

**Metabolske endringer i muskelceller etter
ryggmargsskade - en sammenligning mellom 1 og 12
måneder etter skade med funksjonsfriske kontroller**

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Derya Mohamed



Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap

45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2023

Metabolske endringer i muskelceller etter ryggmargsskade - en sammenligning mellom 1 og 12 måneders etter skade med funksjonsfriske kontroller

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Derya Mohamed



Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2023

Veiledere:

Førsteamanuensis Eili Tranheim Kase

Stipendiat Stanislava Stevanovic

© Derya Mohamed

2023

Metabolske endringer i muskelceller etter ryggmargsskade - en sammenligning mellom 1 og 12 måneder etter skade med funksjonsfriske kontroller

Derya Mohamed

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden fra august 2021 til april 2022.

Førsteamanuensis Eili Tranheim Kase, som er min veileder, har min takk og takknemlighet. Jeg setter stor pris på din veiledning, tid, assistanse, tilbakemeldinger og nyttige råd gjennom hele veien. En stor takk til stipendiat Stanislava Stevanovic for hjelp, gode støtte og motivasjon under utforming av masteroppgaven. Takk til professor G. Hege Thoresen og professor Arild C. Rustan for deres engasjement, gode råd og tilbakemeldinger. Jeg vil takke Hege G. Bakke for utmerket opplæring, oppfølging og hjelp i laboratoriet, men mest av alt setter jeg pris på din tid og svar på alle mine spørsmål. Takk også til Camilla Stensrud for opplæring og veiledning på laboratoriet. Jeg takker alle i «muskelforskningsgruppen» for et morsomt og kunnskapsrikt år på studiet.

Takk til mine venner og medstudenter for alle de fantastiske opplevelsene vi delte mens vi studerte. Uten dere ville ikke tiden på farmasistudiet vært den samme.

Jeg vil spesielt takke familien min, som har vært mine støttespillere. Deres kjærighet og oppmuntring har holdt meg oppe gjennom hele farmasistudiet. Takk til min lille skatt; du var ikke bare en fantastisk overraskelse, men du viste deg også å være min største motivasjon og styrke.

Oslo, mai 2023



Derya Mohamed

Abstract

Background: Inactivity is associated with increased metabolic risk. The skeletal muscles constitute the largest organ in the body which is a significant consumer of energy at rest, but especially during increased and intense physical activity. However, for people with spinal cord injury (SCI), physical activity is not relevant or difficult to carry out. SCI causes major consequences for those who are affected. Patients with SCI have a shorter life expectancy compared to the healthy population, partly because of secondary health conditions such as diabetes type 2, obesity and cardiovascular diseases. The metabolic profile of this patient group is characterized by elevated blood glucose, insulin resistance and hyperlipidaemia. In this thesis, it was investigated whether metabolic changes occur in skeletal muscle cells obtained from biopsies from SCI patients, taken 1 month (SCI-1) and 12 months (SCI-12) after injury, compared to healthy controls.

Method: Skeletal muscle cells from SCI patients and healthy controls were isolated and differentiated into myotubes in vitro. The substrate oxidation method was used to examine fatty acid metabolism and glucose metabolism in myotubes by using [1-¹⁴C]oleic acid and D[¹⁴C(U)]glucose respectively. Real-time accumulation and degradation of [¹⁴C]leucine was investigated by scintillation proximity assay, to study protein turnover in myotubes. Insulin-stimulated Akt phosphorylation was analyzed by Western immunoblotting. Gene expression of the genes myosin heavy chain 2 (MYH2), myosin heavy chain 7 (MYH7) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PPARGC1 α /PGC1 α) was studied by using quantitative polymerase chain reaction in muscle cells. In the last days of the differentiation period, the mitochondrial uncoupler FCCP, the PPAR δ agonist GW501516 and the β 2 receptor agonist terbutaline were added to some of the wells, to look at the effects of these in myotubes.

Results: No significant changes in oleic acid metabolism, glucose metabolism or leucine turnover were observed in SCI cells compared to control cells. Neither GW501516 nor FCCP showed clear effects on fatty acid and glucose metabolism in the myotubes. The GW501516 response of the oleic acid oxidation tended to be lower in SCI-12 myotubes compared to SCI-1 myotubes and control myotubes. There was also a possible tendency towards a lower effect of FCCP in the SCI cells, while the insulin effect on glucose metabolism and Akt phosphorylation did not differ between groups. Gene expression of PGC1 α was significantly

lower in untreated SCI myotubes compared to untreated control myotubes. At the same time, a tendency towards lower expression of MYH2 and MYH7 was observed in SCI-12 myotubes. Treatment with terbutaline led to a significant downregulation of MYH2 in SCI cells compared to control cells. A significantly lower expression of MYH7 in SCI-1 myotubes was also observed after treatment with terbutaline. Treatment with terbutaline induced no significant differences in the accumulation and decay of leucine in SCI myotubes compared to control myotubes.

Conclusion: In this thesis, no changes were found in basal fatty acid metabolism, glucose metabolism and leucine turnover in SCI myotubes compared to control myotubes. Treatment with FCCP, GW501516, terbutaline or insulin did also not elucidate any significant differences between the donor groups. However, some changes in gene expression were observed in cultured muscle cells from SCI patients compared to healthy controls. To draw firm conclusions about possible metabolic changes occurring in skeletal muscle cells from SCI patients, it is necessary to carry out more experiments on more donors.

Sammendrag

Bakgrunn: Inaktivitet er assosiert med økt metabolsk risiko. Skjelettmuskulaturen er det største organet i kroppen og forbruker en betydelig mengde energi ved hvile, men særlig ved økt og intens fysisk aktivitet. For personer med ryggmargsskade (spinal cord injury, SCI) er imidlertid fysisk aktivitet ikke aktuelt eller vanskelig å gjennomføre. SCI forårsaker store konsekvenser for de som blir rammet. Pasienter med SCI har kortere forventet levealder sammenlignet med den funksjonsfriske befolkningen, delvis som følge av sekundære helsetilstander som fedme, diabetes type 2 og kardiovaskulære sykdommer. Metabolsk profil hos denne pasientgruppen er preget av forhøyet blodglukose, insulinresistens og hyperlipidemi. I denne oppgaven ble det undersøkt om metabolske endringer forekommer i skjelettmuskelceller hentet fra biopsier fra SCI-pasienter, tatt 1 måned (SCI-1) og 12 måneder (SCI-12) etter skade, sammenlignet med funksjonsfriske kontroller.

Metode: Skjelettmuskelceller fra SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller ble isolert og differensiert til myotuber *in vitro*. Substratoksidasjonsmetoden ble brukt for å undersøke fettsyremetabolisme og glukosemetabolisme i myotuber ved å benytte [1- ^{14}C]oljesyre og D[^{14}C (U)]glukose. Sanntidsakkumulering og degradering av [^{14}C]leucin ble undersøkt ved scintillation proximity assay for å studere proteinomsetningen i myotuber. Insulinstimulert Akt-fosforylering ble analysert ved Western immunoblotting. Genekspresjon av de utvalgte genene myosin tungkjede 2 (MYH2), myosin tungkjede 7 (MYH7) og peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma coaktivator 1-alfa (PPARGC1 α /PGC1 α) ble studert ved kvantitativ polymerasekjedereaksjon. I de siste dagene av differensieringsperioden ble noen av brønnen tilsatt den mitokondrielle frikobleren FCCP, PPAR δ -agonisten GW501516 og β 2-reseptoragonisten terbutalin, for å se på effektene av disse i myotuber.

Resultater: Ingen signifikante endringer i oljesyremetabolisme, glukosemetabolisme eller leucinomsetning ble observert i SCI-celler sammenlignet med kontroll-celler, eller mellom SCI-celler fra biopsier tatt 1 og 12 måneder etter skaden. Hverken GW501516 eller FCCP hadde tydelige effekter på fettsyre- eller glukosemetabolismen i myotubene, men GW501516-responsen på oljesyreoksidasjonen tenderte til å være lavere i SCI-12-myotuber sammenlignet med SCI-1-myotuber og kontroll-myotuber. Det var også en mulig tendens til lavere effekt av FCCP i SCI-cellene, mens insulineffekten på glukosemetabolisme og Akt-fosforylering ikke var forskjellig mellom gruppene. Terbutalin viste ingen signifikante forskjeller i

akkumulering av leucin i SCI-myotuber sammenlignet med kontroll-myotuber. Genuttrykk av PGC1 α var signifikant lavere i ubehandlede SCI-myotuber sammenlignet med ubehandlede kontroll-myotuber og det var en tendens til lavere uttrykk av MYH2 og MYH7 i SCI-12-myotubene. Behandling med terbutalin førte til en signifikant nedregulering av MYH2 i SCI-celler, noe som ikke ble observert i kontroll-celler. Signifikant redusert uttrykk av MYH7 i SCI-1-myotuber ble også observert etter behandling med terbutalin

Konklusjon: Ingen endringer ble funnet i fettsyremetabolisme, glukosemetabolisme eller leucinomsetning i SCI-myotuber sammenlignet med kontroller-myotuber. Behandling med FCCP, GW501516, terbutalin eller insulin viste heller ingen signifikante forskjeller mellom donorgruppene. Imidlertid ble noen endringer i genuttrykk observert i dyrkede muskelceller fra SCI-pasienter sammenlignet med friske kontroller. For å trekke sikre konklusjoner om mulige metabolske endringer oppstår i skjelettmuskelceller fra SCI-pasienter er det nødvendig å utføre flere forsøk på flere donorer.

Forkortelser

ADP	Adenosindifosfat	IRS	Insulinreseptorsubstrat
AKT	Proteinkinase B	KMI	Kroppsmasseindeks
AS160	Akt-substrat på 160 kDa	LDL	Lav-densitet-lipoprotein
ATP	Adenosintrifosfat	MHC	Myosin tungkjeder
BCAA	Forgrenede aminosyrer	mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
BSA	Bovint serumalbumin	MYH2	Myosin-tungkjede-2-gen
CA	Celleassosiert radioaktivitet	MYH7	Myosin-tungkjede-7-gen
CACT	Karnitin-acylkarnitin-translokase	NAD+	Nikotinamidnukleotid i oksidert form
CoA	Koenzym A	NADH	Nikotinamidnukleotid i redusert form
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre	NaOH	Natriumhydroksid
CO₂	Karbondioksid	pAKT	Fosforylert Proteinkinase B
CPT1	Karnitin-palmityltransferase-I	PBS	Fosfatbuffret saltvann
CPT2	Karnitin-palmityltransferase-II	PGC1a	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma coaktivator 1-alfa
DMEM	«Dulbecco's Modified Eagle medium» (Serumfritt differensieringsmedium)	PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
DMSO	Dimetylsulfoksid	PPARGC1α	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma coaktivator 1-alfa (gen)
DNA	Deoksyribonukleinsyre	qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
DPBS	Dulbecco fosfatbuffret saltvann	RNA	Ribonukleinsyre
FABP	Dettsyrebindende protein	RPLP0	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
FAT/ CD36	Fettsyretranslokase/ «cluster of differentiation 36»	Rpm	Rotasjon per minutt
FATP	Fettsyre transport protein	SCI	Ryggmargsskade
FBS	Føtalt kalveserum	SEM	Standardfeil av gjennomsnittet
FCCP	Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone	TAG	Triglyserid
FFA	Frie fettsyrer	T1D	Diabetes type 1
GLUT	Glukosetransportør	T2D	Diabetes type 2
H₂O	Vann	TTBS	Tween-Tris-bufret saltvann
HBSS	Hanks balanserte saltløsning	VLDL	Veldig lavdensitet lipoprotein
HDL	Høy-densitet-lipoprotein	WHO	Verdens helseorganisasjon
IR	Insulinreseptor		

Innholdsfortegnelse

Forord	V
Abstract	VII
Sammendrag	IX
Forkortelser	XI
Innholdsfortegnelse	XIII
1 Introduksjon	1
1.1 Metabolsk syndrom	1
1.1.1 Diabetes type 2	1
1.1.2 Insulinreseptorsignalveien	2
1.1.3 Fedme.....	3
1.2 Skjelettmuskulatur	4
1.2.1 Oppbygning og struktur	4
1.2.2 Muskelfibertyper.....	5
1.2.3 Isoformer av myosin-tungkjeder (MHC)	6
1.2.4 Satellittceller	6
1.3 Skjelettmuskulaturens rolle i energimetabolismen	7
1.4 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel	8
1.4.1 Glukosemetabolisme i muskelceller	8
1.4.2 Fettsyremetabolisme i muskelceller	9
1.4.3 Effekt av PPAR δ -agonisten GW501516 på energimetabolisme i skjelettmuskulatur	11
1.4.4 PGC1 α	12
1.5 Proteinmetabolisme	12
1.5.1 Proteinbalanse	13
1.5.2 De forgrenede aminosyrene	13
1.6 Hypertrofi og atrofi i skjelettmuskulatur	14
1.6.1 Effekt av β 2-adrenerg-reseptoragonist terbutalin på muskelhypertrofi.....	15
1.7 Ryggmargsskade	15
1.7.1 Skadenivåer	16
1.7.2 Klassifikasjon av ryggmargsskade	17
1.7.3 Epidemiologi.....	18
1.8 Metabolske forstyrrelser etter ryggmargsskade	19
1.8.1 Muskelatrofi og forandret muskelfibersammensetning.....	19
1.8.2 Forstyrrelse i glukose- og fettsyremetabolismen	20
2 Mål for oppgaven	21
3 Materialer og metoder	22
3.1 Materialer	22
3.1.1 Utstyr.....	22
3.1.2 Kjemikalier og reagenser.....	24
3.2 Cellekarakteristika	26
3.3 Dyrking av satellittceller	27
3.3.1 Cellebank.....	27
3.3.2 Utsåing av celler til forsøk.....	27

3.4 Scintillation proximity assay	29
3.5 Substratoksidasjonsmetoden	32
3.5.1 Substratoksidasjonsforsøk	32
3.5.2 Celleassosiert radioaktivitet.....	35
3.6 Proteinmåling (Bradford)	35
3.7 Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR)	36
3.7.1 Forbehandling og høsting av celler til qPCR-forsøk	36
3.7.2 RNA-isolering etter høsting fra lyserte celler.....	37
3.7.3 Kvantifisering av RNA-konsentrasjon med Spektrofotometer	38
3.7.4 cDNA-syntese	38
3.7.5 qPCR	39
3.8 Westernblotting	40
3.8.1 Utsåing, forbehandling og høsting av celler	40
3.8.2 Prøveopparbeidelse	41
3.8.3 Gelelektroforese	42
3.8.4 Blotting	42
3.8.5 Blokking og primærantistoff	42
3.8.6 Vasking og sekundærantistoff	43
3.8.7 Fremkalling.....	43
3.8.8 Stripping og re-blokkering av membran.....	43
3.9 Statistikk	44
4 Resultater	45
4.1 Energimetabolisme	45
4.1.1 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller ..	45
4.1.2 Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på opptak og oksidasjon av oljesyre.....	48
4.1.3 Effekter av FCCP på oksidasjon av oljesyre.....	49
4.1.4 Effekter av FCCP på oksidasjon av glukose	50
4.1.5 Behandlingseffekter av insulin på oksidasjon og opptak av glukose.....	51
4.2 Effekt av insulin på fosforylering av Akt	52
4.3 Leucinomsetning	53
4.3.1 Sammenligning av basal leucinomsetning mellom skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller.....	54
4.3.2 Effekter av terbutalin på leucinomsetning	54
4.4 Genuttrykk	56
4.4.1 Genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α i skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller.....	56
4.4.2 Behandlingseffekter av terbutalin på genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α	57
5 Diskusjon	59
5.1 Metodologiske betraktninger	59
5.1.1 Humane skjelettmuskelceller i kultur	59
5.1.2 Metodene.....	60
5.2 Diskusjon av resultatene	60
5.2.1 Basal oljesyre- og glukosemetabolisme	60
5.2.2 Basal leucin-omsetning	61
5.2.3 Genuttrykk	62
5.2.4 Effekter av FCCP på oljesyre- og glukosemetabolisme	63
5.2.5 Effekter av GW501516 på oljesyremetabolisme	63
5.2.6 Effekt av insulin på glukosemetabolisme og fosforylering av Akt	64
5.2.7 Effekter av terbutalin på leucinomsetning og genuttrykk	65

5.3 Veien videre	67
6 Konklusjon	68
7 Referanseliste	69
Appendiks	82

1 Introduksjon

1.1 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom defineres av en gruppe risikofaktorer for kardiovaskulære sykdommer og diabetes type 2 (T2D) som oppstår samtidig. Insulinresistens, forhøyet blodglukose, nedsatt glukosetoleranse, overflødig fett deponering, dyslipidemi med forhøyet triglyseridnivå og høyt blodtrykk er faktorer som kjennetegner metabolsk syndrom [1]. I løpet av de siste tiårene har antallet personer med metabolsk syndrom økt kraftig over hele verden. Den verdensomspennende fedme- og diabetesepidemien er assosiert med denne økningen [2]. Fysisk inaktivitet og en usunn livsstil er relatert til metabolsk syndrom, men det kan også være genetisk betinget [1]. Det er foreløpig ingen standardbehandling for syndromet, og derfor behandles hver risikofaktor separat [3]. Behandlingsmålene er å redusere risikoen for kardiovaskulære sykdommer og forhindre utvikling av T2D hos personer med nedsatt glukosetoleranse. Personer med metabolsk syndrom, drar nytte av livsstilsendringer som fremmer økt fysisk aktivitet og vekttap [1].

1.1.1 Diabetes type 2

Diabetes er en gruppe metabolske sykdommer som kjennetegnes av forhøyet blodglukose (hyperglykemi) [4]. Tilstanden er forårsaket av utilstrekkelig insulinproduksjon i bukspyttkjertelen og nedsatt insulinvirkning [5]. Denne metabolske sykdommen fører til langvarig skade og dysfunksjon i ulike organer som øyne, nyrer, hjerte, nerver og blodårer [4].

Diabetes klassifiseres i to ulike typer: diabetes type 1 (T1D) og diabetes type 2. T1D skyldes insulinmangel og er mest vanlig hos barn og ungdom [6]. T2D skyldes svikt i regulering av kroppens glukosehomeostase, som er forårsaket av defekter i β -cellene, økt hepatisk glukoseproduksjon og insulinresistens. For å overleve må blodglukosen i kroppen holdes på et tilstrekkelig nivå. Insulin er et nøkkelhormon for opprettholdelse av stabilt blodglukosenivå [7-8]. Funksjonen til β -celler avtar gradvis etter hvert som tilstanden forverres. β -cellene vil ikke være i stand til å justere for insulinresistensen, noe som resulterer i hyperglykemi og utvikling av T2D [8-9]. T2D utvikler seg normalt over flere år, og prosessen begynner vanligvis med vektøkning og utvikling av insulinresistens [10]. Den kroniske hyperglykemien

er også assosiert med en rekke andre metabolske forstyrrelser, inkludert fedme, dyslipidemi og hypertensjon. Alle disse bidrar til høy forekomst av kardiovaskulær sykkelighet og død [11]. I tillegg kan ukontrollert T2D føre til mikrovaskulære komplikasjoner som diabetes retinopati, nefropati og nevropati [4].

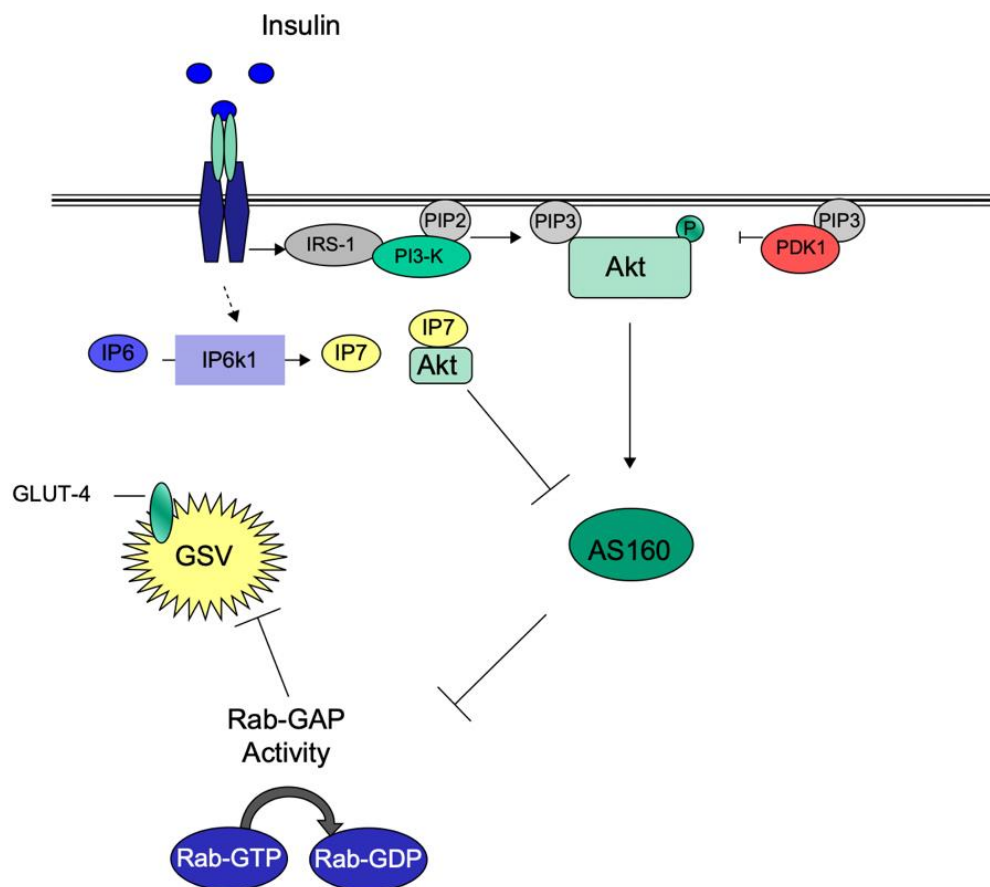
I 2017 ble det anslått at omtrent 451 millioner mennesker i verden i alderen 18-99 år hadde diabetes, og de fleste diabetestilfellene var av type 2 [6]. I Norge er det mellom 316 000 og 345 000 personer som lever med diabetes i dag [12]. Prevalensen av diabetes øker kontinuerlig som et resultat av usunn livsstil med redusert fysisk aktivitet, økt overvekt og insulinresistens [13].

1.1.2 Insulinreseptorsignalveien

Peptidhormonet insulin består av en alfa-kjede (21 aminosyrer) og en beta-kjede (30 aminosyrer) koblet sammen gjennom svovelbroer. Dette hormonet lagres og frigjøres av β -celler i de langerhanske øyer i bukspyttkjertelen. Insulin dannes i utgangspunktet i en inaktiv form (proinsulin), som deretter omdannes til en aktiv form. Insulin spiller en viktig rolle i å opprettholde glukosehomeostase. Frigitt insulin er involvert i en rekke metabolske prosesser som stabiliserer blodglukosenivået i kroppen. Disse inkluderer å øke muskelens evne til å ta opp, lagre og forbrenne glukose, samt leverens evne til å lagre glukose som glykogen [14].

Etter et måltid, når blodglukosenivået stiger, øker produksjon og utskillelse av insulin. Fra blodbanen fraktes insulinmolekylene til kroppens ulike målceller [14]. Gjennom aktivering av insulinreseptorsignalveien åpnes plasmamembranen for glukosetransport inn i cellene. Insulinreseptorsignalveien starter med at insulin binder seg til insulinreseptoren (IR), som forårsaker aktivering av tyrosinkinase som fosforylerer insulinreseptorsubstrat (IRS)-proteiner [15]. Det er seks forskjellige isoformer av IRS (IRS1-6), og i skjelettmuskulaturen er IRS1 den mest utbredte isoformen [16]. Etter at IRS undergår fosforylering, danner de en kompleks med fosfatidylinositol 3-kinase (PI3-K). Dette fører til at PIK3 aktiveres og som videre fosforylerer fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat (PIP2). PIP2 omdannes til fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP3) som aktiverer fosfoinositid-avhengig kinase-1 (PDK1) og fosfoinositid-avhengig kinase-2 (PDK2). PDK1/2 fosforylerer og aktiverer proteinkinase B (Akt/PKB). Fosforylert Akt aktiverer mange proteiner involvert i opptak av glukose, inkludert Akt-substrat på 160 kDa (AS160). Sistnevnte er ansvarlig for translokasjon av glukosetransportør

type 4 (GLUT4) til plasmamembranen og glukosestrømning [15-16]. Figur 1.1 viser insulinreseptorsignalveien.



Figur 1.1: Bildet viser en forenklet oppsummering av insulinreseptorsignalveien. Insulin aktiverer insulinreseptoren, noe som resulterer at GLUT4 translokeres til cellemembranen og glukoseopptaket inn i cellene økes. IRS-1, insulinreseptorsubstrat 1; PI3-K, fosfatidylinositol 3-kinase; PIP2, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat; PIP3, fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat; PDK1, fosfoinositide-avhengig kinase-1; Akt/PKB, proteinkinase B; AS160, Akt-substrat på 160 kDa; GLUT4, glukose transportør 4; GSV, GLUT4-lagrende vesikkel, Rab-GAP, Rab-GTPase-aktiverende protein; Rab-GDP, guanosin-50-difosfat-bundet Rab; Rab-GTP, guanosin-50-trifosfat-bundet Rab. Bildet er hentet fra [17].

1.1.3 Fedme

En kroppsmasseindeks (KMI, kg/m²) på 30 eller høyere defineres som fedme av verdens helseorganisasjon (WHO) [18-19]. Fedme karakteriseres av en uvanlig høy mengde av fett i kroppen som utgjør en helsemessig risiko [19]. Ifølge WHO ble det estimert at mer enn 1,9 milliarder mennesker var overvektige (KMI \geq 25 kg/m²) i 2016, og av disse hadde 650 millioner fedme [18]. Fedme er forårsaket av en rekke faktorer som genetikk og miljøfaktorer. Energiubalanse og høy fettakkumulering er et resultat av et økt kaloriinntak og redusert fysisk aktivitet. Fedme øker også risikoen for å utvikle diabetes, hjerte- og karsykdommer, kreft og

andre kroniske sykdommer [20]. Tilstanden henger sammen med en stor økning i dødelighet, samt en 5-10 års nedgang i forventet levealder [21]. Vekttap reduserer risikoene ved fedme samtidig som det forbedrer livskvaliteten. Dette oppnås ved kostholdsendringer og økt kroppslig bevegelse [19].

1.2 Skjelettmuskulatur

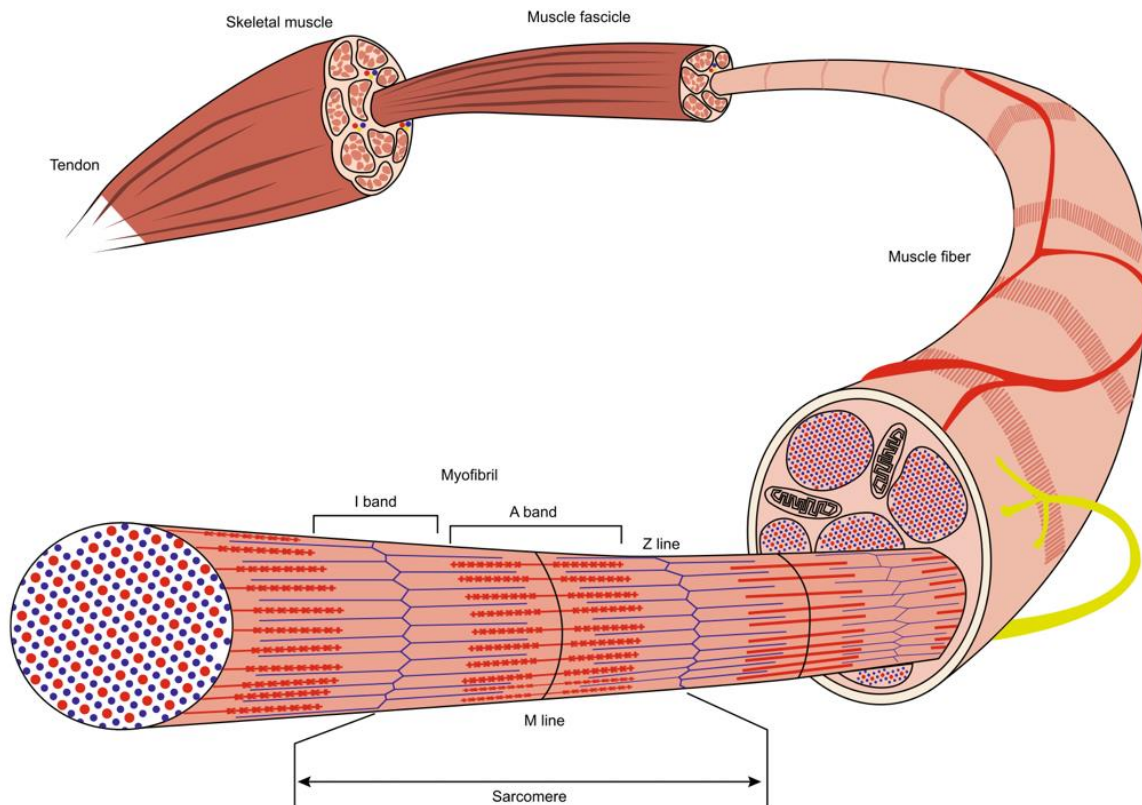
Hos mennesker utgjør muskulaturen ca. 50 % av den totale kroppsvekten, avhengig av faktorer som alder, kjønn, kosthold, genetikk og treningstilstand. Muskler er kontraktile organer som sammen med skjelettet skaper bevegelse og opprettholder stabilitet [22]. Hver muskel er hovedsakelig bygd opp av muskelceller som er spesialiserte på sammentrekning, men består også av bindevev, nerver og blodårer. Muskelvev er delt inn i tre typer basert på forskjeller i egenskaper, utseende og funksjon: hjertemuskulatur, glatt muskulatur og skjelettmuskulatur [23]. Skjelettmuskulatur har størst masse av de tre og er ett av kroppens største organsystem [24]. Skjelettmuskulaturen bidrar til en rekke kroppsfunksjoner. Dens primære oppgaver inkluderer å bevege kroppen, forme kroppens figur og påvirke kroppstillinger, samt støtte og beskytte innvoller, blodårer og nerver, regulere blodstrømmen og kroppstemperaturen, og kontrollere kroppens åpninger [22, 25].

1.2.1 Oppbygning og struktur

Under fosterlivet fusjonerer et stort antall embryonale celler (myoblaster) sammen for å produsere muskelceller (myofiber) med mange kjerner. Hver cellekjerne reflekterer bidraget av en embryonal celle. Disse flerkjernede cellene kalles muskelfibre og er det som utgjør skjelettmuskulaturen [25-26]. Skjelettmuskulaturen er bygd opp av mange parallelle muskelfibre i bunter. En fullt utviklet muskelfiber er noen få centimeter lang og er omtrent 0,01-0,1 mm i diameter. Muskelfibre består av parallelle myofibriller, organisert i et fast mønster av tynne tråder kalt myofilamenter som dannes ved sammenkopling av de kontraktile proteinmolekylene: myosin og aktin. Skjelettmuskelturens karakteristiske tverrstripet struktur er dannet basert på dette mønsteret [22, 25]. Myofilamenter er sammensatt av mange repeterende sarkomerer som er de enhetene i muskelen med minst funksjon.

Myosin og aktin er ansvarlig for skjelettmuskulaturens evne til å kontrahere. Det er et bindingssete for adenosintrifosfat (ATP) på hvert myosinhode. Myosinhodene har ATPase-aktivitet og katalyserer dermed hydrolyse av ATP. I hver syklus gir hydrolyse av ATP

produktene adenosindifosfat (ADP), uorganisk fosfat og energi [25]. Under forbruk av ATP ved muskelkontraksjon forskyves myosinfilamentene og aktinfilamentene i forhold til hverandre [27]. Figur 1.2 viser skjelettmuskulatur oppbygning og struktur.



Figur 1.2: Oppbygning og struktur av tverrstripet muskulatur. Skjelettmuskulatur er satt sammen av muskelbunter med muskelfibre. Muskelfibrene er bygd opp av parallelle myofibriller som består av myofilamenter. Myofilamenter er sammensatt av sarkomerer. Bildet er hentet fra [28].

