

Vil trening *in vivo* prege skjelettmuskelceller *in vitro*?

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Jenny Lund

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Vil trening *in vivo* prege skjelettmuskelceller *in vitro*?

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Jenny Lund



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Veiledere:

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Post.doc. Eili T. Kase

© Jenny Lund

2013

Vil trening *in vivo* prege skjelettmuskelceller *in vitro*?

Jenny Lund

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2012 til mai 2013. Deler av masteroppgaven ble presentert ved foredrag på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen 24.-27. januar 2013 og på seminar ved avdeling for ernæringsvitenskap på medisinsk fakultet ved Universitetet i Oslo.

5 år på Farmasøytisk Institutt er snart over, og selv om det har vært mye hardt arbeid har det virkelig vært verdt det. Det siste året, med ”Muskelbunten” og de andre ansatte og studentene i 4. etasje, har imidlertid vært det beste med hele farmasistudiet. Jeg ønsker derfor å rette en stor takk til veilederne mine, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan og post.doc. Eili T. Kase, for å ha gjort dette til et så fint år! Tusen takk for god oppfølging, veiledning, støtte, korrekturlesing og gode råd underveis. Takk går også til resten av ”Muskelbunten” for faglige, interessante møter gjennom året. Jeg må spesielt takke Camilla Stensrud for støtten underveis, svar på store og små spørsmål, og for fantastisk opplæring på lab. Tusen takk for alle pausene med både mer og mindre faglig innhold, fine samtaler og treningsturer på ettermiddagene. Resten av de ansatte i 4. etasje må også sendes gode hilsener for at de sprer så godt humør og deler med kunnskapen sin på tvers av forskningsgruppene. Jeg må også takke alle de andre studentene på hovedfagskontoret, og de to studentene litt lenger bort i gangen, for en fin tid sammen. Og ikke minst takk til avdelingen for å ha så flotte kaffemaskiner vi studentene har kunnet benytte oss (litt for mye) av.

Min beste venninne gjennom disse fem årene, Maren Levernæs, må få en ekstra stor takk. Studieperioden hadde ikke vært den samme uten deg! Takk for alle studiedagene, filmkveldene, treningsturene og samtalene vi har hatt disse årene, og en ekstra stor takk for gjentatt korrekturlesing av denne oppgaven. Jeg håper og tror at vennskapet vårt vil fortsette.

Sist, men ikke minst må jeg takke min fantastiske familie, og særlig mamma og pappa, som gjennom hele studieperioden min har engasjert seg, støttet og motivert meg. Takk for at dere alltid stiller opp for meg.

Blindern, mai 2013

Jenny Lund

Innholdsfortegnelse

Forord.....	VII
Innholdsfortegnelse	IX
Abstract	XIII
Sammendrag	XV
Forkortelser	XVII
1 Innledning	1
1.1 Overvekt og fedme	1
1.2 Insulinresistens	3
1.3 Metabolsk syndrom	4
1.4 Type 2-diabetes.....	5
1.5 Skjelettmusklenes oppbygning og struktur.....	6
1.6 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.....	8
1.6.1 Glukosemetabolisme	9
1.6.2 Fettsyremetabolisme.....	12
1.7 Angiopoietinlignende protein 4	15
1.8 Trening som behandling for metabolske sykdommer	16
1.8.1 Effekter av trening på fibertypesammensetningen.....	16
1.9 Metabolsk ”switching”	17
1.10 Peroxisomproliferator-aktiverte reseptorer	18
1.10.1 PPAR α	19
1.10.2 PPAR γ	19
1.10.3 PPAR δ	19
1.11 Epigenetikk	21
1.11.1 DNA-metylering.....	21
1.11.2 Histonmodifikasjoner	22
1.11.3 mikroRNA.....	23
1.12 Mål for oppgaven.....	24
2 Materialer og metoder	25
2.1 Materialer.....	25
2.1.1 Kjemikalier og reagenser	25
2.1.2 Utstyr.....	26

2.2	Donorkarakteristika	28
2.3	Utholdenhetstrening.....	29
2.4	Styrketrening	30
2.5	Opprettelse av cellebank.....	32
2.5.1	Oppskalering	32
2.5.2	Nedfrysning av celler	33
2.6	Celledyrking	34
2.6.1	Utsåing	34
2.6.2	Proliferasjon og differensiering.....	34
2.7	Substratoksidasjonsmetoden.....	34
2.7.1	Celleassosiert radioaktivitet	36
2.7.2	Lipidfiltrasjon.....	36
2.7.3	Medier brukt i metoden	37
2.8	Bradfords metode for måling av proteiner	37
2.9	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon	38
2.9.1	Høsting av celler.....	38
2.9.2	Isolering av RNA	38
2.9.3	Spektrofotometrisk kvantifisering av RNA.....	39
2.9.4	cDNA-syntese	39
2.9.5	qPCR	39
2.10	Statistikk	42
3	Resultater	43
3.1	Dyrking av skjelettmuskelceller til forsøk.....	43
3.2	Oksidasjon og opptak av glukose	44
3.2.1	Effekter av trening <i>in vivo</i> på glukosemetabolismen <i>in vitro</i>	44
3.2.2	Effekter av forbehandling med PPAR δ -agonisten GW501516 på glukosemetabolismen <i>in vitro</i>	46
3.3	Oksidasjon og opptak av oljesyre.....	46
3.3.1	Effekter av trening <i>in vivo</i> på oljesyremetabolismen <i>in vitro</i>	47
3.3.2	Effekter av forbehandling med PPAR δ -agonisten GW501516 på oljesyremetabolismen <i>in vitro</i>	49
3.4	Totalopptak og -oksidasjon av energisubstrater i myotubene	49
3.5	Samlet effekt på fettsyremetabolismen.....	50

3.6	Lipidfiltrasjon	51
3.7	Effekter av trening på genekspressjon	52
3.8	Korrelasjonsanalyser	53
3.8.1	Korrelasjon mellom ulike <i>in vitro</i> -celldata.....	53
3.8.2	<i>In vivo-in vitro</i> korrelasjoner.....	57
4	Diskusjon.....	61
4.1	Vurdering av metodikken	61
4.1.1	Treningsstudien	61
4.1.2	Oppdyrking og differensiering av skjelettmuskelceller (myotuber)	62
4.1.3	Metodene brukt for å måle energimetabolisme og genekspressjon.....	63
4.1.4	Analyse av data og statistikk.....	63
4.2	Glukosemetabolisme og treningseffekter	64
4.3	Oljesyremetabolisme og treningseffekter.....	65
4.4	Korrelasjonsvurderinger	66
4.4.1	Korrelasjon mellom ulike <i>in vitro</i> -data	66
4.4.2	<i>In vivo-in vitro</i> korrelasjoner.....	67
4.5	Veien videre.....	70
5	Konklusjon.....	71
	Referanser	72
	Appendiks	79

Abstract

Background: Physical activity has an important place in prophylaxis and treatment of a number of metabolic diseases such as obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and type 2 diabetes. In this study energy metabolism has been examined in cultured skeletal muscle cells isolated from biopsies from volunteer subjects before and after 12 weeks of extensive endurance and strength training.

Method: Skeletal muscle cells were isolated from biopsy from *musculus vastus lateralis* of male volunteers before and after an exercise intervention period, including two endurance and two strength training sessions of 90 minutes per week for 12 weeks. Subjects with normal as well as compromised glucose metabolism were included. Muscle strength and endurance were examined before and after the intervention period; insulin sensitivity was also examined. The muscle cells were cultured and differentiated into multinucleated myotubes. Lipid and glucose metabolism were studied using radiolabeled [1-¹⁴C]oleic acid and D-[¹⁴C(U)]glucose, respectively. In addition cells were incubated with the peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) agonist GW501516 for the last four days of the differentiation period. Gene expression was studied using quantitative polymerase chain reaction (qPCR).

Results: Cells isolated and differentiated to multinucleated myotubes after a training period of 12 weeks had significantly increased uptake and oxidation of oleic acid compared to cells isolated before 12 weeks of training. There were no significant effects on glucose metabolism after the training period. The expression of the genes cluster of differentiation 36 (CD36), peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC1 α), cytochrome c-1 (Cyc1) and PPAR δ appeared to increase 2-4 times in myotubes after the exercise intervention period. GW501516 increased the oleic acid metabolism in myotubes, but had inhibiting effects on the glucose metabolism. There was no additive effect of GW501516 on oleic acid metabolism as a result of the exercise intervention.

Conclusion: Exercise appeared to have a positive effect on fatty acid metabolism in skeletal muscle cells after 12 weeks of training, and thus some of the effects of training *in vivo* appeared to be conserved in human myotubes cultured *in vitro*. However, more data are needed to be able to draw final conclusions since myotubes from a limited number of subjects were examined in this thesis.

Sammendrag

Bakgrunn/mål: Fysisk aktivitet har en viktig rolle i profylakse og behandling av en rekke metabolske sykdommer som fedme, insulinresistens, metabolsk syndrom og type 2-diabetes. I denne studien ble energimetabolisme undersøkt i dyrkede skjelettmuskelceller isolert fra biopsier fra frivillige individer før og etter 12 uker med omfattende utholdenhets- og styrketrening.

Metode: Skjelettmuskelceller ble isolert fra biopsi av *musculus vastus lateralis* til mannlige frivillige forsøkspersoner før og etter en treningsintervensjonsperiode, som inkluderte to utholdenhets- og to styrketreningsøkter á 90 minutter per uke i 12 uker. Både personer med normal og nedsatt glukosemetabolisme ble inkludert. Muskelstyrke og utholdenhet ble undersøkt før og etter den 12 uker lange intervensjonsperioden; insulinsensitivitet ble også undersøkt. Muskelcellene ble dyrket opp og differensiert til flerkjernede myotuber. Lipid- og glukosemetabolisme ble undersøkt ved å benytte henholdsvis radiomerket [1-¹⁴C]oljesyre og D-[¹⁴C(U)]glukose. I tillegg ble celler inkubert med peroksisomproliferator-aktivert reseptor δ (PPAR δ)-agonisten GW501516 de siste fire dagene av differensieringsperioden. Genekspresjon ble undersøkt ved å benytte kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR).

Resultater: Muskelceller isolert og differensiert til myotuber etter en 12 ukers treningsperiode hadde signifikant økt opptak og oksidasjon av oljesyre sammenlignet med cellene isolert før den 12 uker lange treningsperioden. Det var ingen signifikante effekter på glukosemetabolismen etter treningsperioden. Ekspresjonen av genene "cluster of differentiation" 36 (CD36), peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1 α (PGC1 α), cytokrom c-1 (Cyc1) og PPAR δ så ut til å øke 2-4 ganger etter treningsintervensjonsperioden. GW501516 økte oljesyremetabolismen i myotubene, men hadde hemmende effekt på glukosemetabolismen. Det var ingen tilleggseffekt av GW501516 på oljesyremetabolismen som følge av treningsintervensjonen.

Konklusjon: Trening virket til å ha en positiv effekt på fettsyremetabolismen i skjelettmuskelceller etter en 12 ukers treningsperiode, og noen av effektene av trening *in vivo* så derfor ut til å være bevart i humane myotuber dyrket *in vitro*. Mer data trengs for å kunne trekke endelige konklusjoner ettersom myotuber fra et begrenset antall forsøkspersoner ble undersøkt i denne masteroppgaven.

