiology*, 586(1), 35–44.
- Kannus, P., Alosa, D., Cook, L., Johnson, R. J., Renström, P., Pope, M., ... Kaplan, M. (1992). Effect of one-legged exercise on the strength, power and endurance of the contralateral leg - A randomized, controlled study using isometric and concentric isokinetic training. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 64(2), 117–126. doi:10.1007/BF00717948
- Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Christensen, N. J., & Saltin, B. (1993). Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *The Journal of Physiology*, 469, 459–478.
- Kjær, M., Secher, N. H., & Galbo, H. (1987). Physical stress and catecholamine release. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1(2), 279–98.
- Klausen, K., Secher, N. H., Clausen, J. P., Hartling, O., & Trap-Jensen, J. (1982). Central and regional circulatory adaptations to one-leg training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 52(4), 976–983.
- Knight, D. R., Poole, D. C., Schaffartzik, W., Guy, H. J., Prediletto, R., Hogan, M. C., & Wagner, P. D. (1992). Relationship between body and leg VO₂ during maximal cycle ergometry. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 73(3), 1114–21.

- Knight, D. R., Schaffartzik, W., Poole, D. C., Hogan, M. C., Bebout, D. E., & Wagner, P. D. (1993). Effects of hyperoxia on maximal leg O₂ supply and utilization in men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 75(6), 2586–2594.
- Krustrup, P., Hellsten, Y., & Bangsbo, J. (2004). Intense interval training enhances human skeletal muscle oxygen uptake in the initial phase of dynamic exercise at high but not at low intensities. *The Journal of Physiology*, 559(Pt 1), 335–345. doi:10.1113/jphysiol.2004.062232
- Krustrup, P., Jones, A. M., Wilkerson, D. P., Calbet, J. A. L., & Bangsbo, J. (2009). Muscular and pulmonary O₂ uptake kinetics during moderate- and high-intensity sub-maximal knee-extensor exercise in humans. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 8), 1843–1856. doi:10.1113/jphysiol.2008.166397
- Layec, G., & Richardson, R. S. (2012). Training to improve performance: One leg at a time. *Acta Physiologica*, 205(1), 186–188. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02386.x
- McCall, G. E., Byrnes, W. C., Dickinson, A. L., & Fleck, S. J. (1998). Sample size required for the accurate determination of fiber area and capillarity of human skeletal muscle. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne de Physiologie Appliquee*, 23(6), 594–599. doi:10.1139/h98-034
- McPhee, J. S., Williams, A. G., Degens, H., & Jones, D. A. (2010). Inter-individual variability in adaptation of the leg muscles following a standardised endurance training programme in young women. *European Journal of Applied Physiology*, 109(6), 1111–1118. doi:10.1007/s00421-010-1454-2
- Midgley, A. W., McNaughton, L. R., & Wilkinson, M. (2006). Is there an optimal training intensity for enhancing the maximal oxygen uptake of distance runners? Empirical research findings, current opinions, physiological rationale and practical recommendations. *Sports Medicine*, 36(2), 117–132. doi:10.2165/00007256-200636020-00003
- Miles, D. S., Cox, M. H., & Bomze, J. P. (1989). Cardiovascular responses to upper body exercise in normals and cardiac patients. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 21(5 Suppl), S126–S131.
- Miura, S., Kawanaka, K., Kai, Y., Tamura, M., Goto, M., Shiuchi, T., ... Ezaki, O. (2007). An increase in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to exercise is mediated by β -adrenergic receptor activation. *Endocrinology*, 148(7), 3441–3448. doi:10.1210/en.2006-1646
- Miyachi, M., Tanaka, H., Yamamoto, K., Yoshioka, A., Takahashi, K., & Onodera, S. (2001). Effects of one-legged endurance training on femoral arterial and venous size in healthy humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 90(6), 2439–2444.
- Mourtzakis, M., González-Alonso, J., Graham, T. E., & Saltin, B. (2004). Hemodynamics and O₂ uptake during maximal knee extensor exercise in untrained and trained human quadriceps muscle: effects of hyperoxia. *Journal of Applied*

Physiology (Bethesda, Md. : 1985), 97(5), 1796–1802.
doi:10.1152/jappphysiol.00169.2004

Norrbom, J., Sundberg, C. J., Ameln, H., Kraus, W. E., Jansson, E., & Gustafsson, T. (2004). PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 96(1), 189–194. doi:10.1152/jappphysiol.00765.2003

Osawa, Y., Azuma, K., Tabata, S., Katsukawa, F., Ishida, H., Kawai, T., ... Matsumoto, H. (2014). Effects of 16-week high-intensity interval training using upper and lower body ergometers on aerobic fitness and morphological changes in healthy men: a preliminary study. *Open Access J Sports Med*, 4(5), 257–265.
doi:10.2147/OAJSM.S68932

Pendergast, D. R. (1989). Cardiovascular, respiratory, and metabolic responses to upper body exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 21(5 Suppl), S121–S125. doi:10.1249/00005768-198910001-00002

Phillips, S. M., Green, H. J., Tarnopolsky, M. A., Heigenhauser, G. J., & Grant, S. M. (1996). Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 270(2 Pt 1), E265–E272.

Pilegaard, H., Domino, K., Noland, T., Juel, C., Hellsten, Y., Halestrap, A. P., & Bangsbo, J. (1999). Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 276(2 Pt 1), E255–E261.

Pogliaghi, S., Terziotti, P., Cevese, A., Balestreri, F., & Schena, F. (2006). Adaptations to endurance training in the healthy elderly: Arm cranking versus leg cycling. *European Journal of Applied Physiology*, 97(6), 723–731. doi:10.1007/s00421-006-0229-2

Pope, Z. K., Willardson, J. M., & Schoenfeld, B. J. (2013). Exercise and blood flow restriction. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, 27(10), 2914–26. doi:10.1519/JSC.0b013e3182874721

Richardson, R. S., Grassi, B., Gavin, T. P., Haseler, L. J., Tagore, K., Roca, J., & Wagner, P. D. (1999). Evidence of O₂ supply-dependent VO₂ max in the exercise-trained human quadriceps. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 86(3), 1048–1053.

Richardson, R. S., Kennedy, B., Knight, D. R., & Wagner, P. D. (1995). High muscle blood flows are not attenuated by recruitment of additional muscle mass. *The American Journal of Physiology*, 269(5 Pt 2), H1545–H1552.

Richardson, R. S., Knight, D. R., Poole, D. C., Kurdak, S. S., Hogan, M. C., Grassi, B., & Wagner, P. D. (1995). Determinants of maximal exercise VO₂ during single leg knee-extensor exercise in humans. *The American Journal of Physiology*, 268(4 Pt 2), H1453–H1461.

- Richardson, R. S., Leigh, J. S., Wagner, P. D., & Noyszewski, E. A. (1999). Cellular PO₂ as a determinant of maximal mitochondrial O₂ consumption in trained human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(1), 325–331. doi:10.1097/00005768-199705001-01550
- Richardson, R. S., Poole, D. C., Knight, D. R., Kurdak, S. S., Hogan, M. C., Grassi, B., ... Wagner, P. D. (1993). High muscle blood flow in man: is maximal O₂ extraction compromised? *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 75(4), 1911–1916.
- Rowell, L. B., Saltin, B., Kiens, B., & Christensen, N. J. (1986). Is peak quadriceps blood flow in humans even higher during exercise with hypoxemia? *The American Journal of Physiology*, 251(5 Pt 2), H1038–H1044.
- Rud, B., Foss, O., Krusturup, P., Secher, N. H., & Hallén, J. (2012). One-legged endurance training: leg blood flow and oxygen extraction during cycling exercise. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 205(1), 177–85. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02383.x
- Rud, B., & Hallén, J. (2009). Is the balance between skeletal muscular metabolic capacity and oxygen supply capacity the same in endurance trained and untrained subjects? *European Journal of Applied Physiology*, 105(5), 679–685. doi:10.1007/s00421-008-0947-8
- Rønnestad, B. R., Nygaard, H., & Raastad, T. (2011). Physiological elevation of endogenous hormones results in superior strength training adaptation. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9), 2249–2259. doi:10.1007/s00421-011-1860-0
- Rådegran, G., Blomstrand, E., & Saltin, B. (1999). Peak muscle perfusion and oxygen uptake in humans: importance of precise estimates of muscle mass. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(6), 2375–2380.
- Saltin, B. (1986). Physiological adaptation to physical conditioning. Old problems revisited. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum*, 711, 11–24.
- Saltin, B. (1988). Syrets väg till och förbrukning i arbetande muskulatur. In *Konditionsträning: Rapport från Idrottens forskningsråds konferens på GIH i Stockholm januari 1987: En sammanställning av medverkande föreläsare* (pp. 22–37).
- Saltin, B., & Calbet, J. A. L. (2006). Point: in health and in a normoxic environment, VO₂ max is limited primarily by cardiac output and locomotor muscle blood flow. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(2), 744–5. doi:10.1152/japphysiol.01395.2005
- Saltin, B., Hartley, L. H., Kilbom, A., & Åstrand, I. (1969). Physical training in sedentary middle-aged and older men. II. Oxygen uptake, heart rate, and blood lactate concentration at submaximal and maximal exercise. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 24(4), 323–34.