1.2.2 Muskelfibertyper

På bakgrunn av muskelfibrenes kontraksjonshastighet kan de klassifiseres i to hovedtyper; langsomme type-I fibre og raske type-II fibre [22, 29]. Mengdeforholdet er først og fremst genetisk, men den kan også påvirkes av en persons aktivitetsnivå. Type-I fibre har en langsommere kontraksjonshastighet og er mest utholdende. De er egnet for lengere perioder med arbeid og har lavt energiforbruk. Type-I fibre inneholder proteinet myoglobin, som kan lagre oksygen. I motsetning til type-I fibre kontraherer type-II fibre raskere og er mindre utholdende. Type-II fibre har mindre blodgjennomstrømming og inneholder generelt mindre myoglobin [22, 26]. Muskelfibre er også klassifisert basert på deres ferdigheter i aerob og anaerob ATP-generering; oksidative type-I muskelfibre og glykolytiske type-II muskelfibre. Oksidative type-I fibre produserer ATP hovedsakelig ved oksidativ fosforylering og er rike på

mitokondrier. Glykolytiske type-II fibre inneholder færre mitokondrier og dekker i korte perioder ATP-behovet med glykolyse. Videre er type-II muskelfibre klassifisert i to undertyper; raske oksidative fibre (type-IIa) og raske glykolytiske fibre (type-IIx). Type-IIx har færre antall mitokondrier og oksidative enzymer, og er minst utholdende sammenlignet med type-I og type-IIa fibre. Type-IIx fibre består også av mindre myoglobin, men forskjell i myoglobininnholdet mellom fibertypene er relativ liten hos mennesker [25, 29].

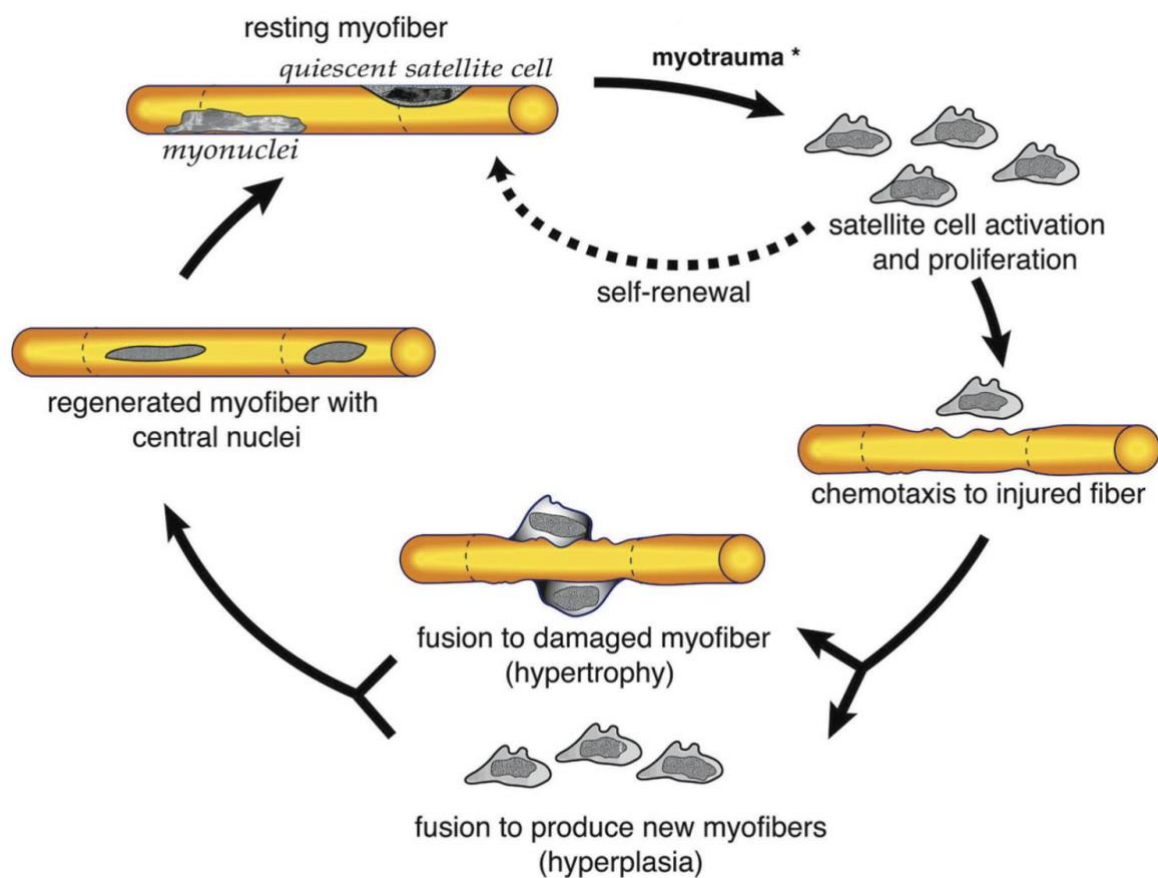
1.2.3 Isoformer av myosin-tungkjeder (MHC)

Muskelfibrenes kontraksjonshastighet bestemmes av myosins ATPase-aktivitet, altså hvor raskt myosin nedbryter ATP. Dette avhenger igjen av hvilket isoformer av myosin tungkjede (MHC) uttrykkes i muskelfiberen. De ulike isoformene av MHC har forskjellig ATPase-aktivitet i myosinhodene [25]. Åtte forskjellige isoformer av MHC er identifisert hos pattedyr [30]. MHCI er klassifisert som langsomme/oksidative type-I muskelfibre (kodet av MYH7-genet), mens raske type-II muskelfibre uttrykker ett eller flere av de seks MHC isoformene. Disse inkluderer embryonale-MHC (kodet av MYH3-genet) og perinatale-MHC (kodet av MYH8-genet), og de raske MHCIIa (kodet av MYH2-genet), MHCIIx/IId (kodet av MYH1-genet) og MHCIIb (kodet av MYH4-genet), samt en unik «rask»-isoform kalt ekstraokulære MHC (kodet av Myh13-genet) [31-32]. De raske embryonale-MHC og perinatale-MHC kommer høyest til uttrykk i skjelettmuskulaturen under fosterlivet, og er viktige for tidlig utvikling av skjelettmuskulatur. Skjelettmuskulaturen hos voksne pattedyr blir hovedsakelig MHCIIa, MHCIIx/IId, MHCIIb og MHCI uttrykket, men mellom arter er uttrykksmønstret forskjellig. I tillegg kan uttrykksmønstret også påvirkes av alder, fysisk aktivitet og sykdom [31].

1.2.4 Satellittceller

Skjelettmuskulaturen inneholder stamceller, kalt satellittceller. Satellittceller er lite differensierte myoblaster lokalisert mellom plasmamembranen og basalmembranen i muskelfibre. De spiller en viktig rolle i utvikling av skjelettmuskulatur, som bidrar til muskelvekst, reparasjon og regenerering av skadete muskelfibre. Myogene faktorer kan aktivere satellittceller til å proliferere og differensiere til nye muskelfibre i skjelettmuskulaturen [25, 33].

Satellittceller aktiveres når muskelfiberen utsettes for traumer eller skader, for eksempel fra overbelastning og overtrening. Etter aktivering vil satellittceller enten gå inn i cellesyklus og dermed øke antall kjerner i muskelfibrene, eller fusjonere med andre satellittceller og danne nye muskelfibre (figur 1.3). Antall satellittceller varierer etter art, alder og muskelfibertype, og ved aldring reduseres antall satellittceller. Det er rapportert at type-I fibre har en satellittcellekonsentrasjon som er fem til seks ganger høyere enn type-II fibre, som følge av økt blod- og kapillærtilførsel [34].



Figur 1.3: I utvikling av skjelettmuskulatur spiller satellittceller en viktig rolle. Disse cellene aktiveres som følge av traumer eller skade på skjelettmuskulaturen. Aktiverte satellittceller kan enten gjennomgå proliferasjon eller returnere tilbake til inaktiv form. Prolifererende myoblaster vil enten sammensmelte med eksisterende myofibriller eller addere flere kjerner til muskelfiberen for regenerering. Bildet er hentet fra [34].

1.3 Skjelettmuskulaturens rolle i energimetabolismen

Skjelettmuskulatur er et av menneskekroppens mest formbare og dynamiske organer. Dette organet spiller en avgjørende rolle i mange kroppsfunksjoner. Mekanisk sett er skjelettmuskulaturens primære oppgave å omdanne kjemisk energi til mekanisk energi for å

produsere muskelkraft og bevegelse, og å opprettholde stabilitet [33]. Metabolsk sett bidrar skjelettmuskulaturen til basal energimetabolisme [33], opprettholdelse av energihomeostase og fungerer som en energikilde under sult [24]. Skjelettmuskulaturen fungerer også som et reservoar for essensielle substrater som aminosyrer og karbohydrater [33]. I tillegg bidrar skjelettmuskelen til oksidasjon av fettsyrer, glukose og aminosyrer, som er avgjørende ved energigenerering og for kroppens substratsykluser [35]. Under faste og vedvarende muskelaktivitet er lipider hovedkilden til energiproduksjon i skjelettmuskulatur, mens under insulinstimulerte forhold (matinntak) er glukose foretrukket som energikilde [36].

1.4 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskulaturen er ansvarlig for energiforbruket i kroppen og har en betydelig rolle i glukose- og fettsyremetabolismen. Muskulaturens intracellulære metabolske maskineri bruker enzymatiske veier for å skape energi fra fettsyrer og glukose, via henholdsvis mitokondriell β -oksidasjon og glykolyse [37].

1.4.1 Glukosemetabolisme i muskelceller

Fra blodet transporteres glukose inn i muskelceller gjennom spesifikke transportproteiner, kalt glukosetransportører (GLUT). I pattedyr er 15 forskjellige isoformer av GLUT identifisert. I voksen skjelettmuskulatur uttrykkes minst fem GLUT-isoformer (GLUT1, 4, 5, 8 og 11), hvor GLUT4 er den viktigste for glukoseopptak i muskelceller [38]. GLUT4 er insulinavhengig transportør, og i fravær av insulin ligger de fleste GLUT4 i membranen til cytosoliske vesikler. Når cellene stimuleres av insulin, fraktes GLUT4 raskt til plasmamembranen ved eksocytose. I den postabsorptive fasen endocytteres GLUT4 tilbake til intracellulære vesikler når plasmainsulinnivået faller. I skjelettmuskelceller stimulerer både insulin og muskelaktivitet translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikler til plasmamembranen [25]. Skjelettmuskulatur står for omtrent 80 % av kroppens totale glukoseopptak etter insulinstimulering [39].

Etter et stort måltid kan glukosen fra maten bli tatt opp og lagret i skjelettmuskelceller i form av polysakkaridet glykogen. Glykogenlagret bygges opp når musklene er inaktive. Under muskelarbeid spaltes glykogen til glukose-1-fosfat og konverteres til glukose-6-fosfat. Glukose-6-fosfat er den fosforylert formen av glukose, og inngår som energikilde for muskelcellenes produksjon av ATP [35].

Nedbrytningen av glukose resulterer i dannelsen av ATP og pyruvat. Denne prosessen kalles for glykolyse og skjer i cellenes cytosol. Glykolysen kan deles inn i to faser. I første fase benyttes to ATP-molekyler for å fosforylere et glukosemolekyl. I andre fase gjendannes ATP fra ADP, kalt substratnivåfosforylering, slik at det produseres fire nye ATP-molekyler for hvert glukosemolekyl. Dermed er netto ATP-produksjon lik to ATP-molekyler. I tillegg til ATP dannes også to NADH-molekyler som følge av reduksjonen av NAD⁺. NADH kan videre brukes i elektrontransportkjeden for å produsere mer ATP. Pyruvat er sluttproduktet fra glykolysen, og det dannes to pyruvatmolekyler for hvert nedbrutt glukosemolekyl. Avhengig av om oksygen er til stede eller ikke, kan pyruvat omdannes til laktat eller acetyl-CoA [40]. Under aerobe forhold transporteres pyruvat fra cytosol inn i mitokondrier for å deretter blir omdannet til acetyl-CoA av pyruvatdehydrogenase-komplekset (PDC). Acetyl-CoA kan videre gå inn i sitronsyresyklusen og oksidere til CO₂ og H₂O (figur 1.4) [41]. Denne reaksjonsveien resulterer i nettoproduksjon av 32 ATP-molekyler. Under anaerobe forhold omdannes pyruvat til laktat. To ATP-molekyler produseres under anaerob respirasjon [42]. Dannelse av laktat fra pyruvat under glykolysen skjer spesielt under anaerobt muskelarbeid [25]. Omdannet laktat transporteres via blodet til leveren og gjennom leverens glukoneogenese regenereres glukosemolekyler (cori-syklusen) [43]. Disse glukosemolekylene kan benyttes av annet vev i kroppen eller brukes om igjen av muskelceller til energiproduksjon [40]. Av glukosen som kommer inn i glykolysen vil ca. 90 % oksideres, mens de gjenstående 10 % vil omdannes til laktat [44].

1.4.2 Fettsyremetabolisme i muskelceller

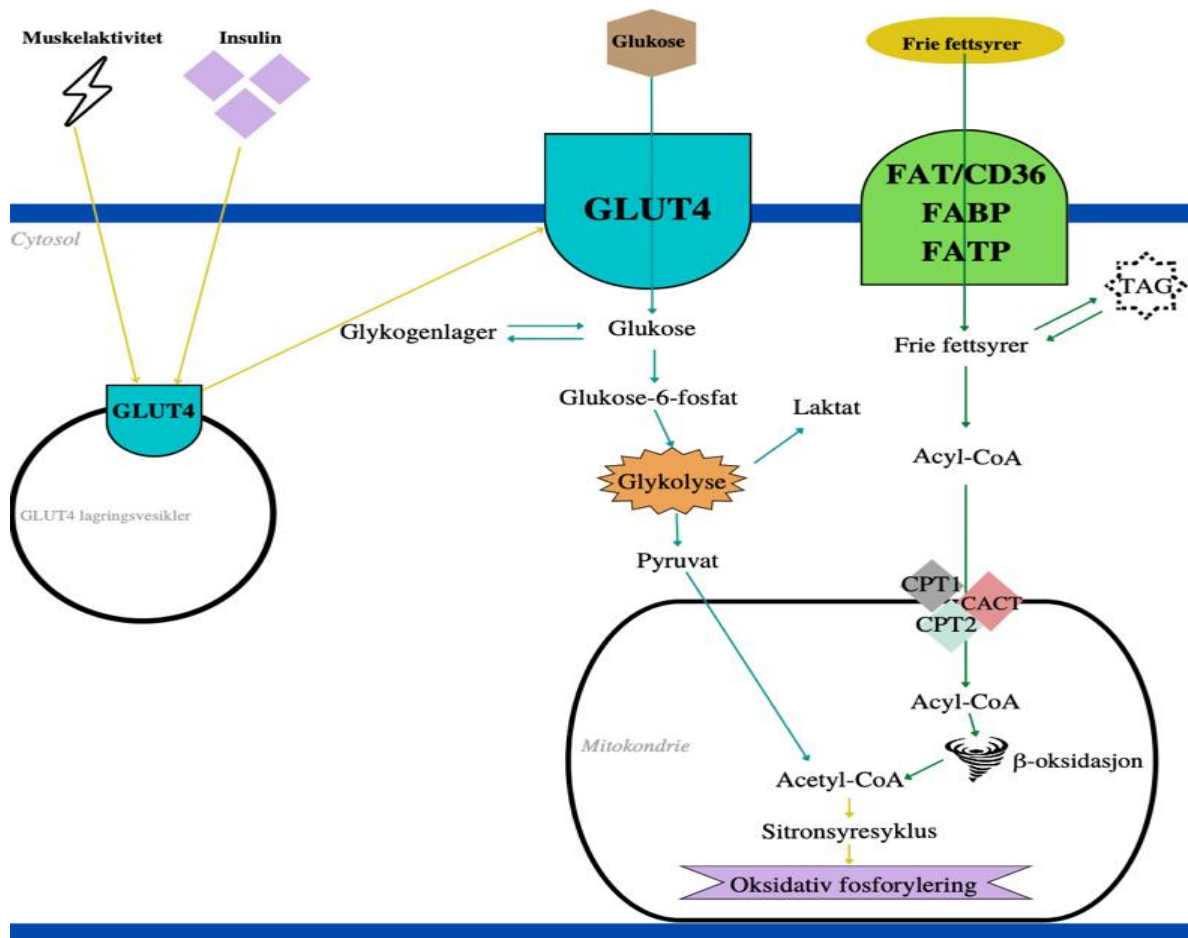
Mobilisert glykogenlager vil kun dekke kroppens normale energibehov i 10-15 timer. Kroppen har imidlertid en stor reserve av energi lagret i form av fett. Fettsyrer er den viktigste energikilden for muskelen under langvarig muskelaktivitet. Økt nedbrytning av kroppens fettlager sikrer tilgangen på fettsyrer. Fra blodet tar muskelceller opp fettsyrer i form av frie fettsyrer (FFA) [25]. I mitokondrier omdannes FFA til energi gjennom en serie av reaksjoner kjent som β -oksidasjon [45].

Fettsyrer lagres i fettvev i form av triglyserider (TAG) som er sammensatt av tre fettsyrer og et glyserolmolekyl. TAG fra kostholdet brytes ned i tarmen til monoglyserider og fettsyrer, som deretter absorberes. I tynntarmceller gjenoppbygges TAG og transporteres til

sirkulasjonen i form av kylomikroner (lipoprotein) gjennom lymfeårenettet. Gjennom kylomikronene fraktes TAG fra tarmen til celler i kroppen, inkludert fettvev. TAG kan også fraktes fra leveren til fettvev, muskler og andre organer av lipoproteinet VLDL. Når celler trenger energi, kan TAG brytes ned til FFA av fettspaltende enzymer (lipaser) og brukes som drivstoff til energiproduksjon. Prosessen der TAG spaltes til FFA kalles lipolyse [46-47].

FFA fraktes fra blodet og inn i muskelceller ved passiv diffusjon eller ved proteinmediert transportmekanisme. De viktigste fettsyretransportører i muskelvev er fettsyretranslokase (FAT/CD36), plasmamembran-fettsyrebindende protein (FABP), og fettsyretransportprotein (FATP) [48-49]. Insulin og muskelkontraksjon øker FFA-opptaket via FAT/CD36-translokasjon fra cytoplasma til plasmamembranen. I tillegg er det rapportert at høyfettdiett oppregulerer uttrykket av CD36 mRNA, noe som øker fettsyreopptaket i celler. FATP-familien (FATP1-6) er vevsspesifikke, og i skjelettmuskulatur dominerer FATP1, FATP4- og FATP6-variantene. Muskelkontraksjon har vist seg å øke FATP4 i sarcolemma, mens insulinstimulering induserer translokasjon av FATP1 og FATP4 til T-tubuli, noe som øker fettsyreopptaket [37].

Når FFA kommer inn i muskelceller, har de forskjellige skjebner avhengig av cellenes energietterspørsel og lipidtilgjengeligheten. FFA vil enten forestres til TAG i endoplasmatisk retikulum eller transporteres inn i mitokondriene for β -oksidasjon [37, 50]. For at langkjedede fettsyrer skal passere gjennom den indre membranen i mitokondriene, må de reagere med karnitin, som ligger i den ytre membranen av mitokondriene. Lange fettsyrer omdannes først til acyl-CoA av en acyl-CoA-syntetase. Deretter, av enzymet karnitin-palmityltransferase-I (CPT-I) omdannes acyl-CoA-estere til acylkarnitin. Karnitin-acylkarnitin-translokase-enzymet (CACT) transporterer acylkarnitin inn i den indre mitokondriemembran, hvor det omdannes tilbake til acyl-CoA av karnitin-palmityltransferase-II (CPT-II). Middels lange og korte fettsyrer transporteres inn i mitokondriene uten hjelp av karnitin. I mitokondriene vil acyl-CoA β -oksideres til acetyl-CoA [45]. I hver syklus forkortes to karbonatomer i fettsyrekjeden for å danne ett acetyl-CoA-molekyl, ett NADH- molekyl og ett FADH₂-molekyl. Videre kan acetyl-CoA-molekylet som dannes gå inn i sitronsyresyklusen, hvor de gjenværende karbonatomene i acetyldelen av molekylet oksideres og omdannes til CO₂ [46]. Figur 1.4 viser en oversikt over skjelettmuskulaturens fettsyre- og glukosemetabolisme.



Figur 1.4: En forenklet oversikt over fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskulatur. Glukose og fettsyrer blir tatt opp gjennom spesifikke transportmekanismer i muskelceller og omdannes til forbindelser som kan brukes som drivstoff til energiproduksjon. Energien dannes gjennom glykolyse, beta-oksidasjon og oksidativ fosforylering. GLUT4, glukosetransportør 4; FAT/CD36, fettsyretranslokase; FABP, plasmamembran fettsyrebindende protein; FATP, fettsyre transport protein; TAG, triglyserider; CoA, koenzym A; CPT1, karnitin-palmityltransferase-I; CPT2, karnitin-palmityltransferase-II; CACT, karnitin-acylkarnitin-translokase. Figuren er modifisert fra [25] og [51].

1.4.3 Effekt av PPAR δ -agonisten GW501516 på energimetabolisme i skjelettmuskulatur

I skjelettmuskulatur har peroksisomproliferatoraktiverte reseptorer (PPAR) en betydelig rolle i reguleringen av metabolisme, noe som er nødvendig for muskelaktivitet. PPAR tilhører kjernereseptorsuperfamilien som reguleres av ligandbinding. PPAR α , PPAR γ og PPAR δ er tre ulike isoformer av PPAR [52].

I skjelettmuskulatur uttrykkes hovedsakelig PPAR δ -isoformen, og PPAR δ uttrykkes mer i type-I muskelfibre enn i type-II [52-53]. PPAR δ kontrollerer gener som koder for proteiner involvert i fettsyreopptak og mitokondriell β -oksidasjon, som FAT/CD36, CPT1 og

lipoprotein lipase [52]. Det er rapportert at aktivering av PPAR δ i muskelceller endrer fibersammensetningen og øker antall type-I muskelfibre [52-53]. Videre har aktivering av PPAR δ vist å øke fetttsyreopptak og mitokondriell β -oksidasjon i muskelceller [54]. I tillegg, under faste, aktiveres PPAR δ når fetttsyrekonsentrasjonen i blodet øker, noe som endrer metabolismen for å bevare glukose og fremme fetttsyreoksidasjonen [55]. PPAR δ -agonisten GW501516 har vist å oppregulere gener involvert i fetttsyremetabolisme og energiforbruk, og forbedrer β -oksidasjon av fettstoffer i skjelettmuskulaturen. PPAR δ spiller dermed en sentral rolle for forbygning av fedme og T2D [56].

1.4.4 PGC1 α

PPAR γ -koaktivator-1 α (PGC1 α) ble først oppdaget i brunt fettvev som en PPAR γ -koaktivator under termogen respons på kulde [57]. PGC1 α binder til og aktiverer mange transkripsjonsfaktorer i kroppen, inkludert PPAR, glukokortikoid-reseptorer, lever X-reseptorer, østrogenreseptorer og retinoid X-reseptorer. Den aktiverer også transkripsjonsfaktorer som ikke krever ligandbinding for å bli aktivert, slik som gallsyrereseptorer og østrogenrelatert reseptor- α [58].

PPAR γ -koaktivator-1 α (PGC1 α) er en viktig nøkkelregulator for energimetabolisme og spiller en sentral rolle i flere biologiske prosesser. Disse inkluderer mitokondriell biogenese og mitokondriefunksjon, adaptiv termogenese, og regulering av fibertype som fremmer en mer oksidativ muskelfibertypesammensetning i skjelettmuskulaturen. I tillegg deltar den både i glukose- og lipidmetabolisme [59]. Muskelvev har høye nivåer av PGC1 α -uttrykk, spesielt i langsomme/oksidative type-I fibre. Talrike studier har rapportert at fysisk aktivitet fremmer en rask økning i PGC1 α -mRNA- og proteinnivåer i skjelettmuskulaturen [60]. Det er også vist at kontinuerlig fysisk aktivitet øker uttrykket av PGC1 α i skjelettmuskulatur hos mennesker [61].

1.5 Proteinmetabolisme

I fordøyelsessystemet nedbrytes proteiner i maten til aminosyrer, som deretter absorberes av tarmen [62]. Fra tarmen tar leverceller opp en stor del av aminosyrene, og gjennom deaminering kan de bli omdannet til ketosyrer (=CO) ved avspaltning av aminogruppen (-NH₂). Ketosyrer brukes som energikilde av leverceller. Imidlertid brukes mesteparten av de til fetttsyresyntese og omdannes til triglyserider, som skilles ut av leveren i form av

lipoproteinmolekyler. Noen av de avspalte aminogruppene under deaminering, inngår i dannelsen av ikke-essensielle aminosyrer fra ketosyrer i leveren. Denne prosessen kalles for transaminering [25].

Aminosyrer kan også brukes som energikilde til ATP-produksjon. Når kroppen mottar større mengde aminosyrer enn det som kreves for å erstatte det kontinuerlige proteintapet i cellene, vil overskuddet deamineres. Ketosyrene som produseres under deamineringen, blir deretter brukt som energikilde, omdannet til glukose og glykogen, eller inkorporert i fettsyntesen. I perioder med sult, når glykogenlagrene i muskulaturen er oppbrukt, blir aminosyrene som produseres ved nedbrytning av kroppens egne proteiner den viktigste kilden til dannelsen av glukose. De fleste av kroppens proteiner finnes i skjelettmuskulaturen, og muskelproteiner utgjør en stor del av aminosyrene som brukes til produksjon av glukose (glukoneogenese) i leveren [25].

1.5.1 Proteinbalanse

Proteinomsetning refererer til kontinuerlig degradering og fornyelse av eldre proteiner til nysyntetiserte kopier [63]. Denne omsetningsmekanismen er hurtig og sikrer en jevn tilførsel av nye og fungerende proteiner samtidig som den ødelegger ikke-funksjonelle eller skadede proteiner [64]. Proteinomsetning koster energi, og det er estimert å utgjøre ca. 20 % av energiforbruket i hvile [65]. Skjelettmuskulatur spiller en sentral rolle i kroppens omsetning av proteiner og fungerer som kroppens viktigste reservoar av aminosyrer [66].

Muskelproteinomsetningen hos funksjonsfriske personer er i gjennomsnitt rundt 1,2 % per dag og er i dynamisk likevekt [67]. I den postabsorptive tilstanden er vev og organer som huden, lever, hjernen og hjerte avhengige av jevnlig tilførsel av aminosyrer gjennom sirkulasjonen for å opprettholde balansen mellom proteinsyntese- og nedbrytning. I fastende tilstand er muskelproteiner det viktigste reservoaret for erstatning av aminosyrer som tas opp av disse essensielle organene [66].

1.5.2 De forgrenede aminosyrene

Leucin, isoleucin og valin, kalt de forgrenede aminosyrene (BCAA), er tre av de ni essensielle aminosyrene hos mennesker. BCAA er kjent for å oksideres i skjelettmuskulaturen og fremmer muskelvekst under trening [68]. BCAA er essensielle aminosyrer som må tilføres via kostholdet og ca. 80 % av BCAA befinner seg i muskelmassen [69]. De er viktige for

oppbygning av muskler og har en sentral rolle i kroppens energimetabolisme sammenlignet med andre aminosyrer. Valin, isoleucin og spesielt leucin har alle anabole effekter som fremmer vekst av muskelmasse. Leucin er spesielt interessant fordi det øker insulinfrigjøringen, forhindrer proteinnedbrytning og oppregulerer proteinsyntese i skjelettmuskulatur [70].

1.6 Hypertrofi og atrofi i skjelettmuskulatur

Den dynamiske balansen mellom syntese og nedbrytning av muskelproteiner er avgjørende for å opprettholde frisk og velfungerende skjelettmuskelvev [67]. Skjelettmuskelmasse og fiberstørrelse reflekteres først og fremst av balansen mellom proteinsyntese og proteinnedbrytning i muskelfibre [71]. Muskelhypertrofi og muskelatrofi er to forskjellige tilstander som kan oppstå i skjelettmuskulatur som hovedsakelig skyldes forstyrrelser i proteinbalansen [72]. Når likevekten favoriserer syntese fremfor nedbrytning av proteiner, betyr det en positiv proteinbalanse. Over tid vil positiv proteinbalanse i skjelettmuskulatur øke muskelmassen og gi muskelvekst (muskelhypertrofi). I motsetning, hvis proteinnedbrytningen i skjelettmuskulaturen overstiger syntesen, er det en negativ proteinbalanse. Negativ proteinbalanse vil over tid føre til tap av muskelmasse (muskelatrofi) [71]. Det er en rekke årsaker til muskelatrofi, inkludert denerverte tilstander, immobilitet og nevromuskulære sykdommer. I tillegg kan muskelatrofi oppstå som følge av alvorlige ulykker eller vanlige helseproblemer, som aldring, systemiske sykdommer og ryggmargsskade. Faktorer som underernæring og redusert fysisk aktivitet forverrer tilstanden [70].

Skjelettmuskelatrofi har vist seg å endre muskelmorfologien, noe som gjenspeiles i symptomer som tap av muskelmasse, redusert muskelfiberdiameter og en reduksjon i det totale antallet muskelfibre [72]. Videre kan muskelatrofi føre til endringer i muskelfibertypesammensetningen, hvor oksidative type-I fibre går over til glykolytiske type-II fibre [73]. Det er også rapportert at muskelatrofi gir alvorlige effekter for kontraktile funksjon og treningskapasitet, samt reduserer livskvalitet og forventet levealder [74]. Muskelatrofi reduserer energiforbruket (fedme), reduserer blodglukoseopptaket i skjelettmuskelvevet og øker blodglukosekonsentrasjonen (diabetes) [75].

1.6.1 Effekt av β 2-adrenerg-reseptoragonist terbutalin på muskelhypertrofi

Adrenerge β 2-reseptoragonister er en gruppe legemidler som har bronkodilatorisk effekt. De stimulerer β 2-reseptorer som befinner seg i den glatte muskulaturen rundt luftveiene. Når β 2-reseptorer aktiveres, utvider luftveiene seg og det blir lettere å puste. β 2-reseptoragonister er derfor viktig for behandling av astma og kronisk obstruktiv lungesykdom (kols) [76].

Bruk av β 2-reseptoragonister som mulige terapeutiske legemidler for behandling av fedme samt inaktivitets- og aldersrelatert muskelatrofi har blitt foreslått [77]. De har vist å ha anabol effekter som kan fremme muskelhypertrofi og forhindre muskelatrofi [78]. Dette kan videre bidra til å opprettholde og forbedre hvilemetabolisme [77]. I en tidligere studie ble daglig inhalasjon av terbutalin, en selektiv korttidsvirkende β 2-reseptoragonist, vist å øke muskelmassen hos både fysisk aktive og inaktive mennesker [77].