Forkortelser

36B4	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
AMP	Adenosin monofosfat
Angptl4	Angiopietinlignende protein 4
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert radioaktivitet
CD36/FAT	"Cluster of differentiation 36"/Fettsyretranslokase
CoxIV	Cytokrom c-oxidase IV/kompleks IV
CPT1A	Karnitin palmitoyltransferase-1 isoform A
Ct	Syklusenes terskelverdi
Cyc1	Cytokrom c-1
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Dietyldikarbonat
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle medium"
DMSO	Dimetylsulfoksid
ETK	Elektrontransportkjeden
FADH ₂	Redusert form av flavin-adenin-dinukleotid (FAD)
FBS	Føtalt bovint serum
FCS	Føtalt kalveserum
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase

Forkortelser

GIR	Glukoseinfusjonshastighet
Glu	Glukose
Glukose-6-P	Glukose-6-fosfat
GLUT	Glukosetransportør
HBSS	Hanks bufrede saltløsning
HDL	”High-density” lipoprotein
HK	Heksokinase
IDF	”International Diabetes Federation”
IL	Interleukin
KMI	Kroppsmasseindeks
LD	Lipiddråper
LDL	”Low-density” lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipase
MAG	Monoacylglyserol
NADH	Redusert form av nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD ⁺)
OA	Oljesyre
OGTT	Peroral glukosetoleransetest
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PBS	Fosfatbufret saltvann
PDC	Pyruvat dehydrogenasekompleks
PDK4	Pyruvatdehydrogenasekinase isoenzym 4
PFK	Fosfofruktokinase
PGC1	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1
XVIII	

Forkortelser

PL	Fosfolipid
PLIN	Perilipin
PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
PPRE	Peroksisomproliferator responselement
qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
RxR	Retinoid-X-reseptor
SkGM	Skjelettmuskelcelle-vekstmedium
SMM	Skjelettmuskelmasse
T2D	Type 2-diabetes
TAG	Triacylglyserol
TNF α	Tumor nekrose faktor α
VO ₂ max	Maksimalt oksygenopptak
WHO	Verdens helseorganisasjon
WHR	”Waist-to-hip ratio”

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Verdens helseorganisasjon (WHO) bruker kroppsmasseindeks (KMI) til å definere ulike vektrelaterede helsetilstander. KMI er definert som personens vekt i kilogram over kvadratet av personens høyde i meter, kg/m^2 [1].

Tabell 1.1: WHO's KMI-klassifisering av ulike vektclasser. KMI, kroppsmasseindeks. Modifisert fra [1].

KMI (kg/m^2)	Vektclassifisering
< 18,5	Undervekt
18,5 – 24,9	Normalvekt
≥ 25	Overvekt (prefedme)
≥ 30	Fedme (sykelig overvekt)
<ul style="list-style-type: none"> • 30,0 – 34,9 • 35,0 – 39,9 • ≥ 40 	<ul style="list-style-type: none"> • Fedme klasse I • Fedme klasse II • Fedme klasse III

I 2008 publiserte WHO at over 1,4 milliarder av alle verdens menn og kvinner over 20 år var overvektige; omtrent $\frac{1}{2}$ milliard av disse led av fedme. Videre konstaterte de i 2011 at det på verdensbasis var mer enn 40 millioner barn under 5 år som var overvektige. Prevalensen er stadig stigende, og bare siden 1980 har tallene nesten doblet seg [2]. Bare i Norge er det estimert at prevalensen av overvekt og fedme blant menn og kvinner over 15 år er henholdsvis 57 % og 46 % [3].

Det er svært få legemidler på det norske markedet mot overvekt og fedme. Per i dag er det kun orlistat, markedsført under preparatnavnet Xenical, som er godkjent legemiddel for disse indikasjonene. Tidligere var det flere preparater på markedet, men disse er gradvis blitt enten permanent eller midlertidig trukket tilbake på grunn av bivirkningsrisiko, hovedsakelig hjerte- og karrelaterede hendelser. Orlistat er en pankreaslipasehemmer som spesifikt reduserer hydrolyse av triglyserider i tarmen slik at omtrent 30 % av triglyseridene ikke absorberes og dermed skilles ut med fæces. Det er indisert å bruke preparatet ved helseskadelig fedme ($\text{KMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) eller ved $\text{KMI} \geq 28 \text{ kg/m}^2$ fulgt av andre helseproblemer som hypertensjon, diabetes og dyslipidemi. Orlistat har vist å gi en vektreduksjon på 2-5 kg i forhold til

placebobehandling når kombinert med kostholdsintervensjon med begrenset energi- og fettinntak, og tilstrekkelig fysisk aktivitet. Videre har behandlingen vist å forbedre risikofaktorer som "low-density" lipoprotein (LDL)-nivå, og har også vist å redusere forekomsten av diabetes [4].

Overvekt og fedme er sterkt assosiert med både insulinresistens og metabolsk syndrom, og bidrar til hypertensjon, forhøyet kolesterol og hyperglykemi. Det er vist i flere ulike studier at risikoen for alvorlige helsekonsekvenser, slik som type 2-diabetes (T2D), koronar hjertesykdom og kreft, øker med økende KMI [5, 6]; flertallet av type 2-diabetikerne er klassifisert som overvektige eller fete [7].

Overvekt og fedme fører til overdreven fettakkumulering i ulike vev, særlig i fettvev. Fettvevets lagringskapasitet vil til slutt overskrides, og lipidene vil gå over i sirkulasjonen. Som en konsekvens av dette kan lipidene akkumuleres ektopisk i andre insulinavhengige vev, slik som skjelettmuskel og lever. Denne ektopiske fettlagringen kan overgå det intracellulære behovet og føre til lipotoksisitet, noe som øker faren for insulinresistens ytterligere [8, 9]. Det er funnet økte nivåer av intramyocellulære lipider i skjelettmuskel hos både toppidrettsutøvere og type 2-diabetikere, men toppidrettsutøverne har sjelden insulinresistens. Dette "atletparadokset" indikerer at ektopisk lipidakkumulering ikke alltid inducerer insulinresistens [9].

Fettvev er et endokrint organ og skiller ut ulike typer bioaktive peptider kjent som adipokiner. Adipokiner kan være hormoner som leptin, peptider som adiponektin og resistin, kjemokiner som interleukin 8 (IL-8), andre proinflammatoriske cytokiner som tumor nekrose faktor α (TNF α), interleukin 1 (IL-1) og interleukin 6 (IL-6), eller antiinflammatoriske peptider som interleukin 10 (IL-10) [10]. Det er vist at mennesker som lider av fedme har et høyere nivå av IL-6 og TNF α enn normalvektige [11, 12]. Det er foreslått at adipokinene har en rolle i samspillet mellom fettvev og skjelettmuskel [13]. En mulig teori er at den forhøyede lipidakkumuleringen i fettvev, som foregår ved overvekt og fedme, gir en ubalanse i utskillelse av de pro- og antiinflammatoriske adipokinene [14]. Denne ubalansen i fettvevet fører til slutt til oksidativt stress og en svak, kronisk inflammasjon [15]. Denne fedmeinduserte inflammasjonen kan dermed være en del av patogenesen til insulinresistens [14].

1.2 Insulinresistens

Insulin er et hormon som produseres i β -cellene i pankreas. Insulinets viktigste oppgave er å mediere glukoseabsorpsjon. Insulinresistens utvikles når cellene i kroppen (lever, skjelettmuskel og fettvev) blir mindre sensitive og til slutt resistente for insulin. Ved insulinresistens klarer ikke cellene lenger å absorbere tilstrekkelig av glukosen, og dette fører til for høy glukosekonsentrasjon i blodet. Økt glukosekonsentrasjon vil påvirke β -cellene i pankreas til å produsere mer insulin for å prøve å absorbere glukosen, noe som fører til en tilstand av hyperinsulinemi. Denne stadig økende produksjonen av insulin svekker, og kan til slutt skade, β -cellene. Når pankreas ikke lenger klarer å produsere tilstrekkelig insulin blir hyperglykemi og til slutt T2D et faktum [5].

En av de største risikofaktorene for utvikling av insulinresistens er overvekt, og det er særlig visceral fedme som er assosiert med størst risiko. Dette er fordi abdominalt fett er resistent mot de antilipolytiske effektene til insulin, noe som fører til overdreven frigjørelse av frie fettsyrer, utvikling av lipotoksisitet, og ytterligere reduksjon av insulinsensitiviteten. Dette fører til økt glukoneogenese i lever, hemmet insulinmediert glukoseopptak i skjelettmuskel og høyere serumkonsentrasjoner av glukose. Videre kan fedme i seg selv føre til insulinresistens ved at adipocytene oppnår en viss størrelse og ikke lenger klarer å lagre mer fett. Dette fett må da som sagt lagres andre steder, og resultatet er fettlagring i skjelettmuskler, lever og pankreas, og påfølgende insulinresistens i disse organene [8].

De fete Zucker (*fa/fa*)-rottene er dyremodeller for alvorlig insulinresistens i skjelettmuskel, med hyperinsulinemi, glukoseintoleranse, dyslipidemi og visceral fedme; alle er karakteristika for human insulinresistens. Det er observert at insulinmediert translokasjon av glukose-transportøren GLUT4 (avsnitt 1.6.1) til cellemembranen og glukosetransportaktiviteten generelt sett er kraftig hemmet i disse dyrene. Det er videre vist at skjelettmuskel hos disse dyrene har betydelige defekter i deler av insulinsignaleringskaskaden ved at de har lavere ekspresjon og insulinstimulert tyrosinfosorylering av insulinreseptor-substrat-1 (IRS-1) [16]. Mengden av den p85-regulerende subenheten til fosfoinositid 3-kinase (PI3-kinase) er dessuten bare 29 % av hva som observeres i de slanke kontrollene [17]. (Se hvilken rolle IRS-1 og PI3-kinase har i energimetabolismen i avsnitt 1.6.1.)

Insulinresistens har altså en omfattende patofysiologi. Imidlertid følges insulinresistens vanligvis av flere andre sykdommer av metabolsk og kardiovaskulært opphav, en tilstand som kalles metabolsk syndrom [17].

1.3 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom er en av de største helseutfordringene på verdensbasis; det er estimert at omtrent 20-25 % av verdens voksne befolkning har sykdommen [18]. Patogenesen bak sykdommen er ikke fullstendig kjent, men abdominal fedme og insulinresistens er kjente inkluderte årsaksfaktorer. Det finnes flere ulike definisjoner på tilstanden. ”International Diabetes Federation” (IDF) definerer sykdommen som en tilstand med sentral overvekt (livvidde menn ≥ 94 cm, livvidde kvinner ≥ 80 cm; europeisk etnisitet), i tillegg til at minst to av følgende må foreligge [5]:

- Forhøyet triglyseridnivå ($\geq 1,7$ mmol/l) eller initiert behandling for denne tilstanden
- Hypertensjon (systolisk blodtrykk ≥ 130 mm Hg og diastolisk blodtrykk ≥ 85 mm Hg) eller initiert behandling for denne tilstanden
- Forhøyet fastende blodglukose ($\geq 5,6$ mmol/l) eller diagnostisert med T2D
- Redusert ”high-density” lipoprotein (HDL)-kolesterolnivå ($< 1,03$ mmol/l for menn og $< 1,29$ mmol/l for kvinner) eller initiert behandling for denne tilstanden

Det finnes også andre definisjoner som inkluderer koagulasjonsforandringer som en del av syndromet [5, 19].

Abdominal fedme, diagnostisert ved livvidde, regnes som et bedre mål for diagnostisering av metabolsk syndrom enn KMI, men IDF slår fast at ved $KMI \geq 30$ kg/m² antas det at livvidden er så stor at det er en god nok indikator for sykdommen [5].

Ettersom denne sykdommen omfatter så mange aspekter er det ikke én spesifikk behandling for alle delene av syndromet, men behandlingen må legges opp etter hver enkelt persons behov. Dette betyr at en eventuell overvekt/fedme behandles for seg, eventuell hypertensjon behandles for seg, eventuell T2D behandles for seg, og så videre.