- Saltin, B., Nazar, K., Costill, D. L., Stein, E., Jansson, E., Essén, B., & Gollnick, D. (1976). The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, *96*(3), 289–305. doi:10.1111/j.1748-1716.1976.tb10200.x
- Savard, G. K., Richter, E. A., Strange, S., Kiens, B., Christensen, N. J., & Saltin, B. (1989). Norepinephrine spillover from skeletal muscle during exercise in humans: role of muscle mass. *The American Journal of Physiology*, *257*(6 Pt 2), H1812–H1818.
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1447–1531. doi:10.1152/physrev.00031.2010
- Schmidt, W., & Prommer, N. (2008). Effects of various training modalities on blood volume. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *18 Suppl 1*, 57–69. doi:10.1111/j.1600-0838.2008.00833.x
- Schmidt, W., & Prommer, N. (2010). Impact of alterations in total hemoglobin mass on VO₂max. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *38*(2), 68–75. doi:10.1097/JES.0b013e3181d4957a
- Schoenfeld, B. J. (2010). The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, *24*(10), 2857–2872. doi:10.1519/JSC.0b013e3181e840f3
- Secher, N. H., Clausen, J. P., Klausen, K., Noer, I., & Trap-Jensen, J. (1977). Central and regional circulatory effects of adding arm exercise to leg exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, *100*(3), 288–97. doi:10.1111/j.1748-1716.1977.tb05952.x
- Secher, N. H., Kagaya, A., & Saltin, B. (1999). Integration of Muscle Blood Flow and Cardiac Output. In *Exercise and Circulation in Health and Disease* (pp. 155–167).
- Slettaløkken, G., Rehn, T. A., Munkvik, M., Rud, B., Nymark, B. S., Lunde, P. K., ... Hallén, J. (2011). Normal training response in skeletal muscle of post-infarction heart failure patients. *European Journal of Sport Science*, *1391*(September), 1–9. doi:10.1080/17461391.2011.624197
- Song, Y., Forsgren, S., Liu, J.-X., Yu, J.-G., & Stål, P. (2014). Unilateral Muscle Overuse Causes Bilateral Changes in Muscle Fiber Composition and Vascular Supply. *PLoS ONE*, *9*(12), e116455. doi:10.1371/journal.pone.0116455
- Suter, E., Hoppeler, H., Claassen, H., Billeter, R., Aebi, U., Horber, F., ... Marti, B. (1995). Ultrastructural modification of human skeletal muscle tissue with 6-month moderate-intensity exercise training. *Int J Sports Med*, *16*, 160–166. doi:10.1055/s-2007-972985
- Svedenhag, J., Henriksson, J., & Sylvén, C. (1983). Dissociation of training effects on skeletal muscle mitochondrial enzymes and myoglobin in man. *Acta Physiologica Scandinavica*, *117*(2), 213–8. doi:10.1111/j.1748-1716.1983.tb07199.x

- Tremblay, A., Simoneau, J.-A., & Bouchard, C. (1994). Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 43(7), 814–8.
- Vandenburgh, H. H. (1987). Motion into mass: how does tension stimulate muscle growth? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 19(5 Suppl), S142–9.
- Vigelsø, A., Dybboe, R., Hansen, C. N., Dela, F., Helge, J. W., & Guadalupe Grau, A. (2015). GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 118(3), 386–394. doi:10.1152/jappphysiol.00840.2014
- Vincent, W. J., & Weir, J. P. (2012). The t test: Comparing Means from Two Sets of Data. In *Statistics in Kinesiology*, 4th ed. (pp. 149–176).
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. doi:10.1038/nrg3185
- Volianitis, S., Yoshiga, C. C., Nissen, P., & Secher, N. H. (2004). Effect of fitness on arm vascular and metabolic responses to upper body exercise. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(5), H1736–H1741. doi:10.1152/ajpheart.01001.2003
- Wagner, P. D. (2011). The critical role of VEGF in skeletal muscle angiogenesis and blood flow. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1556–1559. doi:10.1042/BST20110646
- West, D. W. D., & Phillips, S. M. (2012). Associations of exercise-induced hormone profiles and gains in strength and hypertrophy in a large cohort after weight training. *European Journal of Applied Physiology*, 112(7), 2693–2702. doi:10.1007/s00421-011-2246-z
- Zouhal, H., Jacob, C., Delamarche, P., & Gratas-Delamarche, A. (2008). Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Medicine*, 38(5), 401–423. doi:10.2165/00007256-200838050-00004
- Åstrand, P.-O., & Saltin, B. (1961). Maximal oxygen uptake and heart rate in various types of muscular activity. *Journal of Applied Physiology*, 16(6), 977–981.

Tabelloversikt

<i>Tabell 2.1: Helkroppss treningsstudier (ergometersykling og løping) som har undersøkt lokale tilpasninger</i>	18
<i>Tabell 2.2: Treningsstudier med IKE og ettbeins sykling som har undersøkt lokale tilpasninger</i>	19
<i>Tabell 3.1: Karakteristikk av forsøkspersonene (n=11) ved pretest</i>	21
<i>Tabell 3.2: Det eksperimentelle designet satt i tidsperspektiv</i>	22
<i>Tabell 3.3: Veiledende treningsprogram for forsøkspersonene</i>	25
<i>Tabell 3.4: Primær- og sekundærtstoff benyttet under immunhistokjemianalysene</i> .	32
<i>Tabell 3.5: Eksklusjonskriterier for muskelfibre</i>	33
<i>Tabell 3.6: Kapillærtellekriterier</i>	34
<i>Tabell 3.7: Primær- og sekundærtstoff benyttet under Western Blot-analysene</i>	38
<i>Tabell 4.1: Muskelfiberareal og muskelfibertetthet for 1B2A- og 1B-beinet</i>	45
<i>Tabell 4.2: Ulike kapillariseringsparametre for 1B2A- og 1B-beinet</i>	46
<i>Tabell 4.3: Oksidative enzymer for 1B2A- i prosent av 1B-beinet</i>	46

Figuroversikt

Figur 2.1: Svart felt viser $\dot{V}O_2$ ved maksimal 1KE, 2KE (tobeins kneekstensjoner) og ergometersykling, mens det grå feltet viser muskulaturens metabolske reservekapasitet, ekstrapolert fra 2KE-verdiene.....	13
Figur 2.2: Forenklet modell over de viktigste stimuli som kan gi muskulær utholdenhetsadaptasjon.....	15
Figur 3.1: Treningsøvelsene 1B (øverst) og 1B2A (nederst).....	24
Figur 3.2: Protokoll for tilvenningsøktene til 1B2A og 1B.....	25
Figur 3.3: $\dot{V}O_2$ maks-test på ergometersykel.....	27
Figur 3.4: Tester med $1KE_{submaks}$ og $1KE_{maks}$ på begge bein, samt maksimal armsykling.....	28
Figur 3.5: Treningsøkt med inkludert måling av $\dot{V}O_2$ og katekolaminer.....	29
Figur 3.6: Beregning av muskelfibertverrsnittareal (A) og muskelfibertype (B).....	33
Figur 3.7: Eksempel på telling av absolutt antall kapillærer (A) og kapillærer rundt hver muskelfiber (CAF; B).....	34
Figur 3.8: Eksempelbilde av kapillærtellekriteriene.....	35
Figur 3.9: Eksempelbilde som viser de tre merkingene mot cellemembran, muskelfibertype II og kapillærer.....	35
Figur 3.10: Plassering av PortaMon-sensorene for analyse av O_2 -metning under treningsøvelsene, her; 1B2A.....	39
Figur 4.1: Effekt under treningsøktene for beina (1B og 1B2A) og armene (1B2A).....	41
Figur 4.2: Katekolaminkonsentrasjon i blodplasma i gjennomsnitt (A) og individuelle verdier (B) under treningsøkt med 1B og 1B2A (n=9).....	42
Figur 4.3: HHb (A) og tHb (B) under 1B- og 1B2A-trening subtrahert med tilsvarende arbeid uten ytre effekt (0W).....	42
Figur 4.4: Gjennomsnittlige verdier (A) og individuelle verdier (B) av 1KE $\dot{V}O_2$ peak for 1B- og 1B2A-beinet ved pre- og posttest (n=10).....	43
Figur 4.5: Pre- og postverdier for $\dot{V}O_2$ (A-B), La^- (C-D) og HF (E-F) for 1B- og 1B2A-beinet (n=8).....	44
Figur 4.6: Prosentvis fordeling av muskelfibertype i m. vastus lateralis for 1B- og 1B2A-beinet (n=8).....	45
Figur 4.7: Representative western blot for proteinene som ble studert.....	46
Figur 4.8: $\dot{V}O_2$ peak 1KE og armsykling, samt $\dot{V}O_2$ maks ergometersykling i absolutte (A) og relative verdier av $\dot{V}O_2$ maks sykling (B) (n=10).....	47