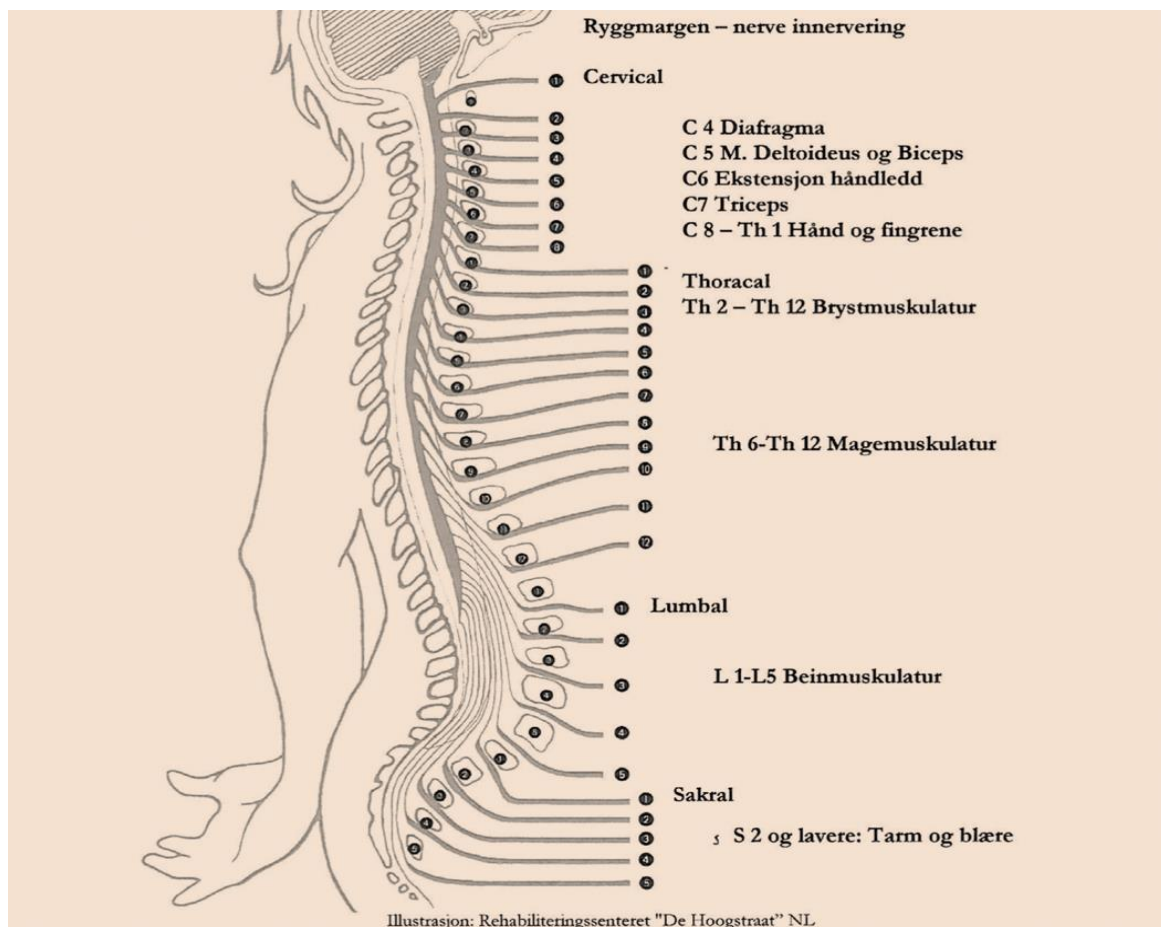
1.7 Ryggmargsskade

En ryggmargsskade (spinal cord injury, SCI) er relativt sjelden, men har alvorlige konsekvenser som påvirker alle aspekter av livet til den skadde pasienten. Skaden endrer pasientens fysiske tilstand, psykisk helse og sosialt velvære.

Ryggmargen består av nervefibre og nerveceller som strekker seg fra hjernen til nedre del av korsryggen. Hjernen, indre organer, muskler og hud kobles sammen gjennom ryggmargen. Den er omtrent på tykkelse av en lillefinger, omtrent 45 cm lang, og er godt skjernet mot omkringliggende vev og spinalvæske [79-80]. Ryggmargen er en del av sentralnervesystemet og er ansvarlig for transport og regulering av en rekke signaler mellom hjernen og kroppen. Disse inkluderer signaler fra det viljestyrte (somatiske) nervesystemet involvert i motoriske og sensoriske prosesser, samt mange funksjoner kontrollert av det ikke viljestyrte (autonome) nervesystemet [80-81].

Fra ryggmargen utgår 31 par ryggmargsnervener som inneholder både sensoriske og motoriske fibre. Ryggmargen er delt inn i ryggmargssegmenter. For å sikre nervetilførsel til musklene og huden i tilsvarende kroppssegment, er hvert par ryggmargsnervener koblet til et eget separat ryggmargssegment. Avhengig av hvilken del av ryggmargen de kommer inn i eller går ut fra, klassifiseres de forskjellige ryggmargsnervene i følgende nivåer: åtte nervepar i halsdelen (cervikaldelen) (C 1-8), tolv nervepar i brystdelen (toraksdelen) (Th 1-12), fem nervepar i

lendedelen (lumbaldelen) (L 1–5), fem par korsnerver (sakraldelen) (S 1–5), og ett nervepar i halebeinet (Co1) [82]. Se figur 1.5.



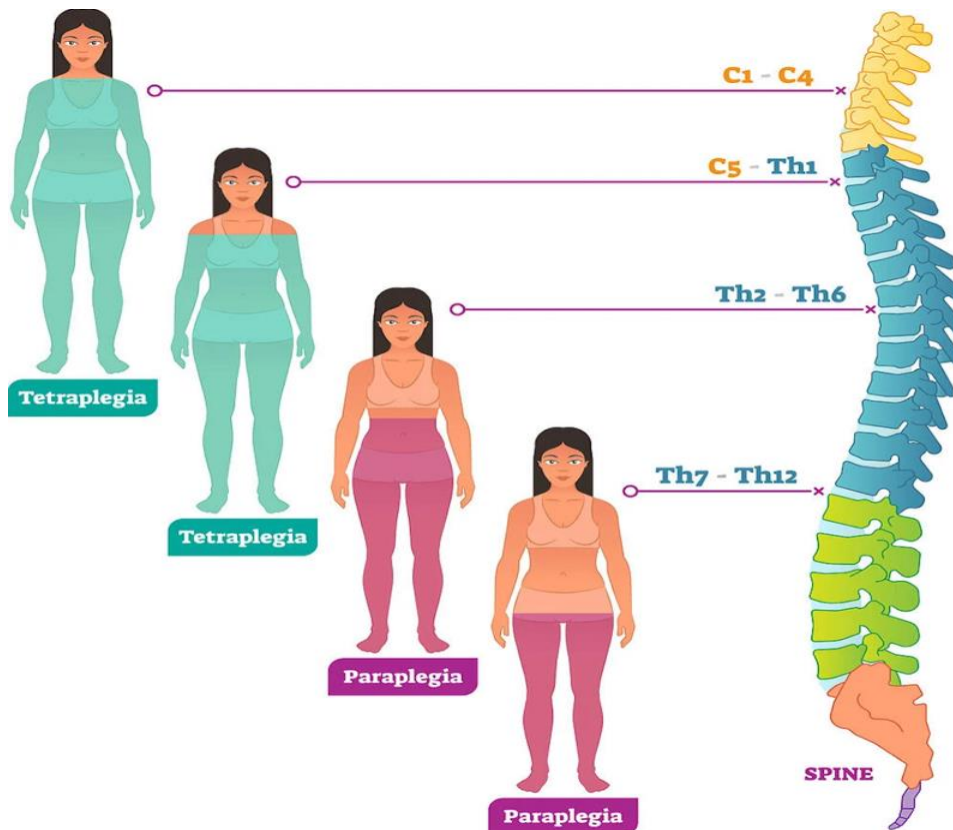
Figur 1.5: Ryggmargssegmenter og ryggmargsnerver. Bilder er hentet fra [83].

Skade av ryggmargen forstyrrer eller ødelegger nerveforbindelser mellom sentralnervesystemet over skadestedet og ryggmargen under skadestedet [83]. Skaden kan oppstå på alle nivåer av ryggraden, og omfanget av skaden avgjør hvordan kroppsfunksjoner påvirkes eller går tapt. Jo høyere skadenivået er, desto flere muskler og kroppsfunksjoner påvirkes. Som regel fører en skade på ryggmargen til lammelser og tap av følelse under skadenivået, med svekket blære-, tarm- og seksuell funksjon [84].

1.7.1 Skadenivåer

Ved tetraplegi oppstår skaden i nakkenivå og fører til varig lammelse og manglende følelse i armer og ben [83, 85-86]. Deler av respirasjonsmuskulaturen vil lammes ved tetraplegi. Pasienter med tetraplegi har redusert sensibilitet under skadestedet, og det er stor sannsynlighet for dannelse av trykksår. I tillegg er det autonome nervesystemet i ubalanse, og

pasienter vil ha nedsatt evne til å kontrollere kroppstemperaturen og redusert sirkulasjonsregulering [87]. Ved paraplegi oppstår skaden nedenfor nakkenivå og fører til lammelser av bena, mens armfunksjonen er normal. Felles for tetraplegi og paraplegi er at skaden medfører svekkelser i blære, tarm- og seksuell funksjon [83, 85, 87]. Figur 1.6 viser forskjellen mellom tetraplegi og paraplegi.



Figur 1.6: Bildet illustrerer forskjellen mellom paraplegi (lilla) og tetraplegi (blå). Fargede områder indikerer kroppsområder med tap av motorisk og/eller sensorisk funksjon. Bildet er hentet fra [88].

1.7.2 Klassifikasjon av ryggmargsskade

SCI kan klassifiseres som traumatisk eller atraumatisk. En traumatisk SCI skjer som følge av et ytre traume som ødelegger ryggmargen direkte eller indirekte. I Norge er fall og bilulykker de viktigste årsakene til traumatiske skader. En atraumatisk SCI er en ikke-progressiv skade av ryggmargen, som forårsakes av en infeksjon, blødning, svulst, betennelse, slitasje eller aldring. I tillegg kan en atraumatisk SCI være medfødt eller skyldes ulike typer kirurgiske eller medisinske behandlinger [83, 85].

Graden av en SCI har en betydelig innvirkning på hvor godt en person kommer seg etter skaden. Et internasjonalt klassifiseringssystem kalt «ASIA (American Spinal Injury

Association) Impairment Scale» brukes for å vurdere alvorlighetsnivået og omfanget av SCI (AIS-score). Generelt klassifiseres AIS i fem klasser fra A til E (tabell 1.1). AIS-A betegnes som fullstendig tap av sensoriske og motoriske funksjoner nedenfor skadeområdet. AIS-B betraktes som ufullstendig skade, hvor sensoriske funksjoner er bevart, men ingen motoriske funksjoner nedenfor skadeområdet. AIS-C og AIS-D innebærer også ufullstendig skade med bevart sensoriske og motoriske funksjoner nedenfor skadeområdet. Ved AIS-E vil skaden på ryggmargen forårsake ubetydelige nevrologiske svekkelser [83, 89-90].

Tabell 1.1: «ASIA (American Spinal Injury Association) impairment scale» er et AIS-klassifiseringssystem som kategoriserer alvorlighetsgraden av en ryggmargsskade i fem kategorier.

«ASIA (American Spinal Injury Association) impairment scale» AIS klassifiseringssystem	
<i>AIS-A (Fullstendig)</i>	Ingen sensoriske eller motoriske funksjoner
<i>AIS-B (Ufullstendig)</i>	Sensoriske funksjoner bevares, men ingen motoriske funksjoner under skadeområdet.
<i>AIS-C (Ufullstendig)</i>	Sensoriske og motoriske funksjoner er bevart under skadenivået, men muskelen er svake.
<i>AIS-D (Ufullstendig)</i>	Sensoriske og motoriske funksjoner bevares nedenfor skadeområdet som resulterer i praktiske nyttige funksjoner
<i>AIS-E (normal)</i>	Normale sensoriske og motoriske funksjoner

SCI endrer betydelig ens kapasitet og mulighet til å delta i fysisk aktivitet, men i denne sammenhengen er skadenes omfang og alvorlighetsgrad avgjørende. Pasienter med fullstendig tetraplegi, hvor også respirasjonssenteret er påvirket, kan bli permanent respiratoravhengige og dermed fysisk inaktive. Pasienter med ufullstendig skade kan imidlertid fortsatte å bruke skjelettmuskulaturen normalt og er begrenset av deres manglende evne til å håndtere naturlige funksjoner [86].

1.7.3 Epidemiologi

Ifølge WHO får mellom 250 000 og 500 000 personer en SCI hvert år. Traumatiske ryggmargsskader utgjør opptil 90 % av alle tilfellene, men andelen atraumatiske ryggmargsskader er økende. De fleste ryggmargsskader er forårsaket av trafikkulykker, fall

eller vold [85]. I Norge er forekomsten av traumatiske skader 10-20 per million innbyggere per år, som tilsvarer 50-100 nye tilfeller årlig. I tillegg får omtrent samme antall personer atraumatiske skader hvert år [91].

1.8 Metabolske forstyrrelser etter ryggmargsskade

Over tid endrer en ryggmargsskade oppbygning og metabolisme i kroppen. Spesielt forandres skjelettmuskulaturens metabolske egenskaper og sammensetning. Pasienter med SCI har redusert forventet levealder sammenlignet med den funksjonsfriske befolkningen [92], men forventet levealder etter SCI har økt drastisk de siste tiårene [93]. I Norge har denne pasientgruppen imidlertid vist seg å ha høyere dødelighet, blant annet av lungebetennelse (16 %) og urogenitale lidelser (13 %), samt har de større sjanse for å utvikle sekundære helsetilstander som hjerte- og karsykdommer, T2D, fedme og osteoporose [93-94].

Redusert muskelmasse [95], forstyrrelser i fettsyre- og glukosemetabolismen og økt kroppsfett er resultater av metabolske endringer forårsaket av SCI og den påfølgende fysiske inaktiviteten forbundet med tap av motorisk funksjon [86, 93, 96]. Energiforbruket etter SCI er redusert [98-99], og basal metabolisme kan være 50 % lavere sammenlignet med funksjonsfriske personer [93, 99]. Det er mange faktorer som bidrar til økt metabolsk risiko etter SCI, inkludert endret kroppssammensetning med tap av mager masse (spesielt skjelettmuskulatur), redusert fysisk aktivitet og økt energiinntak i forhold til behov [97, 100].

1.8.1 Muskelatrofi og forandret muskelfibersammensetning

Et vanlig symptom på SCI er muskelatrofi, som videre kan svekke metabolismen i kroppen og øke risikoen for metabolske sykdommer [101]. Graden av muskelatrofi bestemmes av om SCI påvirker de nedadgående nervebanene i ryggmargen (sentral skade) eller motoriske hornceller (perifer skade). Perifer skade skaper betydelig muskelatrofi, som sees i skadeområdet der de medfølgende motoriske nevronene blir ødelagt. Muskelvev med normal nervetilførsel er på den annen side ofte hypertrofiske som følge av økt bruk etter skaden [93].

I funksjonsfrisk muskulatur er de ulike fibertypene fordelt likt [93]. Hos pasienter med SCI vil fibersammensetningen forandres etter det første skadeåret. Muskelfibersammensetningen endres mer mot glykolytiske fibre. Selv om det molekylære årsaken for disse endringene er ukjent, reflekterer fibersammensetningen en høyere glykolytisk fenotype [95].

Det foreløpig ingen standardbehandling for muskelatrofi under skadenivået etter en SCI. Vektavlastende tredemølltrening etter ufullstendige skade og bensykling med funksjonell elektrisk stimulering etter fullstendig skade er påvist å resultere i en «normalisering» av muskelmasse og muskelfibersammensetning [93].

1.8.2 Forstyrrelse i glukose- og fettsyremetabolismen

Pasienter med SCI har en økt risiko for å utvikle T2D og kardiovaskulære sykdommer [102]. Skjelettmuskulaturen, som er et svært metabolsk aktivt organ, hjelper til med regulering av glukose- og fettsyremetabolisme i kroppen. Skjelettmuskulatur står for størstedelen av perifert glukoseopptak. Dermed vil tap av skjelettmuskulaturens evne til å ta inn og lagre glukose være det første skrittet mot utvikling av metabolske sykdommer [103-104].

Den metabolske profilen hos denne pasientgruppen er preget av forhøyet blodglukose, insulinresistens og hyperlipidemi [94]. Pasienter med SCI har større sannsynlighet for å ha nedsatt glukosetoleranse, hyperinsulinemi, T2D [86, 93, 106] og en ugunstig blodlipidprofil (lavt HDL-kolesterol og høyt LDL-kolesterol) sammenlignet med funksjonsfriske [93, 107]. Sammenlignet med funksjonsfriske individer har SCI-pasienter med normal KMI ofte mer kroppsfett og mindre bein- og muskelmasse. Tap av muskelmasse kan medføre til et dårligere insulinstimulert glukoseopptak i kroppen. Dette gir høyere insulin- og blodglukosenivåer, som dermed kan gi hyperinsulinemi [93]. I tillegg øker forhøyede triglyserider og LDL-kolesterol insulinproduksjonen. Dette resulterer i økt fettdeponering og på et senere tidspunkt metabolske sykdommer [93]. De observerte metabolske endringene stemmer overens med funn fra beskrivende epidemiologiske studier som viser høy prevalens av fedme, insulinresistens, T2D og koronararteriesykdom hos pasienter med langvarig SCI [86].

2 Mål for oppgaven

Som det største organet i kroppen er skjelettmuskulatur en betydelig forbruker av energi ved hvile, men særlig ved økt og intens fysisk aktivitet. Hos personer med SCI er fysisk aktivitet ikke aktuelt eller vanskelig å gjennomføre. Denne pasientgruppen har lavere basalmetabolisme, redusert energiforbruk og økt metabolsk risiko sammenlignet med den funksjonsfriske befolkningen. I tillegg har SCI-pasienter redusert forventet levealder, delvis som følge av sekundære helsetilstander som fedme, diabetes type 2 og kardiovaskulære sykdommer. Hovedmålet med denne oppgaven er å studere om metabolske endringer forekommer i skjelettmuskelceller hentet fra SCI-pasienter, fra biopsier tatt 1 måned og 12 måneder etter skade, sammenlignet med muskelceller fra funksjonsfriske kontroller.

Følgende problemstillinger ble studert i denne oppgaven

- Undersøke skjelettmuskelcellenes evne til å oksidere fettsyrer og glukose i skjelettmuskelceller fra 1 mnd og 12 mnd etter SCI og fra funksjonsfriske kontroller, i nærvær og fravær av PPAR δ -agonisten GW501516 og den mitokondrielle frikobleren FCCP
- Undersøke sanntidsakkumulering og degradering av leucin (mål for proteinsyntese og -nedbrytning) samt effekter av terbutalin i skjelettmuskelceller fra 1 mnd og 12 mnd etter SCI og fra funksjonsfriske kontroller
- Undersøke effekten av insulin på glukosemetabolisme og fosforylering av Akt i skjelettmuskelceller fra 1 mnd og 12 mnd etter SCI og fra funksjonsfriske kontroller
- Undersøke genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α i skjelettmuskelceller fra 1 mnd og 12 mnd etter SCI og fra funksjonsfriske kontroller, i nærvær og fravær av PPAR δ -agonisten GW50151 og terbutalin

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Utstyr

Tabell 3.1: Liste over utstyr som ble benyttet ved gjennomføring av denne oppgaven

Produsent	Utstyr
Applied Biosystems™ (Foster City, California, USA)	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate
	MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
	StepOnePlus™ Real-Time PCR System
	2720 Thermal Cycler
	Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer nitrocellulose (membran)
BioRad (København, Danmark)	Trans-Blot® Turbo™ Mini-size Transfer nitrocellulose (membran) Steaks
	Bio-Rad Powerpac™ HC
Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, USA)	Chemidoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software
	4-20 % Mini-Protean® TGX™ Precast Protein Gels
	V-1 Plus, Personal Vortex
Biosan (Riga, Latvia)	96-brønners Corning® CellBind® Surface brett med lokk
Corning® (New York, USA)	6-well Corning® CellBIND® tissue culture plates
	50 ml Centrifuge Tube, CentriStar™ Cap
	15 ml Centrifuge Tube, CentriStar™ Cap
	Pipetter
Costar® (Kennebunk, Maine, USA)	Safe-Lock Tubes, 1,5 ml
Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland)	Esco CelCulture®, CO ₂ Incubator
Esco Micro Pte. Ltd. (Singapore)	GraphPad Prism version 9.3.1

GraphPad Software (San Diego, California, USA)	Trappestativ, metallplate, silikonmembran og metallskruer
Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)	FIREBOY™ Safety Bunsen Burner
Integra LifeSciences (Plainsboro Township, New Jersey, USA)	Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010
Kubota Corporation (Osaka, Japan)	Digital Dry Bath
Labnet International Inc. (Edison, New Jersey, USA)	Olympus CKX41 microscope med digitalkamera
Olympus (Tokyo, Japan)	Isoplate™-96
PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)	MicroBeta2 2450 Microplate Counter
	Packard Tri-Carb™ Liquid Scintillation Counter 1900 TR
	TopSeal®-A gjennomsiktig film
	Unifilter®- 96 GF/B
	Wallac Victor™ X4 Multilabel Plate Reader
	96-brønners Scintiplate®-96 TC
QIAGEN (Hilden, Tyskland)	Pipettespisser
	RNeasy® Plus Mini Kit
Sarstedt AG & Co. (Nürnberg, Tyskland)	The Belly Dancer®
Stovall Life Science Inc. (Dubuque, IA, USA)	Heraeus™ Fresco™ 21 Centrifuge
Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	Heraeus™ Megafuge™ 16R Centrifuge
	MicroAmp™, 8 tube strip
	MicroAmp™ Fast optical 96-well reaction plate
	MicroAmp™ Optical Adhesive Film
	Nunc™ MicroWell™ 96-brønners microplate
	Nanodrop™ Lite-spektrometer
	Applied Biosystems™ Dynabeads™ MX 12-tube Mixing Wheel

TPP [®] /MIDSCI [®] (St. Louis, Missouri, USA)	Easyflask Nunclon 25 cm ²
VWR [®] International (Radnor, Pennsylvania, USA)	Eppendorf [®] Safe-Lock rør 1,5 ml
	Reagent reservoirs
	Disposable Pasteur pipettes, 230 mm

3.1.2 Kjemikalier og reagenser

Tabell 3.2: Liste over kjemikalier og reagenser som ble benyttet ved gjennomføring av denne oppgaven

Produsent	Kjemikalium/reagens
Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, Texas, USA)	Agilent Total RNA Isolation Mini Kit
	Nuclease-free H ₂ O, 25 ml
Applied Biosystems (Foster City, California, USA)	Power-SYBR [®] Green PCR Master Mix
	Taqman Reverse Transcription Reagents-kit
BioRad (København, Danmark)	Bio-Rad Precision Plus Protein [™] Dual Color Standards
	Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate
	Bromfenylblått
	Clarity [™] Western ECL substrates
	SDS
	Tris/glycine/SDS-buffer
	Tween 20
Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, USA)	Anti-Rabbit Antibody Conjugated to Horseradish Peroxidase
	SDS
	Trypan Blue Solution, 0,4 %
Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)	Monoklonalt antistoff pakt og total Akt
Gibco [®] Invitrogen [™] (Gibco, Life Technologies) (Paisley, Storbritannia)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS uten Mg ²⁺ og Ca ²⁺)

	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) med Glutamax™ (D-Glucose 5,5 mM)
	Føtalt kalveserum (FCS)
	Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B)
	Penicillin-Streptomycin (10 000 IE/ml)
	Trypsin 0,25 %
Invitrogen (Carlsbad, California, USA)	Primere (RPLP0, MYH2, MYH7 og PGC1α)
Life Technologies (Carlsbad, California, USA)	Tryptanblått 0,4 % løsning
Lonza (Verviers, Belgia)	Bio Whittaker® DPBS (Phosphate Buffered Salin)
Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark)	Insulin, ActRapid® Penfill® 100IE/ml
PerkinElmer® (Boston, Massachusetts, USA)	D-[¹⁴ C (U)]glucose 100 og 200 µCi/ml
	[1- ¹⁴ C]oleic acid 100 µCi/ml
	Leucine L-[¹⁴ C(U)], 100 µCi/ml
	Ultima Gold™ XR
QIAGEN (Venlo, Nederland)	Buffer RLT Plus RNeasy Plus Lysis buffer
Sigma- Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	Bovint serumalbumin (BSA)
	Carbonyl cyanid p-(trifluormethoxy) phenylhydrazon (FCCP)
	Dimetylsulfoksid (DMSO)
	Glukose
	Gentamicin
	L-karnitin
	Natriumhydroksid (NaOH)
	Oljesyre (OA)
	Terbutalin
	4-(2-Hydroksyetyl)piperazin-1- etansulfonsyre (HEPES)
Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	SYBR Green Master Mix
	Foetal Bovine Serum (FBS)

Thermo Fisher Scientific (Roskilde, Danmark)	Human Epidermal Growth Factor (hEGF)
	Restore™ Western Blot Stripping Buffer

3.2 Cellekarakteristika

For å studere om metabolske endringer forekommer i skjelettmuskulatur etter en skade på ryggmargen, ble skjelettmuskelceller fra pasienter med SCI benyttet og sammenlignet med celler fra funksjonsfriske kontrollpersoner. Humane skjelettmuskelceller (satellittceller) beholder mange av egenskapene til donorene de ble isolert fra [108]. Satellittceller i cellekultur kan stimuleres til å bli myoblaster og, etter differensiering, til modne myotuber [108]. På grunn av satellittcellenes evne til aktivering og differensiering i kultur, er skjelettmuskelceller isolert fra SCI-pasienter en utmerket modell for å studere om metabolske endringer forekommer under forhold med begrenset fysisk aktivitet.

Satellittceller ble isolert fra muskelbiopsier ved 1 og 12 mnd etter skade fra seks SCI-donorer og sammenlignet med satellittceller hentet fra seks funksjonsfriske kontrolldonorer med tilsvarende kroppsmasseindeks (KMI), kjønn og alder. I denne oppgaven er celler fra SCI-pasienter 1 og 12 mnd omtalt som SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber, mens celler fra funksjonsfriske kontroller omtales som kontroll-myotuber. Tabell 3.3 og tabell 3.4 viser fullstendig oversikt over cellekarakteristika.

Tabell 3.3: Cellekarakteristika for SCI-donorer. Alvorlighetsgraden av skaden kan klassifiseres av «ASIA (American Spinal Injury Association) impairment scale» (AIS) A-E. AIS A: fullstendig tap av sensoriske og motoriske funksjoner under skadenivået, AIS B – D: sensoriske funksjoner er bevart, men ufullstendige motoriske funksjoner under skadenivået, AIS E: normale sensoriske og motoriske funksjoner [83, 89-90].

Donorkode	Kjønn	Alder	KMI* 1 mnd	KMI* 12 mnd	ASIA
Donor 1	Mann	49	23,0	25,7	A
Donor 10	Kvinne	40	21,3	24,4	A
Donor 11	Mann	46	27,8	30,9	A
Donor 21	Mann	44	19,8	19,7	A
Donor 26	Mann	22	18,7	18,8	A
Donor 32	Mann	25	22,5	23,2	A

* *Kroppsmasseindeks (kg/m²)*

Tabell 3.4: Cellekarakteristika for funksjonsfriske kontrolldonorer.

Donorkode	Kjønn	Alder	KMI*	Kontroll til donor
Frisk 1	Mann	45	22,7	Donor 1
Frisk 10	Kvinne	39	24,6	Donor 10
Frisk 11	Mann	45	26,2	Donor 11
Frisk 21	Mann	35	20,3	Donor 11
Frisk 26	Mann	34	20,0	Donor 26
Frisk 32	Mann	33	22,2	Donor 32

* *Kroppsmasseindeks (kg/m²)*

3.3 Dyrking av satellittceller

3.3.1 Cellebank

Ved opprettelse av cellebank ble satellittceller isolert fra skjelettmuskelbiopsier fra SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller og oppskalert over flere passasjer. Videre ble de oppskalerte cellene overført til celleampuller (kryorør) merket med passasje, dato og cellekode. Celleampuller ble fryst ned og oppbevart i nitrogentank ved -196°C før de ble benyttet i denne oppgaven. Oppgaven omfatter forskning på humane celler. Biopsier fra SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller var allerede etablert i henhold til juridiske og etiske lover og retningslinjer, samt innhentet med informert samtykke. All data er anonymisert, og biobanker er blitt godkjent av den regionale etiske komité (REK) sør-øst C, REK-referanse 2011/1838 og 22954.

3.3.2 Utsåing av celler til forsøk

Proliferasjonsmedium ble satt på kulebad og oppvarmet til 37°C før oppstart.

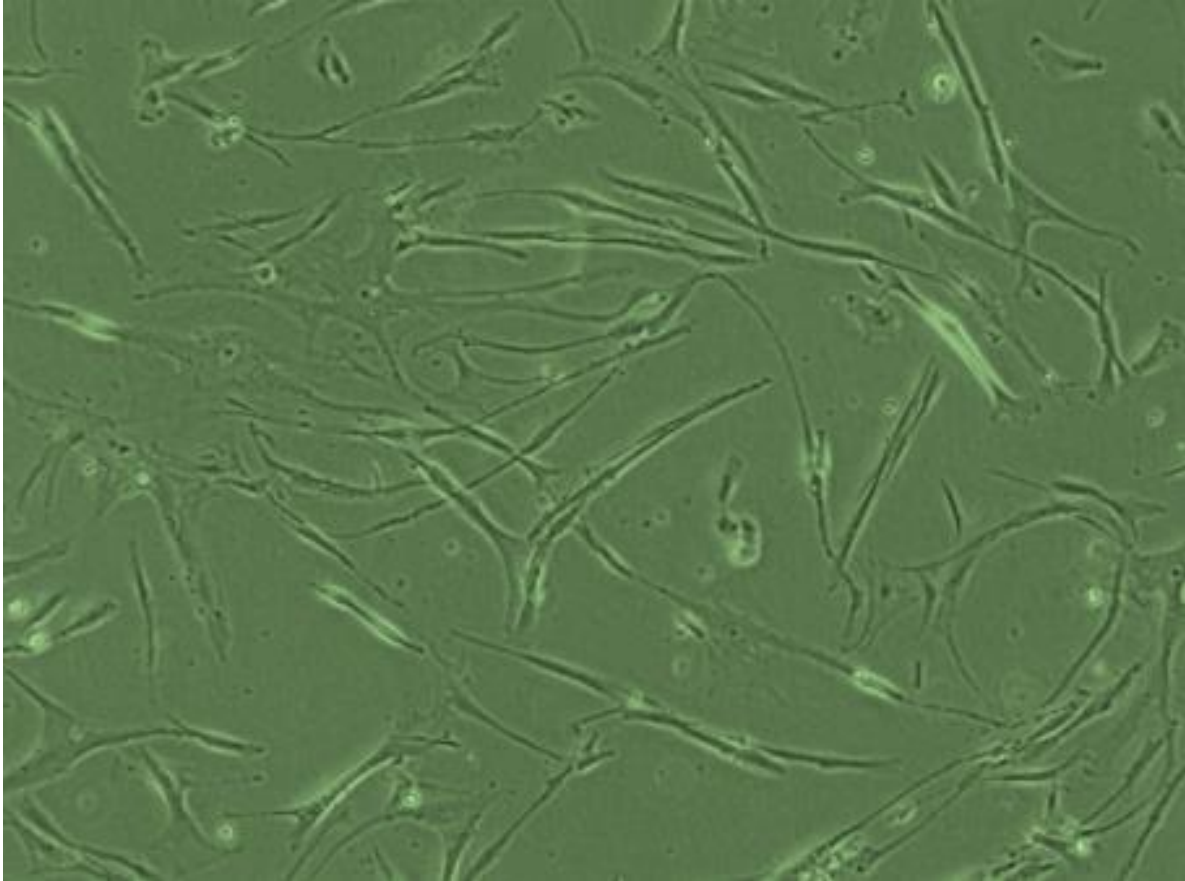
Proliferasjonsmedium er et vekstmedium som øker antall myoblaster og lar cellene vokse i tett kontakt med hverandre for senere differensiering til myotuber. Fra nitrogentanken ble ampuller med satellittceller fraktet til cellelaboratoriet i en isboks. Deretter ble celleampullene (ca. 1 million celler) tint opp i hånda, og cellene ble overført i et 15-ml-sentrifugerør med oppvarmet proliferasjonsmedium (se appendiks 1.1). Videre ble 1 ml av celleduspensjonen pipettert tilbake i kryorøret og deretter tilbake i sentrifugerøret. Dette var for å sikre at alle cellene ble tatt med.

Ved nedfrysing av celler i nitrogentanken ble et frysebeskyttende middel, dimetylsulfoksid (DMSO), benyttet for å hindre cellelysering. DMSO er celletoksisk og derfor var det nødvendig å fjerne det før utsåing av cellene. For å fjerne DMSO ble sentrifugerøret med cellesuspensjonen sentrifugert i fem minutter ved 1300 omdreininger per minutt (rpm). Etter sentrifugering ble supernatanten med DMSO sugd av forsiktig. Cellepellet i bunnen av sentrifugerøret ble resuspendert i proliferasjonsmedium og blandingen ble deretter sådd ut i enten 6- eller 96-brønnersbrett eller 25 cm² flaske, avhengig av hvilket forsøk som ble utført (tabell 3.5). Cellene ble inkubert i en inkubator (5 % CO₂) ved 37°C.