I begrepet metabolsk syndrom er det følgelig en rekke risikofaktorer for hjerte- og karsykdommer som sammenfattes. Sjansen for å rammes av minst ett hjerteinfarkt eller hjerneslag tredobles for mennesker med metabolsk syndrom, og i tillegg har mennesker med metabolsk syndrom fem ganger høyere risiko for å utvikle T2D [20].

1.4 Type 2-diabetes

Type 2-diabetes (diabetes mellitus type 2 - T2D) er et resultat av insulinresistens. Ved insulinresistens virker ikke insulinet godt nok, og insulinproduksjonen stiger kompensatorisk for å holde glukosenivåene innen normalområdet. Til slutt vil imidlertid β -cellene svikte og hyperglykemi inntre; dersom utviklingen ikke stoppes er T2D et faktum. Sammenlignet med type 1-diabetes skjer utviklingen av T2D gradvis. Hemmet glukosetoleranse og hyperinsulinemi kan oppdages før T2D er fullt utviklet, og med endret diett, mer trening og vekttap kan utviklingen av T2D forhindres [8].

Dersom T2D er et faktum vil tilstrekkelig behandling vanligvis være en kontrollert diett, røykeslutt dersom det er aktuelt, fysisk aktivitet og perorale antidiabetika. Det er viktig at det blir satt individuelle behandlingsmål for vekt, fysisk aktivitetsnivå, kolesterol, blodtrykk, blodglukose og glykosylert hemoglobin (HbA_{1C}), noe som presiseres i de nasjonale retningslinjene. De generelle behandlingsmålene anbefaler at alle type 2-diabetikere bør oppnå et vekttap på 5-10 % (dersom overvektig), drive fysisk aktivitet minst 30 minutter daglig, tilstrebe LDL-kolesterol $\leq 2,5$ mmol/l ($\leq 1,8$ mmol/l dersom pasienten har koronar hjertesykdom), blodtrykk $\leq 135/80$ mmHg, fastende blodglukose på 5-6 mmol/l, ikke-fastende blodglukose på 4-10 mmol/l og $HbA_{1C} < 7$ % (de tre sistnevnte parametrene er generelle behandlingsmål for personer under 80 år) [19].

Dersom legemiddelbehandling er nødvendig skal denne også tilpasses den enkelte person. Av perorale antidiabetika er metformin i de fleste tilfeller førstevalg med gradvis økende dosering til behandlingsmålet for blodglukose nås. Behandlingen kan eventuelt suppleres med et sulfonylureapreparat dersom maksimal dose metformin ikke har tilstrekkelig blodglukosesenkende effekt [19]. Det diskuteres stadig om statinbehandling bør være en del av behandlingen for T2D uansett kolesterolnivå og risikograd for hjerte- og karsykdom ettersom statinbehandling har vist å ha en klar beskyttende effekt mot kardiovaskulær sykdom. Dette inngår imidlertid ikke i de gjeldende norske anbefalingene [21]. For de som

har vansker med å oppnå behandlingsmålene kan forverringen av sykdommen fortsette og det kan bli nødvendig å tilføre insulin i form av NPH-insulin [19].

T2D er vanligst hos personer over 40 år, men inntreffer vanligvis ved 60-70 års alder. Det er imidlertid viktig å påpeke at T2D observeres hos stadig yngre personer; til og med hos barn. WHO har estimert at T2D utgjør nesten 90 % av all diabetes i verden, og at det hovedsakelig skyldes overvekt og inaktivitet [22]; omtrent 80 % av alle type 2-diabetikere er overvektige [8]. Overvekten er, som tidligere beskrevet, med på utviklingen av insulinresistens, og det er visceral fedme som er assosiert med høyest risiko. Genetikk er imidlertid også involvert. Dersom en av foreldrene har T2D er sannsynligheten for at barnet utvikler sykdommen 5-10 %, sammenlignet med en sannsynlighet på 1-2 % for barn av foreldre med type 1-diabetes [8]. Selv om gener kan predisponere en person for å utvikle T2D må vanligvis også livsstilsfaktorene med ubalansert kosthold, fysisk inaktivitet, overvekt, og visceral fedme være involvert [23].

Risikofaktorene for å utvikle T2D kan deles inn i ikke-modifiserbare og modifiserbare risikofaktorer. De ikke-modifiserbare risikofaktorene omfatter hovedsakelig genetikk, alder og kjønn, mens de modifiserbare risikofaktorene er fedme, fysisk inaktivitet og kosthold. Ettersom omtrent 75-80 % av alle diabetikere dør som følge av kardiovaskulære sykdommer, og type 2-diabetikere har 2-4 ganger høyere risiko for å utvikle koronar hjertesykdom enn den øvrige befolkningen, er det svært viktig å prøve å påvirke de modifiserbare risikofaktorene så tidlig som mulig [23].

Bare i Europa lever omtrent 60 millioner mennesker med T2D, og prevalensen fortsetter stadig å øke [24]. Det er trolig et svært stort antall på verdensbasis som er udiagnostiserte ettersom symptomene vanligvis er lite fremtredende og kommer gradvis over lang tid. IDF estimerte i 2012 at det på verdensbasis er mer enn 371 millioner diabetikere (20-79 års alder), hvorav omtrent halvparten er udiagnostiserte; de fleste av disse er type 2-diabetikere [25].

1.5 Skjelettmusklens oppbygning og struktur

Skjelettmuskulaturen består av omtrent 600 separate muskler som alle er bygd opp av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Hver muskelfiber er omgitt av en bindevevshinne, og i denne er det både blodårer og nerver. Skjelettmuskelcellene dannes i fosterstadiet ved at

myoblaster (embryonale celler) fusjonerer til flerkjernede muskelceller (myotuber), og etter hvert som barnet vokser øker muskelfibrenes størrelse. Ferdig utvikste muskelfibre har typisk en diameter på 50 μm og har vanligvis noen få centimeters lengde. Det er imidlertid viktig å påpeke at diameteren til de enkelte muskelfibrene hos hver enkelt person kan variere avhengig av trening [26].

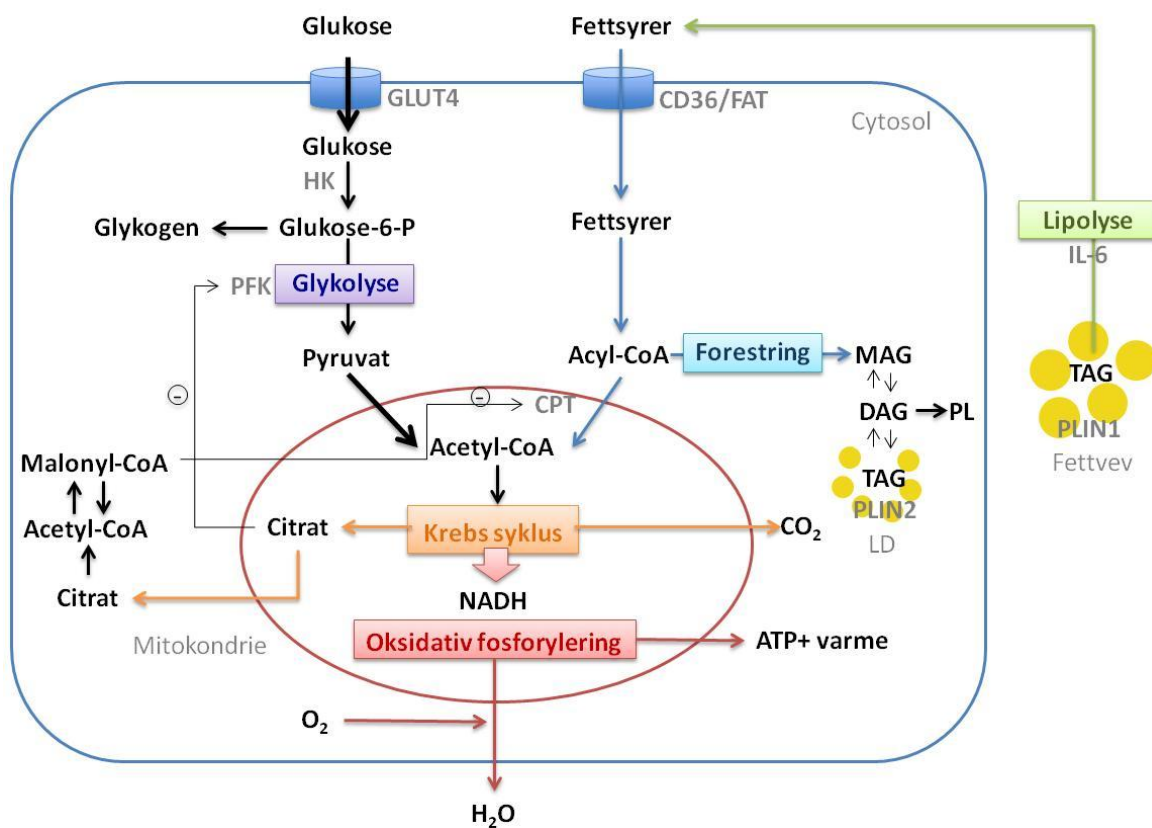
Skjelettmuskulaturen kalles tverrstripet muskulatur på grunn av struktureringen av aktin- og myosinfilamentene som myofibrillene består av. Myofibriller er strukturer som utgjør mesteparten av muskelfibrene, og er tett sammenpakket i hele muskelfibrenes lengde. Myofibrillene består dermed hovedsakelig av to typer filamenter, proteinene aktin og myosin, som følger et fast mønster som gir den karakteristiske tverrstripete strukturen. Sarkomeren er den minste enheten i mønsteret og består av to sett aktinfilamenter med et myosinfilament mellom hvert aktinfilament. Når muskelfibrene kontraherer forkortes sarkomere ved at myosinfilamentene blir forskjøvet i forhold til hverandre slik at det blir en økt overlapping mellom aktin- og myosinfilamentene. Når skjelettmuskulaturen stimuleres til å kontrahere begynner hodet på myosinet og bevege seg langs aktinfilamentet i gjentatte sykluser hvor myosinhodet binder og hydrolyserer ett ATP-molekyl i hver syklus. Når kontraksjonen er ferdig mister myosinhodet kontakten med aktinfilamentet og muskelen hviler. Ved utstreking av muskelen blir naturlig nok overlappingen derfor mye mindre. [26].

Satelittceller ble første gang beskrevet i froskemuskel i 1961 av Alexander Mauro på bakgrunn av morfologien og plasseringen deres i forhold til ferdig utvikste muskelfibre [27]. Satelittcellene i ferdig utvikst skjelettmuskel er vanligvis mitotisk passive, men aktiveres som respons på stress, for eksempel traume/skade eller muskelvekst [28]. Antallet passive satelittceller i ferdig utvikst skjelettmuskel forblir tilnærmet konstant gjennom flere sykluser med degenerering og regenerering, noe som tyder på at satelittcellene kan fornye seg selv. Antallet satelittceller og fordoblingspotensialet deres reduseres imidlertid hos personer med muskelsykdommer som Duchennes muskeldystrofi. Aktiverte prolifererende satelittceller (myoblaster) kan ettersom proliferasjonen fortsetter fusjonere med preeksisterende muskelfibre eller fusjonere med andre myoblaster og danne flerkjernede myotuber [29]. Satelittcellene medierer dermed musklens postnatale vekst, og som en følge av fusjoneringen er det sett i rotter at antallet satelittceller reduseres med økende alder [30]. Ekspresjonen av viktige proteiner involvert i glukose- [31] og lipidmetabolisme [32] øker under differensiering av myoblaster til myotuber. Sammenlignet med proteinekspresjonsmønsteret som ses i

myoblaster ligner proteinekspresjonsmønsteret i myotubene mer på det som observeres i ferdig utviklede skjelettmuskelfibre *in vivo*. Det er derfor myotuber det foretrekkes å gjøre forsøk på [33].