Forkortelser og akronymer

1KE	Ettbeins kneekstensjoner
1KE _{maks}	Maksimal test med ettbeins kneekstensjoner
1KE _{submaks}	Submaksimal test med ettbeins kneekstensjoner
1B	Ettbeins trening
1B2A	Ettbeins trening med samtidig armtrening
2D	Todimensjonal
3D	Tredimensjonal
♀	Kvinne
♂	Mann
AD	Adrenalin
a-vO ₂ differanse	Forskjellen i blodets oksygenkonsentrasjon mellom arterie og blandet veneblod
CAF	Gjennomsnittlig antall kapillærer rundt hver muskelfiber
CAFA	Kapillærer rundt hver muskelfiber relatert til dens tverrsnittareal (CAF/muskelfibertverrsnittsareal (i μm^2) x 1000 for hver individuelle fiber
CD	Kapillærtetthet (kapillærer per kvadratmillimeter)
C/F	Ratio mellom antall kapillærer og antall muskelfibre i et område
CS	Citrate Synthase
CSA	Tverrsnittsareal
CO ₂	Karbondioksid
COX4	Cytochrome c Oxidase subenhet 4
dH ₂ O	Ultrareint vann
ES	Effektstørrelse
FFA	Frie fettsyrer
GLUT4	Glukosetransportør nummer 4
HADH	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
HHb	Deoxyhemoglobin

HF	Hjertefrekvens
HF_{maks}	Maksimal hjertefrekvens
La^-	Laktatkonsentrasjon i helblod
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
MTT	Mean transit-tid
$M\dot{V}$	Hjertets minuttvolum per tidsenhet
NA	Noradrenalin
NIRS	Near-infrared spectroscopy
O_2	Oksygen
PBS og PBS-t	Phosphate-buffered saline, henholdsvis uten og med Tween 20
<i>per se</i>	"I seg selv"
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α
P_i	Uorganisk fosfat
RER	Respiratorisk utvekslingskvotient
RPE	Opplevd anstrengelse
RPM	Omdreininger per minutt
SD	Standardavvik
SV	Slagvolum
TBS og TBS-t	Tris-buffered saline, henholdsvis uten og med Tween 20
tHb	Totalt hemoglobin
TTU	Tid til utmattelse
$\dot{V}E$	Ventilasjon per tidsenhet
$\dot{V}O_2$	Oksygenopptak per tidsenhet
$\dot{V}O_{2maks}$	Maksimalt oksygenopptak per tidsenhet
$\dot{V}O_{2peak}$	Høyeste målte oksygenopptak per tidsenhet
V	Volt
W	Effekt (watt; joule \cdot sek ⁻¹)

Vedlegg

Tabeller:

- I** Variabler testet under treningsøkt
- II** Data fra $1KE_{maks}$ -testene
- III** Data fra $1KE_{submaks}$ -testene
- IV** Data fra maksimale tester med armsykling og ergometersykling
- V** Alle kapillærvariablene

Annet:

- VI** Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet:
«Størrelsen på arbeidende muskulaturs betydning for muskulære utholdenhetstilpasninger»
- VII** Prosedyre katekolaminprøvetaking
- VIII** Prosedyre Western Blot
- IX** Prosedyre immunhistokjemi

Vedlegg I

Vedlegg I: Variabler testet under treningsøkt

	1B (n=9)	1B2A (n=9)	Sammenligning	
	Snitt ± SD	Snitt ± SD	Forskjell (% snitt ± SD)	Effektstørrelse (Cohen's <i>d</i>)
NA (pmol · L ⁻¹)	4465 ± 1866	12445 ± 3905	197 ± 101	* 2,61 (stor)
AD (pmol · L ⁻¹)	1341 ± 837	2462 ± 1161	139 ± 144	* 1,11 (stor)
VO ₂ (ml · min ⁻¹)	1094 ± 306	2295 ± 525	112 ± 11	* 2,79 (stor)
HF (slag · min ⁻¹)	108 ± 21	157 ± 15	48 ± 20	* 2,72 (stor)
VE (L · min ⁻¹)	33 ± 8	74 ± 14	128 ± 28	* 3,62 (stor)
RER	0,93 ± 0,06	0,96 ± 0,04	4 ± 6	0,65 (moderat)
La ⁻ (mmol · L ⁻¹)	2,68 ± 0,77	4,71 ± 1,24	84 ± 51	* 1,97 (stor)
RPE (6-20)	14,4 ± 1,6	14,4 ± 1,2	1,1 ± 14,7	0,00 (ubetydelig)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, forskjell; forskjell mellom 1B- og 1B2A-trening, NA; noradrenalin, AD; adrenalin, VO₂; oksygenopptak per tidsenhet, HF; hjertefrekvens, VE; ventilasjon per tidsenhet, RER; respiratorisk utvekslingskvotient, La⁻; laktat målt i helblod, RPE; opplevd anstrengelse. *; Signifikant forskjell mellom øvelsene (p<0,05).

Vedlegg II

Vedlegg II: Data fra $1KE_{maks}$ -testene

Variabel	1B2A (n=10)				1B (n=10)				Sammenligning bein	
	Pretest (Snitt ± SD)	Posttest (Snitt ± SD)	Endring (%) (Snitt ± SD)	ES	Pretest (Snitt ± SD)	Posttest (Snitt ± SD)	Endring (%) (Snitt ± SD)	ES	Δ forskjell (% snitt ± SD)	ES (Cohen's d)
$\dot{V}O_2peak$ ($ml \cdot min^{-1}$)	1343 ± 308	1568 ± 432	17 ± 21	* 0,73	1478 ± 349	1600 ± 432	8 ± 14	0,35	8 ± 27	0,34 (liten)
Justert $\dot{V}O_2peak$ ($ml \cdot min^{-1}$)	1198 ± 235	1290 ± 243	8 ± 10	* 0,39	1252 ± 261	1315 ± 326	4 ± 9	0,24	4 ± 11	0,12 (ubetydelig)
$\dot{V}O_2peak$ – hvile ($ml \cdot min^{-1}$)	935 ± 188	1022 ± 221	9 ± 12	* 0,46	989 ± 220	1047 ± 307	5 ± 14	0,27	5 ± 14	0,14 (ubetydelig)
% av $\dot{V}O_2maks$ sykling	29 ± 3	30 ± 3	4 ± 10	0,33	30 ± 3	31 ± 4	1 ± 9	0,07	4 ± 11	0,29 (liten)
TTU (sek.)	398 ± 125	473 ± 116	21 ± 9	* 0,59	422 ± 123	495 ± 123	18 ± 8	*	2 ± 8	0,01 (ubetydelig)
Høyeste oppnådde effekt (W)	45 ± 11	52 ± 12	15 ± 9	* 0,58	46 ± 12	54 ± 12	17 ± 8	*	-2 ± 9	-0,09 (ubetydelig)
RER	1,19 ± 0,2	1,21 ± 0,1	3 ± 12	0,12	1,16 ± 0,1	1,23 ± 0,1	6 ± 7	*	-3 ± 15	-0,31 (liten)
HFpeak (slag $\cdot min^{-1}$) (n=9)	149 ± 19	147 ± 16	-1 ± 9	-0,10	150 ± 21	151 ± 22	1 ± 10	0,05	-2 ± 13	-0,14 (ubetydelig)
$\dot{V}Epeak$ ($L \cdot min^{-1}$)	57 ± 15	69 ± 24	21 ± 22	* 0,83	62 ± 18	69 ± 22	11 ± 17	0,38	9 ± 29	0,34 (liten)
La' ($mmol \cdot L^{-1}$)	3,70 ± 0,9	3,95 ± 0,8	11 ± 2	0,28	3,82 ± 1,1	3,89 ± 0,8	8 ± 28	0,06	4 ± 31	0,18 (ubetydelig)
RPE (6-20)	17,4 ± 1,6	17,9 ± 1,4	3 ± 7	0,30	17,4 ± 1,5	17,5 ± 1,6	1 ± 8	0,07	2 ± 5	0,25 (liten)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, Δ forskjell; forskjell i endring mellom 1B2A- og 1B-beinet fra pre- til posttest, ES; effektstørrelse (Cohen's d), $\dot{V}O_2peak$; høyeste målte oksygenopptak, justert $\dot{V}O_2peak$; justerte peak-verdier ekstrapolert fra submaksimale verdier til avsluttet test, RER; respiratorisk utvekslingskvotient, HFpeak; høyeste målte hjertefrekvens, $\dot{V}Epeak$; høyeste målte ventilasjon, La' ; laktat målt i helblod, RPE; opplevd anstrengelse, *; signifikant endring fra pretest ($p < 0,05$), †; tendens til endring fra pretest ($p < 0,1$).