Tabell 3.5: Oversikt over celleutsåing for de ulike forsøkene som ble utført i denne oppgaven.

Forsøk	Antall og type brønn/flaske per donorgruppe	Volum (µl) per brønn/flaske	Antall celler per brønn/flaske
Substratoksidasjon	1 x 96-brønners Corning	100 µl	10 000
SPA	1/3 x 96-brønners (Scintiplate [®] 96 TC)	100 µl	10 000
Real-time qPCR	3 x Easyflask Nunclon 25 cm ²	3000 µl	300 000
Western blotting	1 x 6-brønners (Corning [®])	2000 µl	160 000

Proliferasjonsmediet ble byttet ut annenhver til tredje dag, inntil cellene oppnådde 80–90 % konfluens. Proliferasjonsmediet ble deretter erstattet med differensieringsmedium, slik at myoblaster kunne differensiere til modne myotuber. Over en sek-syv dagers periode ble differensieringsmediet byttet hver 2.-3. dag (se appendiks 1.2).



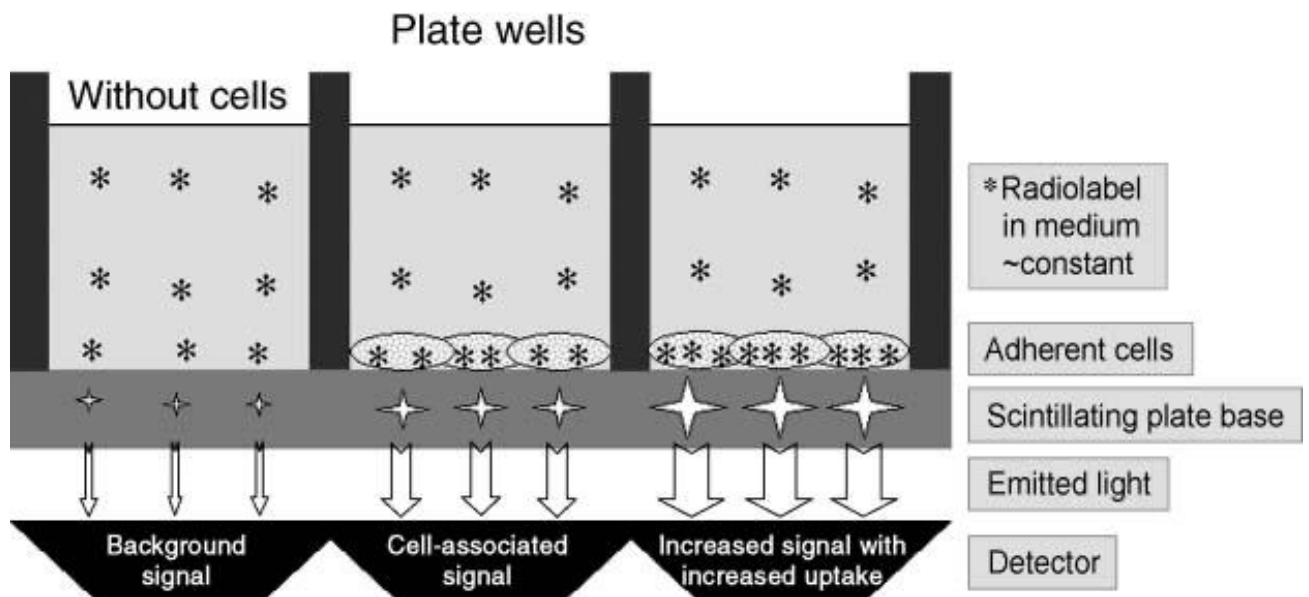
Figur 3.1: Humane skjelettmuskelceller. Bildet viser humane skjelettmuskelceller etter sju dager i proliferasjonsmedium, sett med 4xforstørrelse i mikroskop. Bildet tatt av Derya Mohamed.

3.4 Scintillation proximity assay

Scintillation proximity assay (SPA) ble benyttet til å karakterisere og undersøke proteinomsetning hos SCI-pasienter og funksjonsfriske kontrollpasienter på basalt og i nærvær av terbutalin. SPA er en metode designet for å detektere akkumulering av radiomerket substrat i adherente celledag. Under metoden brukes Scintiplate® 96 TC, som er en spesiell type 96-brønners plate med scintillatorbase innebygd under hver brønn på celleplaten. Radiomerket substrat tatt opp og akkumulert av celler i bunnen av celleplatebrønnene og konsentrert nær scintillatoren gir et sterkere signal til detektoren sammenlignet med radiomerket substrat oppløst i cellemediet. Det vil si at signalintensitet øker og blir sterkere, jo nærmere radioaktiviteten befinner seg scintillatoren. Omvendt, vil signalintensitet reduseres og blir lavere jo lengere unna radioaktiviteten befinner seg scintillatoren [109].

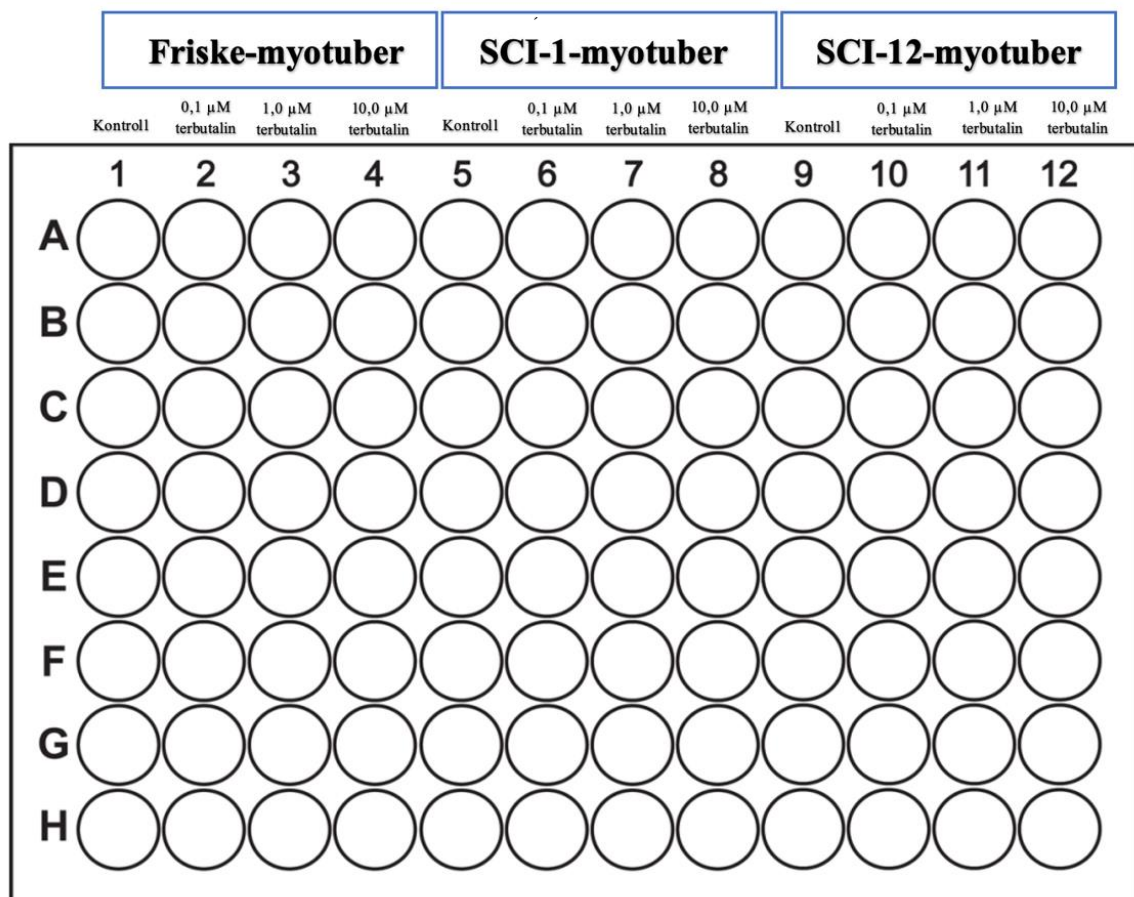
På denne måten kan SPA-systemet måle signaler fra radiomerket substrat som akkumuleres inn i cellene. Etter at cellene vaskes av radiomerket substratet, vil signalene bli svakere. Radiomerket substratet som befinner seg inn i cellene etter vask, vil forsvinne ved for

eksempel lipolyse. Dette muliggjør måling av både akkumulering og degradering av radiomerket substrat [109]. Teorien bak SPA-metoden er illustrert i figur 3.2.



Figur 3.2: Prinsippet for scintillasjonsnærhetsanalysen (SPA). Det radiomerkede substratet som blir tatt opp av celler i bunnen av brønnen med innebygd scintillator base, vil ligge nærmere detektoren og gi et sterkere signal enn det radiomerkede substratet som er løst i cellediet. Signalintensitet blir sterkere jo mer radiomerket substrat cellene tar opp. Bildet hentet fra [109].

På Scintiplate®-96 TC ble 1/3 av brønnene tilsatt utsåingsmedium med *SCI-1-myotuber*, 1/3 utsåingsmedium med *SCI-12-myotuber* og 1/3 utsåingsmedium med *kontroll-myotuber*, med omtrent 10000 celler per brønn (tabell 3.5). Videre prolifererte cellene til 80-90 % konfluens og differensiert i seks-syv dager. Dag tre av celledifferensiering ble cellene behandlet med 100 µl terbutalin i forskjellige konsentrasjoner (0,1 µM, 1 µM og 10 µM) og 0,1% DMSO per brønn (se appendiks 2.1). Oppsett av forsøk er illustrert i figur 3.3.



Figur 3.3: Forsøksoppsettet for 96-brønners Brett for Scintillation proximity assay. Friske myotuber ble sådd ut i rad 1-4, SCI-1-myotuber i rad 5-8 og SCI-12-myotuber i rad 9-12 av brønnene. Cellene ble forbehandlet med terbutalin i fire dager i ulike konsentrasjoner (0,1 μ M, 1 μ M og 10 μ M) og 0,1 % DMSO (negativ kontroll til terbutalin).

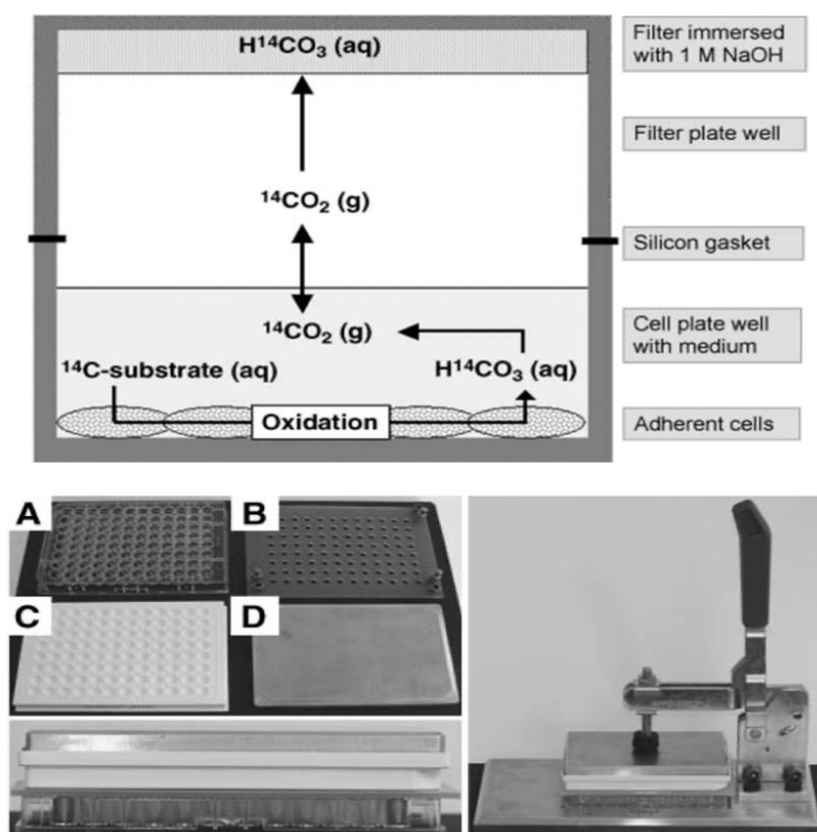
Differensieringsmediet ble sugd av og erstattet med 50 μ l pulsmedium med radiomerket Leucin, DMSO 0,1 % og terbutalin ulike konsentrasjoner (0,1 μ M, 1 μ M og 10 μ M) (se appendiks 2.2-2.3) per brønn på forsøksdagen. Deretter etter tilsetning av pulsmediet ble scintillasjonen umiddelbart telt på MicroBeta. Dette ble utført for å måle leucinopptaket ved tiden null. Denne målingen var viktig, som ble relatert til senere målinger utført på MicroBeta. Videre ble leucinakkumuleringen målt hver 2. time i ti timer, og igjen neste dag etter 24 timer. Scintiplate®-96 TC ble holdt i inkubator (37°C, 5% CO₂) mellom hver måling. Cellene ble vasket en gang med 100 μ l 10 μ M BSA i HBSS eller DPBS med Ca²⁺ og Mg²⁺ etter siste telling. Etter vask ble 50 μ l chasemedium satt til hver brønn (se appendiks 2.4) og scintillasjonen ble målt hver 2. time i seks timer. Mellom hver måling ble Scintiplate®-96 TC med celler beholdt i inkubator (37°C, 5% CO₂). Etter den endelige tellingen ble cellene vasket to ganger med 150 μ l PBS og deretter lysert med 200 μ l 0,1 M natriumhydroksid (NaOH). Til

slutt ble lysatet med cellene nedfrosset ved -20°C for senere analyse av celleassosiert radioaktivitet (avsnitt 3.5.2) og proteinmåling (avsnitt 3.6).

3.5 Substratoksidasjonsmetoden

3.5.1 Substratoksidasjonsforsøk

Substratoksidasjonsmetoden ble benyttet for å karakterisere energimetabolisme og undersøke fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskelceller hos SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller. Denne metoden, som *Wensaas et al.* først beskrev i 2017, ble utviklet for å måle akkumulering og oksidasjon av ^{14}C -radiomerket substrater [109]. Under metoden tilsettes cellebrettet et medium med ^{14}C -radiomerket substrat og plasseres i et trappestativ, en ferdig montert lufttett system (figur 3.4). Cellene oksideres og omdanner det radiomerkede substratet til $^{14}\text{CO}_2$ ved oksidativ fosforylering under fire-timers inkubering. Omdannet substrat i form av $^{14}\text{CO}_2$ diffunderes og samles opp av filteret som er blitt fuktet med $20\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ NaOH . Etter fire timer i inkubator tilsettes filterbrettet tellevæske og inkuberes i to dager i romtemperatur. Etter to dager telles mengde radioaktivitet i filterbrettet i en scintillasjonsteller (Wallac VictorTM X4 Multilabel Plate Reader). Mengde radioaktivitet telt i scintillasjonsteller er et mål på den fullstendige oksidasjonen av substratet [109]. Prinsippet og oppsett substratoksidasjonsmetoden er vist i figur 3.4.



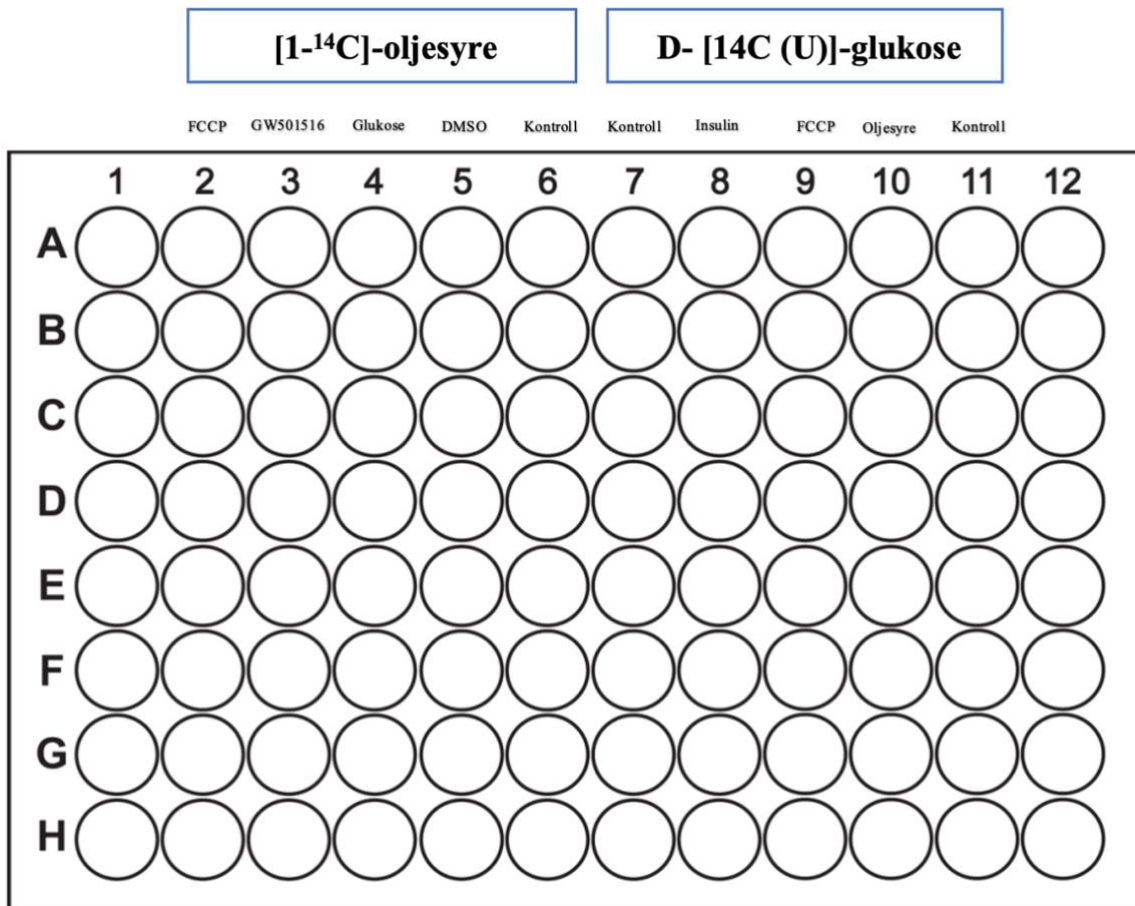
Figur 3.4: Prinsipp og oppsett av trappesystem for substratoksidasjonsmetoden.

(A) 96-brønners Corning® CellBIND® Brett. (B) Metalskruer satt inn i silikonlapp for stabilitet. (C) 96-brønners UniFilter-brett fuktet med 1 M NaOH. (D) Blyplate som gir jevn trykk på brettet. Bildet nederst til høyre viser ferdig montert trappesystemet, en såkalt sandwich, med platepresseren som sikrer et lufttett system med jevnt trykk under inkubering. ^{14}C -substratet tas opp av cellene i cellebrettet og omsettes via oksidasjon til $^{14}\text{CO}_2$. Omdannet $^{14}\text{CO}_2$ diffunderer og blir fanget i filterbrettet fuktet med NaOH. Bildene er hentet fra [109]. NaOH; natriumhydroksid.

Celler fra SCI-pasienter og friskekontroller ble sådd ut i 96-brønners plater med 10 000 celler per brønn (tabell 3.5). Etter oppnådd 80-90 % konfluens i proliferasjonsmedium, ble cellene tilsatt differensieringsmedium (se appendiks 3.1) i seks-syv dager som er beskrevet i avsnitt 3.3.2. To dager før forsøksdagen ble brønnene med myotuber i rad 3 og 5 av cellebrettet forbehandlet med 10 nM GW501516 og 0,1 % DMSO (negativ kontroll). Deretter ble cellebrettet satt tilbake i inkubatoren ved normale betingelser (37°C , 5% CO_2) og inkubert i 48 timer. Dagen før forsøket ble radioaktive medier med $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose laget.

På forsøksdagen ble differensieringsmediet sugd av i avtrekkskap og 50 μl av radioaktivt medium ble tilsatt. Halvparten av de aktuelle brønnene med celler ble tilsatt radioaktivt medium med $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre, og den andre halvparten ble tilsatt radioaktivt medium med D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose (se appendiks 3.2-3.3). I tillegg ble myotuber akuttbehandlet med 1 μM

karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)-fenyldrazone (FCCP), 5,5 mM ikke-radioaktiv glukose, 100 nM insulin, 1 μ M FCCP og 100 μ M ikke-radioaktiv oljesyre (se appendiks 3.4-3.8). Akuttmedier ble tilsatt i radioaktivt medium med enten [1- 14 C]oljesyre eller 14 C (U)]glukose. Oppsettet av forsøket er vist i figur 3.5.



Figur 3.5: Forsøksoppsettet for 96-brønners Brett for substratoksidasjonsforsøk. Brønnene i rad 2-6 med skjelettmuskelceller fikk radioaktivt medium med [1- 14 C]oljesyre, mens brønnene i rad 7-11 fikk radioaktivt medium med D-[14 C (U)]glukose. Myotubene ble forbehandlet med PPAR δ reseptoragonisten GW501516 10 nM og 0,1 % DMSO, og akuttbehandlet med 1 μ M FCCP, 5,5 mM ikke-radioaktiv glukose, 100 nM insulin, 1 μ M FCCP og 100 μ M ikke-radioaktiv oljesyre. FCCP; karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)-fenyldrazone.

96-brønns filterbrett (Unifilter[®]-96 GF/B) ble fuktet med 20 μ l 1 M NaOH i per brønn før cellebrettet ble plassert på den forhåndsmonterte trappetativet som vist i figur 3.4. Mellom cellebrettet, silikonlappen og filterbrettet ble metallskruer plassert på hvert av de fire hjørnene for stabilisering. Blyplaten som ga jevnt trykk, ble satt øverst og trappesystemet ble låst opp av en platepresser for å sikre at systemet var lufttett. Trappetativet ble videre plassert i en inkubator (37°C) i fire timer.

Trappesystemet ble demontert etter fire timer, og radioaktive medier ble sugd av. Cellebrettet ble vasket med 2 x 150 µl PBS for fjerning av radioaktive rester. Deretter ble cellene lysert med 200 µl 0,1 M NaOH. 96-brønnersbrettet med cellelysatet ble forseglet med lokk og satt i fryseren ved -20°C. Videre ble gjenstående medierester fra radioaktivt medium satt i kjøleskapet til senere måling av celleassosiert radioaktivitet (avsnitt 3.5.3). Hver brønn i filterbrettet ble fylt med 40 µl tellvæske (Ultima Gold™ XR) og forseglet med TopSeal®-A transparent film. Før måling på scintillasjonsteller (Wallac Victor™ X4 Multilabel Plate Reader), ble filterbrettet inkubert i 48 timer i romtemperatur.

3.5.2 Celleassosiert radioaktivitet

Det nedfryste 96-brønnersbrettet med cellelysat ble hentet fra fryseren og satt i inkubatoren ved 37°C til tining. Etter tining ble 50 µl av lysatet med celler overført til hver brønn i en scintillasjonsplate (96-brønners Isoplate™-brett), og 50 µl av isotopmedierester som var til overs fra substratoksidasjonsforsøket ble tilsatt i tomme rader i tripler. Videre ble brettet tilsatt 100 µl tellvæske (Ultima Gold™ XR) til hver brønn og forseglet med TopSeal®-A transparent film. Før kvantifisering av celleassosiert radioaktivitet (¹⁴CA) på scintillasjonsteller (Wallac Victor™ X4 Multilabel Plate Reader), ble scintillasjonsplaten inkubert i minst to timer ved romtemperatur.

¹⁴CA er et mål på mengde radiomerket substrat som akkumuleres i adherente cellelag, altså det som befinner seg i cellene etter forsøket. Ved å addere kvantifisert ¹⁴CA og ¹⁴CO₂ får vi et estimat på cellenes evne til opptak av radiomerket substrat under hele forsøket, kalt totalt opptak (¹⁴CA + ¹⁴CO₂). Videre kan dette brukes til å bestemme fraksjonell oksidasjon, mengde radiomerket substrat oksidert i forhold til totalt opptak (CO₂/ (CA+ CO₂)).

3.6 Proteinmåling (Bradford)

Resultat av radioaktivitet målt ved SPA-forsøk og substratoksidasjonsforsøk er oppgitt som CO₂ per nmol/mg protein frigjort. Kvantifisert radioaktivitet må i teorien relateres til antall celler som finnes i hver brønn fordi dette gir et felles sammenligningsgrunnlag for brønnene. Telling av antall celler per brønn er imidlertid ikke mulig og i stedet brukes proteinkonsentrasjon som surrogat. Dermed ble metoden Bradford benyttet for måling av proteinkonsentrasjon i denne oppgaven.

Bradford-metoden muliggjør proteinmåling med Coomassie Brilliant Blue G250 fargestoff, som kan endre farge etter binding til proteiner under sure betingelser, med et absorpsjonsmaksimum mellom 465 nm og 595 nm. Når fargestoffet fester seg til proteiner, endrer det farge fra rødt til blått. Intensiteten til den blå fargen kan ved hjelp av et spektrofotometer og en kjent polynomial-standardkurve detektere et estimat på mengde protein i en prøve. Jo høyere proteinkonsentrasjon i prøven, desto sterkere blir blåfargen [110].

I denne oppgaven ble Bradford utført samtidig med telling av celleassosiert radioaktivitet. 96-brønnersbrettet med nedfrost cellelysat og ferdiglaget BSA standarder i ulike konsentrasjoner (0, 5, 10, 20, 40, 80 og 160 µg BSA/ml 0,1 M NaOH) ble tint i et varmeskap ved 37°C. Etter ca. en time i varmeskap ble cellene homogenisert ved hjelp av en pipette. 50 µl av cellelysatet ble videre overført til 96-brønners microplate (Nunc™ MicroWell™). Rad 1 og 2 i cellebrettet inneholdt 50 µl standardløsninger, som ble tilsatt i paralleller. Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate ble fortynnet 1:5 med destillert vann. Hver brønn med standarder og prøver ble tilsatt 200 µl av fortynnet Bio-Rad konsentrat. Før telling av proteinkonsentrasjon, sto 96-brønnersbrettet med standarder og prøver tilsatt fortynnet Bio-Rad-konsentrat i fem minutter ved romtemperatur. Deretter ble proteinkonsentrasjon analysert i spektrofotometer (Wallac Victor™ X4 Multilabel Plate Reader).

3.7 Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR) er en effektiv og enkel kvantifiseringsmetode til å måle genuttrykk. qPCR brukes for amplifisering av en spesifikk DNA-sekvens i en prøve gjennom flere repeterende PCR-sykluser [111]. For cellekultur kan metoden anvendes til å undersøke endringer i genuttrykk gjennom måling av mRNA-uttrykk i celler. qPCR ble brukt til å studere uttrykk av utvalgte gener i skjelettmuskelceller hos SCI pasienter og funksjonsfriske kontrollpasienter etter forbehandling med GW501516 og terbutalin i denne studien.

3.7.1 Forbehandling og høsting av celler til qPCR-forsøk

Satellittcellene fra SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller ble dyrket til myotuber i 25 cm² flasker (Easyflask Nunclon) med ventilert lokk (avsnitt 3.3.2). 1 ml celleampulle (ca. 1

million celler) ble overført til 15-ml-sentrifugerør med 8,5 ml oppvarmet proliferasjonsmedium. 3 ml av cellesuspensjonen (ca. 300 000 celler per flaske) ble sådd i tre 25 cm² flasker for hver donor (tabell 3.5). Til sammen ble 9 celleflasker brukt for hvert forsøk: 3 flasker for *SCI-1-myotuber*, 3 flasker for *SCI-12-myotuber* og 3 flasker for *kontroll-myotuber*. Celleflaskene ble satt i inkubatoren ved 37°C (5% CO₂).

Proliferasjonsmediet ble skiftet ut annenhver til tredje dag inntil cellene oppnådde 80-90 % konfluens. Proliferasjonsmediet ble deretter erstattet med differensieringsmedium. I differensieringsmediet differensierte myoblastene til myotuber i en periode på syv dager. Dag tre av differensieringen ble myotubene forbehandlet med terbutalin (1 µM) og 0,1 % DMSO i differensieringsmedier. På femte differensieringsdag ble terbutalin- og DMSO-behandlingen sugd av og gjentatt, og celler ble forbehandlet med GW501516 (10 nM) (se appendiks 4.1). 0,1 % DMSO ble benyttet som negativ kontroll til GW501516- og terbutalinbehandling. På forsøksdagen ble mediet fjernet og 2x2 ml DPBS ble brukt til å vaske cellene. 300 µl av lysisbuffer (RNeasy Plus Lysis buffer) ble deretter tilsatt i hver flaske. Cellene på overflaten av flasken ble skrapet av forsiktig med en skraper, og cellelysatet i flasken ble videre overført til eppendorfrør merket med donor, dato og type behandling. Deretter ble eppendorfrør med cellelysatet fryst ned ved -80°C til videre bruk ved isolering av RNA (avsnitt 3.7.2). Prosedyren ble gjentatt for alle donorer som ble benyttet i forsøket.

3.7.2 RNA-isolering etter høsting fra lyserte celler

RNeasy[®] Plus Mini Kit (QIAGEN) ble brukt ved isolering av total-RNA fra det nedfryste cellelystatet. Eppendorfrør med cellelysat ble hentet opp fra fryseren og tint i romtemperatur. Cellelysatet ble pipettert direkte inn i en QIAshredder-spinn-kolonne plassert i 2-ml-oppsamlingsrør og sentrifugert i to minutter ved høyest hastighet. For å fjerne genomisk DNA (gDNA) ble det homogeniserte lysatet overført til en kolonne som binder gDNA, kalt gDNA Eliminator-spinnkolonne. Kolonnen ble påsatt i et 2-ml-oppsamlingsrør og sentrifugert ved 8000 g i 30 sekunder. Spinnkolonnefilteret med gDNA ble deretter kastet. 300 µl av 70 % etanol ble tilsatt filtratet i oppsamlingsrøret. Blandingen ble godt blandet med en pipette og overført videre til en RNeasy-spinnkolonne påsatt i et 2-ml-oppsamlingsrør. Oppsamlingsrøret ble sentrifugert ved 8000 g i 15 sekunder, og filtratet i oppsamlingen ble kastet.

RNeasy-spinnkolonne ble tilsatt 700 µl Buffer RW1. Spinn-kolonnen sentrifugerte i 15 sekunder ved 8000 g, og filtratet i oppsamlingsrøret ble forkastet. Til den samme kolonnen ble 500 µl Buffer RPE med etanol tilsatt i to runder. Videre ble kolonnen sentrifugert i to omganger ved 8000 g, første gang i 15 sekunder og andre gang i to minutter. Etter hver sentrifugering ble filtratet forkastet, mens selve samlerøret ble ikke kastet før andre runde med sentrifugering. Ved tilsetning av Buffer RW1 og Buffer RPE ble spinn-kolonne membranen vasket, og salter ble fjernet.

Fra siste trinnet ble RNeasy-spinnkolonne overført til et nytt 1,5-ml-opsamlingsrør med lokk. Deretter, for RNA-eluering, ble 30 µl RNase-fritt vann tilsatt direkte til spinnkolonne-membranen. Kolonnen sentrifugerte i 60 sekunder ved 8000 g, og RNA ble eluert med vannet opp i oppsamlingsrøret. Analysen ble utført på alle aktuelle donorer som ble benyttet i forsøket.

3.7.3 Kvantifisering av RNA-konsentrasjon med Spektrofotometer

RNA brukt som utgangsmateriale, og Thermo Fisher Scientifics Nanodrop™ Lite-spektrometer ble brukt til å måle konsentrasjonen og renheten til RNA i hver prøve ved 260 nm absorbans. RNA-renheten i en prøve kan vurderes ved å benytte absorbans-forholdet mellom 260 nm og 280 nm. Rent RNA antas å ha et forhold på omtrent to. RNA-konsentrasjonen som ble bestemt i hver prøve brukes videre for senere analyse av cDNA-syntese (avsnitt 3.7.4). Under analysen ble først absorbans av en blank prøve målt på spektrometeret. I dette tilfellet var blank prøve 2 µl Rnase-fritt vann (elueringsbuffer). Deretter ble 2 µl av hver prøve pipettert på måleplaten, og RNA-konsentrasjonen ble angitt i ng/µl.