1.6 Glukose- og fettsyremetabolisme i skjelettmuskel

Skjelettmuskel, som utgjør inntil 40-50 % av kroppsmassen [17, 34], har hovedansvar for kroppens energiomsetning. Det er et veldig plastisk vev som tilpasses etter bruk og næringsstatus [34]. Ved faste reduseres energiinntaket, mens energiforbruket øker ved trening [35]. Skjelettmuskel tilpasser seg disse vekslende forholdene ved å hovedsakelig benytte lipidoksidasjon som energikilde ved faste, og ved å øke glukoseoksidasjon samt redusere lipidoksidasjon som respons på insulin [36]. Manglende evne til å øke lipidoksidasjonsbehovet kan være involvert i patogenesen ved insulinresistens, metabolsk syndrom og fedme [35, 37]. Figur 1.1 viser en forenklet versjon av glukose- og fettsyremetabolismen i skjelettmuskel, og samspillet med fettvevet.



Figur 1.1: Forenklet illustrasjon av glukose- og fettsyremetabolisme i en skjelettmuskelcelle og samspill med fettvev. Glukose og fettsyrer tas opp og omdannes enten til stoffer som kan lagres eller tas opp og oksideres i mitokondriene. GLUT4, glukosetransportør 4; CD36/FAT, "Cluster of differentiation 36"/fettsyretranslokase;

HK, heksokinase; Glukose-6-P, glukose-6-fosfat; PFK, fosfofruktokinase; IL-6, interleukin 6; CPT, karnitin palmitoyltransferase; CoA, koenzym A; MAG, monoacylglycerol; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol; PL, fosfolipid; PLIN1, perilipin 1; PLIN2, perilipin 2; LD, lipiddråper; NADH, redusert form av nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺); ATP, adenosintrifosfat; O₂, oksygen; H₂O, vann. Modifisert fra [38].

1.6.1 Glukosemetabolisme

Glukose transporteres inn i skjelettmuskelcellene ved hjelp av transmembrane glukosetransportører (GLUT) som vist i figur 1.1. Det er identifisert 15 ulike GLUT-proteiner, og minst fem av disse er uttrykt i skjelettmuskel [39]. Det er vist at GLUT1 og GLUT4 er de to isoformene som er viktigst for glukosetransporten inn i skjelettmuskelceller. GLUT1 er relativt lavt uttrykt i skjelettmuskel, men det er antatt at denne isoformen er ansvarlig for basalopptaket av glukose. GLUT4 er den dominerende glukosetransportøren i skjelettmuskel og står for det insulinmedierte glukoseopptaket. Under basale forhold lagres GLUT4 intracellulært, mens ved insulinstimulering translokeres den til cellemembranen [40]. Glukosetransporten gjennom cellemembranen er det hastighetsbegrensende trinnet i glukosemetabolismen i skjelettmuskel [41].

Glukosetransporten inn i myotubene stimuleres dermed hovedsakelig ved en insulinavhengig mekanisme, men kan også aktiveres av muskelkontraksjoner ved trening. Når insulin binder seg til α -subenheten på insulinreseptoren øker aktiviteten av tyrosinkinase i de intracellulære β -subenhetene. Dette fører til autofosforylering av insulinreseptoren og tyrosinfosforylering av insulinreseptor-substrat-1 (IRS-1). Dette IRS-1-molekylet kan så binde seg til den p85-regulerende subenheten på fosfatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), som så aktiverer den katalytiske p110-subenheten. De katalytiske produktene fra PI3-kinase kan føre til aktivering av fosfoinositidavhengige kinaser (PDK) [17]. PDK har fire isoenzymer [34], og de ulike PDK har ulike kinaser de virker på nedstrøms, blant annet Akt/PKB og Akt/PI3. Aktivering av disse trinnene fører til slutt til translokasjon av GLUT4 til cellemembranen og t-tubuli, som igjen kan øke glukoseopptaket til skjelettmuskel. Translokasjonen av GLUT4 til membranen kan også bli stimulert av muskelkontraksjoner alene [17]. Det er trolig ulike intracellulære signaleringsmekanismer involvert for å få GLUT4-translokasjon ved insulin- og kontraksjonsstimuli. Aktivering av enzymet 5'-adenosin monofosfataktivert protein kinase (AMPK) kan ha en rolle i den kontraksjonsmedierte translokasjonen. AMPK aktiveres av en reduksjon i konsentrasjonen av kreatinfosfat og en økning av AMP-til-ATP ratioen som følge av fysisk aktivitet (muskelkontraksjoner). I en studie av Kurth-Kraczek *et al.* ble det funnet at

AMPK-aktivering økte glukoseopptaket via en økt translokasjon av GLUT4 til cellemembranen [42]. Aktivering av AMPK har også vist å stimulere lipidoksidasjon i tillegg til glukoseopptak [16].

I cytosol kan glukose, som vist i figur 1.1, enten omdannes til pyruvat gjennom glykolysen eller lagres i lever og skjelettmuskel i form av glykogen. Pyruvat kan videre tas opp i mitokondriene og omdannes til acetyl-CoA, som så kan gå inn i Krebs syklus der CO₂ frigjøres som et avfallsprodukt. Videre fortsetter reaksjonen med oksidativ fosforlyring (OXPHOS), det siste trinnet i metabolismen av glukose og fettsyrer. I denne prosessen dannes FADH₂ og NADH som gir fra seg elektronene sine i elektrontransportkjeden (ETK) hvilket resulterer i frigivelse av energi i form av ATP og varme, og til slutt H₂O fra H⁺ og molekylært oksygen [38]. ETK består av fire elektronbærerkomplekser, kompleks I-IV, som alle er innesluttet i mitokondrienes innermembran. Kompleks I (NADH koenzym Q reduktase) mottar elektroner fra NADH fra Krebs syklus og viderefører dem til koenzym Q (ubiquinon). Koenzym Q mottar også elektroner fra kompleks II (suksinat dehydrogenase) som selv mottar elektroner fra FADH₂ fra Krebs syklus. Ubiquinon overfører elektronene til kompleks III (cytokrom bc₁ kompleks) som overfører dem til cytokrom c (Cyc1). Cyc1 overfører til slutt elektronene til kompleks IV (cytokrom c oxidase – CoxIV) som bruker elektronene sammen med hydrogenioner til reduksjonen av molekylært oksygen til vann [43].

Effekt av trening på glukosemetabolismen

Utholdenhetstrening endrer skjelettmuskels metabolske fenotype; antall mitokondrier øker, noe som fører til økt kapasitet for skjelettmuskel for aerob metabolisme. Sammen med det økte mitokondrieantallet er det også sett at utholdenhetstreningen fører til akutte effekter på virkningen av insulin, forbedret insulinsensitivitet og glukosetoleranse, og økt ekspresjon og translokasjon av GLUT4 [17, 44, 45]. Nivået av GLUT1 forblir upåvirket [45].

Det insulinmedierte glukoseopptaket er som sagt relatert til den aerobe kapasiteten. Når mer GLUT4 er tilgjengelig i cellemembranen vil dette mediere økt glukoseopptak, som igjen medierer økt glukoseoksidasjon og lagring av glykogen. Videre øker, som tidligere nevnt, muskelkontraksjoner i seg selv translokasjonen av GLUT4 til membranen og på den måten opptaket av glukose [17, 40]. Det er imidlertid observert i flere studier at insulinstimulering ikke fører til den normale induseringen av GLUT-4 translokasjon til cellemembranen hos type 2-diabetikere [17]; det er dette som er insulinresistens.

Hos individer med insulinresistens er det observert dårligere insulinstimulering av insulinreseptoren samt mindre IRS-1-fosforylering og PI3-kinaseaktivitet. Trening har vist å ha adaptive responser på slike enzymer som er involvert i fosforylering og oksidasjon av glukose. Moderat- og høyintensitets utholdenhetstrening har også ført til høyere nivåer av enzymer involvert i glukosekatabolisme i skjelettmuskel, slik som heksokinase og citrat syntase [17].

Skjelettmuskel produserer på lignende måte som fettvev ulike faktorer som har endokrin effekt, og kalles da myokiner [46]. Det er observert at mRNA-ekspresjonen av myokinet IL-6 oppreguleres som følge av muskelkontraksjoner i skjelettmuskel, og det er observert inntil 100 gangers økning av IL-6 i sirkulasjonssystemet som følge av trening, selv om en mer moderat økning er mest vanlig [47]. Produksjonen av IL-6 er imidlertid relatert til både treningsintensiteten og treningsvarigheten; for å kunne påvise myokinet må treningen ha vedvart i minst 30 minutter. Videre er utholdenhetskapasitet og hvor stor muskelmasse som benyttes under treningen faktorer av betydning for hvor stor økning det blir i plasmakonsentrasjonen av IL-6 [48]. Det er blitt foreslått at IL-6 kan være involvert i å mediere glukoseopptak under trening da økt ekspresjon av IL-6 under trening er assosiert med økt glukoseopptak [49]. Studier gjennomført *in vivo* av Carey *et al.* viste at IL-6 medierte både basalopptak og insulinstimulert glukoseopptak gjennom å mediere translokasjon av GLUT4 til cellemembranen [50].

Fettsyrers hemming av glukosemetabolismen

Fettsyremetabolismen er relatert til glukosemetabolismen på flere måter. Hvis fettsyreoksidasjonen minker vil glukose- og glykogenoksidasjonen øke for å opprettholde nødvendige energinivåer i kroppen. I 1963 la Randle *et al.* frem en hypotese kalt glukose-fettsyre syklusen. Hypotesen går ut på at tilgjengeligheten av frie fettsyrer bestemmer graden av lipidoksidasjon i skjelettmuskel, og at fettsyreoksidasjonen igjen direkte hemmer lagring og nedbrytning av glykogen og glukosemetabolismen [51]. Det er foreslått flere mulige forklaringer på denne effekten [52, 53]:

- Hemming av PDK gjennom akkumulering av acetyl-CoA

- Hemming av fosfofruktokinase (PFK) gjennom akkumulering av citrat fra Krebs syklus. (PFK er et enzym som katalyserer omdannelsen av glukose-6-fosfat til pyruvat.)
- Hemming av heksokinase (HK) på grunn av akkumuleringen av glukose-6-fosfat når PFK hemmes. (HK er et enzym som katalyserer omdannelsen av glukose til glukose-6-fosfat.)

Dette er imidlertid ikke observert i mennesker, men glukose-fettsyre syklusen står likevel sentralt som forklaring på substratinteraksjonen mellom glukose og fettsyrer i mennesker ettersom det i flere studier er observert at økt fettsyrekonsentrasjon fører til økt fettsyreoksidasjon og redusert glukoseoksidasjon [52, 53].

1.6.2 Fettsyremetabolisme

Fett er hovedreservoaret for energi og også den største energikilden til kroppen. Dårlig regulering av fettsyremetabolismen er relatert til utvikling av metabolske sykdommer som insulinresistens og diabetes, og kardiovaskulære sykdommer [53].