Vedlegg III

Vedlegg III: Data fra IKE_{submaks}-testene

	IB2A (n=11)				IB (n=11)				Sammenligning bein	
	Pretest (Snitt ± SD)	Posttest (Snitt ± SD)	Endring (%) (Snitt ± SD)	ES	Pretest (Snitt ± SD)	Posttest (Snitt ± SD)	Endring (%) (Snitt ± SD)	ES	Δ Forskjell (% snitt ± SD)	ES
20W (n=11)										
$\dot{V}O_2$ (ml · min ⁻¹)	722 ± 74	640 ± 62	-10 ± 15	* -1,11	690 ± 91	639 ± 88	-6 ± 17	-0,56	-4 ± 20	-0,37 (liten)
$\dot{V}O_2$ – hvile (ml · min ⁻¹)	443 ± 100	366 ± 62	-13 ± 25	‡ -0,77	412 ± 112	365 ± 93	-7 ± 16	-0,42	-6 ± 35	-0,29 (liten)
% av justert $\dot{V}O_2$ peak (n=10)	62 ± 13	51 ± 8	-17 ± 10	* -0,83	57 ± 14	51 ± 12	-10 ± 11	*	-7 ± 15	-0,52 (moderat)
RER	0,92 ± 0,1	0,88 ± 0,1	-4 ± 7	‡ -0,47	0,91 ± 0,1	0,87 ± 0,1	-4 ± 6	‡	0 ± 7	-0,01 (ubetydelig)
HF (slag · min ⁻¹) (n=10)	100 ± 28	90 ± 16	-8 ± 11	‡ -0,37	99 ± 27	90 ± 17	-6 ± 13	-0,31	-2 ± 13	-0,03 (ubetydelig)
VE (L · min ⁻¹)	22 ± 4	19 ± 2	-13 ± 20	‡ -0,89	21 ± 2	19 ± 2	-9 ± 16	‡	-4 ± 19	-0,44 (liten)
La (mmol · L ⁻¹)	1,49 ± 0,7	0,95 ± 0,5	-29 ± 29	* -0,73	1,34 ± 0,6	0,93 ± 0,5	-25 ± 33	*	-4 ± 37	-0,21 (liten)
RPE (6-20)	10,1 ± 2,1	8,2 ± 2,1	-18 ± 15	* -0,92	10,0 ± 1,9	8,1 ± 1,9	-18 ± 13	*	0 ± 6	0,00 (ubetydelig)
30W (n=10)										
$\dot{V}O_2$ (ml · min ⁻¹)	891 ± 67	852 ± 74	-4 ± 10	-0,58	883 ± 52	823 ± 75	-6 ± 11	‡	-1,15	0,35 (liten)
$\dot{V}O_2$ – hvile (ml · min ⁻¹)	602 ± 108	568 ± 98	-4 ± 15	-0,32	594 ± 91	539 ± 91	-8 ± 16	-0,60	4 ± 11	0,19 (ubetydelig)
% av justert $\dot{V}O_2$ peak (n=9)	73 ± 13	64 ± 12	-12 ± 8	* -0,66	68 ± 11	61 ± 9	-10 ± 10	*	-2 ± 10	-0,14 (ubetydelig)
RER	0,96 ± 0,1	0,93 ± 0,1	-3 ± 6	-0,43	0,94 ± 0,1	0,91 ± 0,1	-4 ± 7	-0,55	0 ± 6	0,09 (ubetydelig)
HF (slag · min ⁻¹)	97 ± 15	93 ± 12	-3 ± 9	-0,27	96 ± 16	93 ± 11	-2 ± 14	-0,19	-2 ± 11	-0,05 (ubetydelig)
VE (L · min ⁻¹)	27 ± 4	27 ± 6	-3 ± 14	-0,16	26 ± 3	24 ± 4	-10 ± 15	‡,§	7 ± 1	0,59 (moderat)
La (mmol · L ⁻¹)	1,83 ± 0,7	1,28 ± 0,7	-28 ± 23	* -0,76	1,71 ± 0,7	1,25 ± 0,6	-23 ± 19	*	-4 ± 15	-0,13 (ubetydelig)
RPE (6-20)	12,7 ± 1,6	11,1 ± 2,1	-13 ± 12	* -1,02	12,3 ± 1,5	10,6 ± 1,8	-14 ± 12	*	1 ± 11	0,07 (ubetydelig)
40W (n=8)										
$\dot{V}O_2$ (ml · min ⁻¹)	1117 ± 101	1080 ± 77	-2 ± 14	-0,37	1111 ± 61	1065 ± 56	-4 ± 9	-0,74	1 ± 9	0,10 (ubetydelig)
$\dot{V}O_2$ – hvile (ml · min ⁻¹)	817 ± 128	794 ± 81	0 ± 21	-0,17	810 ± 102	780 ± 94	-3 ± 13	-0,30	3 ± 12	0,07 (ubetydelig)
% av justert $\dot{V}O_2$ peak (n=7)	87 ± 14	77 ± 9	-10 ± 12	‡ -0,69	81 ± 9	73 ± 6	-9 ± 6	*	0 ± 14	-0,16 (ubetydelig)
RER	1,04 ± 0,1	1,02 ± 0,1	-2 ± 6	-0,25	1,04 ± 0,1	0,99 ± 0,1	-4 ± 8	-0,41	2 ± 8	0,20 (liten)
HF (slag · min ⁻¹)	108 ± 15	98 ± 12	-9 ± 7	* -0,68	104 ± 16	98 ± 10	-4 ± 10	-0,36	-5 ± 7	-0,31 (liten)
VE (L · min ⁻¹)	38 ± 7	35 ± 7	-6 ± 20	-0,42	36 ± 4	32 ± 2	-10 ± 9	*	5 ± 16	0,18 (ubetydelig)
La (mmol · L ⁻¹)	2,79 ± 1,1	2,30 ± 0,9	-16 ± 13	* -0,44	2,66 ± 1,0	2,20 ± 0,9	-14 ± 18	*	-2 ± 16	-0,03 (ubetydelig)
RPE (6-20)	14,8 ± 1,3	13,3 ± 2,5	-10 ± 14	‡,§ -1,12	14,4 ± 0,8	12,9 ± 1,7	-10 ± 9	*	1 ± 9	0,06 (ubetydelig)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, Δ forskjell; forskjell i endring mellom IB2A- og IB-beinet fra pre- til posttest, ES; effektstørrelse (Cohen's d), $\dot{V}O_2$; oksygenopptak per tidsenhet, RER; respiratorisk utvekslingskvotient, HF; hjerterefrekvens, VE; ventilasjon per tidsenhet, La; laktat målt i helblod, RPE; opplevd anstrengelse, *, signifikant endring fra pretest (p<0,05), ‡; tendens til endring fra pretest (p<0,1), §; signifikant endring fra pretest med ikke-parametriske test (p<0,05; ikke-normalfordelte data).

Vedlegg IV

Vedlegg IV: Data fra maksimale tester med armsykling og ergometersykling

	Pretest (Snitt ± SD)	Posttest (Snitt ± SD)	Endring (%) (Snitt ± SD)	Effektstørrelse (Cohen's <i>d</i>)
Armsykling (n=11)				
$\dot{V}O_2$ peak (ml · min ⁻¹)	2310 ± 632	2482 ± 631	8 ± 8	* 0,27 (liten)
$\dot{V}O_2$ peak (ml · kg ⁻¹ · min ⁻¹)	28 ± 6	31 ± 6	8 ± 8	* 0,36 (liten)
$\dot{V}O_2$ peak – hvile (ml · min ⁻¹)	2032 ± 556	2207 ± 589	9 ± 9	* 0,32 (liten)
% av $\dot{V}O_2$ maks sykling	54 ± 8	57 ± 7	5 ± 6	* 0,29 (liten)
TTU (sek.)	458 ± 104	517 ± 90	15 ± 10	* 0,58 (moderat)
Høyeste oppnådde effekt (W)	129 ± 35	145 ± 37	14 ± 7	* 0,48 (liten)
RER	1,26 ± 0,1	1,28 ± 0,1	2 ± 8	0,39 (liten)
HFpeak (slag · min ⁻¹)	178 ± 9	177 ± 8	0 ± 2	-0,05 (ubetydelig)
$\dot{V}E$ peak (L · min ⁻¹)	111 ± 27	129 ± 31	18 ± 21	* 0,66 (moderat)
La ⁻ (mmol · L ⁻¹)	6,64 ± 1,2	7,45 ± 1,3	14 ± 22	⊠ 0,69 (moderat)
RPE (6-20)	18,0 ± 1,6	18,3 ± 1,1	2 ± 7	0,20 (liten)
Ergometersykling (n=11)				
$\dot{V}O_2$ maks (ml · min ⁻¹)	4214 ± 921	4354 ± 940	3 ± 3	* 0,15 (ubetydelig)
$\dot{V}O_2$ maks (ml · kg ⁻¹ · min ⁻¹)	52 ± 6	54 ± 7	4 ± 4	* 0,29 (liten)
$\dot{V}O_2$ maks – hvile (ml · min ⁻¹)	3936 ± 858	4080 ± 909	4 ± 4	* 0,17 (ubetydelig)
TTU (sek.)	390 ± 84	421 ± 81	9 ± 7	* 0,37 (liten)
Høyeste oppnådde effekt (W)	338 ± 74	351 ± 78	4 ± 4	* 0,18 (ubetydelig)
RER	1,18 ± 0,1	1,17 ± 0,0	-1 ± 6	-0,24 (liten)
HFpeak (slag · min ⁻¹)	190 ± 9	189 ± 7	-1 ± 3	-0,13 (ubetydelig)
$\dot{V}E$ peak (L · min ⁻¹)	165 ± 34	171 ± 37	4 ± 10	0,17 (ubetydelig)
La ⁻ (mmol · L ⁻¹)	9,43 ± 1,6	8,52 ± 1,4	-8 ± 16	⊠ -0,58 (moderat)
RPE (6-20)	18,2 ± 1,5	18,7 ± 1,2	3 ± 5	⊠ 0,37 (liten)

Snitt; gjennomsnitt. SD; standardavvik, ES; effektstørrelse (Cohen's *d*), $\dot{V}O_2$ peak/maks; høyeste målte oksygenopptak per tidsenhet, TTU; tid til utmattelse, W; watt, RER; respiratorisk utvekslingskoeffisient, HFpeak; høyeste målte hjertefrekvens, $\dot{V}E$ peak; høyeste målte ventilasjon per tidsenhet, La⁻; laktat målt i helblod, RPE; opplevd anstrengelse, *, signifikant endring fra pretest (p<0,05), ⊠; signifikant endring fra pretest (p<0,1).