3.7.4 cDNA-syntese

Reverstranskripsjon av RNA til komplementært DNA (cDNA) var nødvendig før genene kunne måles ved qPCR. Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied biosystems) ble benyttet for syntese av cDNA i hver prøve. Prøver med RNA og reagenser ble tint på is i romtemperatur. En reaksjonsblanding av reagensene ble laget og blandet sammen (se appendiks 5.1). RNA fra hver prøve ble overført til et eppendorfrør, og tilsatt nukleasefritt vann til et totalt volum på 13,2 µl. 6,8 µl av reagensblandingen ble pipettert over til hver prøve og blandet godt sammen. For cDNA-syntese ble rørene med prøvene forseglet og satt

inn i en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Tre separate trinn av cDNA-syntese fant sted ved forskjellige temperaturer. Primere ble bundet til templat i det første trinnet i ti minutter ved 25°C. Det følgende trinnet var omvendt transkripsjon, som ble utført i 80 minutter ved 37 °C. Omvendt transkriptase-enzymet ble deretter gjort inaktiv ved 85°C i fem minutter. For senere analyse av qPCR ble prøvene med cDNA nedfrosset ved -20°C (avsnitt 3.7.5).

3.7.5 qPCR

cDNA-prøver ble hentet fra fryseren og satt til tining for qPCR-analyse. For å forberede cDNA-miks ble 2 µl av hver prøve overført og blandet inn i et eppendorfrør. Denne cDNA-miksen ble benyttet til å lage en standardkurve for å beregne mengde av cDNA amplifisert under qPCR-kjøringer. For å tillagning av standard 1000 ble cDNA-miksen fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann. Deretter ble standard 500, 250 og 125 laget fra standard 1000 gjennom en fortynningsserie (se appendiks 5.2). Videre i prosedyren ble cDNA i hver prøve fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann (se appendiks 5.3). For cDNA-amplifisering ble Power-SYBR® Green PCR Master Mix fra Applied Biosystems benyttet. SYBR® Green PCR-miks med spesifikke primere for RPLP0-, MYH2-, MYH7- og PGC-1 α -genet ble laget (se appendiks 5.4).

Ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0) ble bruk som en endogenkontroll. Liste over primere og tilhørende primersekvens brukt under qPCR-analysen er vist i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Liste over primere og tilhørende primersekvens brukt under qPCR-analysen.

RPLP0, ribosomalt fosfoprotein P0; MYH2, Myosin-tungkjede-2-gen; MYH7, Myosin-tungkjede-7-gen; PPARGC1alfa (gen), peroksisom proliferator aktivert reseptor gamma-koaktivator 1-alfa

Primer	Fremover primersekvens	Reverse primersekvens
RPLP0	CCA TTC TAT CAT CAA CGG GTA CAA	AGC AAG TGG GAA GGT GTA ATC C
MYH2	AAG GTC GGC AAT GAG TAT GTC A	CAA CCA TCC ACA GGA ACA TCT TC
MYH7	CTC TGC ACA GGG AAA ATC TGA A	CCC CTG GAC TTT GTC TCA TT
PPARGC1alfa	AAA GGA TGC GCT CTC GTT CA	TCT ACT GCC TGG AGA CCT TGA TC

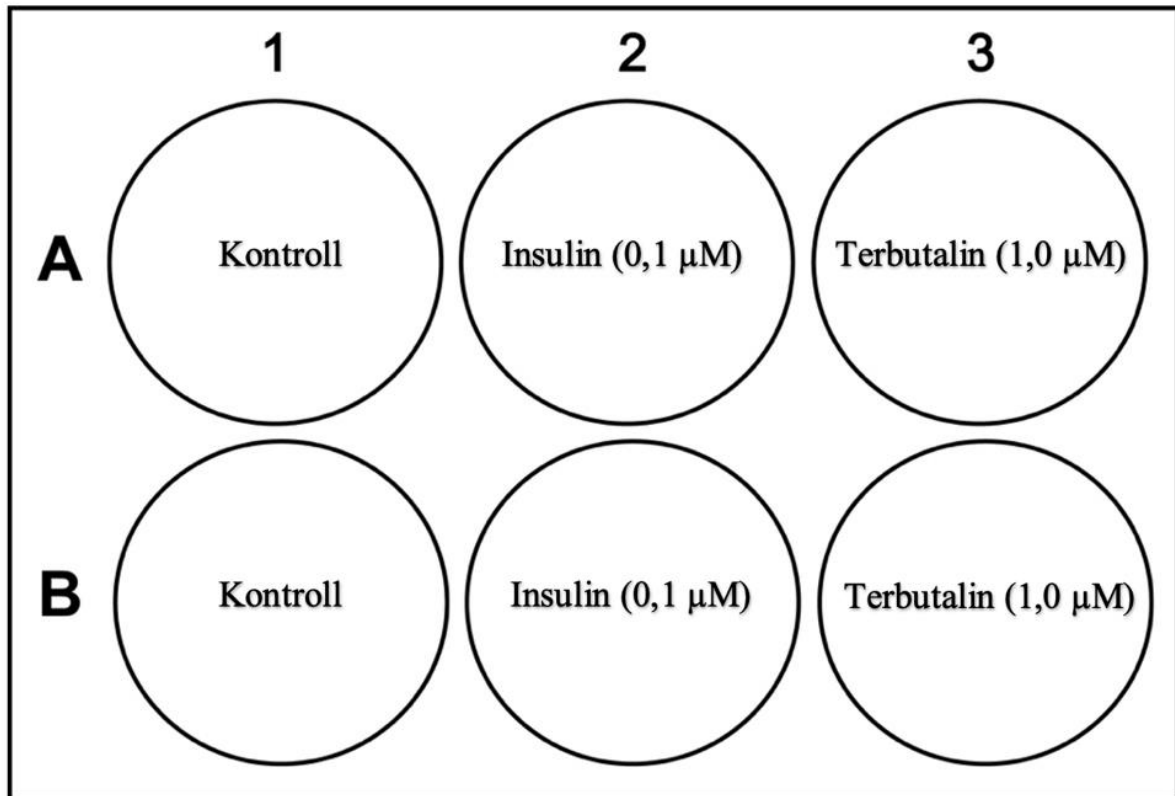
I brønner på en MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate ble 2,5 µl av hver fortynnet cDNA-prøve, standarder og nukleasefritt vann (negativ kontroll) tilsatt. Standarder (1000, 500, 250, 125) ble tilsatt i tomme rader i tripler, mens fortynnet cDNA-prøver og nukleasefritt vann ble tilsatt i paralleller. Deretter ble 22,5 µl av SYBR® Green PCR-miks tilsatt til hver brønn (se appendiks 5.5). Platen ble satt i StepOnePlus™ Real-Time PCR System fra Applied Biosystem for amplifisering av cDNA.

3.8 Westernblotting

Metoden western blotting, også kalt immunoblot, baseres på elektroforeseprinsippet for separasjon og deteksjon av et bestemt protein i en prøve. Denne metoden separerer proteiner etter molekylvekt og utføres gjennom gelelektroforese, som deretter overføres til en cellulosemembran. Cellulosemembranen tilsettes en blokkeringsløsning, som forhindrer uspesifikke interaksjoner med målprotein. Proteinidentifikasjon baseres på immunodeteksjon og skjer ved hjelp av en fremkallingsvæske. Under immunologisk deteksjon blir to typer av antistoffer benyttet, først et primærantistoff, deretter et sekundærantistoff. Primærantistoffet gjenkjenner og binder spesifikk til antigenet, mens sekundærantistoffet binder spesifikk til primærantistoffet [112]. Westernblotting ble benyttet i denne oppgaven for å studere fosforylering av proteinkinase B (pAkt) og total Akt i skjelettmuskelceller hos SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller.

3.8.1 Utsåing, forbehandling og høsting av celler

Satellittcellene fra SCI pasienter og funksjonsfriske kontrollpasienter ble sådd ut i 6-brønners brett (Corning®). En celleampulle med ca. 1 million celler ble overført til 15 ml sentrifugerør med 11,5 ml oppvarmet proliferasjonsmedium. Et totalvolum på 2 ml av cellesuspensjonen (ca. 160 000 celler per brønn) ble sådd ut i hver brønn av 6-brønners brettet (avsnitt 3.3.2). Tre 6-brønners brett ble benyttet for hvert forsøk; ett brett for *SCI-1-myotuber*, ett brett for *SCI-12-myotuber* og ett brett for *kontroll-myotuber*. Celler vokste til 80-90 % konfluens og differensierte deretter i differensieringsmedium i syv dager. To brønner ble forbehandlet med 1 µM terbutalin og fire brønner ble forbehandlet med 0,1% DMSO på dag tre av differensieringsperioden. Differensieringsmedier med terbutalin og DMSO ble skiftet på dag fem av differensieringen. På forsøksdagen ble to brønner akuttbehandlet med insulin (0,1 µM) i 15 minutter (se appendiks 4.1). DMSO ble benyttet som kontroll til terbutalin- og insulinbehandlingen. Oppsett av forsøket er vist i figur 3.6.



Figur 3.6: Forsøksoppsett for Western blotting. I 6-brønns plate (Corning®) ble skjelettmuskelceller fra SCI pasienter og funksjonsfriske kontrollpasienter sådd ut og behandlet med 0,1% DMSO (negativ kontroll), 0,1 μ M insulin og 1 μ M terbutalin.

Mediene i brønnene ble sugd ut etter 15 minutter inkubering med insulin, og cellene ble deretter skylt med 2x2 ml DPBS. Videre ble cellene tilsatt 100 μ l lysisbuffer (høstebuffer) (se appendiks 6.1-6.2) per brønn, og med en skrape ble cellene skrapet av forsiktig. Cellelysatet i hver brønn ble overført til eppendorfrør merket med etikett (donor, dato og type behandling). Videre ble eppendorfrøret med cellelysat fryst ned ved -20°C frem til videre analyse ved prøveopparbeidelse (avsnitt 3.8.2).

3.8.2 Prøveopparbeidelse

Eppendorfrør med cellelysat ble hentet ut fra fryseren og kokt ved 100°C i fem minutter. Samplebufferen som ble benyttet under prøveopparbeidelse inneholdte komponenten natriumdodecylsulfat (SDS), som er en anion-detergent. SDS førte til at proteinene i prøven denaturerte under kokingen, noe som ga dem en sterk negativ ladning. Dermed var molekylstørrelse den eneste faktoren som påvirket separasjonen i gelen. Eppendorfrørene ble videre satt på is, og proteinkonsentrasjon av hver prøve ble kvantifisert gjennom en

spektrofotometer (NanoDrop™ Lite). Først ble 1 µl lysisbuffer tilsatt og målt som blankprøve (kontroll), deretter ble 1 µl av hver prøve målt. Etter måling av proteinene i prøvene ble hvert eppendorfrør tilsatt 10 % beta-merkaptoetanol, som spaltet disulfidbindinger i proteinene, og 5 % bromfenylblått, som ga prøvene en blå fargetone. Prøvene ble deretter igjen kokt ved 100°C i fem minutter før de ble nedfrosset ved -20°C for senere analyse ved gelelektroforese (avsnitt 3.8.3).

3.8.3 Gelelektroforese

For gelelektroforese ble Mini-PROTEAN® TGX™ gel benyttet. Gelen inneholdt en 4 til 20 % gradient av akrylamid, som betyr at porestørrelsen på gelen avtar med økende akrylamidkonsentrasjon. Dette førte til at mindre molekyler vandret lengre nedover gelen enn større molekyler.

Den grønne kammen på toppen og den grønne tapen på bunnen ble først fjernet fra geler. Hver gel ble deretter plassert i en Mini Protean® electrophoresis boks med elektroforesebuffer (se appendiks 6.3). Første brønn ble benyttet som standard og ble tilsatt 5 µl av Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Til de andre brønnene ble et volum som tilsvarer 20 µg protein av hver prøve tilsatt. Elektroforese ble videre kjørt i ti minutter 80 V og så i cirka 30-40 minutter ved 200 V.

3.8.4 Blotting

Etter gelelektroforese ble de separerte proteinene i gelen overført til en nitrocellulose-membran med 0,2 µm porestørrelse. Før «sandwichen» av filterpapir, membran, gel og filterpapir ble satt sammen ble de ferdigkuttet filterpapirene og membranen fuktet i ca. fem minutter med blottebuffer (se appendiks 6.4). Til sammen ble det benyttet én gel, én membran og to stabler med filterpapir per forsøk. «Sandwichen» ble satt på en kassett før den ble blottet i Bio-Rad PowerPac™ HC i syv minutter ved 2,5 A og 25 V. Etter avsluttet blotting ble membranen overført til en plastbeholder.

3.8.5 Blokking og primærantistoff

Det ble tilsatt 10 ml blokkebuffer (5 % tørrmelk løst i 1xTTBS) (se appendiks 6.5-6.6) til membranen i plastbeholderen, som forhindrer uspesifikke bindinger av de primære og sekundære antistoffene til membranen, da den har en sterk proteinbindingskapasitet [113].

Videre ble plastbeholderen med membran og blokkebuffer satt på The Belly Dancer® i 60 minutter i romtemperatur.

Etter 60 minutter på The Belly Dancer® ble membranen i plastbeholderen med blokkebuffer tatt ut. Membranen ble overført til et 50-ml-sentrifugerør og 5 ml av primærantistoffet (fortynnet 1:1000 i 5% tørrmelk) ble tilsatt mot pAkt og total Akt. Til slutt ble sentrifugerøret satt på Dynabeads™ MX 12-tube Mixing Wheel (Applied Biosystems) og plassert i kjøleskapet over natten.

3.8.6 Vasking og sekundærantistoff

Neste dag ble sentrifugerøret tatt ut fra kjøleskapet. Membranen ble deretter overført til en plastbeholder og vasket med 3x10 ml vaskebuffer (1xTTBS) i fem minutter på The Belly Dancer® i romtemperatur. Vaskebuffer ble benyttet for å fjerne gjenværende primærantistoff.

Etter vasking ble membranen tilsatt 5 ml av sekundærantistoffet (fortynnet 1:3000 med 2,5 % tørrmelk). Antitrabbit (sekundærantistoff) ble benyttet mot det primære antistoffet. Videre ble membranen med sekundærantistoff satt til vipping på The Belly Dancer® i 60 minutter. Etter 60 minutter ble membranen vasket tre ganger i fem minutter med 10 ml vaskebuffer (1xTTBS) på The Belly Dancer®.

3.8.7 Fremkalling

Etter vasking med vaskebuffer ble plastbeholderen med membranen tilsatt 6 ml fremkallingsvæske og satt til vipping i fem minutter på The Belly Dancer® i romtemperatur. Fremkallingsvæsken kan bli gjenbrukt for opptil åtte membraner. Fremkallingsvæsken besto av to reagenser med 1:1 blandingsforhold. Membranen ble videre plassert mellom to gjennomsiktige plastfolier for at membranen kunne påføres uten å skades eller endre resultatet. Til slutt ble membranen lagt i ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) for deteksjon av protein immunoblott.

3.8.8 Stripping og re-blokking av membran

For å fjerne fremkallingsvæske fra membranen etter deteksjon av immunoblott ble membranen vasket med 4x10 ml 1xTTBS i ti minutter på The Belly Dancer®. Deretter ble 10 ml strippeløsning tilsatt til membran i 15 minutter. Membranen ble vasket tre nye runder med

10 ml 1XTTBS i ti minutter. Etter vasking med vaskebuffer ble membranen blokket med 5 ml 5 % tørrmelk i 1xTTBS i 60 minutter på The Belly Dancer® ved romtemperatur. Membranen ble overført til en 50-ml-sentrifugerør og inkubert med 5 ml primærantistoffløsning.

Sentrifugerøret ble deretter plassert i kjøleskap over natten på Dynabeads™ MX 12-tube Mixing Wheel.

3.9 Statistikk

Microsoft Excel og GraphPad Prism 9 ble benyttet til statistisk analyse i denne studien.

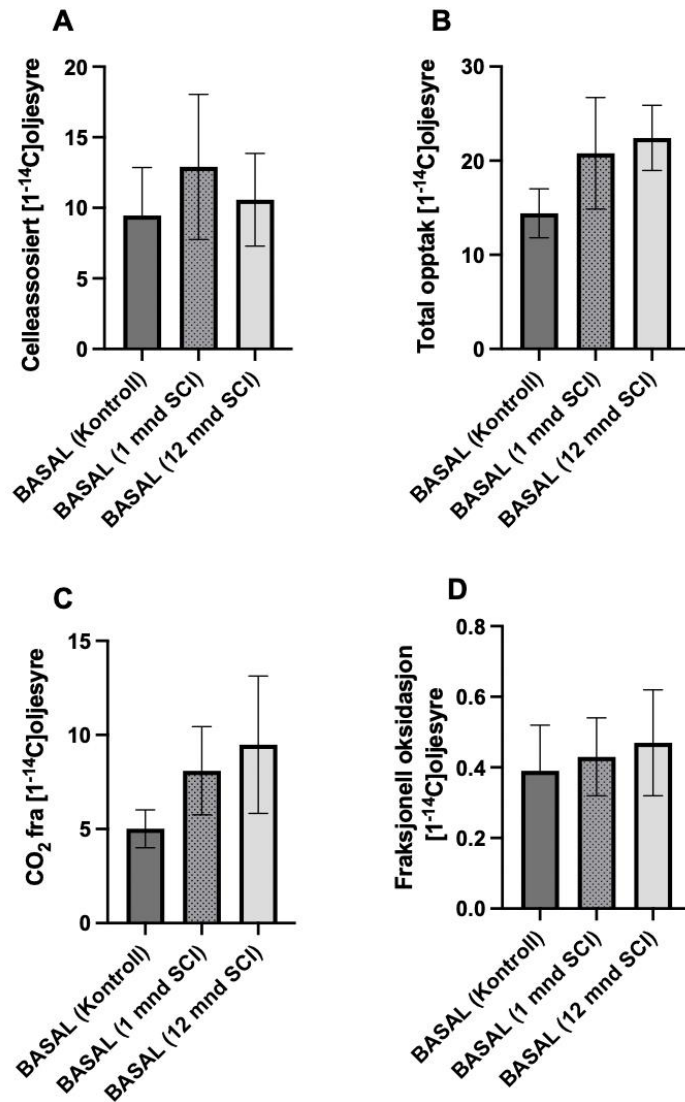
Det ble gjennomført 4 uavhengige forsøk per donorgruppe i substratoksidasjonsforsøkene og qPCR, og 3-4 uavhengige forsøk per donorgruppe for SPA og Westernblotting. Dataene for de gjennomførte forsøkene blir presentert som gjennomsnitt \pm SEM (standardfeil av gjennomsnitt). For vurdering av behandlingseffekter ble tosidig uparet t-test benyttet ved sammenligning ubehandlede-myotuber mot behandlede-myotuber innenfor samme donorgruppe. For vurdering av behandlingsrespons (donor forskjeller) mellom donorene ble tosidig uparet t-test benyttet ved sammenligning av kontroll-myotuber mot SCI-myotuber, og tosidig paret t-test ved sammenligning mellom SCI-myotuber, 1 og 12 mnd etter skade. Et signifikansnivå på 5 % ($\alpha=0,05$) ble satt for evaluering om et resultat er statistisk signifikant.

4 Resultater

4.1 Energimetabolisme

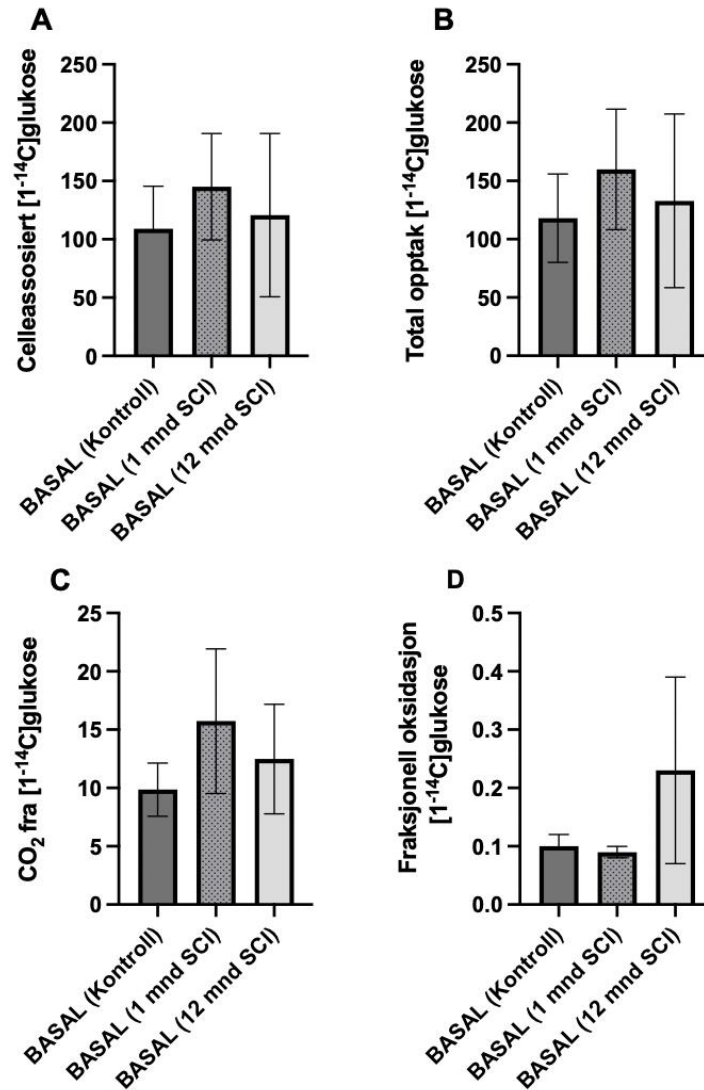
4.1.1 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller

For å undersøke om det skjer metabolske endringer i inaktiv skjelettmuskulatur ble basal oljesyre- og glukosemetabolisme studert i cellene hentet fra SCI-pasienter, 1 måned og 12 måneder etter skade. I tillegg, for å sammenligne med frisk skjelettmuskulatur, ble de samme forsøkene utført for celler fra funksjonsfriske kontrollpersoner. For dette formålet ble akkumulering, opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose og [1-¹⁴C]oljesyre studert ved hjelp av substratoksidasjonsmetoden. Resultatene er vist i figur 4.1 og 4.2.



Figur 4.1: Oljesyremetabolisme i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. (A) Celleassosiert radioaktivitet (CA), (B) totalt opptak (CA+CO₂), (C) oksidasjon (CO₂) og (D) fraksjonell oksidasjon (CO₂/(CA+ CO₂)) av radioaktiv merket oljesyre i SCI-mytuber, 1 og 12 måneder, og tilhørende kontroll-mytuber under basalforhold. Cellene ble behandlet med [^{14}C]oljesyrebehandling (0,5 Ci/ml, 100 M) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnittet ± SEM av absoluttverdi nmol/mg protein beregnet ved tosidig hypotesetest.

Statistiske beregninger viser ingen signifikante forskjeller i basal oljesyremetabolisme hverken for akkumulering, totalt opptak, oksidasjon eller fraksjonell oksidasjon av [^{14}C]oljesyre når SCI-mytuber sammenlignes mot basal (kontroll) (figur 4.1). Ingen signifikante forskjeller er heller ikke observert mellom SCI-1-mytuber og SCI-12-mytuber (figur 4.1).

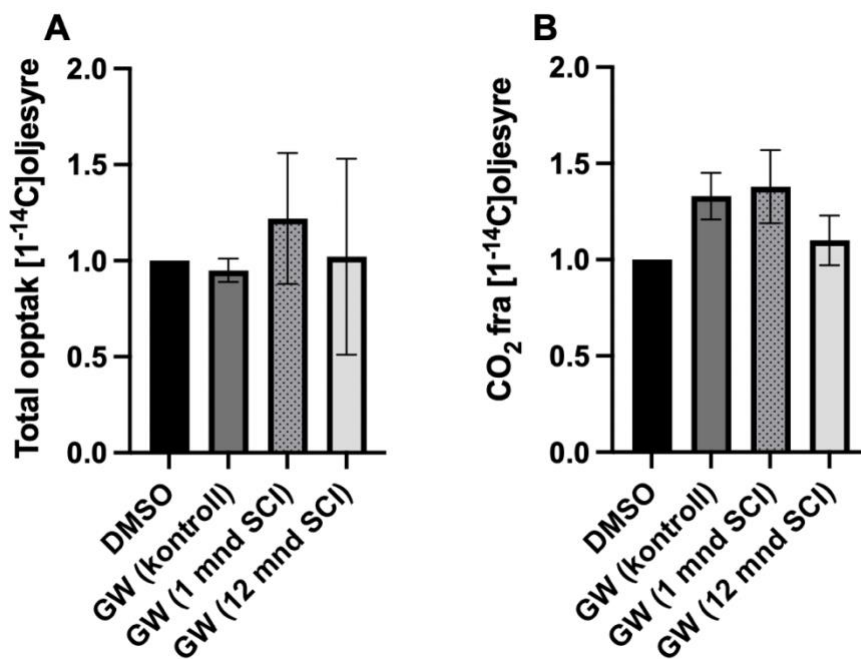


Figur 4.2: Glukosemetabolisme i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. (A) Celleassosiert radioaktivitet (CA), (B) totalt opptak (CA+CO₂), (C) oksidasjon (CO₂) og (D) fraksjonell oksidasjon (CO₂/(CA+ CO₂)) av radioaktiv merket glukose i SCI-myotuber, 1 og 12 måneder, og tilhørende kontroll-myotuber under basalforhold. Cellene ble behandlet med D-[¹⁴C(U)]glukose (100 μCi/ml, 200 μM) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnittet ± SEM av absoluttverdi nmol/mg protein beregnet ved tosidig hypotesetest.

Ingen signifikante forskjeller i basal glukosemetabolisme er observert hverken i akkumulering, totalt opptak, oksidasjon eller fraksjonell oksidasjon av D-[¹⁴C(U)]glukose når SCI-myotuber sammenlignes mot basal (kontroll) (figur 4.2). Ingen signifikante forskjeller er vist mellom SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber (figur 4.2).

4.1.2 Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på opptak og oksidasjon av oljesyre

For å studere effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på fettsyremetabolisme ble oksidasjon (CO₂) og opptak (CA+CO₂) av [1-¹⁴C]oljesyre målt i SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber som hadde fått tilsatt 10 nM GW501516 i differensieringsmediet i to døgn (avsnitt 3.5.1). Cellene ble deretter inkubert i fire timer med [1-¹⁴C]oljesyre. Resultatene er vist i figur 4.3.



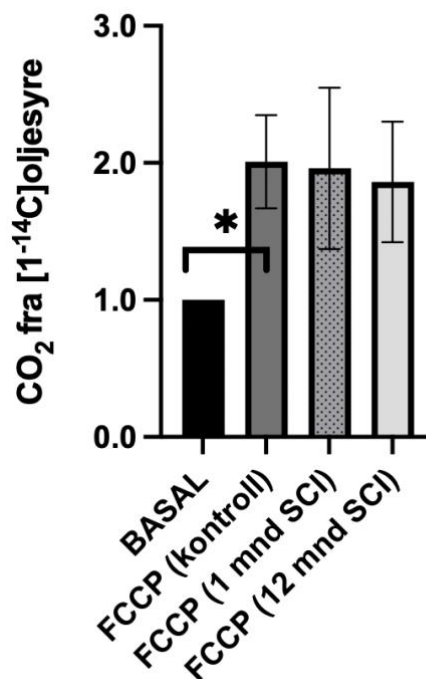
Figur 4.3: Effekt av behandling i 48 timer med PPAR δ -reseptoragonisten GW501516 på totalt opptak (CA+ CO₂) og oksidasjon (CO₂) for oljesyre i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. (A) totalt opptak og (B) oksidasjon av radioaktiv merket oljesyre i SCI-myotuber, 1 og 12 måneder, og tilhørende kontroll-myotuber etter behandling med GW501516. Noen celler fikk tilsatt 0,1% DMSO (negativ kontroll) og 10 nM GW501516 under differensieringsperioden. På forsøksdagen ble cellene behandlet med [1-¹⁴C]oljesyrebehandling (0,5 Ci/ml, 100 M) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, normalisert mot ubehandlet kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser; *p \leq 0,05 effekt av FCCP-behandling relativt til basal (DMSO), #p \leq 0,05 forskjeller mellom donorer. DMSO, Dimetylsulfoxid.

Som vist i figur 4.4 er ingen signifikante effekter av GW501516 relativt til basal (DMSO) observert for totalt opptak og oksidasjon av [1-¹⁴C]oljesyre, det er heller ingen forskjell mellom donorgruppene.

4.1.3 Effekter av FCCP på oksidasjon av oljesyre

Hensikten med dette forsøket var å studere oksidativ reservekapasitet i myotubene. Den mitokondrielle fettsyreoksidasjonen i cellene ble undersøkt ved å benytte en mitokondriell oksidativ fosforylerings frikopler: karbonylcyanid 4-(trifluorometoksy)fenyldiazon (FCCP). FCCP avkobler oksidativ fosforyleringen i cellene og forhindrer syntesen av ATP ved å få protongradienten som er forårsaket av elektrontransport over membranen til å kollapse [114]. Respirasjonen vil fortsette til det ikke er mer oksygen igjen [114]. Derfor gir FCCP en måling på den høyeste respirasjonshastigheten som en celle er i stand til å oppnå [115].

SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber ble tilsatt 1 μ M FCCP under substratoksidasjonsforsøket. Cellene ble inkubert i fire timer med [1- 14 C]oljesyre (avsnitt 3.5.1). CO₂-produksjon fra [1- 14 C]oljesyre ble målt etter behandling med FCCP og resultatene er vist i figur 4.4.

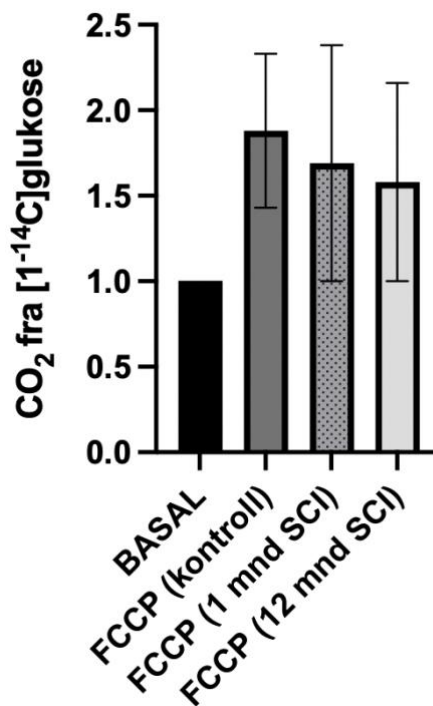


Figur 4.4: Effekt av behandling med FCCP i fire timer på oksidasjon (CO₂) for oljesyre i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargsskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. Noen celler fikk tilsatt 1 μ M FCCP under substratoksidasjonsforsøket. På forsøksdagen ble cellene behandlet med [1- 14 C]oljesyrebehandling (0,5 Ci/ml, 100 M) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnitt ± SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, normalisert mot ubehandlet kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser; *p ≤ 0,05 effekt av FCCP-behandling relativt til basal, #p ≤ 0,05 forskjell mellom donorer. FCCP; karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)-fenyldiazon.

Statistiske beregninger viser en signifikant høyere oljesyreoksidasjon i kontroll-mytotuber relativt til basal (ubehandlet kontroll) etter behandling med FCCP. Ingen statistisk signifikante forskjeller i FCCP-effekt er funnet i oljesyreoksidasjon i SCI-1-mytotuber og SCI-12-mytotuber relativt til basal (figur 4.3), det er heller ikke funnet forskjeller i FCCP-respons mellom donorgruppene (figur 4.4).