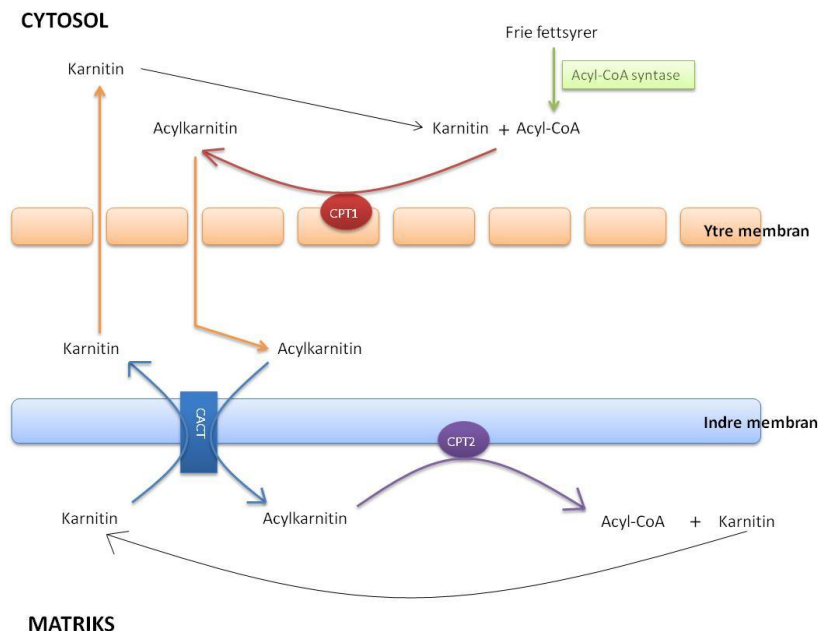
Triacylglyserol (TAG) er hovedlipidet som tilføres via kosten. I magesekken brytes dette ned av spesifikke lipaser, og frie fettsyrer og glyserol frigjøres. Fettsyrene tas opp og forestres tilbake til triglyserider av enterocytene, pakkes sammen med fosfolipider og proteiner, og danner kylomikroner. Disse går via lymfesystemet og ender til slutt i sirkulasjonssystemet. Kylomikronene blir her brutt ned til frie fettsyrer av enzymet lipoprotein lipase (LPL), som hovedsakelig finnes i endotelcellelaget i kapillærer i skjelettmuskler, fettvev, lever og hjertet. De frie fettsyrene kan så tas opp i disse ulike vevene. I fettvev blir fettsyrene vanligvis forestret tilbake og lagret som triglyserider, men noe triglyserid blir også lagret intracellulært i skjelett- og hjertemuskel [53]. Perilipin 2 (PLIN2) er en av de mest fremtredende perilipinene i skjelettmuskel. Perilipiner er proteiner som sitter i membranen til lipiddråpene (LD). Ekspresjonen av PLIN2 er involvert i både syntese av lipiddråper, lagring av TAG og hemming av lipiddråpelipolyse. Dette gjør at proteinet er en viktig demper av lipotoksisitetsindusert insulinresistens [9].

Det er hovedsakelig lever, skjelett- og hjertemuskel som står for oksidasjonen av fettsyrene. Når leveren oksiderer fettsyrene dannes ketonlegemer som kan oksideres videre av hjernen og

skjelettmuskler når glukosenivåene er for lave [53]. Det er imidlertid, som tidligere antydnet, lagringen av triglyserider og fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel som er mest relevant med tanke på mulig patofysiologi bak metabolske tilstander som insulinresistens, metabolsk syndrom, fedme og T2D. De påfølgende mekanismene som beskrives her omhandler derfor fettsyremetabolisme i skjelettmuskel.

Fettsyreer transporteres inn i cytosol via passiv diffusjon eller ved hjelp av transportproteiner, for eksempel "cluster of differentiation"/fettsyretranslokase (CD36/FAT) [54], som vist i figur 1.1. I cytosol blir fettsyrene transportert av fettsyrebindende proteiner før nedbrytning til acyl-CoA av enzymet acyl-CoA-syntase. Avhengig av energibehovet kan acyl-CoA fraktes videre inn i mitokondriene for β -oksidasjon eller til endoplasmatisk retikulum for forestring til TAG som så kan lagres i lipiddråper i skjelettmuskel eller i fettvev [55]. Triglyseridene kan så brytes ned til frie fettsyrer igjen gjennom lipolysen. Enzymet hormonsensitiv lipase frigjør fettsyrene fra triglyseridene. I visse tilfeller påvirker tilgjengeligheten av frie fettsyrer opptaket og oksidasjonen av fettsyrer i skjelettmuskel og lipolysereguleringen blir da svært viktig [53].

Acyl-CoA er ikke permeabel for den indre membranen i mitokondriene [55] og må omdannes til acylkarnitin av enzymet karnitin palmitoyltransferase 1 (CPT1) som vist i figur 1.2.



Figur 1.2: Transport av acyl-CoA inn i mitokondrienes matris. Opptak av acyl-CoA til mitokondrier er avhengig av tre transportproteiner i en trinnavvis utvekslingsreaksjon med karnitin. CoA, koenzym A; CPT1, karnitin palmitoyltransferase 1; CACT, karnitin:acylkarnitin-translokase; CPT2, karnitin palmitoyltransferase 2.

CPT1 er første del av karnitin palmitoyltransferase (CPT)-komplekset, og er lokalisert på overflaten av den ytre membranen til mitokondriene. Det er foreløpig to kjente isoformer av proteinet, CPT1A og CPT1B, som hovedsakelig finnes i henholdsvis lever og skjelettmuskel. Etersom β -oksidasjonen avhenger av at acyl-CoA kommer seg inn i mitokondriene regnes CPT1-transporten som det hastighetsbestemmende trinnet [53]. Denne reaksjonen kan hemmes av malonyl-CoA som interfererer ved å regulere CPT1, noe som fører til at fettsyrene ikke klarer å assosiere seg med karnitin. Dannelsen av malonyl-CoA er katalysert av enzymet acetyl-CoA karboksylase (ACC). ACC finnes som to kjente isoformer, ACC α og ACC β , der ACC β er den isoformen som hovedsakelig uttrykkes i skjelettmuskel og som er involvert i malonyl-CoA sin inhiberende evne på CPT1 [55].

Acylkarnitin translokteres inn i mitokondrienes matriks i en utvekslingsreaksjon katalysert av andre del av CPT-komplekset, karnitin:acylkarnitin-translokase (CACT), et integrert innermembran protein (se figur 1.2). Inne i matriksen blir acylkarnitin omdannet tilbake til acyl-CoA av siste del av CPT-komplekset, enzymet karnitin palmitoyltransferase 2 (CPT2), som er lokalisert på overflaten til den indre membranen som vist i figur 1.2 [55].

Så fort acyl-CoA har kommet inn i mitokondriematriksen kan den metaboliseres videre til acetyl-CoA som så kan oksideres videre i Krebs syklus og OXPHOS som beskrevet for glukosemetabolismen [38].

Effekt av trening på fettsyremetabolismen

Ved hvile blir omtrent 70 % av de frie fettsyrene som blir frigjort til sirkulasjonen under lipolysen forestret tilbake til triglyserider i stedet for å gå til oksidasjon [56]. Ved trening kan disse fettsyrene imidlertid bli brukt til å tilføre energi til skjelettmusklene [53].

CD36/FAT er som sagt en viktig transportør for å mediere opptak av fettsyrer til cytosol. I tidligere studier er det vist at CD36/FAT translokteres fra intracellulære lagringssteder til cellemembranen ved trening. Dermed kan mer fettsyrer tas opp over membranen, som igjen kan føre til høyere fettsyreoksidasjon [57]. Det er videre indikasjoner på at CD36/FAT kan mediere opptak av andre PPAR δ -ligander. CD36/FAT er selv et målgen for PPAR δ , noe som gjør at dette vil føre til en positiv "feedback"-mekanisme og forsterke PPAR δ -effektene ved tilstedeværelse av en aktiv ligand [34].

Ved trening er det vist at konsentrasjonen av malonyl-CoA reduseres og konsentrasjonen reduseres som funksjon av treningsintensiteten. Når nivåene av malonyl-CoA minker øker aktiviteten av CPT1, noe som kan bidra til en økt fetttsyreoksidasjon [53].

Som tidligere nevnt er det sett at mRNA-ekspressjonen av IL-6 øker under trening og at dette cytokinet har vist å være involvert i glukoseopptak. Studier har imidlertid også vist at IL-6 kan øke fetttsyreoksidasjonen. Som for glukosemetabolismen er det foreslått at aktivering av AMPK er en viktig del av årsaken til hvordan IL-6 påvirker lipidoksidasjonen. IL-6 aktiverer AMPK og fører til fosforylering av ACC som fører til at ACC-aktiviteten hemmes. Dette reduserer nivået av malonyl-CoA som gjør at malonyl-CoA sin hemming av CPT1 opphører. Dette muliggjør, som beskrevet overfor, en økt lipidoksidasjon [50].

Glukoses hemming av fetttsyremetabolismen

Glukose er hovedsignalet for insulinfrigjøring, noe som gjør at det forventes en effekt på lipolyse avhengig av glukoseinntaket. Dette er blitt observert i flere studier, der en økende konsentrasjon av plasmaglukose stimulerer insulinfrigjøring, noe som igjen øker glukoseopptaket og forestringen av fettstyrer, og dette vil igjen redusere lipolysen. Den hemmende effekten glukose har på lipolyse medieres dermed fullstendig av insulin [58].

Den intracellulære konsentrasjonen av malonyl-CoA i skjelettmuskel er en viktig regulator av CPT1-aktiviteten, og konsentrasjonen øker med økende glukosenivå. Dette er derfor en viktig del av mekanismen for hvordan glukose undertrykker fetttsyreoksidasjonen, ved at det økende glukoseinntaket undertrykker den CPT1-medierte transporten av fettstyrer inn i mitokondrienes matriks [53].

1.7 Angiopoietinlignende protein 4

Angiopoietinlignende protein 4 (Angptl4) er et protein som hovedsakelig er uttrykt i fettvev og lever. Det er et målgen for både PPAR α og PPAR γ , og aktivering av begge disse reseptorene har vist å øke ekspressjon og sirkulerende nivåer av Angptl4 i både mennesker og gnagere. I tillegg er Angptl4 under kontroll av næringsinntak ved at plasmakonsentrasjonen øker under faste og reduseres ved inntak av mat med høyt fettinnhold. De metabolske funksjonene til Angptl4 er ikke nøyaktig forstått, men studier gjort på mus av Xu *et al.* har assosiert Angptl4 med regulering av glukosemetabolisme. De fant at overekspressjon av

Angptl4 merkbart reduserte blodglukosenivåene og forbedret glukosetoleransen i mus, og forbedret også hyperglykemi, hyperinsulinemi og glukoseintoleranse hos *db/db* diabetiske mus [59]. Robciuc *et al.* fant imidlertid ingen effekt på glukosemetabolismen ved overekspresjon av Angptl4 i myotuber dyrket opp fra humane satelittceller [60].

Lipoprotein lipase (LPL) er en viktig regulator av triglyseridnivåene i kroppen som respons på næringssituasjonen, noe som gjør at den er kritisk for å opprettholde lipidhomeostasen og energitilførsel. Angptl4 har vist å regulere triglyseridmetabolismen ved å hemme LPL. I studier av Köster *et al.* ble det funnet at Angptl4 transgene mus hadde forhøyede nivåer av triglyserider i plasma, forhøyet total kolesterol og redusert LPL-aktivitet. I motsetning utviklet Angptl4 ”knockout”-mus hypotriglyseridemi og hadde økt LPL-aktivitet, med større effekt i fastende enn foret tilstand; Angptl4 induseres som nevnt av faste. De konkluderte dermed med at Angptl4 har som funksjon å regulere nivåene av sirkulerende triglyserider under de ulike næringstilgangene og spiller dermed en rolle i lipidmetabolismen under foring/faste gjennom ulik hemming av LPL [61].