Vedlegg V

Vedlegg V: Alle kapillærvariablene

	1B2A (n=8)	1B (n=8)	Sammenligning bein		
	Snitt ± SD	Snitt ± SD	Forskjell (% snitt ± SD)	P	Effektstørrelse (Cohen's <i>d</i>)
C/F	2,43 ± 0,53	2,49 ± 0,47	-2 ± 15	0,81	-0,13 (ubetydelig)
CAF fibertype I	5,2 ± 1,1	5,6 ± 1,1	-7 ± 11	0,44	-0,40 (liten)
CAF fibertype II	5,1 ± 1,0	5,2 ± 0,8	-2 ± 11	0,87	-0,08 (ubetydelig)
CAF alle fibre	5,2 ± 1,0	5,4 ± 0,9	-4 ± 11	0,63	-0,24 (liten)
CAFA fibertype I	1,31 ± 0,19	1,19 ± 0,23	13 ± 26	0,28	0,57 (moderat)
CAFA fibertype II	1,10 ± 0,22	1,05 ± 0,27	9 ± 27	0,66	0,23 (liten)
CAFA alle fibre	1,19 ± 0,19	1,11 ± 0,25	10 ± 26	0,50	0,34 (liten)
CD (kapillærer/mm²)	540 ± 100	494 ± 120	13 ± 29	0,42	0,41 (liten)

Snitt; gjennomsnitt, SD; standardavvik, forskjell; prosent forskjell fra 1B-beinet, P; p-verdi, C/F; ratio mellom antall kapillærer og antall muskelfibre i et område, CAF; gjennomsnittlig antall kapillærer rundt hver muskelfiber, CAFA; kapillærer rundt hver muskelfiber relatert til dens tverrsnittsareal, CD; kapillærtetthet.

Vedlegg VI



NORGES IDRETTSHØGSKOLE

Forespørsel om deltakelse i forskningsprosjektet

«Størrelsen på arbeidende muskulaturs betydning for muskulære utholdenhetstilpasninger»

Bakgrunn og hensikt

Dette er et spørsmål til deg om å delta i en forskningsstudie der vi skal se nærmere på hva som bestemmer tilpasningene i muskulaturen ved utholdenhetstrening. Vi ønsker i denne forbindelse å undersøke om muskulære tilpasninger påvirkes av størrelsen på muskulaturen som brukes når man trener. Dette kan gjøres ved å sammenligne trening med bare ett bein opp mot trening hvor man bruker ett bein og armene samtidig. Funn i studien vil bidra til å forstå hva som regulerer tilpasningene til utholdenhetstrening og hvordan trening bør gjennomføres.

Vi søker til denne studien moderat trente, fordi man da vanligvis oppnår raskere treningseffekter enn hos meget godt trente. Treningsperioden kan derfor være relativt kort.

Hva innebærer studien?

Denne studien omfatter at du som forsøksperson må møte jevnlig på NIH i en 7-8 ukers periode. 5 av disse ukene vil være trening, mens 2-3 uker vil gå med til tilvenning av utstyr og testing. Både under treningen og under de fleste testene skal du benytte et såkalt sparkeergometer. Da sitter du i en stol, mens det ene beinet pendler rytmisk frem og tilbake. Denne øvelsen gjøres med ett bein, mens det andre holdes i ro. Det andre beinet skal trenes på samme måte, rett etter det første beinet er trent. I tillegg plasseres det et armergometer foran deg, slik at du kan sykle med armene samtidig som beinet pendler. Dette gjør at man trener med en større total mengde muskler, siden musklene i overkroppen også er aktive.

Treningen og testingen utføres på Norges idrettshøgskole under veiledning av en trener. Hver økt varer fra 45 minutter til ca. én time. Du vil trene beinøvelsen og den kombinerte bein- og armøvelsen i samme økt, med 10 minutters pause imellom. Etter treningsperioden skal vi teste hvorvidt treningen har påvirket muskulaturen i de to beina forskjellig. Disse testene vil være måling av oksygenopptak (VO_2) på tre submaksimale belastninger og en maksimal belastning ($VO_{2\text{maks}}$) for hvert bein. Det vil i tillegg bli tatt to små vevsprøver på størrelse med et fyrstikkhode fra lårmuskulaturen i hvert bein (muskelbiopsier). Dette gjøres for å måle eventuelle kvalitetsendringer i selve

lårmuskulaturen mellom beinet som kun har trent beinøvelsen og beinet som har trent den kombinerte bein- og armøvelsen.

Tester

Før og etter treningen:

1. VO₂maks på vanlig ergometersykkel
2. VO₂maks-tester for beinøvelsen, venstre og høyre bein
3. VO₂-tester ved submaksimale belastninger for beinøvelsen, venstre og høyre bein
4. VO₂maks-test av armene (armergometer)

Disse testene blir gjennomført både før og etter treningsperioden. Testene blir gjennomført i løpet av to dager. Etter treningsperioden, vil testene igjen bli gjennomført. Under de maksimale testene økes belastningen gradvis, inntil du ikke klarer en høyere belastning. Under de submaksimale belastningene arbeider du på en bestemt belastning i fem minutter, mens det måles VO₂ og hjerterefrekvens. Totalt må det beregnes 45 minutter til VO₂maks på ergometersykkel og tre timer til den andre testdagen. I denne beregninga er en pause på ca. én time være medregnet. Denne pausen kan du benytte til hva du vil, men vi ser helst at du oppholder deg i nærheten av laboratoriet.

Målinger

Under testene skal vi måle oksygenopptak. For å få dette til må du puste gjennom et munnstykke under testene. Det vil også bli gjort målinger av hjerterytme under testene og under treningen, dette vil bli gjort med pulsbelte festet under brystet til forsøkspersonen. Under en treningsøkt med beinøvelsen og den kombinerte bein- og armøvelsen vil det bli tatt til sammen tre blodprøver for å undersøke konsentrasjonen av katekolaminer i blodet (adrenalin og noradrenalin). Dette vil gjøres under en treningsøkt tidlig i treningsperioden og under en økt mot slutten av treningsperioden. Prøvene vil tas som en vanlig venep prøve, og vil bli utført av sertifisert helsepersonell. I tillegg måles melkesyre i blodet ved et lite stikk i fingeren.

Rekkefølge oppsummert

Den første gangen du møter under studien er for å tilvenne deg å sykle på ergometersyssel. Dag 2 vil være å teste VO₂maks på ergometersyssel. Etter dette må du møte ca. 3 ganger for å øve på øvelsene vi skal bruke under treningen. Dette vil ta ca. en time hver gang. Før og etter treningen vil det også være to testdager, som vil ta ca. 45 minutter (VO₂maks på syssel) og rundt tre timer (tester med beinøvelsen og armøvelsen. Her er en pause på ca. én time medregnet). Treningen vil tilsammen være ca. 17 økter med en varighet på rundt en time. Noen økter vil være litt kortere, andre litt lengre. Det vil være tre økter i uka. Etter siste VO₂-test må du møte en siste gang for å ta muskelbiopsi.

1. 1 tilvenningsøkt ergometersyssel (1time)
2. Test VO₂maks ergometersyssel (45 min)
3. 3 tilvenningsøkter til treningsøvelsene (3 x 1 time)
4. Tester før trening (3 timer, hvor én time pause er inkludert)
5. Treningsperiode (5 uker)
6. Tester etter trening (2 x 45 min - 3 timer)
7. Muskelbiopsi

Mulige fordeler og ulemper ved å delta

Testene i forsøket kan oppleves som anstrengende, og litt stølhet i muskulaturen etter de første treningene kan forekomme. Du kan også oppleve litt ømhet og bli litt blå rundt stikkstedet hvor muskelbiopsien ble tatt de første dagene etter inngrepet. Selve inngrepet skal være smertefritt, siden man får lokalbedøvelse. Blodprøvene blir i all hovedsak tatt med et lite stikk i fingeren, unntatt analysen av katekolaminene som blir tatt ved veneprove. Alle blodprøvene skal medføre minimalt med ubehag. Deltakelse i prosjektet er derimot tidkrevende, derfor vil vi legge til rette for deg så godt som overhodet mulig.

Du vil ved å delta i dette prosjektet gjennomgå flere avanserte (og kostbare) tester som du vanligvis ikke får mulighet til, bl.a. VO₂maks på ergometersyssel. Du vil også få et innblikk i hvordan forskning bedrives og tilegne deg kunnskap om muskulaturens tilpasninger ved forskjellige stimuli og disse tilpasningenes effekt på prestasjon. Det kan her også gis tilbud om forelesning hvis interessen er stor nok. Dagen før testene skal du ikke ha utmattende aktivitet, men ellers ønsker vi at du opprettholder ditt daglige aktivitetsnivå under treningsperioden, hvilket betyr at du kan trene eller være i aktivitet som normalt.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten

navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste.