4.1.4 Effekter av FCCP på oksidasjon av glukose

Den mitokondrielle frikobleren, FCCP, ble også brukt til å studere mitokondriell glukoseoksidasjon i SCI-1-mytotuber, SCI-12-mytotuber og kontroll-mytotuber. Under substratoksidasjonsforsøket ble differensierte myotuber tilsatt 1 μM FCCP som videre ble behandlet 200 μM D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose i fire timer (avsnitt 3.5.1). CO_2 -produksjon fra D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose ble målt etter behandling med FCCP og resultatene er vist i figur 4.5.

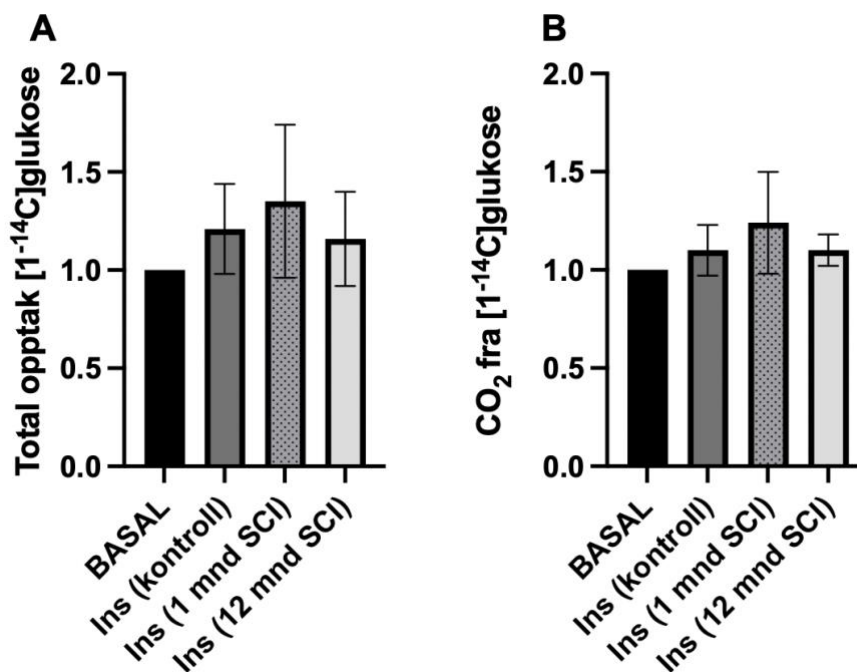


Figur 4.5: Effekt av behandling med FCCP i fire timer på oksidasjon (CO_2) for glukose i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargsskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. Noen celler fikk tilsatt 1 μM FCCP under substratoksidasjonsforsøket. På forsøksdagen ble cellene behandlet med D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose (100 $\mu\text{Ci/ml}$, 200 μM) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk ($n=4$) er presentert som gjennomsnitt \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, normalisert mot ubehandlet kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser. FCCP: karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)-fenyldiazon.

Statistiske beregninger viser ingen signifikante forskjeller i mitokondriell glukoseoksidasjon (CO_2) av D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose etter behandling med FCCP relativ til basal (ubehandlet kontroll) eller mellom donorgruppene (figur 4.5).

4.1.5 Behandlingseffekter av insulin på oksidasjon og opptak av glukose

For å studere behandlingseffekter av insulin på glukosemetabolisme ble oksidasjon (CO_2) og opptak ($\text{CA}+\text{CO}_2$) av D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose målt i SCI-1-mytuber, SCI-12-mytuber og kontroll-mytuber som hadde fått tilsatt 100 nM insulin under substratoksidasjonsforsøket (avsnitt 3.5.1). Cellene ble behandlet med 200 μM D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose i fire timer. Resultatene er vist i figur 4.6.



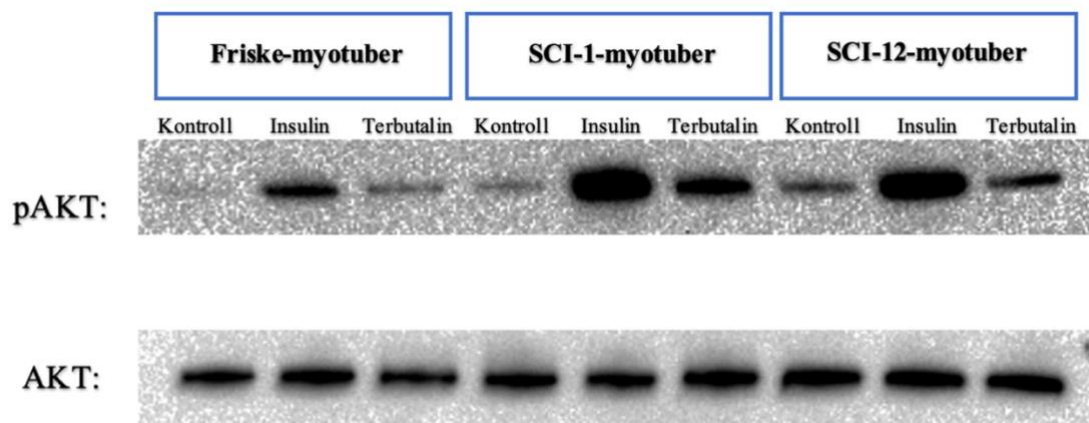
Figur 4.6: Effekt av behandling med insulin på totalt opptak (CO_2+CA) og oksidasjon (CO_2) for glukose i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroll. (A) totalt opptak og (B) oksidasjon av radioaktiv merket glukose i SCI-mytuber, 1 og 12 måneder, og tilhørende kontroll-mytuber etter insulinbehandling. Noen celler fikk tilsatt 100 nM insulin under substratoksidasjonsforsøket. På forsøksdagen ble cellene behandlet med D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 200 μM) før de ble plassert i et trappesystem. Trappesystemet med cellene ble satt i inkubator (37°C) i fire timer. Data fra fire uavhengige forsøk ($n=4$) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, normalisert mot ubehandlet kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser.

Ingen signifikante forskjeller er observert på total opptak og oksidasjon av D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose etter behandling med insulin relativ til basal (ubehandlet kontroll) og mellom donorgruppene (figur 4.6).

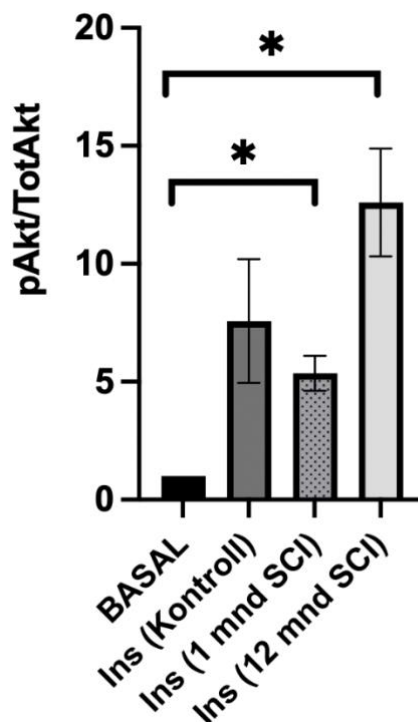
4.2 Effekt av insulin på fosforylering av Akt

Aktivering og fosforylering av Akt fører til translokasjonen av GLUT4 lagringsvesikler til plasmamembranen, noe som resulterer i økt glukoseopptak [15-16]. Akt-signalveien avgjørende for normalt metabolisme i kroppen, og ubalanse i signalveien kan føre til utvikling av fedme og T2D [116]. I en tidligere studie er det vist at insulin fremmer aktivering og fosforylering av Akt i muskelceller [117].

Det var ønskelig å studere insulineffekten på Akt-fosforylering i SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber ved hjelp av Western blot. Myotubene ble tilsatt 0,1 μM insulin i 15 minutter før de ble høstet til Westernblottforsøket (avsnitt 3.8.1). Figur 4.7 viser Westernblott fra et representativt forsøk. Figur 4.8 viser kvantifisert nivå av fosforylert Akt relativt til total mengde Akt i insulinbehandlede myotuber.



Figur 4.7: Westernblott med fosforylert Akt (pAKT) og total Akt (AKT) i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende kontroller etter terbutalin-og insulinbehandling. Noen myotuber ble tilsatt 0,1% DMSO og 1 μM terbutalin under differensieringsperioden og 0,1 μM insulin i 15 minutter før cellene ble høstet. DMSO ble benyttet som kontroll. Bildet viser Westernblott for pAkt og Akt fra ett av de fire forsøkene som ble utført under studien. DMSO, Dimetylsulfoxid.



Figur 4.8: Fosforylering av Akt i insulinbehandlede i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende kontroller etter insulinbehandling analysert ved Western blot. Noen brønner ble behandlet med 0,1 μ M insulin i 15 minutter før cellene ble høstet. Data viser fosforylert Akt (pAkt) relatert til total Akt (Akt) i insulinbehandlede myotuber. Data fra tre-fire uavhengige forsøk (n=3-4) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser; * $p \leq 0,05$ effekt av insulinbehandling relativt til basal.

Et signifikant økt nivå av ratio fosforylert Akt/total Akt etter insulinbehandling ble vist i SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber sammenlignet med ustimulerte celler (basal) (figur 4.8). I motsetning er ingen signifikante effekter av insulin observert på fosforylering av Akt i kontroll-myotuber relativt til basal. Ingen signifikante forskjeller er observert mellom donorgruppene etter behandling med insulin. Det ble også sett på effekter av terbutalin-behandling på Akt-fosforylering i myotubene, men det er ikke funnet noen forskjeller og derfor er ikke data vist.

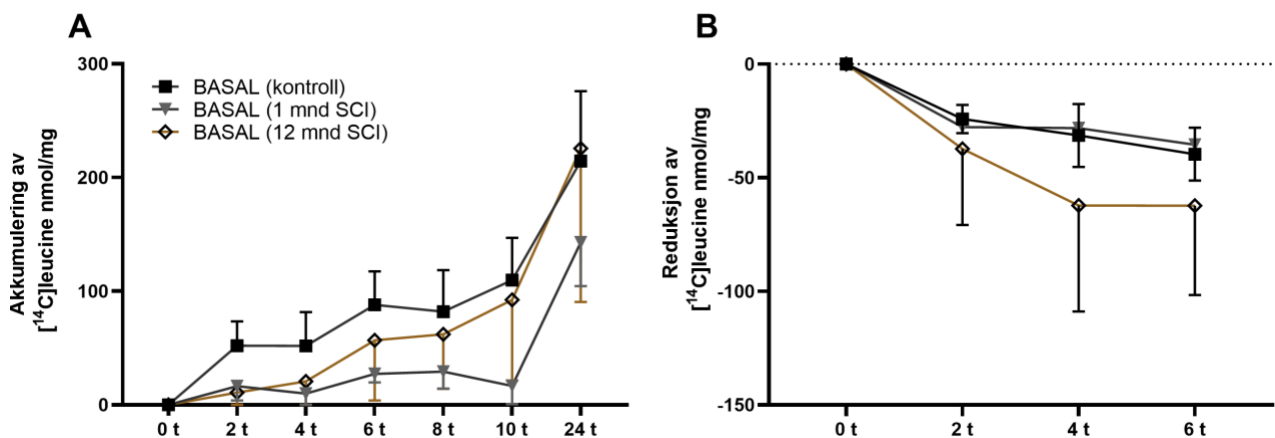
4.3 Leucinomsetning

For å karakterisere proteinomsetning i cellene hentet fra SCI-pasienter, 1 måned og 12 måneder etter skade, ble sanntidsakkumulering av den radioaktive isotopen [14 C]leucin studert i ubehandlede SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber ved hjelp av SPA. I tillegg, for å undersøke effekter av terbutalin på akkumulering og reduksjon av leucin, ble SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber behandlet med 1 μ M terbutalin i

differensieringsmediet i fire dager. Det ble også sett på effekter av behandling med 0,1 μM og 10 μM terbutalin i myotubene, men det er ikke funnet noen forskjeller og derfor er ikke data vist.

4.3.1 Sammenligning av basal leucinomsetning mellom skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller

For å studere proteinomsetning i skjelettmuskelceller hentet fra SCI-pasienter sammenlignet med funksjonsfriske kontroller ble akkumulering (syntese) og reduksjon (nedbrytning) av [^{14}C]leucin undersøkt. Ubehandlete SCI-myotuber- og kontroll-myotuber ble tilsatt 1,7 μM [^{14}C]leucin. Deretter ble akkumulering av leucin målt ved tidene 0, 2, 4, 6, 8, 10 og 24 timer i MicroBeta. Etter 24 timer ble cellene vasket og reduksjon av [^{14}C]leucin i cellene ble målt etter 0, 2, 4 og 6 timer.



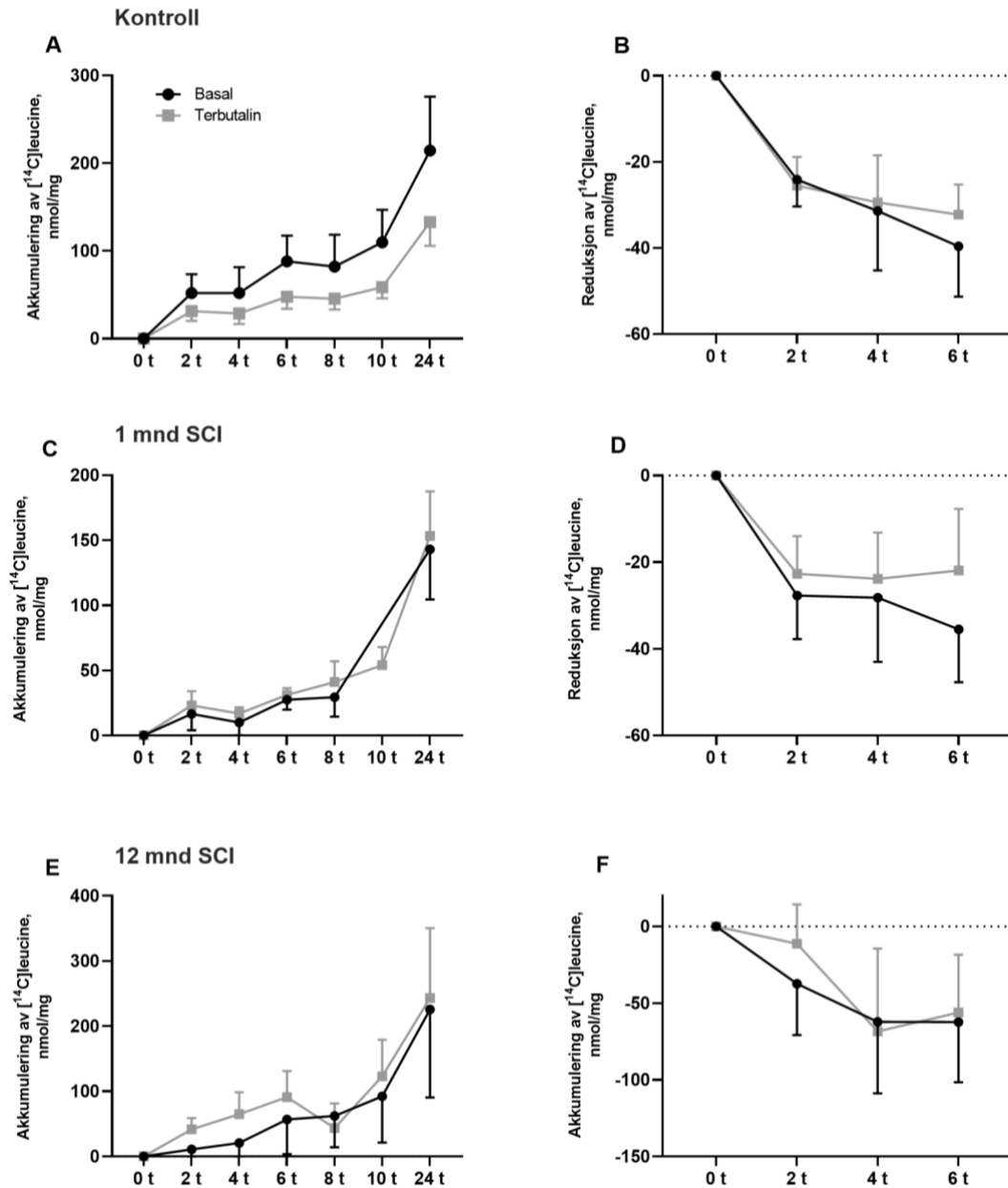
Figur 4.9: Leucinomsetning i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargsskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. (A) akkumulering og (B) reduksjon av [^{14}C]leucin i ubehandlede SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber. Cellene ble tilsatt [^{14}C]leucin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 1,7 μM) og målt i MicroBeta etter 0, 2, 4, 6, 8, 10 og 24 timer. Cellene ble deretter vasket og reduksjon av leucin ble målt etter 0, 2, 4 og 6 timer. Data fra tre-fire uavhengige forsøk ($n=3-4$) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absolutte verdier relatert til tid 0 (nt-0t). Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser.

Figur 4.9 viser sanntidsakkumulering og reduksjon av [^{14}C]leucin i ubehandlede SCI-myotuber og kontroll-myotuber. Ingen signifikante forskjeller mellom cellene er observert for akkumulering og reduksjon av [^{14}C]leucin innad i samme tidsintervall.

4.3.2 Effekter av terbutalin på leucinomsetning

For å studere effekter av terbutalin på proteinomsetning ble akkumulering og reduksjon av [^{14}C]leucin målt i SCI-1-myotuber, SCI-12-myotuber og kontroll-myotuber som hadde fått

tilsatt 1 μM terbutalin i differensieringsmediet i fire dager (avsnitt 3.4). Myotubene ble tilsatt $[^{14}\text{C}]$ leucin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 1,7 μM leucin) og telt ved forskjellige tidsintervaller over 24 timer. Etter 24 timer ble myotubene vasket og reduksjon av $[^{14}\text{C}]$ leucin ble målt etter 0, 2, 4 og 6 timer. Resultatene er vist i figur 4.10.



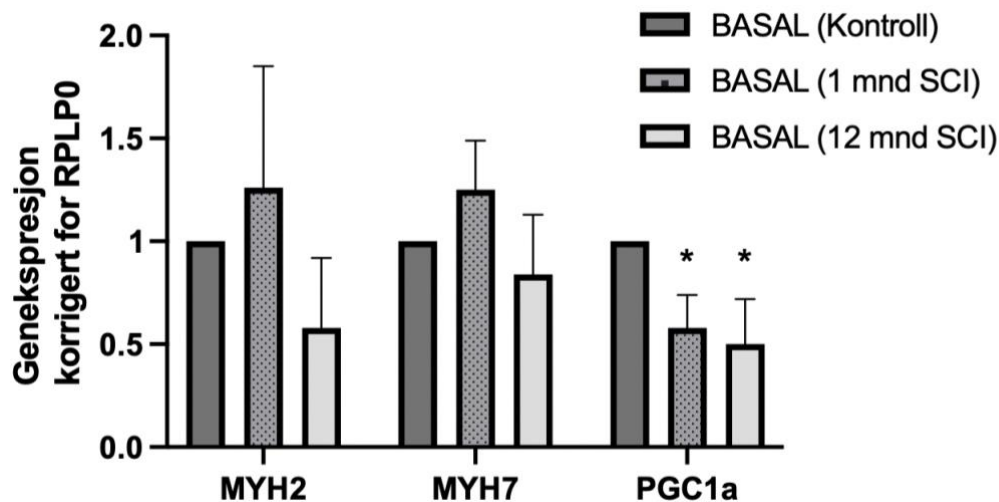
Figur 4.10: Effekter av 96 timers behandling med terbutalin på msetning av leucin i humane muskceller fra pasienter med ryggmargsskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og fra tilhørende friske kontroller. (A-B) akkumulering og reduksjon av $[^{14}\text{C}]$ leucin i kontroll-myotuber. (C-D) akkumulering og reduksjon av $[^{14}\text{C}]$ leucin i SCI-1-myotuber. (E-F) akkumulering og reduksjon av $[^{14}\text{C}]$ leucin i SCI-12-myotuber etter behandling med terbutalin. Cellene ble behandlet med 1 μM terbutalin under differensieringsfasen. På forsøksdagen ble $[^{14}\text{C}]$ leucin (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 1,7 μM leucin) tilsatt og målt i MicroBeta ved tidene 0, 2, 4, 6, 8, 10 og 24 timer. Cellene ble deretter vasket og reduksjon av radioaktivitet i cellene ble målt etter 0, 2, 4 og 6 timer. Data fra tre-fire uavhengige forsøk ($n=3-4$) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absolute verdier relatert til tid 0 (nt-0t). Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser.

Figur 4.10 viser ingen signifikante effekter av terbutalin på akkumulering og reduksjon av [¹⁴C]leucin relativ til basal og mellom donorgruppene.

4.4 Genuttrykk

4.4.1 Genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α i skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadde og friske kontroller

Det var ønskelig å undersøke om endringer i genekspresjon forekommer i celler fra inaktiv skjelettmuskulatur sammenlignet med celler fra funksjonsfrisk skjelettmuskulatur. Dermed ble ekspresjon av utvalgte gener; MYH2, MYH7 og PGC1 α studert i ubehandlede SCI-myotuber- og kontroll-myotuber. De strukturelle genene MYH2 og MYH7 er viktige for skjelettmuskulaturens oppbygning. PGC1 α er viktig for mitokondriefunksjon og dermed energimetabolisme. mRNA-ekspresjon av MYH2, MYH7 og PGC1 α ble analysert ved kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon og er videre justert for gjennomsnittet av ribosomalt fosfoprotein P0 (RPLP0).

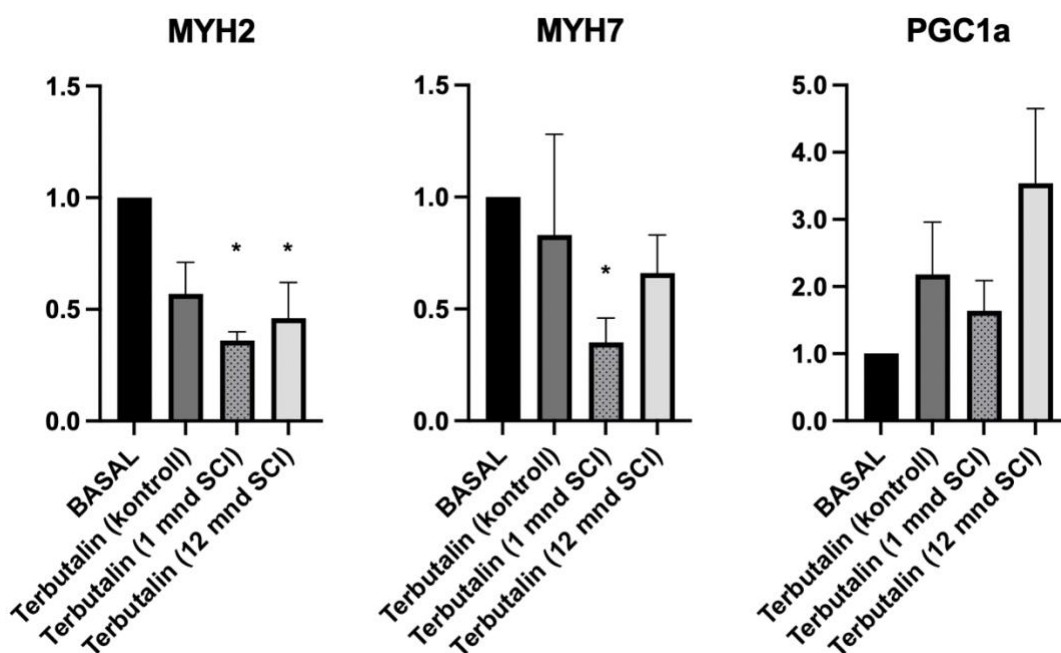


Figur 4.11: mRNA-uttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α (PPARGC1alfa) i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargsskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller. Basalt genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α ble analysert ved kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR), og ble justert for gjennomsnittet av RPLP0. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, relatert til kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser; *p \leq 0,05 når myotuber sammenlignes med basal (kontroll). RPLP0, ribosomalt fosfoprotein P0; MYH2, myosin tungkjedegen-2; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; PGC1alfa, peroksisom proliferator aktivert reseptor gamma-koaktivator 1-alfa; PPARGC1alfa, peroksisom proliferator aktivert reseptor gamma-koaktivator 1-alfa (gen).

Figur 4.11 viser basalt genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α i kontroll-myotuber, SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber. Statistiske beregninger viser signifikant lavere uttrykk av PGC1 α i ubehandlede SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber, sammenlignet med kontroll-myotuber, men ingen signifikante forskjeller er observert mellom SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber. Det var heller ingen signifikante forskjeller observert i uttrykk av MYH2 og MYH7 i mellom celler fra ulike donorgrupper (figur 4.11).

4.4.2 Behandlingseffekter av terbutalin på genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α

For å undersøke effekter av terbutalin på genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α ble myotubene behandlet med 1,0 μ M terbutalin i differensieringsmediet i fire dager (avsnitt 3.7.1). Genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α ble målt ved qPCR og er videre justert for gjennomsnittet av RPLP0.



Figur 4.12: Genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α (PPARGC1alfa-gen) i humane muskelceller fra pasienter med ryggmargskade (SCI), 1 og 12 måneder etter skade, og tilhørende friske kontroller etter behandling med terbutalin i 96 timer. (A) Genuttrykk av MYH2-, (B) MYH7- og (C) PGC1 α i kontroll-myotuber, SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber etter behandling med 1,0 μ M terbutalin. Uttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α ble analysert ved kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR) og videre justert for gjennomsnittet av RPLP0. Data fra fire uavhengige forsøk (n=4) er presentert som gjennomsnittet \pm SEM av absoluttverdi nmol/mg protein, relatert til ubehandlet kontroll. Tosidig hypotesetest er brukt for å beregne statistiske analyser; * $p \leq 0,05$ relativ til basal. RPLP0, ribosomalt fosfoprotein P0; MYH2, myosin tungkjedegen-2; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; PGC1alfa, peroksisom proliferator aktivert reseptor gamma-koaktivator 1-alfa; PPARGC1alfa, peroksisom proliferator aktivert reseptor gamma-koaktivator 1-alfa (gen).

Figur 4.12 viser genekspressjon av MYH2, MYH7 og PGC1 α i kontroll-myotuber, SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber etter behandling med 1,0 μ M terbutalin. Statistiske beregninger viser at behandling med terbutalin ga signifikant lavere uttrykk av MYH2 i SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber relativ til basal (ubehandlet kontroll). I SCI-1-myotuber er det også vist et signifikant lavere uttrykk av MYH7 etter behandling med terbutalin. Ingen signifikante endringer er funnet i genekspressjon av PGC1 α i nærvær av terbutalin. Det ble også sett på effekter av GW501516-behandling på uttrykk av de samme genene i myotubene, men det er ikke funnet noen effekter og derfor er ikke data vist.

5 Diskusjon

5.1 Metodologiske betraktninger

5.1.1 Humane skjelettmuskelceller i kultur

I denne studien ble isolerte satellittceller fra skjelettmuskelbiopsier fra ryggmargsskadede pasienter, 1 måned og 12 måneder etter skade, og funksjonsfriske kontroller benyttet. Humane satellittceller fra skjelettmuskelbiopsier kan isoleres [118] og deretter aktiveres til myoblaster via proliferasjon og differensieres til flerkjernede myotuber *in vitro* [108, 118]. Myoblaster kan lagres i flytende nitrogen etter biopsiisolering uten å miste evnen til å proliferere og differensiere [118].

Myotuber *in vitro* er en god modell for studie av skjelettmuskulatur, da de har vist seg å gjenspeile flere morfologiske og metabolske egenskaper som skjelettmuskelceller *in vivo* har [108, 119-120]. Myotuber i kultur kan brukes for å undersøke de molekylære mekanismene bak skjelettmuskulaturens metabolske aktiviteter [121]. Disse skjelettmuskelcellene er også enklere å arbeide med siden det ikke er noen endokrin effekt og dermed kan det ekstracellulære miljøet være mer kontrollert [108].

Det er flere begrensninger med *in vitro*-modellen, inkludert fraværet av flere viktige bioaktive komponenter fra andre vev i det ekstracellulære miljøet *in vivo* og direkte celle-til-celle kommunikasjon med andre celletyper som for eksempel nerveceller [108]. Myotuber *in vitro* og skjelettmuskelceller *in vivo* er forskjellige blant annet ved at førstnevnte har et større GLUT1:GLUT4-forhold. Lavere ekspresjon av GLUT-4-transportøren fører til at insulinstimulert glukoseopptak i myotubene vil være relativt redusert sammenlignet med skjelettmuskelceller *in vivo* [108]. Videre er mRNA-uttrykk av enkelte gener rapportert å være lavere *in vitro* enn *in vivo* [108]. Imidlertid er det også observert at myotuber *in vitro* har lavere oksidative kapasitet enn skjelettmuskelceller *in vivo* [108]. En annen begrensning er at skjelettmuskelcellenes evne til å proliferere og differensiere *in vitro* avtar etter hvert som antall passasjer øker. Økning av antall passasjer bremser også metabolske aktiviteter i skjelettmuskelceller, inkludert glukoseopptak, syntese av glykogen, oksidasjon av glukose og betaoksidasjon av fettsyrer [122].

I denne studien ble samme celledyrkningsprosedyre og *in vitro*-modell brukt for alle muskelceller. Muskelceller med lavt passasjetall (passasje 3, p3) ble brukt for å forhindre påvirkning av deres metabolske kapasitet og evne proliferasjon og differensiering *in vitro*. SCI-gruppen og kontroll-gruppen besto av donorer med tilsvarende KMI, kjønn og alder (tabell 3.3 og tabell 3.4). De ulike donorene viste seg å vokse forskjellig. I de fleste tilfellene prolifererte myoblastene fra kontroll-donorene raskere, og de nådde 80 % konfluens før SCI-donorene. For kontroll-myoblastene kunne differensieringsprosessen settes i gang etter fem-seks dager, mens SCI-myoblaster ofte hadde en lengre proliferasjonsperiode og differensieringen ble satt i gang etter seks-åtte dager. SCI-12-myoblaster viste også langt større variasjon. I noen tilfeller var SCI-12-myoblaster i stand til å differensieres etter seks-åtte dager, men i andre tilfeller kunne proliferasjonsperioden vare i mer enn ti dager. Selv om muskelcellene vokste med forskjellige hastigheter, var alle tilstrekkelig differensierte før forsøk, basert på visuell inspeksjon i mikroskop.

5.1.2 Metodene

Substratoksidasjonsmetoden som ble etablert i 2007 av Wensaas et al [109], er benyttet til å studere fettsyre- og glukosemetabolisme i skjelettmuskelceller *in vitro* ved bruk av radiomerket oljesyre- og glukose. For å se på proteinomsetning i humane myotuber ble sanntidsakkumulering og degradering av radiomerket leucin studert ved hjelp av scintillation proximity assay. SPA- og substratoksidasjonsforsøkene ble utført i 96-brønners brett, noe som gjør metodene effektive og praktiske. For måling av proteinmengden i myotubene ble Bradfords metode benyttet. Bradfords metode ble utviklet i 1976 av Marion Bradford [110] og er godt validert. Genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α i myotubene ble målt med qPCR, der produsentenes utarbeidede metode ble benyttet. RPLP0 ble benyttet som et referansegen (endogen kontroll) for justering av ulik mengde RNA tilsatt i prøvene. For å undersøke insulinstimulert Akt-fosforylering i myotubene ble Westernblotting brukt. Ved hjelp av antistoffer ble fosforylert Akt og total Akt kvantifisert, og fosforylert Akt ble korrigert mot total Akt.