1.8 Trening som behandling for metabolske sykdommer

Den kraftige økningen av metabolske sykdommer er sterkt relatert til fysisk inaktivitet [23]. Jevnlig fysisk aktivitet er assosiert med redusert risiko for utvikling av overvekt/fedme, metabolsk syndrom, T2D og kardiovaskulære sykdommer, og også forbedring av alle disse tilstandene. Det er sett at fysisk aktivitet blant annet forbedrer insulinsensitivitet, glukosehomeostase (reduserer plasmaglukose, øker glukoseopptak og glykogensyntese i skjelettmuskel) og øker fetttsyreoksidasjon i skjelettmuskel [17, 57], reduserer blodtrykk og plasmanivåer av lipoproteiner og triglyserider [16]. Fysisk aktivitet, sammen med en kostholdsintervensjon, som hovedbehandling for metabolske sykdommer er derfor anbefalt av både leger og myndigheter. De nasjonale helseanbefalingene per i dag er minimum 30 minutter moderat intensiv aktivitet daglig [19].

1.8.1 Effekter av trening på fibertypesammensetningen

Skjelettmuskel inneholder en blanding av ulike typer muskelfibre og kan deles inn i to hovedgrupper: type I (langsomme/oksidative)- og type II (raske/glykolytiske)-fibre [26]. Type I-fibrene har langsom kontraksjonshastighet, er rike på mitokondrier og produserer

hovedsakelig energi gjennom OXPHOS. Dette gjør at de har en langvarig ATP-tilførsel og er derfor svært utmattelsesresistente. Type II-fibre kan deles inn i tre undergrupper: type IIa-, IIx- og IIb-fibre. Felles for alle tre er at de har rask kontraksjons-hastighet, men de er ulike med tanke på mitokondrienivå og energiproduksjon. Type IIb-fibrene har laveste mitokondrienivå og færrest oksidative enzymer, det vil si at de produserer energi gjennom glykolysen og er da mer mottakelige for utmattelse. Type IIa- og IIx-fibrene ligger et sted mellom type I- og type IIb-fibrene med tanke på mitokondrieinnhold og energiproduksjon [26, 62].

Muskelfibersammensetningen ser ut til å være relatert til ulike metabolske sykdommer, deriblant fedme og T2D. Mrad *et al.* viste i 1992 at når rotter gis en diett med høyt fettinnhold så er det rottene med færrest type I-fibre som legger på seg mest [63]. Videre er det observert redusert oksidativ kapasitet, økt glykolytisk kapasitet og redusert prosentvis mengde type I-fibre i skjelettmuskel både hos pasienter som lider av fedme [64, 65] og T2D [64, 66]. Økning av mengden oksidative fibre kan forbedre insulinvirkningen og redusere størrelsen på adipocytene [62].

Som tidligere nevnt er skjelettmuskel et plastisk organ. Ulike studier har fått resultater som tyder på at skjelettmuskel kan gjennomgå fibertypeendring, fra fibertype IIb til type IIa eller I, som respons på trening [62, 67], men det diskuteres fremdeles om dette faktisk skjer i human skjelettmuskel. Det tenkes at denne omdannelsesreaksjonen er mediert av en kalsiumsignaleringskjede som involverer kalsineurin, kalmodulinavhengig kinase og peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1 α (PGC1 α) [62]. PGC1 α er en transkripsjonskoaktivator som kontrollerer ekspresjonen av gener involvert i oksidativ metabolisme [68]. Den induseres av trening [69], og er ved ekspresjon i skjelettmuskel involvert i blant annet fiberbytte, mitokondriebiogenese og økt fettsyreoksidasjon [70]. Økt ekspresjon av PGC1 α er assosiert med redusert risiko for (videre)utvikling av fedme og diabetes [68].

1.9 Metabolsk ”switching”

Metabolsk ”switching” i humane skjelettmuskelceller dyrket *in vitro* ble første gang beskrevet av Ukropcova *et al.* i 2005. Suppressibilitet ble definert som evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen, mens adapterbarhet ble definert som evnen til å øke

fettsyreoksidasjonen når fettsyretilgjengeligheten øker. Metabolsk fleksibilitet *in vivo* ble definert som evnen til å bytte fra fettsyreoksidasjon under faste til å øke glukoseoksidasjonen og undertrykke lipidoksidasjonen som respons på insulin [71].

In vitro suppressibilitet viste seg å være motsatt korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet *in vivo*, mens adapterbarhet var positivt korrelert med disse parametrene. Dermed ble det slått fast at skjelettmuskels metabolske fleksibilitet er hemmet ved insulinresistens og at metabolsk fenotype er av stor betydning [71]. Metabolsk fleksibilitet er karakteristisk for friske individer med normal vekt [36], og er redusert hos individer med insulinresistens [71], fedme og T2D [35].

Ved trening skjer det en kraftig økning i opptaket og oksidasjonen av langkjedete fettsyrer i skjelettmuskel. Ved lavintensitetstrening over flere timer øker utnyttelsen av lipider, på bekostning av karbohydrater, som energikilde med den gradvise nedgangen i den respiratoriske kvotienten. Når intensiteten i treningen øker så skjer det derimot et bytte i energisubstratpreferanse ved at utnyttelsen av karbohydrater øker mens utnyttelsen av fett minker. Ved utholdenhetstrening skjer det i stedet en et bytte mot større utnyttelse av fett enn karbohydrater som energikilde [54].

1.10 Peroxisomproliferator-aktivererte reseptorer

Familien av peroksisomproliferator-aktivererte reseptorer (PPAR) består av tre medlemmer, PPAR α , PPAR γ og PPAR δ , og er klassifisert som subtype 1C blant kjernerreseptorene [34, 72]. Alle PPAR er ligandaktivererte transkripsjonsfaktorer, vidt distribuert over mange vev, og har mange ulike fysiologiske funksjoner [34]. PPAR aktiverer gentranskripsjonen blant annet ved å heterodimerisere med retinoid-X-reseptorer (RxR). Etersom RxR også finnes som ulike isoformer kan dette resultere i ulike heterodimerer, noe som kan ha funksjonell betydning i ulike celler [72]. Etter dimeriseringen med RxR binder reseptorkomplekset seg til et peroksisomproliferator responselement (PPRE) som sitter i promotordelen eller i andre regulatoriske områder i målgenet. Reseptorkomplekset regulerer dermed transkripsjonen av gener som har et PPAR-responselement; PPRE finnes i gener involvert i energimetabolisme [34]. Endogene ligander for PPAR er flerumettede fettsyrer [73], eikosanoider [74, 75], triglyserider og retinoinnsyre [75]. I fravær av ligand binder PPAR til korepressorer og undertrykker ekspresjonen av målgenene sine, mens når ligand er tilstede vil korepressoren

fortrenges og ligand-reseptor komplekset bindes til en koaktivator. Dette komplekset vil så bindes til PPRE og enten føre til aktivering eller hemming av det aktuelle målgenet [34]. PPAR sine funksjoner kobles gjerne med de ulike målgenene de ulike isoformene har, men det er også en vesentlig grad av overlapping [76]. Samlet spiller PPAR-familien viktige roller i regulering av energimetabolismen, hvor den ulike vevsdistribusjonen og de ulike spesifikke målgenene de ulike PPAR-isoformene har fører til forskjellige effekter for de ulike isoformene [34, 77, 78].

1.10.1 PPAR α

PPAR α uttrykkes hovedsakelig i lever og brunt fettvev, og forekommer i mindre grad i nyre, tarm og skjelettmuskel. Hovedoppgaven til PPAR α er å regulere energihomeostase ved å stimulere glukoneogenese og kontrollere fettsyrekatabolisme [74, 79, 80]. Fibrater er PPAR α -agonister som brukes i behandlingen av hyperlipidemi. Virkestoffene gemfibrozil og fenofibrat brukes flere steder i verden, markedsført som henholdsvis Lopid og Lipanthyl eller Fenofibrat, men er ikke registrerte legemidler i Norge [4].

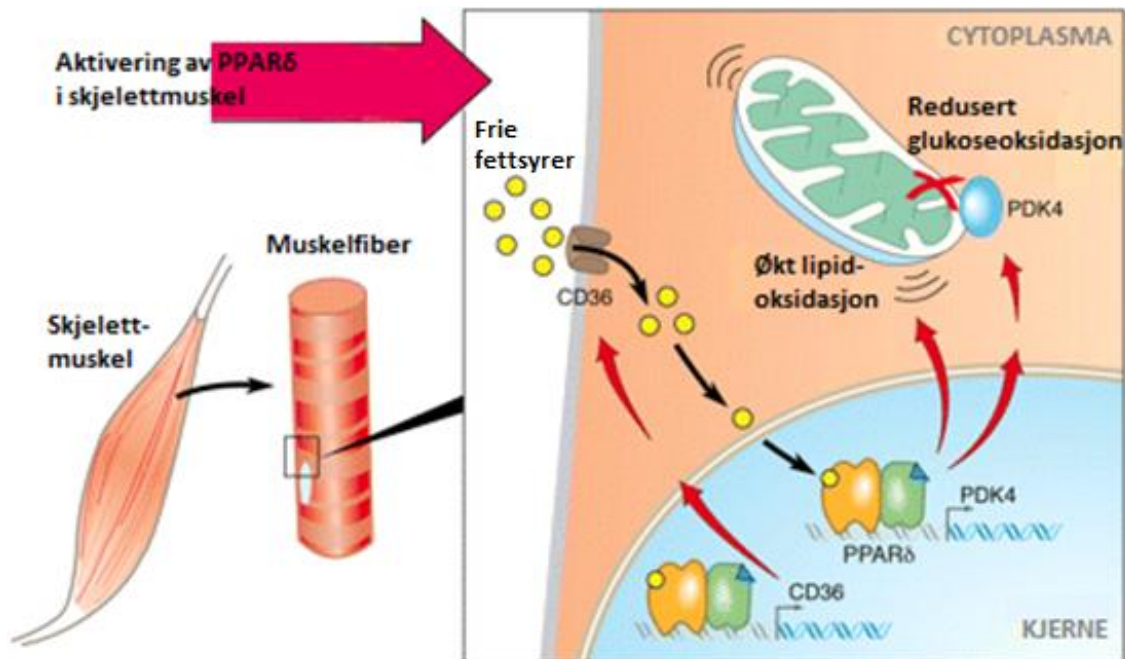
1.10.2 PPAR γ

PPAR γ er uttrykt i nyrene, immunsystemet, og brunt og hvitt fettvev [81]. Det er denne varianten som er involvert i differensieringen av adipocytene og lagringen av lipider i hvitt fettvev [82, 83], i tillegg til å ha en rolle i glukosemetabolismen ved å forbedre insulinsensitiviteten [83]. Dette er grunnen til at det er utviklet flere PPAR γ -agonister, glitazoner, for behandlingen av T2D. Av disse er det kun pioglitazon som er registrert i Norge, markedsført under preparatnavnet Actos [4].

1.10.3 PPAR δ

Av PPAR er PPAR δ (også kjent som PPAR β) den eneste som ikke har en agonist som er i klinisk bruk. PPAR δ er den PPAR med høyest ekspresjon i skjelettmuskel, og er høyere uttrykt i de oksidative type I-fibrene sammenlignet med de glykolytiske type II-fibrene [73]. Noen av de mange effektene PPAR δ er assosiert med er lipid- og lipoproteinmetabolisme [84], adaptiv termogenese [74], mitokondriell respirasjon, bestemmelse av fibertype i skjelettmuskel, redusert fedme, sårheling [85] og inflammasjon [73].