Det er kun prosjektleder og medarbeidere som har adgang til navnelisten og som kan finne tilbake til deg.

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

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke til å delta i studien. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Om du nå sier ja til å delta, kan du senere trekke tilbake ditt samtykke uten at det påvirker din øvrige behandling. Dersom du seinere ønsker å trekke deg eller har spørsmål om studien, kan du kontakte Knut Sindre Mølmen på tlf. 94860805 (knutsm@student.nih.no) eller Bjarne Rud på tlf. 23262333 (bjarne.rud@nih.no).

Ytterligere informasjon om studien finnes i kapittel A – utdypende forklaring av hva studien innebærer.

Ytterligere informasjon om biobank, personvern og forsikring finnes i kapittel B – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.

Samtykkeerklæring følger etter kapittel B.

Kapittel A- utdypende forklaring av hva studien innebærer

Kriterier for deltakelse i studien

Vi ønsker å rekruttere 10 friske, moderat utholdenhetstrete kvinner og menn (VO_2 maks $\sim 45\text{-}60 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) mellom 18 og 40 år. Inkluderingen vil skje etter at egenerklæring for forsøkspersoner (vedlegg) er godkjent, skriftlig informert samtykke er underskrevet (vedlegg) og etter at VO_2 maks-test på ergometersykkel er gjennomført. Eksklusjonskriterier til studien er bruk av blodfortynnende medikamenter, eller om forsøkspersonen har allergiske eller hypersensitive reaksjoner på bedøvelse. Prosjektet var informert til Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) avdeling sør-øst før oppstart (referansenr. 2013/1238).

Utdypende forklaring av studien

Før pretesting vil alle forsøkspersonene gjennomføre tilvenning til både ergometersykling, 1-KE og 1-KE + armer. Inkludering i studien vil skje etter gjennomført tilvenningsøkt til ergometersykling og påfølgende VO_2 maks-test. Deretter vil forsøkspersonene gjennomføre flere tilvenningsøkter til 1-KE og 1-KE + armer. Først når forsøkspersonene er på et godt nok teknisk nivå vil det bli utført pretester som undersøker submaksimale og maksimale belastninger med 1-KE på begge bein, samt maksimal belastning i armsykkelergometer.

Oppstart av treninga vil skje etter at pretestene er gjennomført. Treningsperioden vil være på ~ 5 uker. I praksis vil forsøkspersonene trene lenger, siden det er en omfattende tilvenningsperiode før pretestene. Alle forsøkspersonene skal under treningsperioden både trene 1-KE og 1-KE + armer. Slik blir forsøkspersonene sin egen kontroll og antall forsøkspersoner kan holdes relativt lavt. I treningsperiodens første og siste uke vil det bli foretatt blodprøver for analyse av adrenalin og noradrenalin etter utført trening med 1-KE og 1-KE + armer. I disse øktene vil det også bli gjennomført måling at VO_2 for å kvantifisere O_2 -kostnad for treningsøktene. Intensiteten på treningsøktene vil bli justert på bakgrunn av to midt-tester som vil bli gjennomført underveis i treningsperioden

Etter treningsperioden vil testene som ble utført før treningsperioden bli gjentatt med de samme prosedyrene og den samme testlederen. I tillegg vil det bli tatt biopsi av m. vastus lateralis i begge bein.

Forsøkspersonene blir oppfordret til å opprettholde sitt normale kosthold og aktivitetsnivå under prosjektet. Før testene og treningene skal forsøkspersonene unngå alkohol og andre rusmidler de siste 24 timene. Det vil også bli anbefalt å innta et lett måltid ca. 1 time for test og trening.

Tabell 2.3.: Tabellen viser det eksperimentelle designet satt i tidsperspektiv.

Tilvenning sykkel	x								
VO ₂ maks sykkel	x							x	
Tilvenning 1-KE og 1-KE + armer	x	x							
Tester 1-KE og armsykling			x					x	
1-KE midttester				x		x			
Katekolaminkonsentrasjon			x					x	
VO ₂ trening			x					x	
Biopsi								x	
		Pretest		Intervensjon				Posttest	
		↔		←—————→					
Uke		-2	-1	1	2	3	4	5	6

Under treninga vil det bli disponert et spesialdesignet sparkeergometer for kneekstensjoner, bygd etter prinsippene til Andersen et al. (1985). Ergometeret begrenser kontraksjonene til m. quadriceps femoris (Andersen et al., 1985; Richardson et al., 1998). 1-KE-treninga vil bestå av kneekstensjoner fra en knevinkel på ~ 90° til ~ 170°. Svinghjulets momentum og tyngdekrafta vil sørge for at beinet passivt føres tilbake til utgangsposisjon ~ 90° ved hvert spark. Under 1-KE + armer-treninga vil det kombinert med 1-KE bli utført armsykling med begge armene i et armergometer plassert foran sparkeergometeret (Excalibur Sport; Lode B.V., Groningen, Nederland).

Treningsprogram

Treningsprogrammet vil ha en progresjon i treningsbelastning, både når det gjelder varighet, intensitet og hyppighet på øktene.

Tabell 2.4.: Veiledende treningsprogram for forsøkspersonene.

Uke	Treningsøktas innhold	Treningshyppighet
1-2	20 min 1-KE og 20 min 1-KE + armer.	Tre økter/uke.
3	25 min 1-KE og 25 min 1-KE + armer.	Tre økter/uke.
4	25-30 min 1-KE og 25-30 min 1-KE + armer.	Fire økter/uke.
5	30 min 1-KE og 30 min 1-KE + armer.	Fire økter/uke.

Treningsprotokollen skal gjennomføres både med 1-KE og 1-KE + armer. Dette vil foregå i samme økt med ti minutter pause mellom øvelsene. Forsøkspersonene counterbalanserer hvilken øvelse de begynner øktene med. Treningsøktene skal gjennomføres med en frekvens på 60 rpm både i sparke- og armergometeret. Intensiteten på øktene vil bli justert individuelt til hver økt av treningsveileder på bakgrunn av forsøkspersonens effektprestasjon under VO₂peak-testen og midt-tester gjennomført ca. hver femte treningsøkt. Disse testene vil bli gjennomført for å oppdage forskjell i prestasjon mellom beina, slik at belastninga på hvert bein kan individuelt justeres.

Tester

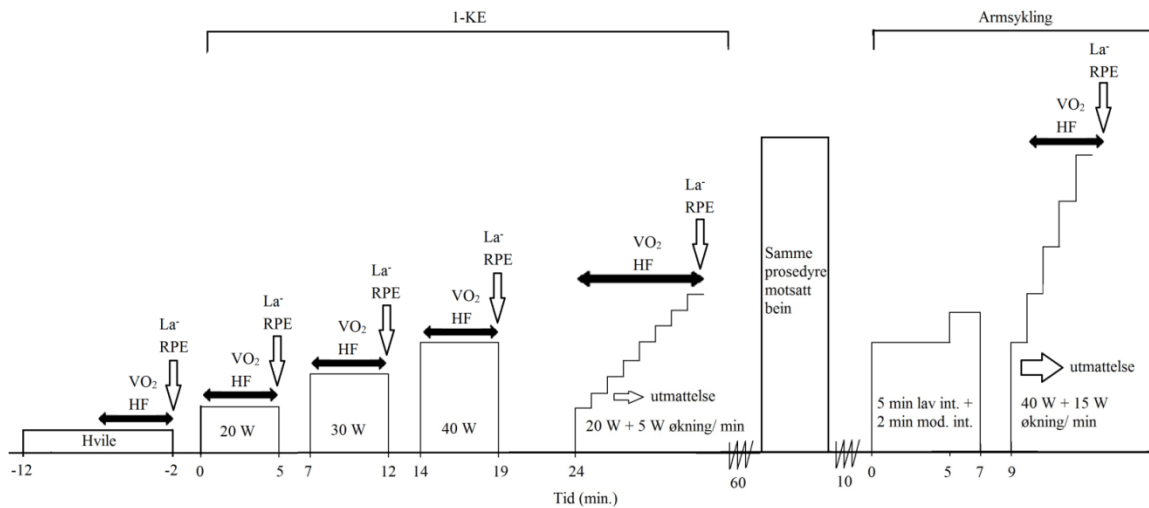
Tradisjonell VO₂maks-test på ergometersykkel blir utført for å måle helkroppsv-VO₂maks. Belastningen økes hvert minutt inntil utmattelse. Her vil man øke med 25 watt/ min for menn og 20 watt/ min for kvinner. Testen vil avsluttes når forsøkspersonen ikke klarer å opprettholde en tråkkfrekvens på over 80 rpm. Gjennomsnittet av de to høyeste målingene vil bli brukt i utregningene. Det vil under testen bli gjennomført oksygenmålinger, hjerterefrekvens, samt laktat ved testens slutt. VO₂maks gjennomføres på en separat dag uten øvrige tester. Denne testen vil bli gjennomført i uke -2 og i uke 6.

Submaksimale belastningstester for 1-KE med henholdsvis venstre og høyre bein vil bli gjennomført i uke -1 og i uke 6. Her vil vi ha standardiserte belastninger på 20, 30 og 40 W hvor forsøkspersonene skal opprettholde en sparkefrekvens på 60 rpm i fem minutter per belastning. Det vil være to minutter pause mellom hver submaksimale test. Det vil bli foretatt kontinuerlig måling av VO₂ og hjerterefrekvens, mens det gjøres måling av laktat ved slutten av hver belastning.