5.2 Diskusjon av resultatene

5.2.1 Basal oljesyre- og glukosemetabolisme

Ryggmargsskadde pasienter med inaktiv og etter hvert atrofiert skjelettmuskulatur utvikler betydelig hyperinsulinemi, insulinresistens, økt visceralt fett, unormale lipidprofiler, lavere

muskelmasse og redusert benteitet [93-94, 107]. Dette øker risikoen for metabolske sykdommer, inkludert T2D, fedme og kardiovaskulære sykdommer [86, 93-94, 106-107]. Muskelatrofi, som er et vanlig symptom på ryggmargsskade, kjennetegnes av endringer i fibertypesammensetningen av den skadede skjelettmuskelen. Muskulaturen vil hovedsakelig bestå glykolytiske muskelfibre som erstatter oksidative muskelfibre [95, 121]. De ulike muskelfibertypene kan ha ulikt energimetabolisme. Glykolytiske fibre har en høyere oksidasjon og et mer effektivt forbruk av glukose enn oksidative fibre. Det er også vist i studier at atrofiert muskel er mer avhengig av glukose for energi [124-125]. Det kan derfor antas at denne egenskapen gjenspeiles i eksempelvis glukoseopptaket i SCI-myotuber *in vitro*. I tillegg til morfologiske endringer, reduserer SCI også kapasiteten til fettsyreoksidasjon i skjelettmuskulaturen [126-127]. Studier har vist at β -oksidasjon var redusert i skjelettmuskulatur etter SCI *in vivo*, noe som ble gjenspeilt i nedgang i opptak av frie fettsyrer, nivåer av oksidative enzymer og mitokondrieinnhold [126-127]. I en studie av Savikj *et al.* [73] ble oksidasjon av palmitinsyre målt ved et radioaktiv tracer-basert assay i SCI-myotuber og kontroll-myotuber fra funksjonsfriske. Funn fra denne studien viste at SCI-myotuber og funksjonsfriske kontrollceller var i stand til å oksidere palmitinsyre på et sammenlignbart nivå [73]. Det ble også vist, til tross for metabolske endringer som oppstår i skjelettmuskulaturen *in vivo*, at myotuber fra SCI-pasienter hadde normal fettsyremetabolisme [73]. Resultatene fra denne masteroppgaven viste heller ingen signifikante forskjeller i basal fettsyre- og glukosemetabolisme mellom de ulike donorgruppene, hverken for SCI-myotuber mot kontroll-myotuber eller mellom SCI-myotuber. Få forsøk og store donorvariasjoner i denne studien kan ha gjort det vanskelig å oppdage mulige endringer i basal fettsyre- og glukosemetabolisme.

5.2.2 Basal leucin-omsetning

I muskelceller er det en balanse mellom proteinsyntese og proteinnedbrytning [71]. Forstyrrelser i proteinbalansen kan gi muskelatrofi [72]. Muskelatrofi hos personer med SCI kan svekke metabolismen i kroppen og øke risikoen for metabolske sykdommer [101]. I dag finnes ingen standardbehandling for muskelatrofi etter SCI [93]. I denne studien ble proteinomsetning i muskelceller fra SCI-pasienter og funksjonsfriske undersøkt. Sanntidsakkumulering og degradering av radiomerket leucin ble målt på forskjellige tidspunkter i SCI-myotuber og kontroll-myotuber. Ingen studier har så langt undersøkt tilsvarende leucinakkumulering- og degradering i ubehandlede muskelceller fra SCI-pasienter.

Resultatene fra forsøkene viste ingen signifikante forskjeller i akkumulering og degradering mellom donorgruppene. Likevel er det en tendens til at leucinakkumulering (som et mål på proteinsyntese) er lavere, mens leucinreduksjon (som indikerer proteinnedbrytning) tenderer til å være større i SCI-celler enn i kontroll-celler. Resultatene fra denne studien kan dermed indikere at etter SCI vil hastigheten på proteinsyntesen reduseres og proteinnedbrytningen økes i muskelcellene. For å kunne trekke sikre konklusjoner om proteinomsetning i muskelceller fra SCI-pasienter er det imidlertid nødvendig med flere forsøk på flere donorer.

5.2.3 Genuttrykk

MYH7 og MYH2 koder for henholdsvis MHC-I langsomme oksidative type I- og MHC-IIa raske oksidative type II-fibre [31-32]. Flere *in-vivo* studier har knyttet SCI til reduksjon i MHC-I og økning i MHC-II i skjelettmuskulaturen, noe som antyder et skifte i sammensetning av fibertype fra langsomme type I-fibre til stort sett raske type II-fibre [128-129]. En studie observerte høyere nivåer av MHC-II og en lignende tendens for MHC-I i myotuber *in vitro* fra SCI-pasienter [73]. I motsetning til tidligere studier viste resultatene i denne studien ingen signifikante forskjeller i uttrykk av MYH2 og MYH7 mellom donorgruppene, hverken i SCI-myotuber sammenlignet med kontroll-myotuber eller mellom SCI-donorer. Det var en tendens til lavere uttrykk av MYH2 i SCI-12-myotuber. Dette kan kanskje tyde på forandringer i fibertypesammensetning i løpet av det første året etter skade, men flere forsøk er nødvendig for å kunne si noe sikkert om dette.

PGC1 α er en koaktivator ved transkripsjon som regulerer mitokondriell biogenese, og er derfor viktig for kroppens energimetabolisme [57, 59]. PGC1 α spiller også en sentral rolle i ombygging av skjelettmuskulatur ved å skifte fibertypesammensetningen fra glykolytiske type II-fibre til de mer oksidative type I-fibre [59]. Det er rapportert at både SCI-individer og funksjonsfriske viste en positiv korrelasjon mellom ekspresjonen av PGC-1-genet og andelen oksidative type I-fibre [130]. Mitokondriell dysfunksjon i ryggmargen er en velkjent bivirkning av SCI. Hu *et al.* observerte lavere PGC-1 α -nivåer etter SCI sammenlignet med sunt vev [132]. Mitokondriell dysfunksjon etter SCI hindrer funksjonell utvinning [132]. I en annen studie er det også rapportert lavere ekspresjonen av PGC-1 α etter SCI [133]. I denne masteroppgaven ble genuttrykk av PGC-1 α undersøkt i SCI-myotuber og kontroll-myotuber under basalforhold. Resultatene viste en signifikant lavere uttrykk av PGC1 α i ubehandlede

SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber sammenlignet med ubehandlede kontroll-myotuber, noe som er i samsvar med funn i tidligere studier [132].

5.2.4 Effekter av FCCP på oljesyre- og glukosemetabolisme

Mitokondriefunksjonen i SCI-myotuber og kontroll-myotuber ble undersøkt ved bruk av den mitokondrielle frikobleren FCCP. FCCP frikobler elektrontransporten fra syntesen av ATP [133]. Dette medfører at ATP-syntesen i cellen blir blokkert, samtidig som elektrontransporten forsetter og den respiratoriske kjeden blir upåvirket. Tilsetning av FCCP kan derfor gi informasjon om den maksimale oksidative kapasiteten myotubene kan oppnå. I denne studien ga akutt tilsetning av FCCP i kontroll-myotuber signifikant høyere oljesyreoksidasjon sammenlignet med ubehandlede celler, i samsvar med at mitokondrielle avkoblere øker mitokondriell respirasjon, noe som gir et økt oksygenforbruk [134]. Effekten av FCCP var ikke signifikant i SCI-myotuber, noe som sannsynligvis skyldes stor variasjon mellom forsøkene. Det var tendens til høyere glukoseoksidasjon i SCI-myotuber og kontroll-myotuber etter behandling med FCCP, men ingen signifikante effekter. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom donorgruppene, selv om det var en mulig tendens til lavere effekt av FCCP i SCI-cellene. I henhold til funnene i denne oppgaven er det ikke mulig å fastslå om FCCP-frikoblingseffekten på oksidasjon av glukose- og oljesyre var endret hos SCI-myotuber sammenlignet med kontroll-myotuber.

5.2.5 Effekter av GW501516 på oljesyremetabolisme

Den selektive og potente PPAR δ -agonisten GW501516 har i flere studier vist å være involvert i fettsyremetabolismen. Det er observert at behandling med GW501516 oppregulerer gener som er involvert i fettsyremetabolisme, samtidig som β -oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskulaturen øker [56]. I studien til Dressel *et al.* [135] ble myotuber fra mus *in vitro* forbehandlet med GW501516 i to dager, og det ble demonstrert at PPAR δ -agonisten oppregulerte ekspresjonen av en rekke gener involvert i fettsyreopptak og -oksidasjon [135]. Studier på dyrkende humane myotuber har også vist at GW501516 øker fettsyremetabolismen [136-138]. I en studie på myotuber fra alvorlig overvektige personer med og uten T2D ble det observert blant annet økt fettsyreoksidasjon og -opptak i myotubene som følge av GW501516-behandling [139]. I tillegg er det rapportert at PPAR δ -aktivering i muskelceller kan endre fibersammensetningen mot en høyere oksidativ fenotype [52-53]. Det er derfor diskutert om GW501516 kan være et aktuelt legemiddel i forebygging av fedme og T2D [55].

Funn fra denne studien viste en tendens til økt oksidasjon av oljesyre etter GW501516-behandling i kontrollceller og SCI-1-myotuber, men ingen signifikante effekter ble funnet av GW501516 på opptak eller oksidasjon av oljesyre, hverken i SCI-myotuber og kontroll-myotuber. Det kan se ut som GW-responsen på oljesyreoksidasjonen er lavere i SCI-12-myotuber enn i SCI-1-myotuber og myotuber fra kontroller. Imidlertid er det nødvendig med flere forsøk for å trekke konklusjoner angående GW501516-effekter på myotuber fra SCI-pasienter.

5.2.6 Effekt av insulin på glukosemetabolisme og fosforylering av Akt

Insulin fremmer glukoseopptak i skjelettmuskelceller [140-141]), og ca. 80% av kroppens totale insulinstimulerte glukoseopptak skjer i skjelettmuskulaturen [39]. Resistens mot insulinvirking i skjelettmuskulatur anses som et tidlig tegn på utviklingen av T2D [142]. Tidligere er det vist at pasienter med langvarig SCI har vesentlig redusert glukosetoleranse [143] og dårligere insulinstimulert glukoseopptak, noe som kan øke risikoen for metabolske sykdommer inkludert utvikling av insulinresistens og T2D [93, 123]. For å studere insulinresponsen i SCI-myotuber og kontroll-myotuber ble effekten av insulin på glukosemetabolisme og fosforylering av Akt undersøkt.

I skjelettmuskel er GLUT4 den viktigste glukosetransportøren for insulinstimulert glukoseopptak [25]. Ingen tidligere studier har sett på insulinstimulert glukoseopptak og -oksidasjon i dyrkede SCI-myotuber. Maier *et al.* viste at pasienter med T2D har betydelig lavere GLUT4-uttrykk i skjelettmuskulatur, noe som indikerer redusert insulinstimulert glukoseopptak [144]. Det kan dermed antas at lavere GLUT4-uttrykk og redusert insulinstimulert glukoseopptak kan gjenspeiles i muskelceller fra SCI-pasienter i likhet med det som ble gjort hos T2D-pasienter. I denne studien ga insulin ingen signifikant økning av glukoseopptak og -oksidasjon, hverken i SCI-myotuber eller i kontroll-myotuber. Som forklart tidligere uttrykker skjelettmuskelceller *in vitro* mindre av GLUT-4-transportøren enn skjelettmuskelceller *in vivo* [108, 118]. Lavt uttrykk av GLUT-4-transportøren i myotubene kan være en mulig årsak til dette. Savikj *et al.* observerte et lavere proteinuttrykk av GLUT-4 i muskler fra ryggmargsskadede pasienter [73], men dette er ikke studert i denne oppgaven.

Insulin virker ved å binde IR, og når insulin bindes til IR i muskelceller, resulterer det i en kompleks signalkaskade. Dette fører bl.a. til at Akt og AS160 blir fosforylert, noe som øker

translokasjonen av GLUT-4 lagringsvesikler til cellemembranen [15-16]. Western immunblotting ble benyttet for å undersøke insulinstimulert Akt-fosforylering i SCI-myotuber og kontroll-myotuber. Det ble valgt å benytte Akt fordi Akt spiller en sentral rolle i insulinsignalveien som et signalprotein for aktivering av glukoseopptak (gjennom GLUT4-translokasjon) i muskelceller [143]. Det var forventet at insulin ville gi en økning i Akt-fosforylering i myotubene sammenlignet med basal. I denne studien ble det observert et signifikant økt nivå av ratio fosforylert Akt/total Akt etter insulinbehandling i SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber sammenlignet med ustimulerte celler (basal). Ingen signifikante effekter av insulin ble funnet på fosforylering av Akt i kontroll-myotuber relativ til basal, noe som kan skyldes stor variasjon mellom forsøkene. Tidligere studier har funnet at progresjonen av metabolske sykdommer har vært knyttet til abnormiteter i insulinsignalering via Akt i skjelettmuskulaturen, og insulins manglende evne til å stimulere glukoseopptak og glykogensyntese er blitt assosiert med disse defektene [145]. Forskning har observert en moderat lavere insulinstimulert Akt-fosforylering i myotuber *in vitro* fra T2D-pasienter vs. funksjonsfriske [146-147]. Ingen tidligere publikasjoner har studert insulinstimulert fosforylering av Akt i SCI-myotuber som i våre studier. Derimot er det gjort studier hvor nivået av fosforylert Akt (Ser473) og (Thr308) ble målt i myotuber fra ryggmargsskadede og funksjonsfriske individer. Nivået av Akt Ser473- og Thr308-fosforylering var uendret hos ryggmargsskadede i løpet av det første året etter SCI [73]. En annen studie observerte en signifikant økning i Akt Ser473-fosforylering etter 60 minutter med nevromuskulær elektrisk stimuleringsindusert motstandstrening i SCI-gruppen, men ingen signifikant endring ble funnet i funksjonsfriskekontroll-gruppen [143]. Resultatene i denne studien viste heller ingen signifikante forskjeller mellom donorene. For å avklare forskjellene mellom donorene, ville det være ønskelig å gjennomføre flere forsøk. Videre er Western blotting en semikvantitativ metode som består av flere trinn utført over 2-3 dager. Det kan dermed oppstå variasjoner under utføring av metoden som kan ha en innvirkning på resultatene.

5.2.7 Effekter av terbutalin på leucinomsetning og genuttrykk

Ved å oppregulere proteinsyntese og nedregulere proteinnedbrytning har β 2-reseptoragonister vist å spille en rolle for muskelmassen [148]. β 2-reseptoragonisters hypertrofiske egenskaper har vist å øke muskelmasse og forhindrer muskelatrofi [178]. Med disse egenskapene er β 2-reseptoragonister mulige kandidater i behandling av fedme, T2D, og inaktivitets- og aldersrelatert muskelatrofi [77, 149-150]. Tidligere *in vivo*- og *in vitro*-studier har rapportert

at behandling med β 2-agonister fremmer muskelhypertrofi [151-153]. Bare få *in vitro*-studier har vist hypertrofe effekter av β 2-agonister [154-155]. Skagen *et al.* viste økt akkumulering av [^{14}C]leucin etter forbehandling (96 timer) med den β 2-adrenerge agonisten terbutalin i humane myotuber fra friske menn sammenlignet med ubehandlede celler, mens nedbrytningen av [^{14}C]leucin ikke ble påvirket av terbutalin [156]. I denne studien ble effekten av terbutalin på proteinomsetning i SCI-myotuber og kontroll-myotuber undersøkt. Myotubene ble behandlet med terbutalin i 96 timer før SPA-forsøk med radiomerket leucin ble gjennomført. Resultatene fra forsøkene viste ingen signifikante effekter av terbutalin på akkumulering eller reduksjon av leucin i noen av donorgruppene. Så langt har ingen publikasjoner sett på tilsvarende effekter av terbutalin på skjelettmuskelceller fra personer med SCI. Å utføre flere forsøk på flere donorer er nødvendig for å avklare en mulig forskjell mellom donorene i nærvær av terbutalin.

Overgang fra langsomme til raske fenotyper etter kronisk behandling med β 2-resptoragonister er blitt vist i flere studier [157-158]. I motsetning til dette viste resultatene fra forsøkene våre en signifikant nedregulering av MYH2 i terbutalinbehandlede SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber sammenlignet med kontroll-myotuber, noe som kan tyde på mindre uttrykk av raske fibre etter terbutalinbehandling i vår modell. En tidligere studie observerte en nedregulering i mRNA- og proteinnivået av MYH7 i myotuber *in vitro* etter behandling med terbutalin [156]. Funn fra denne masteroppgaven viste også lavere uttrykk av MYH7 etter behandling med terbutalin, med dette var bare signifikant i SCI-1-myotuber.

Effekt av terbutalin på genuttrykk av PGC-1 α ble også undersøkt. Resultatene viste ingen signifikante endringer i genekspressjon av PGC1 α i nærvær av terbutalin mot basal og mellom donorene. Tidligere studie rapportert at langtidsvirkende β 2-resptoragonist, formoterol, øker ekspressjon av PGC-1 α og forbedrer skjelettmuskulaturen etter en SCI. En annen studie viste gjort på humane myotuber *in vitro* viste en økt mRNA-uttrykket av PGC-1 α etter forbehandling med terbutalin [156]. Til sammenligning støtter ikke resultatene i denne studien med tidligere funn. Det vil være nødvendig å utføre flere forsøk på flere donorer for å fange opp mulige effekter av terbutalin på ekspressjon av PGC-1 α i dyrkede SCI-myotuber.

5.3 Veien videre

I denne studien ble substratoksidasjonsforsøk, SPA, Western blot og qPCR utført på 4 utvalgte SCI-donorer og tilsvarende funksjonsfriske kontrolldonorer. Å kjøre flere forsøk med alle de åtte tilgjengelige donorene, kan være nyttig for å se om flere donorer påvirker resultatene. Videre hadde det vært interessant å se på genekspressjonen av GLUT4 og PDK4 i ubehandlede og GW501516-behandlede skjelettmuskelceller fra SCI-pasienter sammenlignet med funksjons friskekontroller for å få et bedre bilde av fetttsyre- og glukosemetabolisme i inaktiv skjelettmuskulatur, samt undersøke hvordan PPAR δ -aktivering påvirker disse. I tillegg kan måling av mRNA-ekspressjon av enzymet MMP-2 i muskelceller etter terbutalin-behandling være aktuelt. Dette enzymet er benyttet som en markør for hypertrofi i skjelettmuskulatur [156]. Det bør vurderes å utføre proteomikk på de forskjellige donorene, noe som kan gi mulighet for å se på flere forskjeller i muskelcellene.

Å identifisere relevante molekylære mekanismer som ved aktivering vil øke energiutnyttelsen og fremme vekst i skjelettmuskulaturen, er viktig for kunne å behandle inaktivitetsrelaterte sykdommer i fremtiden. Sarkoplasmatiske retikulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)-pumpe har fått økt interesse på grunn av dens evne til å forbedre cellulær energiforbruket uten å kreve muskelkontraksjon. Elektrisk puls-stimulering (EPS) er en *in vitro* utholdenhetstreningsmetode som brukes til å studere treningeffekten i dyrkede skjelettmuskelceller. Det vil derfor være aktuelt å se hvordan SERCA-modulering og EPS kan øke energiutnyttelsen av glukose og fettstoffer, indukere hypertrofistyrer veier og fremme fibertypeovergang i skjelettmuskelceller hentet fra SCI-pasienter og funksjonsfriske kontroller.

6 Konklusjon

Metabolske forstyrrelser forårsaket av SCI og den påfølgende muskelatrofien øker risikoen for fedme, T2D og kardiovaskulære sykdommer i denne pasientgruppen. Per dags dato er metabolske endringer i skjelettmuskulaturen hos SCI-pasienter mangelfullt utforsket. Denne studien har tatt for seg *in vitro*-forsøk hvor oljeyre- og glukosemetabolisme, leucinomsetning, insulinstimulert Akt-signalering og genuttrykk av MYH2, MYH7 og PGC1 α er blitt undersøkt i dyrkende skjelettmuskelceller fra ryggmargsskadede pasienter, 1 måned og 12 måneder etter skade, og sammenlignet med funksjonsfriske kontroller.

Genuttrykk av PGC1 α var signifikant lavere i ubehandlede SCI-1-myotuber- og SCI-12-myotuber sammenlignet med ubehandlede kontroll-myotuber, og behandling med terbutalin ga signifikant lavere MYH2-uttrykk i SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber og signifikant lavere MYH7-uttrykk i SCI-1-myotuber sammenlignet med ubehandlede myotuber. Det var en signifikant effekt av insulinstimulert Akt-fosforylering i SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber sammenlignet med ubehandlede myotuber. SCI-1-myotuber og SCI-12-myotuber viste et signifikant økt nivå av ratio fosforylert Akt/total Akt etter insulinbehandling sammenlignet med ustimulerte celler (basal).

Ingen signifikante endringer ble funnet i oljesyre- og glukosemetabolisme og leucinomsetning hverken i SCI-myotuber mot kontrollmyotuber eller mellom SCI-myotuber, og hverken behandling med PPAR δ -aktivatoren GW501516, den β 2-adrenerge agonisten terbutalin, den mitokondrielle frikobleren FCCP eller insulin viste forskjeller mellom celler fra de ulike donorgruppene. Ytterligere forsøk med flere donorer er nødvendig for å trekke sikre konklusjoner om mulige metabolske endringer i muskelceller hentet fra pasienter med ryggmargsskade, 1 måned og 12 måneder etter skade, sammenlignet med funksjonsfriske kontroller.

7 Referanseliste

1. Åsvold, B.O. (2022). *Metabolsk syndrom*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: https://sml.sn.no/metabolsk_syndrom (Hentet: 11. august 2022).
2. Eckel, R., Grundy, S. og Zimmet, P. (2005). *The metabolic syndrome*. *Lancet*; 365: 1415–28 doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
3. Grundy, S. (2006) *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. *Nat Rev Drug Discov* 5, 295–309. doi:10.1038/nrd2005.
4. American Diabetes Association. (2011). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* 1; 34 (Supplement_1): S62–S69. doi:10.2337/dc11-S062.
5. World Health Organization. (2022). *Diabetes*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (Hentet: 12. august 2022).
6. Stene, L.C.M. (2014). *Diabetes i Norge*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nettpub/hin/ikke-smittsomme/diabetes/> (Hentet: 12. august 2022).
7. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. og Van Haeften, T.W. (2005). *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*. *Lancet*; 365(9467):1333-46. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
8. Kase, E.T. og Birkeland, K.I. (2008). *Antidiabetika som påvirker inkretinsystemet*, *Tidsskrift for den Norske legeforening*: nr. 4, 2008; 128: 440–2. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2008/02/legemidler-i-praksis/antidiabetika-som-pavirker-inkretinsystemet> (Hentet: 13. august 2022).
9. Skyler J.S., et al. (2017). *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis*. *Diabetes* 1; 66 (2): 241–255. doi:10.2337/db16-0806.
10. Åsvold, B.O. (2022). *Diabetes type 2*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: https://sml.sn.no/diabetes_type_2 (Hentet: 15. august 2022).
11. Edelman, S.V. *Type II diabetes mellitus*. *Adv Intern Med*. 1998;43:449-500. PMID: 9506190. Tilgjengelig fra: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9506190/> (Hentet: 12. august 2022).
12. Folkehelseinstituttet (2020). *Diabetes i Norge*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/nyheter/2020/nye-tall-om-hvor-mange-som-har-diabetes-i-norge/> (Hentet: 12. august 2022).
13. Shaw, J.E., Sicree, R.A. og Zimmet, P.Z. (2009). *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res Clin Pract.*; 87(1):4-14. doi:10.1016/j.diabres.2009.10.007.

14. Vaaler, S. (2022). *Insulin*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/insulin> (Hentet: 12. august 2022).
15. Świdarska, E., et al. (2018). *Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake*. In: Szablewski L, ed. *Blood Glucose Levels*:1-18. doi:10.5772/intechopen.80402.
16. Petersen, M.C. og Shulman, G.I. (2018). *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. *Physiol Rev*;98(4):2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017.
17. Mackenzie, R. og Elliott, B. (2014). *Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes*. *Diabetes Metab Syndr Obes*; 7:55-64. doi:10.2147/DMSO.S48260.
18. World Health Organization. (2021) *Obesity and overweight*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (Hentet: 12. august 2022).
19. Olsen, T.K. (2020). *Fedme*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/fedme> (Hentet: 12. august 2022).
20. Ghanemi, A., Yoshioka, M. og St-Amand, J. (2018) *Broken Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis: The Surrounding Concepts*. *Journal of Clinical Medicine*; 7(11):453. doi:10.3390/jcm7110453
21. Fruh, S.M. (2017) *Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management*. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners* 29(S1): p S3-S14. doi:10.1002/2327-6924.12510
22. Holck, P. (2022). *Musklene*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/musklene> (Hentet: 16. august 2022).
23. William, J.G. og Stanfield, C.L. (2004) *Principles of Human Physiology*. 2. utg. Benjamin Cummings. s 284
24. Dave, H.D., Shook, M., og Varacallo, M. (2020) *Anatomy, Skeletal Muscle*: In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537236/> (Hentet: 16. august 2022).
25. Sand, O., Sjaastad, Ø.V. og Haug, H. (2014). *Menneskets fysiologi*. 2 utg. Oslo, Norge: Gyldendal Norsk Forlag.
26. Fasting, S. (2022). *Muskelvev*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/muskelvev> (Hentet: 21. juni 2022).
27. Kåss, E. (2019). *Myosin*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/myosin> (Hentet: 21. juni 2022).

28. Lim, H., *et al.* (2021) *Approaches to characterize the transcriptional trajectory of human myogenesis*. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 4221–4234. doi:10.1007/s00018-021-03782-1.
29. Balberova, O.V., *et al.* (2021) *Candidate Genes of Regulation of Skeletal Muscle Energy Metabolism in Athletes*. *Genes* 2021, 12,1682. doi:10.3390/genes12111682.
30. Zhang, M., *et al.* (2014) *Expression of MyHC genes, composition of muscle fiber type and their association with intramuscular fat, tenderness in skeletal muscle of Simmental hybrids*. *Mol Biol Rep*;41(2):833-40. doi:10.1007/s11033-013-2923-6.
31. Resnicow, D.I., *et al.* (2009). *Functional diversity among a family of human skeletal muscle myosin motors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107(3). doi:10.1073/pnas.0913527107
32. Agarwal, M., *et al.* (2020) *Myosin heavy chain-embryonic regulates skeletal muscle differentiation during mammalian development*. *Development*. 2020 Apr 6;147(7): dev184507. doi:10.1242/dev.184507.
33. Frontera, W.R. og Ochala, J. (2015). *Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function*. *Calcif Tissue Int*; 96:183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y.
34. Hawke. J.T og Garry D.J. (2001) *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. *J Appl Physiol* (1985);91(2):534-51. doi:10.1152/jappl.2001.91.2.534.
35. Jing, X.P., *et al.* (2021). *Energy substrate metabolism in skeletal muscle and liver when consuming diets of different energy levels: comparison between Tibetan and Small-tailed Han sheep*. *Animal*;15(3):100162. doi:10.1016/j.animal.2020.100162.
36. Thoresen, G.H., *et al.* (2011). *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;85(5):227-34. doi:10.1016/j.plefa.2011.04.017.
37. Morales, P.E., Bucarey, J.L. og Espinosa A. (2017) *Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins*. *J Diabetes Res*. V.2017; 2017:1789395. doi:10.1155/2017/1789395.
38. Tremblay, F., Dubois, M.J. og Marette, A. (2003). *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. *Front Biosci*.1;8:d1072-84. doi:10.2741/1137.
39. Solis-Herrera, C., *et al.* (2021) *Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus*. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, *et al.*, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.

40. Baumann, H. (2022). *Glykolyse*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/glykolyse> (Hentet: 17. august 2022).
41. Alberts, B., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. New York: Garland Science. How Cells Obtain Energy from Food. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26882/> (Hentet: 17. august 2022).
42. Chaudhry, R. og Varacallo, M. (2022). Biochemistry, Glycolysis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/> (Hentet: 17. august 2022).
43. Jensen, J., et al. (2011). *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. *Front Physiol*; 2:112. doi:10.3389/fphys.2011.00112.
44. Abdul-Ghani, M.A., og DeFronzo, R.A. (2010). *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. *J Biomed Biotechnol*. Volume 2010;476279. doi:10.1155/2010/476279.
45. Woldseth, B. og Rootwelt, T. (2006). *Defekter i mitokondriell fettsyrenedbrytning*, *Tidsskrift for den Norske legeförening* 2006 126: 756-9. Tilgjengelig fra: <https://tidsskriftet.no/2006/03/oversiktsartikkel/defekter-i-mitokondriell-fettsyrenedbrytning> (Hentet: 17. august 2022).
46. Alberts, B. (2013) *Essential cell biology*. 4 utg. New York, NY: Garland Science.
47. Lande, B., Tonstad, S. og Svihus, B. (2022). *Triglyserider*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/myosin> (Hentet: 19. august 2022).
48. Koonen, D.P., et al. (2005). *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. *Biochim Biophys Acta*. 1;1736(3):163-80. doi:10.1016/j.bbaliip.2005.08.018.
49. Schwenk, R.W., et al. (2010). *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*;82(4-6):149-54. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.029.
50. Kerner, J. og Hoppel, C. (2000). *Fatty acid import into mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*;1486(1):1-17. doi:10.1016/s1388-1981(00)00044-5.
51. Zhang, L., et al. (2010). *Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. *Biochim Biophys Acta*;1801(1):1-22. doi:10.1016/j.bbaliip.2009.09.014.
52. Manickam, .R., Duszka, K. og Wahli, W. (2020). *PPARs and Microbiota in Skeletal Muscle Health and Wasting*. *Int J Mol Sci*. 29;21(21):8056. doi:10.3390/ijms21218056.

53. Wang, Y.X., *et al.* (2004). *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta*. PLoS Biol;2(10): e294. doi:10.1371/journal.pbio.0020294.
54. Liu, Y., *et al.* (2018). *The Role of PPAR- δ in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor*. Int J Mol Sci. 26;19(11):3339. doi:10.3390/ijms19113339.
55. Ehrenborg, E. og Krook, A. (2009). *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol;61(3):373-93. doi:10.1124/pr.109.001560.
56. Tanaka, T., *et al.* (2003). *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A. 23;100(26):15924-9. doi: 10.1073/pnas.0306981100.
57. Corona, J.C. og Duchen, M.R. (2015). *PPAR γ and PGC-1 α as therapeutic targets in Parkinson's*. Neurochem Res; 40(2):308-16. doi:10.1007/s11064-014-1377-0.
58. Liu, C. og Lin, J.D. (2011). *PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai); 43(4):248-57. doi: 10.1093/abbs/gmr007.
59. Liang, H. og Ward, W.F. (2006). *PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ; 30(4):145-51. doi:10.1152/advan.00052.2006.
60. Wright, D.C., *et al.* (2007). *Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression*. J Biol Chem. 5;282(1):194-9. doi:10.1074/jbc.M606116200.
61. Pilegaard, H., Saltin, B. og Neufer, P.D. (2003). *Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle*. J Physiol. 1;546(Pt 3):851-8. doi:10.1113/jphysiol.2002.034850.
62. Kierulf, P. (2022). *Proteiner (ernæring), Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: [https://sml.snl.no/proteiner - ernæring](https://sml.snl.no/proteiner_-_ernæring) (Hentet: 30. august 2022).
63. Doherty, M.K. og Whitfield, P.D. (2011). *Proteomics moves from expression to turnover: update and future perspective*. Expert Rev Proteomics; 8(3):325-34. doi:10.1586/epr.11.19.
64. Toyama, B.H. og Hetzer, M.W. (2013). *Protein homeostasis: live long, won't prosper*. Nat Rev Mol Cell Biol; 14(1):55-61. doi:10.1038/nrm3496.
65. Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. (1999). *The Role of Protein and Amino Acids in Sustaining and Enhancing Performance*.