PPAR δ regulerer et stort antall gener som er involvert i lipidoksidasjon, og viktige proteiner i denne sammenhengen er CPT, CD36 og PDK. PDK fosforylerer og inaktiverer pyruvat dehydrogenasekomplekset (PDC), og dette er det hastighetsbestemmende trinnet i oksidasjonen av karbohydrater i muskler. Økt ekspresjon av PDK4 fører dermed til hemming av PDC og redusert glukoseoksidasjon, noe som kan flytte brennstoffpreferansen i skjelettmuskel fra glukose- til fettsyreoksidasjon. Aktivering av PPAR δ fører samtidig til økt ekspresjon av gener involvert i opptak av fettsyrer. Det er foreslått, som vist i figur 1.3, at det er et direkte samspill mellom PPAR δ , CD36 og PDK4 i skjelettmuskel som går ut på at CD36 medierer opptak av fettsyrer som trengs for aktivering av PPAR δ , som igjen fører til økt ekspresjon av PDK4 og dermed videre økende ekspresjon av CD36. Ved faste er det økt mengde frie fettsyrer i sirkulasjonen, og ut fra hypotesen vil da PPAR δ aktiveres og endre energimetabolismen slik at glukose spares mens fettsyrer oksideres. I PPAR δ -null mus er fasteindusert induksjon av PDK4 i skjelettmuskel merkbart hemmet, mens den er uendret i PPAR α -null mus. Dette indikerer at PPAR δ er den hovedsakelige isoformen som er involvert i reguleringen av brennstoffutnyttelse i skjelettmuskel som respons på faste [34].



Figur 1.3: PPAR δ -medierte forandringer i genekspressjon fører til økt lipidoksidasjon i skjelettmuskel. Frie fettsyrer tas opp over membranen til cytosol via fettsyretransportøren CD36. Dette kan føre til aktivering av gener som er avhengige av PPAR δ , for eksempel PDK4 som fører til redusert glukoseoksidasjon, og flere gener involvert i fettsyreoksidasjon. I tillegg er CD36 selv et PPAR δ -avhengig gen. CD36, "Cluster of differentiation 36"; PDK4, Pyruvat dehydrogenasekinase isoenzym 4; PPAR δ , Peroksisomproliferator-aktivert reseptor δ . Modifisert fra [34].

Et annet viktig målgen for PPAR δ i skjelettmuskel er Angptl4. Angptl4 er, som tidligere nevnt, en potent hemmer av LPL. I tillegg er Angptl4 en modulator av fedme ved å øke intracellulær lipolyse i adipocytter. I studier av Robciuc *et al.* ble det funnet at fettsyremediert aktivering av PPAR δ oppregulerte Angptl4 og hemmet LPL-aktivitet og LPL-mediert fettsyreopptak i myotuber [60].

Flere PPAR δ -agonister er under klinisk utprøving, i tillegg til at de i stor grad brukes i forskning. GW501516 er en av dem det er blitt forsket mye på gjennom flere år. Noen av effektene som er observert ved behandling med GW501516 er økte sirkulerende HDL-nivåer, reduserte triglyserid- og insulinnivåer [84], forbedret insulinsensitivitet [86], og forhindret utvikling av metabolsk syndrom [74] og fedme [85]. Det er imidlertid observert ulike effekter i ulike vev noe som trolig skyldes vevsspesifikke kofaktorer, ekspresjon av nedstrøms målgener, ulik heterodimerisering og posttranskripsjonelle modifiseringer, blant annet fosforylering [72].

1.11 Epigenetikk

Epigenetikk er læren om hvordan gener forandres uten at selve DNA i kjernen (nukleotidsekvensen) forandres, og viser at arvelige egenskaper kan modifiseres [87]. Epigenetiske modifikasjoner kan enten overføres fra en cellegenerasjon til neste (mitotisk overføring) eller mellom generasjoner for en spesifikk art (meiotisk overføring) [88]. Epigenetiske forandringer kan skyldes til- eller frakobling av metylgrupper (metyleringsreaksjoner), modifisering av histoner, eller mikroRNA [87, 88]. Disse tre ulike typene epigenetiske faktorer kan forklare hvordan celler med identisk DNA kan differensiere til ulike celletyper med ulike fenotyper [88].

1.11.1 DNA-metylering

DNA-metylering gir den mest stabile modifikasjonen av kromatinstrukturen til DNAet, og adderer en metylgruppe til 5-posisjonen på en cytosinring i et CpG (-cytosin-fosfat-guanin-) dinukleotid. CpG-setene er asymmetrisk distribuert i genomet i regioner med lite CpG og områder med mye CpG, såkalte CpG ”øyer”. CpG ”øyene” forblir vanligvis umetylert, mens de sporadiske CpG-setene i resten av genomet metyleres [89]. For at denne reaksjonen skal kunne skje trengs metyltransferaser. Det finnes to ulike grupper metyltransferaser: DNMT1

som kopierer DNA-metyleringsmønsteret mellom cellegenerasjoner under replikasjonen, og DNMT3a og DNMT3b som står for *de novo* DNA-metylering [88]. Ved reduksjon av metyleringen øker transkripsjonen, mens ved økt metylering reduseres transkripsjonen. DNA-metylering påvirkes av blant annet miljøfaktorer, diett og trening [90].

Som tidligere nevnt kan risikoen for blant annet T2D reduseres kraftig gjennom ikke-farmakologisk behandling med trening og diett. Endringer i DNA-metyleringen har blitt foreslått som en av flere potensielle molekylære mekanismer for dette ettersom det er sett at både diett og trening kan påvirke graden av DNA-metylering [90].

1.11.2 Histonmodifikasjoner

I eukaryote celler er DNA pakket tett sammen med spesifikke proteiner, histoner, for å danne kromatin. Hovedbyggesteinen til kromatinet er nukleosomet som består av omtrent 147 DNA-basepar pakket rundt en oktamer av histonproteiner. Selv om kjernehistonene er tett sammenpakket kan NH₂-terminalhalene deres modifiseres av histonmodifiserende enzymer, og kan blant annet føre til acetylering, metylering eller fosforylering [91]. Kun histonacetylering og -metylering vil bli omtalt her.

Histonacetylering er den mest vanlige posttranslasjonelle modifikasjonen av histonene. Histonacetyleringen skjer ved hjelp av to enzymer: histon acetyltransferase (HAT) og histon deacetylase (HDAC), som henholdsvis legger til og fjerner acetylgrupper på lysinresiduer på histonhalene. Histonacetylering er assosiert med økt gentranskripsjon. Det er flere teorier om hvorfor dette skjer. En av de tidligste teoriene var at acetyleringen fører til en mer åpen kromatinstruktur noe som muliggjør en økt gentranskripsjon. Etter hvert har imidlertid flere hypoteser blitt foreslått, inkludert at flere histonmodifikasjoner virker sammen for å regulere transkripsjonen, eller at acetyleringen rekrutterer bromdomeneproteiner som virker som transkripsjonsaktivatorer. Det er videre blitt foreslått at glukosetilgjengelighet kan påvirke histonacetyleringen [88].

Histonmetylering medieres av histon metyltransferaser og histon demetylaser, og fører til henholdsvis aktivering og inaktivering av transkripsjonen avhengig av graden av metylering og hvilket lysin- og/eller argininresidu som modifiseres. Tap av funksjonen til histon demetylasen Jhdm2a er assosiert med fedme og redusert ekspresjon av metabolsk aktive gener i skjelettmuskel [88].

1.11.3 mikroRNA

MikroRNA (miRNA) er små RNA-molekyler, bestående av omtrent 22 nukleotider, som posttranskripsjonelt kan kontrollere ekspresjonen av sine målgener negativt. miRNA binder til sine mål-mRNA og nedregulerer stabiliteten og/eller translasjonen deres. Binding av miRNA til sitt mål-mRNA kan også føre til degradering eller suppresjon, avhengig av hvor komplementært miRNA bindes til mRNA. Det er mer enn 460 kjente humane miRNA, men det virkelige antallet er trolig mye høyere. miRNA er kodet for i genomet og transkriberes av RNA polymerase II. Ekspresjonen av miRNA er hovedsakelig blitt relatert til kreft, ettersom de kan virke enten som onkogener eller tumorsuppressorgener [89].

1.12 Mål for oppgaven

Det er flere studier som har vist at fysisk aktivitet har potensial til å både forhindre utvikling av og også behandle flere metabolske lidelser slik som fedme, insulinresistens, metabolsk syndrom og type 2-diabetes. Studiene som er blitt gjort på dette feltet har hovedsakelig vært direkte på muskelbiopsier. Målet med denne oppgaven er derfor å undersøke om skjelettmuskelcellene i kultur husker treningen som er gjort *in vivo* etter flere celledelinger og differensiering *in vitro*. Følgende delmål for oppgaven ble satt:

- Undersøke effekten av trening *in vivo* på glukoseopptak og -oksidasjon i humane myotuber *in vitro*
- Undersøke effekten av trening *in vivo* på fettsyreopptak og -oksidasjon i humane myotuber *in vitro*
- Undersøke effekten av trening *in vivo* på ekspresjon av viktige gener involvert i glukose- og fettsyremetabolismen i humane myotuber *in vitro*
- Undersøke om fysiologiske data som ble målt i løpet av treningsintervensjonen korrelerer med de metabolske effektene av treningen på myotubene

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1: Oversikt over benyttede kjemikalier og reagenser

Leverandør	Kjemikalium/reagens
Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA)	Nuclease-free H ₂ O, 25 ml
Applied Biosystems™ (Warrington, Storbritannia)	Power SYBR® Green PCR Master Mix (5 ml)
BioRad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)	Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate
Fremstilt av Calin C. Ciocoiu (Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Norge)	GW501516
Gibco®, Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia)	Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I 1g/L glukose)
	Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS u/ Ca ²⁺ og Mg ²⁺)
	Fungizone® (250 µg/ml amphotericin B)
	Føtalt kalveserum
	Føtalt storfeserum
	Hanks Balanced Salt Solution (HBSS u/ Ca ²⁺ og Mg ²⁺)
	Penicillin-streptomycin (10000 IE/ml)
	Trypsin
Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Primere (36B4, Angptl4, CD36, CoxIV, CPT1A, Cyc1, GAPDH, IL-6, PDK4, PGC1α, PLIN2, PPARδ)
Lonza (Verviers, Belgia)	BioWhittaker® PBS Phsopahte Buffered Salin
Lorenza Cloretics, levert av Medinor	SkBM-kit (SkGM)
Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark)	Actrapid® Penfill® 100 IE/ml
Pall Life Sciences (Cergy-Saint-Christophe, Frankrike)	Ultroser™G

Materialer og metoder

PerkinElmer [®] (Boston, MA, USA)	[1- ¹⁴ C]oleic acid 100 µCi/ml
	D-[¹⁴ C(U)]glucose 100 µCi/ml
PerkinElmer [™] (Shelton, Scotland, USA)	OptiPhase Supermix
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	Glukose
	Dimetylsulfoksid (DMSO)
	L-karnitin hydroklorid
	Bovint serumalbumin (BSA)
	Oljesyre (OA)
	HEPES
	Tryptanblått 0,4 % løsning
VWR (Poole, England)	NaOH

2.1.2 Utstyr

Tabell 2.2: Oversikt over benyttet utstyr

Leverandør	Utstyr
AB Applied Biosystems (Stockholm, Sverige)	1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter
	2720 Thermal Cycler
	AbiPrism 7000 Sequence Detection System
Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA)	Agilent Total RNA Isolation Mini Kit
Applied Biosystems [™] (Foster City, CA, USA)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
	MicroAmp [®] Optical 96-Well Reaction Plate
	MicroAmp [®] Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
Bibby Scientific (Staffordshire, Storbritannia)	Techne Dri-Block [®] DB·2A
Corning Inc. (Corning, NY, USA)	15 ml Centrifuge Tube, CentriStar [™] Cap
	50 ml Centrifuge Tube, CentriStar [™] Cap
	96-brønners Corning [®] CellBIND [®] Surface brett med lokk
Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland)	Safe-Lock rør 1,5 ml