VO₂peak-testene for 1-KE blir utført rett etter de submaksimale belastningstestene. Forsøkspersonene blir randomisert til hvilket bein de skal teste først. De submaksimale belastningstestene vil være en del av oppvarmingen til VO₂peak-testen for 1-KE. Det vil være 1 time pause mellom den maksimale testen på det ene beinet, før man gjennomfører de submaksimale belastningene på det andre beinet. Selve VO₂peak-testen for 1-KE vil bli utført etter samme prinsipp som helkroppsv-VO₂maks. Det vil være en trappetrinnsprotokoll hvor man øker belastningen med 5 W per minutt inntil utmattelse. Det vil også her bli gjennomført måling av hjerterefrekvens underveis i testen, VO₂ og laktat ved testens slutt. Startbelastningen vil bli bestemt etter tilvenningsøktene, og skal være lik både ved pre og post, siden testene også vil fungere som en prestasjonstest (tid til utmattelse). Det vil også her bli gjennomført måling av hjerterefrekvens underveis i testen, VO₂ og laktat ved testens start og slutt.

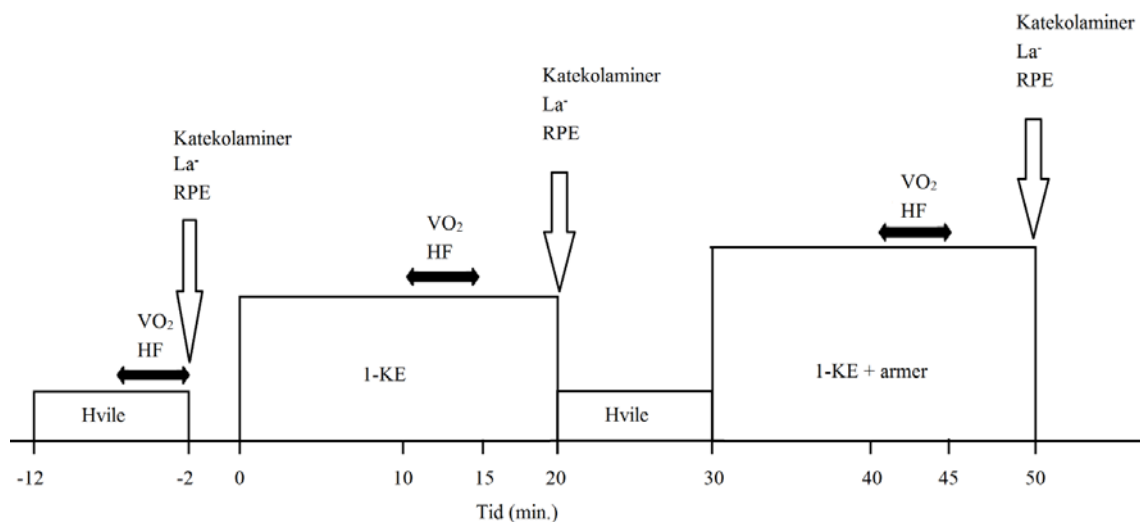
Det vil være én times pause mellom de submaksimale og maksimale belastningene på det ene beinet før oppstart av testene på det andre beinet.

Det vil både pre og post også bli gjennomført en VO₂peak-test i armergometer etter samme prinsipp. Her vil økningen i belastning være på 15 W/ per minutt. Oppvarmingen vil være på 10 min. 5 min med lav intensitet og 5 min med moderat intensitet. 2 min pause mellom oppvarming og test.



Figur: Oversikt over VO_2 -tester av submaksimale og maksimale belastninger med 1-KE med begge bein, samt maksimal belastning med armsyking.

Katekolaminkonsentrasjon og O_2 -kostnad på treningsøvelsene vil undersøkes i forbindelse med en treningsøkt i første og siste treningsuke. Det vil bli foretatt blodprøver som skal analyseres for adrenalin- og noradrenalin-konsentrasjon. Per økt vil det bli gjennomført tre blodprøver. Én i hvile før treninga, én rett etter trening med 1-KE og én rett etter trening med 1-KE + armer. Disse dagene vil det også gjennomføres måling av O_2 -kostnad på treningsøktene med 1-KE og 1-KE + armer, laktat og PRE etter hvile og trening og kontinuerlig måling av hjertefrekvens.



Figur: Oversikt over treningsøkt med inkludert måling av VO_2 og katekolaminer.

Biopsianalyse

I uke 6 og uke 7 av prosjektet, mellom 4-7 dager etter siste treningsøkt, vil det bli gjennomført punktbiopsier av m. vastus lateralis på begge bein.

Selve biopsiprosedyren starter med at forsøkspersonen legger seg på en behandlingsbenk og blir desinfisert med Klorhexidinsprit (5 mg/ml) på låroverflaten. Deretter blir forsøkspersonen bedøvd i underhud og over fascien til m. vastus lateralis med Xylocain med adrenalin (10 mg/ml og 5 µg/ml). Bedøvelsen får virke i 10 minutter før den blir testet med en prikketest. Hvis bedøvelsen virker som den skal, blir det satt et snitt på ca. 10 mm gjennom hud og fascien rundt muskelbuen med skalpell. Deretter blir en biopsinål med en diameter på 6 mm ført inn i muskelen. Denne vinkles i distal retning parallelt med fiberretningen på muskelbuen. Prøven blir så tatt i posisjon like under fascien ca. to cm distalt for innstikksstedet. Det vil bli benyttet Bergström-metoden, hvor muskelvevet blir trukket inn i en åpning i nålen ved hjelp av et sug, og en innvendig sylinder i nålen klipper av vevet som er sugd inn i nålen. Et klipp gir ca. 100 mg vev. Det vil bli tatt to prøver, altså totalt 200 mg vev per bein. Den andre prøven vil bli tatt på tilsvarende måte, men i proksimal retning. Til slutt blir snittet stripset med sårlukningstape og dekket med sårbandasje. Muskelprøvene blir så lagt i stabiliserende lim og lagret ved -80°C.

Immunhistokjemi vil bli benyttet for å kvantifisere kapillærtetthet. I tillegg vil biopsiprøvene bli analysert for mengde aerobe enzymene ved western blot.

Tidsskjema

Testingen og treningen vil foregå høst/vinter 2014/2015.

Risikovurdering

Risikoen for skader eller andre komplikasjoner i forbindelse med treningen og testingen vurderer vi som liten, så sant sikkerhetsforskriftene etterfølges og trener er tilstede under forsøkene.

Økonomi

Forsøksperson vil ikke motta honorar for å delta i studien, men studien vil ikke påføre forsøkspersonen kostnader. Reiseutgifter kan derfor dekkes av Norges Idrettshøgskole.

Kapittel B - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Opplysninger som registreres om deg er VO₂maks fra de ulike testene, vekt, høyde, alder, resultater fra spørreskjema og resultater fra de fysiologiske testene.

Daglig ansvarlig for prosjektet vil være Bjarne Rud. Databehandlingsansvarlig er Turid Sjøstedt, avdelingsleder ved avdeling for forskning og bibliotek på Norges Idrettshøgskole. Datamaterialet vil kun bli benyttet av forskere og masterstudenter ved samme institusjon.

Biobank

Biopsiene og blodprøvene som blir tatt vil bli lagret i en forskningsbiobank ved Norges Idrettshøgskole. Prøvene vil bli lagret i 5 år. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Ansvarshavende for forskningsbiobanken er Bjarne Rud. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK).

Rett til innsyn og sletting av opplysninger om deg og sletting av prøver

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.

Forsikring

Norges Idrettshøgskole er en statlig utdanningsinstitusjon, og staten er derfor selvassurandør.

Informasjon om utfallet av studien

Når studien er ferdig vil vi invitere alle forsøkspersonene til et informasjonsmøte der resultatene fra studien vil bli presentert.

Samtykke

Hvis du har lest informasjonsskrivet og ønsker å være med som forsøksperson i prosjektet, ber vi deg undertegne “Samtykke til deltakelse i studien” 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.

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med Knut Sindre Mølmen på tlf. 94860805, eller Bjarne Rud på tlf. 23262333.

Med vennlig hilsen

Knut Sindre Mølmen (masterstudent)

Bjarne Rud (førsteamanuensis)

Jostein Hallén (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 VII

Prosedyre katekolaminprøvetaking

Standardisert prosedyre:

- Unngå koffein og nikotin den dagen testen er
- Faste siste 4 timer før test (lik faste for de to dagene)
- Likt tidspunkt
- Medisiner (eks. bronkodilatorer) er greit, men må standardiseres
- Ingen hvileprosedyre før trening da treninga er vår standardisering

Gjennomføring:

Forsøkspersonen møter til to treningsøkter på to separate dager i andre halvdel av treningsperioden. Tar blodprøve rett etter utført første treningsøvelse i øktene.

Forsøkspersonene counterbalanserer hvem som trener 1-KE+A eller 1-KE på første testdag.