- Washington (DC): National Academies Press (US); 1999. 5, The Energy Costs of Protein Metabolism: Lean and Mean on Uncle Sam's Team.
66. Wolfe, R.R. (2006). *The underappreciated role of muscle in health and disease*. Am J Clin Nutr; 84(3):475-82. doi:10.1093/ajcn/84.3.475.
67. Schoenfeld, B. J., (2020). *Science and Development of Muscle Hypertrophy 2 utg*. Human Kinetics. s. 8.
68. Shimomura, Y., et al. (2004). *Exercise promotes BCAA catabolism: effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise*. J Nutr; 134(6 Suppl):1583S-1587S. doi:10.1093/jn/134.6.1583S.
69. Poortmans, J.R., et al. (2012). *Protein turnover, amino acid requirements and recommendations for athletes and active populations*. Braz J Med Biol Res; 45(10):875-90. doi:10.1590/s0100-879x2012007500096.
70. Blomstrand, E., et al. (2006). *Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise*. J Nutr; 136(1 Suppl):269S-73S. doi:10.1093/jn/136.1.269S.
71. Sandri, M. (2013). *Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome*. Int J Biochem Cell Biol; 45(10):2121-9. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.023.
72. Boonyarom, O. og Inui, K. (2006). *Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects*. Acta Physiol (Oxf); 188(2):77-89. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01613.x.
73. Savikj, M. et al. (2018). *Retained differentiation capacity of human skeletal muscle satellite cells from spinal cord-injured individuals*. Physiol Rep; 6(12):e13739. doi:10.14814/phy2.13739.
74. Hostrup, M. et al. (2018). *Beta₂-adrenoceptor agonist salbutamol increases protein turnover rates and alters signalling in skeletal muscle after resistance exercise in young men*. J Physiol; 596(17):4121-4139. doi:10.1113/JP275560.
75. Kamei, Y., et al. (2020). *Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids*. Nutrients; 12(1):261. doi:10.3390/nu12010261.
76. Kristiansen, M.K. (2020). *Beta-2-agonister, Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/beta-2-agonister> (Hentet: 10. september 2022).
77. Jessen, S., et al. (2018). *Hypertrophic effect of inhaled beta₂-agonist with and without concurrent exercise training: A randomized controlled trial*. Scand J Med Sci Sports; 28(10):2114-2122. doi:10.1111/sms.13221.

78. Hostrup, M. *et al.* (2020). *Anabolic and lipolytic actions of beta2 -agonists in humans and antidoping challenges*. *Drug Test Anal*; 12(5):597-609. doi:10.1002/dta.2728.
79. Landsforeningen for Ryggmargsskade. (2018). *ABC om lungefunksjon for deg med ryggmargsskade*. Tilgjengelig fra: <https://usercontent.one/wp/www.lars.no/wp-content/uploads/2021/01/ABC-om-lungefunksjon-for-deg-med-ryggargsskade-web.pdf> (Hentet: 16. september 2022).
80. Jansen, J.K.S., Glover, J. og Holck, P. (2022). *Ryggmargen*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/ryggmargen> (Hentet: 16. august 2022).
81. Garstang ,S.V. og Miller-Smith, S.A. (2007). *Autonomic nervous system dysfunction after spinal cord injury*. *Phys Med Rehabil Clin N Am*; 18(2):275-96, vi-vii. doi:10.1016/j.pmr.2007.02.003.
82. Walberg, F. og Holck, P. (2022). *Ryggmargsnervene*, *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn.no/ryggmargsnervene> (Hentet: 16. august 2022).
83. Landsforeningen for Ryggmargsskade. (2012). *ABC om ryggmargsskade - for helsepersonell*. Oslo. Tilgjengelig fra: <https://www.legeforeningen.no/contentassets/f0852754bf0a4307b83ffa1b87d888ce/abc-om-ryggmargsskade-helsepersonell.pdf> (Hentet: 16. september 2022).
84. St. Olavs hospital. Helsenorge. (2020). *Ryggmargsskade*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsenorge.no/sykdom/hjerne-og-nerver/ryggmargsskade/> (Hentet: 18. september 2022).
85. World Health Organization. (2013) *Spinal cord injury*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury> (Hentet: 18. september 2022).
86. Hjeltnes, N. (2009). *Ryggmargsskade*. In Bahr, R., Karlsson, J., Ståhle, A., Tranquist J. og Aadland, A.A. *Aktivitetshåndboken. Fysisk aktivitet i forebygging og behandling*. Helsedirektoratet, s. 523-533
87. Aaril, J.C., Magnæs B., Hjeltnes, N., Sæterhaug. I. og Haugtomt, H. (1998). *Behandling av ryggmargsskade i Norge*. Statens helsetilsyn, 4-98 veiledningsserie, s. 10-25.
88. Moen, R.D. (2020). *Hva er en ryggmargsskade? Made for movement*, 20. august. 2020. Tilgjengelig fra: <https://blog.madeformovement.com/no/hva-er-en-ryggmargsskade> (Hentet: 19. september 2022).
89. Hagen, E.M. *et al.* (2012). *Traumatiske ryggmargsskader – forekomst, skademekanismer og forløp*. *Tidsskrift for den Norske legeförening*: 2012 132 : 831-7

- doi:10.4045/tidsskr.10.0859. Tilgjengelig fra:
<https://tidsskriftet.no/2012/04/oversiktsartikkel/traumatiske-ryggmargsskader-forekomst-skademekanismer-og-forlop> (Hentet: 19. september 2022).
90. Roberts, T.T., Leonard, G.R. og Cepela, D.J. (2017). *Classifications In Brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale*. Clin Orthop Relat Re; 475(5):1499-1504. doi:10.1007/s11999-016-5133-4.
91. Landsforeningen for Ryggmargsskade. (2012). *ABC for deg med ryggmargsskade*. Oslo. Tilgjengelig fra: https://www.lars.no/wp-content/uploads/2020/11/06_ABCfordegmedryggmargsskade.pdf (Hentet: 20. september 2022).
92. Groah, S.L. et al. (2012). *Spinal cord injury and aging: challenges and recommendations for future research*. Am J Phys Med Rehabil; 91(1):80-93. doi:10.1097/PHM.0b013e31821f70bc.
93. Kostovski, E., Iversen, P.O. og Hjeltnes, N. (2010). *Komplikasjoner etter kronisk ryggmargsskade*. Tidsskrift for den Norske legeforening; 2010 130 : 1242-5 doi:10.4045/tidsskr.09.0055 Tilgjengelig fra:
<https://tidsskriftet.no/2010/06/oversiktsartikkel/komplikasjoner-etter-kronisk-ryggmargsskade>. (Hentet: 20. september 2022).
94. Bauman, W.A. og Spungen, A.M. (2001). *Carbohydrate and lipid metabolism in chronic spinal cord injury*. J Spinal Cord Med; 24(4):266-77. doi:10.1080/10790268.2001.11753584.
95. Boon, H., et al. (2015). *MicroRNA-208b progressively declines after spinal cord injury in humans and is inversely related to myostatin expression*. Physiol Rep; 3(11):e12622. doi:10.14814/phy2.12622.
96. Hjeltnes N. (1998). *Physical exercise and electrical stimulation in the management of metabolic, cardiovascular and skeletal-muscle alterations in people with tetraplegia* [doktorsavhandling]. Stockholm: Karolinska sjukhuset.
97. Buchholz, A.C. og Pencharz, P.B. (2004). *Energy expenditure in chronic spinal cord injury*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care; 7(6):635-9. doi:10.1097/00075197-200411000-00008.
98. Monroe, M.B., et al. (1998). *Lower daily energy expenditure as measured by a respiratory chamber in subjects with spinal cord injury compared with control subjects*. Am J Clin Nutr; 68(6):1223-7. doi:10.1093/ajcn/68.6.1223.

99. Aksnes, A.K., *et al.* (1993). Meal-induced rise in resting energy expenditure in patients with complete cervical spinal cord lesions. *Paraplegia*; 31(7):462-72.
doi:10.1038/sc.1993.75.
100. Raymond, J., *et al.* (2010). *Glucose tolerance and physical activity level in people with spinal cord injury*. *Spinal Cord*; 48(8):591-6. doi:10.1038/sc.2009.180.
101. Giangregorio, L. og McCartney, N. (2006). *Bone loss and muscle atrophy in spinal cord injury: epidemiology, fracture prediction, and rehabilitation strategies*. *J Spinal Cord Med*; 29(5):489-500. doi:10.1080/10790268.2006.11753898.
102. Bauman, W.A. og Spungen, A.M. (2001). *Invited Review Carbohydrate And Lipid Metabolism In Chronic Spinal Cord Injury*, *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 24:4, 266-277. doi:10.1080/10790268.2001.11753584.
103. Evans, P.L., *et al.* (2019). *Regulation of Skeletal Muscle Glucose Transport and Glucose Metabolism by Exercise Training*. *Nutrients*; 11(10):2432.
doi:10.3390/nu11102432.
104. Merz, K.E. og Thurmond, D.C. (2020). *Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake*. *Compr Physiol*; 10(3):785-809. doi:10.1002/cphy.c190029.
105. Di Meo, S., Iossa, S. og Venditti, P. (2017). *Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training*. *J Endocrinol*;
234(3):R159-R181. doi:10.1530/JOE-17-0186.
106. Aksnes, A.K., *et al.* (1996). *Intact glucose transport in morphologically altered denervated skeletal muscle from quadriplegic patients*. *Am J Physiol*; 271(3 Pt 1):E593-600. doi:10.1152/ajpendo.1996.271.3.E593.
107. Bauman, W.A., *et al.* (1992). *Depressed serum high density lipoprotein cholesterol levels in veterans with spinal cord injury*. *Paraplegia*;30(10):697-703.
doi:10.1038/sc.1992.136.
108. Aas, V., *et al.* (2013). *Are cultured human myotubes far from home?* *Cell Tissue Res*;
354(3):671-82. doi: 10.1007/s00441-013-1655-1.
109. Wensaas, A.J., *et al.* (2007). *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *J Lipid Res*; 48(4):961-7.). doi: 10.1194/jlr.D600047-JLR200.
110. Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*; 72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
111. Lederman, L. (2009). *qPCR*. *BioTechniques* 47:817-819. doi 10.2144/000113234.

112. Mahmood, T. og Yang, P.C. (2012). *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci; 4(9):429-34. doi:10.4103/1947-2714.100998.
113. Abcam. (2007). *WESTERN BLOTTING - A BEGINNER'S GUIDE*. Tilgjengelig fra: <https://www.abcam.co.jp/ps/products/131/ab131366/documents/Western%20blotting%20-%20a%20beginner%27s%20guide.pdf> (Hentet: 30. september 2022).
114. Kuruvilla, S. et al. (2003). *Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations*. Toxicol Sci. 2003 Jun;73(2):348-61. doi:10.1093/toxsci/kfg084.
115. Agilent Technologies. (2016). *Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit*. Tilgjengelig fra: <https://hpst.cz/sites/default/files/oldfiles/5991-7118en.pdf> (Hentet: 30. september 2022).
116. Huang, X., et al. (2018). *The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes*. Int J Biol Sci; 14(11):1483-1496. doi:10.7150/ijbs.27173.
117. Lund, J., et al. (2017). *Exercise in vivo marks human myotubes in vitro: Training-induced increase in lipid metabolism*. PLoS One; 12(4):e0175441. doi:10.1371/journal.pone.0175441.
118. Blau, H.M. og Webster, C. (1981). *Isolation and characterization of human muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A; 78(9):5623-7. doi:10.1073/pnas.78.9.5623.
119. Gaster, M., et al. (2001). *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS; 109(11):735-44. doi:10.1034/j.1600-0463.2001.d01-140.x.
120. Berggren, J.R., Tanner, C.J. og Houmard, J.A. (2007). *Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism*. Exerc Sport Sci Rev; 35(2):56-61. doi:10.1249/JES.0b013e31803eae63.
121. Heden, T.D., et al. (2017). *Greater Oxidative Capacity in Primary Myotubes from Endurance-trained Women*. Med Sci Sports Exerc; 49(11):2151-2157. doi:10.1249/MSS.0000000000001352.
122. Nehlin, J.O., et al. (2011). *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. Biogerontology; 12(4):349-65. doi:10.1007/s10522-011-9336-5.
123. Graham, Z.A., et al. (2019). *Key Glycolytic Metabolites in Paralyzed Skeletal Muscle Are Altered Seven Days after Spinal Cord Injury in Mice*. J Neurotrauma; 36(18):2722-2731. doi:10.1089/neu.2018.6144.

124. Fitts, R.H., Riley, D.R. og Widrick, J.J. (2000). *Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle*. J Appl Physiol; 89(2):823-39. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.823.
125. Stein, T.P. og Wade, C.E. (2005). *Metabolic consequences of muscle disuse atrophy*. J Nutr; 135(7):1824S-1828S. doi:10.1093/jn/135.7.1824S.
126. Wang, H., et al. (1999). *Relationships between muscle mitochondrial DNA content, mitochondrial enzyme activity and oxidative capacity in man: alterations with disease*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol; 80(1):22-7. doi:10.1007/s004210050553.
127. McCully, K.K., et al. (2011). *Skeletal muscle metabolism in individuals with spinal cord injury*. J Appl Physiol (1985); 111(1):143-8. doi:10.1152/jappphysiol.00094.2011.
128. Lotta, S., et al. (1991). *Morphometric and neurophysiological analysis of skeletal muscle in paraplegic patients with traumatic cord lesion*. Paraplegia; 29(4):247-52. doi:10.1038/sc.1991.35.
129. Kostovski, E. et al. (2013). *Altered content of AMP-activated protein kinase isoforms in skeletal muscle from spinal cord injured subjects*. Am J Physiol Endocrinol Metab; 305(9):E1071-80. doi:10.1152/ajpendo.00132.2013.
130. Krämer, D.K., et al. (2006). *Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA*. Acta Physiol (Oxf); 188(3-4):207-16. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01620.x.
131. Hu, J., et al. (2015). *The Neuroprotective Effect of Tetramethylpyrazine Against Contusive Spinal Cord Injury by Activating PGC-1 α in Rats*. Neurochem Res; 40(7):1393-401. doi:10.1007/s11064-015-1606-1.
132. Simmons, E.C., et al. (2020). *5-hydroxytryptamine 1F Receptor Agonist Induces Mitochondrial Biogenesis and Promotes Recovery from Spinal Cord Injury*. J Pharmacol Exp Ther; 372(2):216-223. doi:10.1124/jpet.119.262410.
133. Terada, H., (1990). *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environmental Health Perspectives; 87:213-218. doi:10.1289/ehp.9087213.
134. Kenwood, B.M., et al. (2013). *Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane*. Mol Metab; 3(2):114-23. doi:10.1016/j.molmet.2013.11.005.
135. Dressel, U., et al. (2003). *The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and*

- energy uncoupling in skeletal muscle cells*. Mol Endocrinol; 17(12):2477-93.
doi:10.1210/me.2003-0151.
136. Ciocoiu, C.C., *et al.* (2010). *Synthesis and dual PPARalpha/delta agonist effects of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole analogues of GW 501516*. Eur J Med Chem; 45(7):3047-55. doi:10.1016/j.ejmech.2010.03.035.
137. Nikolić, N., *et al.* (2012). *Overexpression of PGC-1 α increases fatty acid oxidative capacity of human skeletal muscle cells*. Biochem Res Int; 2012:714074.
doi:10.1155/2012/714074.
138. Dimopoulos, N., *et al.* (2007). *The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. FEBS Lett; 581(24):4743-8.
doi:10.1016/j.febslet.2007.08.072.
139. Feng, Y.Z., *et al.* (2015). *Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an in vitro model of exercise*. Am J Physiol Cell Physiol; 308(7):C548-56. doi:10.1152/ajpcell.00314.2014.
140. Petersen, M.C. og Shulman, G.I. (2018). *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev; 98(4):2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017.
141. Sarabia, V., Ramlal, T. og Klip, A. (1990). *Glucose uptake in human and animal muscle cells in culture*. Biochem Cell Biol; 68(2):536-42. doi:10.1139/o90-076.
142. DeFronzo, R.A. og Tripathy, D. (2009). *Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes*. Diabetes Care; 32 Suppl 2(Suppl 2):S157-63.
doi:10.2337/dc09-S302.
143. Yarar-Fisher, C., *et al.* (2013). *Skeletal muscle signaling associated with impaired glucose tolerance in spinal cord-injured men and the effects of contractile activity*. J Appl Physiol (1985); 115(5):756-64. doi:10.1152/jappphysiol.00122.2013.
144. Maier, V.H. og Gould, G.W. (2000). *Long-term insulin treatment of 3T3-L1 adipocytes results in mis-targeting of GLUT4: implications for insulin-stimulated glucose transport*. Diabetologia; 43(10):1273-81. doi:10.1007/s001250051523.
145. Samuel, V.T. og Shulman, G.I. (2016). *The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux*. J Clin Invest; 126(1):12-22.
doi:10.1172/JCI77812.
146. Kase, E.T., *et al.* (2016). *Primary defects in lipolysis and insulin action in skeletal muscle cells from type 2 diabetic individuals*. Biochim Biophys Acta; 1851(9):1194-201. doi:10.1016/j.bbailip.2015.03.005.

147. Krook, A., *et al.* (1998). *Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects*. *Diabetes*; 47(8):1281-6. doi:10.2337/diab.47.8.1281. PMID: 9703329.
148. Yimlamai, T., *et al.* (1985). *Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Appl Physiol* (1985); 99(1):71-80. doi:10.1152/japplphysiol.00448.2004.
149. Fan, W. og Evans, R.M. (2017). *Exercise mimetics: impact on Health and performance*. *Cell Metabol*; 25(2):242–247. doi:10.1016/j.cmet.2016.10.022.
150. Guerrieri, D., Moon, H.Y. og van Praag, H. (2017). *Exercise in a pill: the latest on exercise-mimetics*. *Brain Plast*; 2(2):153–169. doi:10.3233/BPL-160043.
151. Hostrup, M., *et al.* (2020). *Anabolic and lipolytic actions of beta2-agonists in humans and antidoping challenges*. *Drug Test. Anal*; 12(5):597–609. doi:10.1002/dta.2728.
152. Nevzorova, J., *et al.* (2006). *Multiple signalling pathways involved in β 2-adrenoceptor-mediated glucose uptake in rat skeletal muscle cells*. *Br. J. Pharmacol*; 147(4):446–454. doi:10.1038/sj.bjp.0706626.
153. Ziegler, M.G., *et al.* (2012). *Epinephrine and the metabolic syndrome*. *Curr. Hypertens. Rep*; 14(1):1–7. doi:10.1007/s11906-011-0243-6.
154. Ito, A., *et al.* (2019). *Role of β -adrenergic signaling in masseter muscle*. *PloS One*; 14(4) doi:10.1371/journal.pone.0215539.
155. Koziczak-Holbro, M., *et al.* (2019). *Pharmacological characterization of a novel 5-hydroxybenzothiazolone (5-HOB) derived β 2-adrenoceptor agonist with functional selectivity for anabolic effects on skeletal muscle resulting in a wider cardiovascular safety window in preclinical studies*. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut*; 118:255307. doi:10.1124/jpet.118.255307.
156. Skagen, C., *et al.* (2021). *Chronic treatment with terbutaline increases glucose and oleic acid oxidation and protein synthesis in cultured human myotubes*. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*; 2:100039. doi:10.1016/j.crphar.2021.100039.
157. Dodd, S.L., *et al.* (1996). *Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle*. *Med Sci Sports Exerc*; 28(6):669-76. doi:10.1097/00005768-199606000-00005.
158. Zhang, K.M., *et al.*, (1996). *Salbutamol changes the molecular and mechanical properties of canine skeletal muscle*. *J Physiol*; 496 (Pt 1)(Pt 1):211-20. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021678.

Appendiks

1. Medier til celledyrking

1.1 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM med/Glutamax (lavt glukose, 1g/l) 50 ml FBS (Foetal Bovint Serum)

12,5 ml HEPES (1M stock)

500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amphotericin) 500 µl hEGF, 10 µg/ml fond

500 µl deksametason, 0,39 mg/ml lager 3,3 ml BSA 7,5 % løsning

1.2 Differensieringsmedium

500 ml DMEM med/Glutamax (lavt glukose, 1g/l) 10 ml FBS (Foetal Bovint Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin)

12,5 ml HEPES (1M lager)

500 µl Gentamicin (50 mg/ml)

25 pmol Insulin (→ 21,5 µl av 1000x fortynnet Insulin Actrapid, Novo Nordisk, 0,6 mM

2. Medier til Scintillation proximity assay

2.1 Forbehandling

Forsøksoppsettet for 96-brønners Brett for Scintillation proximity assay:

	¹⁴ C]Leucine*											
Donorer:	Matchet kontroll				Donor X: 1 mnd				Donor X: 12 mnd			
Behandling:	K	Ter	Ter	Ter	K	Ter	Ter	Ter	K	Ter	Ter	Ter
Konsentrasjon (µM):	0,1 %	0,1 µM	1 µM	10 µM	0,1 %	0,1 µM	1 µM	10 µM	0,1 %	0,1 µM	1 µM	10 µM
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2.1.1 Differensieringsmedium med DMSO i 4 dager to skifte (per forsøk)

Det ble tilsatt 0,1 % DMSO til differensieringsmedium 1.2 som negativ kontroll i 4 dager.

6 ml av medium 1.2

6 μ l DMSO (stock 1 mM) i kolonne 1, 5 og 9:

- 24 brønner * 100 μ l = 2400 μ l \rightarrow 3000 μ l per brett (overskudd) per skifte
100% * v_1 = 0,1% * 3000 μ l (differensieringsmedium) = 3 μ l * 2 skift = 6 μ l

2.1.2 Differensieringsmedium med terbutalin 0.1, 1.0 og 10 μ M i 4 dager to skifte (per forsøk)

Terbutalin (2 skift):

- Lager først 1 mM Terbutalin. 20 μ l av 10 mM Terbutalin i 180 μ l DMSO (100%) = 200 μ l av 1 mM Terbutalin i 100% DMSO
- 1000 μ M * v = 100 μ M * 200 μ l (lager stock med 100 μ M)
 V_1 = 20 μ l (av 1 mM Terbutalin i 200 μ l differensieringsmedium)
- 100 μ M * v_1 = **0,1 μ M** * 1000 μ l
 V_1 = 1 μ l (av 100 μ M i 1000 μ l differensieringsmedium) * 6 (fordi vi har 3 koloner og 2 skift)
- 1000 μ M x v_1 = **1 μ M** x 1000 μ l
 V_1 = 1 μ l (av 1 mM Terbutalin i 1000 μ l differensieringsmedium) * 6 (fordi vi har 3 koloner og 2 skift)
- 10 000 μ M x v_1 = **10 μ M** x 1000 μ l
 V_1 = 1 μ l (av 10 mM stock Terbutalin i 1000 μ l differensieringsmedium) x 6 (fordi vi har 3 koloner og 2 skift)

2.2 Pulse medium (per forsøk)

5 ml Basal medium (colourless)

FBS (2%) 100 μ l

275 μ l Glucose (5,5 mM) fra 100 mM stock

0,21 μ l Insulin (25 pmol/l)

25 μ l Pen strep (100 μ g/ml)

25 μ l Fungizone (250 μ g/ml)

25 μ l [¹⁴C]leucine (2 μ Ci/ml)

2.3 Pulse medium med DMSO og terbutalin 0.1, 1.0 og 10 μM (per forsøk)

Ta ut 2 ml (x4) pulse medium (2.2) i 2 ml Eppendorf (x4), og tilsett DMSO eller Terbutalin:

- Kontroll = 0,1% DMSO \rightarrow 2 μl DMSO i 2 ml pulse medium
- 10 μM terbutaline \rightarrow 2 μl terbutaline i 2 ml pulse medium
Lag 1 ml 10 μM terbutalin løsning for 1 og 0,1 μM løsningene:
- 1 μM terbutaline \rightarrow 200 μl av løsningen i 2 ml pulse medium
- 0,1 μM terbutaline \rightarrow 20 μl av løsningen i 2 ml pulse medium

2.4 Chasemedium (per forsøk)

5 ml Basal medium

(fargeløs)

275 μl Glucose (5,5 mM) fra 100 mM stock

3,4 mg BSA (10 μM)

3. Medier til substratoksidasjonsmetoden

3.1 Forbehandling

Forsøksoppsettet for 96-brønners Brett for substratoksidasjonsforsøk:

Forbehandli ng	Oljesyre*						Glukose*					
	Behandling:	FCCP	GW 2 d	Glu	DMS O 2 d	K	K	Ins	FCCP	OA	K	
Konsentrasjo n:		1 μM	10 nM	5,5 m M	0,1 %			100 nM	1 μM	100 μM		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TOM											TOM
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3.1.1 Differensieringsmedium med DMSO (per forsøk)

Det ble tilsatt 0,1 % DMSO til differensieringsmedium 1.2 som negativ kontroll i 2 dager.

2 ml av medium 1.2

2 µl DMSO (**stock 1 mM**) i kolonne 5 og 11:

- 16 brønner * 100 µl = 1600 µl → 2000 µl per brett (overskudd).
100% * v1 = 0,1% * 2000 µl (differensieringsmedium) = 2 µl

3.1.2 Differensieringsmedium med GW501516 (per forsøk)

1 ml av medium 1.2

1 µl GW501516 (10 µM stock) i kolonne 3 i 2 dager:

- 100 ul * 8 brønner = 800 ul = 1 ml per brett (overskudd). Uttak GW (stock 10 uM)
= 1 ul til 1 ml gir 10 nM løsning. 10 µM * v1 = 0,01 µM * 1000 µl
(differensieringsmedium) = 1 µl

3.2 Radioaktiv glukose (per forsøk)

200 µM glukose:

15 µl D-[¹⁴C(U)]glukose (100 µCi/ml)

5,9 µl glukose (0,1M)

12,5 µl BSA (2,4 mM)

3 µl L-carnitine (1M)

2,964 ml DPBS med HEPES

Totalt: 3 ml

3.3 Radioaktiv oljesyre (per forsøk)

100 µM oljesyre:

15 µl [1-¹⁴C]oljesyre (0,5 µCi/ml)

46 µl oljesyre (6 mM)

4 µl BSA (2,4 mM)

3 µl L-carnitine (1M)

2,932 ml DPBS med HEPES

Totalt: 3 ml

3.4 Radioaktiv glukose med FCCP (per forsøk)

0,5 ml av medium 3.2

0,5 µl FCCP (1 µM stock) i kolonne 9:

- Tilsetter 1 uM FCCP = 0,5 ml radioaktiv glukose

$$1000 \text{ uM} * v_1 = 1 \text{ uM} * 0,5 \text{ mL} = 0,5 \text{ uL}$$

3.5 Radioaktiv glukose med oljesyre (per forsøk)

0,5 ml av medium 3.2

8,3 µl oljesyre (6 mM stock) i kolonne 10:

- Ønsker 100 uM i 0,5 ml radioaktiv glukose

$$6000 \text{ uM} * v_1 = 100 \text{ uM} * 0,5 \text{ mL} = 8,3 \text{ ul}$$

3.6 Radioaktiv glukose med insulin (per forsøk)

0,5 ml av medium 3.2

8,3 µl insulin (6 mM stock) i kolonne 8:

- Insulin (0,6 mM stock) til 100 nM = 0,5 ml radioaktiv glukose

$$1 \text{ µl insulin (0,6 mM stock)} + 99 \text{ µl PBS} = 6 \text{ µM mellomøsning}$$

$$6 \text{ µM} * v_1 = 0,1 \text{ µM} * 500 \text{ µl} = 8,3 \text{ µl}$$

3.7 Radioaktiv oljesyre med FCCP (per forsøk)

0,5 ml av medium 3.3

0,5 µl FCCP (1 µM stock) i kolonne 2:

- Tilsetter 1 uM FCCP = 0,5 ml radioaktiv oljesyre

$$1000 \text{ uM} * v_1 = 1 \text{ uM} * 0,5 \text{ mL} = 0,5 \text{ uL}$$

3.8 Radioaktiv oljesyre med glukose (per forsøk)

0,5 ml av medium 3.3

27,5 µl glukose (0,1M stock) i kolonne 4:

ønsker 5,5 mM i 0,5 ml radioaktiv oljesyre

$$100 \text{ mM} * v_1 = 5,5 \text{ mM} * 0,5 \text{ mL} = 27,5 \text{ ul}$$

4. Forbehandling qPCR og westernblotting

4.1 Forbehandling

1 flaske x 3 per donor: 1 mnd, 12 mnd og tilhørende kontroll = 3 flasker per donor/kontrollsett

Volum (diff):	qPCR (ml)	WB (ml)	Totalt	3 sett	Behandling (µl)
Kontroll (DMSO)	9 ml	16 ml	25 ml	75 ml	75 µl
Terbutalin 1 µM, 4 dager	6 ml	8 ml	14 ml	42 ml	42 µl
Insulin (100 nM akutt)	/	2 ml	2 ml	Tilsettes direkte til brønn	33,3 µl
GW 10 µM, 2 dager	3 ml	/	3 ml	9 ml	9 µl

DMSO 0,1 %:

- $100\% \text{ DMSO} * v_1 = 0,1\% \text{ DMSO} * 75 \text{ ml}$
- $V_1 = 75 \mu\text{l}$ i 75 ml differensieringsmedium

Insulin:

Lager mellomløsning med 6 µM insulin:

10 µl insulin (0,6 mM stock) + 990 µl PBS = 1 ml av 6 µM løsning

- $6 \mu\text{M insulin} * v_1 = 0,1 \mu\text{M} * 2 \text{ ml} = 33,3 \mu\text{l}$ i 2 ml differensieringsmedium

Terbutalin 1,0 µM:

- $1000 \mu\text{M Terbutalin} * v_1 = 1 \mu\text{M} * 42 \text{ ml}$
 $V_1 = 42 \mu\text{l}$ (av 1 mM Terbutalin i 42 ml differensieringsmedium)

GW501516:

- $10 \mu\text{M GW} * v_1 = 0,01 \mu\text{M} * 9 \text{ ml}$ (differensieringsmedium)
 $V_1 = 9 \mu\text{l}$ av 10 µM stock i 9 ml differensieringsmedium

5. Buffer og medier til qPCR

5.1 Reaksjonsblanding (per forsøk)

13,2 µl DEPC-dH₂O + prøve

2,0 µl 10 x TaqMan RT Buffer

0,8 µl dNTP mix
2,0 µl 10 x RT Random hexamers
1,0 µl RNase inhibitor (20 U/µl)
1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)
Totalt per prøve: 20 µl i hvert rør

5.2 Standarder

cDNA-mix: 2 µl fra hver prøve (1 µl × 36 prøver = 36 µl)
Std. 1000 (1:5 fortynnet cDNA-mix):
2,5 µl × 3 paralleller × 12 gener = 90 µl × 2 = 180 µl → 180 µl
180 µl/5 = 36 µl → 36 µl cDNA-mix + 144 µl nukleasefritt vann
Std. 500 (1:2 fortynnet std. 1000):
90 µl std. 1000 + 90 µl nukleasefritt vann
Std. 250 (1:2 fortynnet std. 500):
90 µl std. 500 + 90 µl nukleasefritt vann
Std. 125 (1:2 fortynnet std. 500):v
90 µl std. 250 + 90 µl nukleasefritt vann

5.3 Fortynning av cDNA-prøve

2,5 µl × 2 paralleller × 12 gener = 60 µl → Lager 70 µl av hver prøve
Skal fortynnes 1:5 → 70 µl/5 = 14 µl → 14 µl prøve + 56 µl nukleasefritt vann

5.4 Fortynning av primere

Ønsket konsentrasjon 30 µM. Stock har konsentrasjon 300 µM → Fortynner 1:10. Lager 100 µl → 10 µl primer + 90 µl nukleasefritt vann

5.5 SYBR Green PCR-mix (per prøve)

12,5 µl SYBR Green PCR master mix
0,25 µl Forward primer (30 µM)
0,25 µl Reverse primer (30 µM)
9,5 µl nukleasefritt-dH₂O
Totalt 22,5 µl i hver brønn

6. Medier til westernblotting

6.1 Harvesting buffer (høstebuffer)

2xSamplebuffer

10 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail

10 µl/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

6.2 2xSamplebuffer

10 ml 0,5 mol/l Tris-HCl

8 ml glyserol

8 ml 10 % (w/v) SDS

14 ml dH₂O

6.3 Elektroforesebuffer

25 mmol/l Tris

192 mmol/l glycin

0,1 % (w/v) SDS

Fortynnes 1:10 med dH₂O (pH 8,3)

6.4 Blottebuffer

200 ml 5x Transferbuffer

600 ml dH₂O

200 ml etanol (96%)

6.5 1xTTBS

10xTBS fortynnes 1:10 i dH₂O 0,05 % Tween20:

0,05 % Tween20 (= 0,5 ml) + 10xTBS (= 100 ml) + dH₂O (= 900 ml)

6.6 10xTBS

61 g Tris Base

90 g NaCl

1000 ml MilliQ-vann

pH justeres til 8,4 med konsentrert HCl