Procedure blood sampling of plasma catecholamines

- Glasses have to be stored in refrigerator.
 - The glasses are light sensitive, so they must be wrapped in aluminium foil when taken out of the fridge. They also needs to be cold, so it's important that the glasses are in a box with ice and water before sampling.
- 1) After the blood is drained, turn the glass 5-6 times, so the blood becomes well mixed (don't shake).
 - 2) Put the glass immediately in ice and water.
 - 3) Centrifuge the sample at 4-6°C with 3250 rpm in 10 minutes.
 - 4) The plasma must be immediately pipetted into a tube, for instance a 3,6 ml Nunc-tube with screw cap, and frozen at -20°C (longer freeze storage demands -80°C)
- (The analysis demands 3 ml plasma).

Vedlegg VIII

Prosedyre Western Blot

Løsninger:

- TBS: 200 ml TBS + 1800 ml dH₂O
 - TBS-t: 200 ml TBS + 1800 ml dH₂O + 2 ml Tween20
 - Transferbuffer: 200 ml Tris/Glycin transfer buffer + 1600 ml dH₂O + 200 ml methanol
 - Running buffer: 200 ml SDS + 1800 ml dH₂O
 - Sample buffer: 384 µl Laemmli + 16 µl 5M DTT
 - 5 % melkeløsning: 5 g melkepulver + 100 ml TBS-t
 - 1 % melkeløsning: 1 g melkepulver + 100 ml TBS-t
- *Mengde beregnet for 1 boks (4 geler/membraner)

Dag 0: Lag TBS, TBS-t og transferbuffer. Sett i kjøleskap over natt. Pipetter dH₂O i aliquoter iht. samplepreparationmalvariant.

Dag 1:

1. Sett på varmeblokk 70°C + hent prøver fra fryser
2. Lag running- og sample buffer
3. Pipetter sample buffer + prøve i aliquote med dH₂O iht. samplepreparationmalvariant.
4. Varmeblokk 70°C i 10 min.
5. Gjør klar geler, elektroforeseboks + running buffer. Husk kam + plastremse + skylle brønner med r-buffer. Husk å fjerne plastremse og merke gelene.
6. Fyll indre kammer med running buffer over brønnene.
7. Loading: Lever 5 µl GeneOn-markør i brønn 1 og 10 og sett 30 µl prøver i brønn 2-9.
8. Fyll ytre kammer med running buffer opp til indikasjonsmerke.
9. Elektroforese: 200V, ~31 min
10. Gjør klar til blotting: Kar til hver gel med transferbuffer (MERK), dypp pad i transferbuffer i sandwichkar, ta fram verktøy, filterpapir etc. Klipp til membraner. **Mot slutten av elfo (ca. 25 min) må membranene aktiveres=** 1. Metanol i 30 sek. 2. dH₂O i 30 sek. 3. dH₂O på ristevakt 1-2 min. 4. Transferbuffer 10-15 min ristevakt.
11. Knekk opp gelplate → legg gel i transferbuffer → ta bilde (Protein Gels → stain free gels → 2,5 min act.)
12. Lag sandwich (HUSK: Rød side ned → pad-filterpapir-membran-gel-filterpapir-pad. NB! Husk å fjerne luftbobler med rulle+minimere bevegelse på gelene)
13. Blotting: 100 V, 30 min
14. Lag 5 % melkeløsning: 5g melkepulver + 100 ml TBS-t.
15. Gel og membraner i egne kar med transferbuffer.
16. Nye bilder. *Membran:* Blot → stain free blot → auto. *Gel:* Stain Free → rask akt.
17. Blokkering: Membranene 2t på ristevakt med 5% melkeløsning
18. Analyser membranbildet for totalprotein: Lane. Like mange piksler i hver bane som skal sammenliknes (V-H, gjør ikke noe om duplikatene har forskjellig mengde piksler) → excel → oversiktsregneark.

19. Lag 1% melkeløsning + gjør klart primært antistoff
20. Skyll 2x TBS-t raskt + vask 2x2 min TBS-t → legg i TBS.
21. Kutt membranene med skalpell på glassplate: Hver membran deles i 3 deler.
22. Legg membranene i tilhørende antistoffløsning over natt i kjøleskap. Bruk «slukboks». 8 ml i hver. NB: Husk å tape fast boksen i ristevekt
 - COX4, 17 kDa (ab14744, mouse monoclonal): 1:1000 i TBS-t med 1% melk.
 - HADH, 34 kDa (ab154088, rabbit polyclonal): 1:8000 i TBS-t med 1% melk.
 - CS, 52 kDa (ab96600, rabbit polyclonal): 1:2000 i TBS-t med 1% melk.

Dag 2:

1. Ta ut 1 % melkeløsning fra kjøleskap.
2. Skyll 2x TBS-t raskt + 1x15 min gyrorocker (60 rpm).
3. 3x5 min TBS gyrorocker.
4. Gjør klart sekundært antistoff
5. Inkuber sekundært antistoff 1 time på ristevekt.
 - COXIV-membran i goat-anti-mouse (Thermo Sc): 1:30 000 i TBS-t med 1% melk (1ul antistoff + 30 ml TBS-t med 1% melk)
 - HADH- og CS-membran i goat-anti-rabbit (Cell Sign.): 1:3 000 i TBS-t med 1% melk (7 ul antistoff + 21ml TBS-t med 1% melk)
6. Steg 2 og 3 igjen.
7. Bland substratvæske
8. La TBS renne av på papir → monter på glassplate + inkuber med substratvæske → la stå lysfritt i kamera ca. 2 min.
9. Ta bilde: Blots → chemi hi sensitivity. Ta også bilde av membran. NB: Husk også å lagre et merged bilde.
10. Analyse: Lag like store rektangler over proteiner som skal sammenlignes → excel → oversiktsregneark.

Vedlegg IX

Protokoll immunhistokjemi

Løsninger:

PBS: 1 tablett/ L dH₂O

PBS-t: 1 tablett/ L dH₂O + 0,5 ml Tween20

BSA: 25 ml dH₂O + 5 ml BSA (flytende)

Primærantistoffløsninger:

CD31 monoklonal mus (Dako): **1:100** i BSA-løsning

SC71 monoklonal mus (DSHB): **1:1000** i BSA-løsning (SC71 og dystrofin blandes sammen)

Dystrofin polyklonal kanin (Abcam): **1:500** i BSA-løsning (SC71 og dystrofin blandes sammen).

Sekundærantistoff:

CD31 og SC71 (anti-mouse): Alexa 488 (grønn) **1:200** i BSA-løsning*

Dystrofin (anti-rabbit): Alexa 594 (rød): **1:200** i BSA-løsning*

*Sekundærantistoff for SC71 og dystrofin blandes i samme BSA-løsning.

NB! Husk å miks + rask sentrifugering av antistoff. Husk også at de sekundære antistoffene er lysømfintlige og må skjermes for lys så godt som mulig.

Protokoll:

Dag 1:

1. Fukt fuktkammer (papir + PBS-t)
2. Ta glassene ut av fryseren. La tørke i 30 min (skal ikke være fuktighet på dem).
 - a) Etter 15 min: tegn rundt snittene med lipidpenn (PAP PEN) i avtrekksskap.
 - b) Skriv på glassene hvilke antistoff/løsninger som skal brukes.
3. Inkuber BSA i lipidringen i 30 min (gjøres i fuktkammeret)
 - a) Lag primær antistoff CD31 Dako monoklonalt/mus 1:100
4. Rist/ tørk av overflødig BSA-løsning med lofritt papir.
5. Inkuber primært antistoff CD31 på snittene
 - a) La stå i kjøleskap til neste morgen.

Dag 2:

1. Rist av antistoffet og vask 3x10 min PBS-t i vaskeglass på ristevekt (ca. 150rpm)
 - a) Bytt vaskeløsning mellom hver gang.
 - b) Lag sekundærantistoff 1:200 i BSA-løsning
 - c) Rist + tørk av vaskeløsning.
2. Påfør sekundærantistoff og inkuber i romtemperatur 30 minutter i fuktkammer (pass på lyseksponering).
3. Rist av sekundærantistoffet og vask 3x10 min PBS-t (skjerm for lys).
 - a) Bytt vaskeløsning mellom hver gang.
 - b) Lag primært antistoff dystrofin + SC71 i samme BSA-løsning
 - c) Rist + tørk av vaskeløsning.
4. Ta bilder i gråtoner av CD31 i mikroskopet (pass på lyseksponering)
5. Påfør SC71- og dystrofin antistoff. Inkuber i 1 t i fuktkammer i romtemperatur.
6. Vask glassene 3x10 min i PBS-t

- a) Lag sekundære antistoff i samme BSA-løsning
- b) Rist + tørk av vaskeløsning
- 7. Påfør sekundærantistoffløsningene på snittene og inkuber 30 min i fuktkammer i romtemperatur (skjerm for lys!).
- 8. Vask glassene 3x10 min i PBS-t (skjerm for lys)
 - a) Rist + tørk av vaskeløsning
- 9. Monter dekkglass med tilsatt DAPI for merking av myonuclei.
 - a) Tørk til neste dag

Dag 3:

- 1. Ta bilder i gråtoner av cellemembran + fibertype i mikroskopet. NB! Husk å ha identiske bilder, også med kapillærbildet fra dag 2. Analyser bildene i TEMA.
- 2. Analyser bildene i TEMA (ant. fibre, fibertype og kapillærer)