Materialer og metoder

Gibco [®] , Invitrogen [™] (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA)	Countess [™] counting chamber slides
Gibco [®] , Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia)	Countess automated cell counter
Kubota Corporation (Tokyo, Japan)	Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010
Laget av instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)	Trappestativ, inkludert metallskruer, metallplate og silikonlapp
Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)	Millipore MultiScreen HTS [™] , Opaque non-sterile, hydrophobic plates with lid. High protein binding Immobilon-P Membrane)
	Multiscreen _{HTS} Vacuum Minifold
Olympus (Tokyo, Japan)	Olympus CKX41 microscope med digitalkamera
PerkinElmer [™] (Shelton, Scotland, USA)	Isoplate [™] -96
	TopSeal [®] -A gjennomsiktig film
	Unifilter [®] -96 GF/B
	Wallac Victor ³ _{TM} 1420 Multilabel Counter
Thermo Scientific (Roskilde, Danmark)	96-brønners NUNC Brett med flat bunn
	Cryotube 4,5 ml
	Heraeus Fresco21 Centrifuge
	Nanodrop Lite Spectrophotometer
	NUNC 25 cm ² celleflasker
	NUNC 75 cm ² celleflasker
TPP [®] /MIDSCI [®] (St. Louis, MO, USA)	Cell scrapers 24 cm
VWR [®] International (Radnor, PA, USA)	VWR Microcentrifuge MiniStar Silverline

2.2 Donorkarakteristika

Arbeidet er basert på humane skjelettmuskelceller isolert fra biopsier av *musculus vastus lateralis* til åtte frivillige donorer. Alle var inaktive menn i alderen 40-58 år, som hverken brukte legemidler fast eller røykte. Inaktiv ble definert som at deltakeren trente mindre enn én gang i uken. Kostholdet skulle ikke legges om i løpet av studien. Avhengig av forhåndsdefinerte klassifiseringer ble de fordelt i én av to mulige grupper; kontrollgruppen eller pasientgruppen. De viktigste donorkarakteristika er presentert nedenfor i tabell 2.3.

Tabell 2.3: Donorkarakteristika før og etter treningsintervensjonen. KMI, kroppsmasseindeks; GIR, ”clamp” glukoseinfusjonshastighet; SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorkode	Gruppe	Alder (år)	KMI basal (kg/m ²)	KMI etter trening (kg/m ²)	ΔKMI (%)	GIR basal (mg/kg/min)	GIR etter trening (mg/kg/min)	ΔGIR (%)
1	Kontroll	40	23,8	22,8	-4,2	6,6	9,5	43,9
3	Kontroll	42	25,0	23,8	-4,8	9,6	9,7	1,0
8	Kontroll	41	23,1	23,5	+1,7	8,6	9,7	12,8
13	Kontroll	53	21,3	21,0	-1,4	5,3	8,8	66,0
Gjennomsnitt ± SEM		44,0 ± 3,0	23,3 ± 0,8	22,8 ± 0,6	-2,2 ± 1,5	7,5 ± 1,0	9,4 ± 0,2	30,8 ± 14,8
2	Pasient	46	31,4	29,7	-5,4	4,4	7,0	59,1
4	Pasient	58	29,4	28,0	-4,8	5,0	4,4	-12,0
17	Pasient	49	28,0	26,2	-6,4	4,4	4,9	11,4
21	Pasient	46	32,5	31,9	-1,8	1,5	4,7	213,3
Gjennomsnitt ± SEM		49,8 ± 2,8	30,3 ± 1	29,0 ± 1,2	-4,6 ± 1,0	3,8 ± 0,8	5,3 ± 0,6	65,9 ± 48,3
Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)		46,9 ± 2,2	26,8 ± 1,5	25,9 ± 1,3	-3,4 ± 0,9	5,7 ± 0,9	7,3 ± 0,8	48,4 ± 24,3

Klassifiseringen av om de hørte til i kontrollgruppen eller pasientgruppen ble gjort ut fra følgende kriterier:

- Kontrollgruppe: Normalt resultat i peroral glukosetoleransetest (OGTT) og KMI 19-25 kg/m²
- Pasientgruppe: Forhøyet OGTT-resultat, det vil si fastende glukose > 5,6 mmol/l og/eller 2-timersglukose > 7,8 mmol/l, og KMI 27-32 kg/m²

Det er viktig å presisere at de frivillige i pasientgruppen ikke var pasienter ut fra ordets sanne betydning, men at gruppen ble kalt dette for å presisere at de lå i faresonen for utvikling av metabolske sykdommer i forhold til kontrollgruppen.

I tillegg til KMI og ”clamp” glukoseinfusjonshastighet (GIR) ble det målt en rekke andre fysiologiske parametre. Disse er presentert i tabell 2.4.

Tabell 2.4: Forandring i fysiologiske parametre som følge av treningsintervensjonen. S-insulin, seruminsulin (målt under ”clamp”-analysens siste 30 minutter); SMM, skjelettmuskelmasse; WHR, ”waist-to-hip” ratio; SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorkode	Gruppe	Δ Kroppsvekt (kg)	Δ S-insulin (pmol/l)	Δ Fastende glukose (mmol/l)	Δ SMM (kg)	Δ WHR	Δ Fettprosent (%)	Δ Visceral fettmengde (cm ²)
1	Kontroll	-3,2	+58,0	+1,0	-0,1	0,00	-2,6	13,7
3	Kontroll	-3,9	-77,6	-0,3	-1,0	-0,01	-1,8	-8,2
8	Kontroll	+1,1	-52,0	-2,2	+0,7	-0,01	-0,5	-8,9
13	Kontroll	-0,9	+28,3	-0,9	+1,3	0,00	-3,7	+3,5
<i>Gjennomsnitt \pm SEM</i>		<i>-1,7 \pm 1,1</i>	<i>10,8 \pm 32,2</i>	<i>-0,6 \pm 0,7</i>	<i>0,2 \pm 0,5</i>	<i>-0,005 \pm 0,003</i>	<i>-2,2 \pm 0,7</i>	<i>0,03 \pm 5,4</i>
2	Pasient	-5,7	+78,0	+0,5	-0,6	-0,01	-3,1	-22,6
4	Pasient	-4,5	+2,7	-0,3	+0,2	+0,01	-4,3	+2,9
17	Pasient	-6,9	-87,7	-1,3	-1,0	+0,01	-2,7	+1,2
21	Pasient	-2,0	+69,4	+3,1	-0,3	+0,01	-0,9	-0,8
<i>Gjennomsnitt \pm SEM</i>		<i>-4,8 \pm 1,0</i>	<i>15,6 \pm 38,3</i>	<i>0,5 \pm 0,9</i>	<i>-0,4 \pm 0,3</i>	<i>0,005 \pm 0,005</i>	<i>-2,8 \pm 0,7</i>	<i>-4,83 \pm 5,8</i>
<i>Gjennomsnitt \pm SEM (begge grupper)</i>		<i>46,9 \pm 2,2</i>	<i>2,4 \pm 23,7</i>	<i>-0,1 \pm 0,6</i>	<i>-0,1 \pm 0,3</i>	<i>0,000 \pm 0,003</i>	<i>-2,5 \pm 0,5</i>	<i>-2,40 \pm 3,8</i>

Treningsintervensjonen foregikk over 12 uker med fire treningsøkter i uken, to økter med utholdenhetstrening og to økter med styrketrening. Hver treningsøkt ble fulgt opp av kvalifiserte treningsinstruktører ved Norges Idrettshøyskole. Studien ble registrert i databasen clinicaltrials.gov med identifikasjonskode NCT01803568.

2.3 Utholdenhetstrening

Utholdenhetstreningen bestod av intervallbasert spinning og startet med 12-15 minutters oppvarming med tre intervaller á 4-5 minutter ved 60 %, 70 % og 75 % av maksimal hjertefrekvens (HF_{max}). Deretter fulgte hovedøkten som varte i omtrent 60 minutter, før treningen ble avsluttet med 5 minutters sykling med selvvalgt intensitet. En av de ukentlige spinningøktene ble gjennomført med 7 minutters intervaller ved ~ 85 % av HF_{max} og tre minutters restitusjon med lav intensitet mellom hvert intervall ved ~ 60 % av HF_{max} . Den andre ukentlige spinningøkten ble gjennomført med 2 minutters intervaller ved en hjerterytme > 90 % av HF_{max} og to minutters restitusjon med lav intensitet mellom hvert intervall ved ~ 60 % av HF_{max} . I midten av økten med 2 minutters intervaller ble en av restitusjonsperiodene økt til fem minutter ved ~ 60 % av HF_{max} . Deltakerne ble oppmuntret underveis til å øke intensiteten så de holdt seg ved ønsket hjerterytme.

Den aerobe kapasiteten ble målt ved maksimalt oksygenopptak, VO_{2max} . Deltakeren fulgte en standardisert oppvarming før testen ble gjennomført. Denne oppvarmingen bestod av 3-4

intervaller á 5 minutter med økende intensitet etter hvert femte minutt. Etter det siste intervallet syklet deltakeren i 5 minutter ved lavere intensitet før VO₂max-testen begynte. VO₂max-testen bestod av 45 minutters sykling ved 70 % av estimert VO₂max. Resultatene av utholdenhetstestet er vist i tabell 2.5.

Tabell 2.5: Resultater av utholdenhetstreningen i intervensjonsperioden. VO₂max, maksimalt oksygenopptak; SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorkode	Gruppe	Compliance (%)	ΔVO ₂ max (%)
1	Kontroll	96,0	23,5
3	Kontroll	76,0	1,3
8	Kontroll	92,0	-1,6
13	Kontroll	100,0	13,6
<i>Gjennomsnitt ± SEM</i>		<i>91,0 ± 5,3</i>	<i>9,2 ± 5,8</i>
2	Pasient	100,0	18,5
4	Pasient	84,0	9,0
17	Pasient	96,2	3,8
21	Pasient	85,2	12,7
<i>Gjennomsnitt ± SEM</i>		<i>91,4 ± 4,0</i>	<i>11,0 ± 3,1</i>
<i>Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)</i>		<i>91,2 ± 2,9</i>	<i>10,1 ± 3,1</i>

Som vist i tabell 2.5 økte alle deltakerne med unntak av kontroll 8 sin maksimale aerobe kapasitet. Videre observeres det at pasientgruppene hadde en lavere aerob kapasitet enn kontrollgruppen, men at pasientgruppens gjennomsnittlige forbedring var noe høyere enn kontrollgruppens. Pasientgruppen hadde imidlertid noe større interindividuell variasjon enn kontrollgruppen. Det er viktig å huske på at deltakernes mentalitet på prøvetakings-tidspunktet hadde veldig mye å si for resultatet. Hvis deltakeren var litt sliten eller lei er risikoen større for at han ikke ytte sitt beste, og virkelig VO₂max ble kanskje ikke nådd.

2.4 Styrketrening

Styrketreningen ble spesielt godt overvåket for å sikre korrekt teknikk og kontinuerlig progresjon, og vanligvis var det én instruktør som hadde ansvar for å følge opp to deltakere i alle øktene. Før studien startet fikk hver deltaker en personlig økt for å justere utstyret og for å lære teknikkene. Hver styrketreningsokt ble innledet med 10 minutters aerob oppvarming (sykling på spinningssykel, løp på tredemølle eller roing på romaskin). I hver økt

gjennomførte deltakerne tre sett á åtte øvelser (beinpress, benkpress, skulderpress, ”sittende roing”, ”cable pull-down”, ”leg curls”, ryggøvelse og ”crunches”). De første tre ukene av treningsintervensjonen ble styrketreningen gjennomført med en byrde som gjorde at hver øvelse ble gjennomført med 12 repetisjoner. I fjerde treningsintervensjonsuke ble byrden økt så deltakeren kun klarte å gjennomføre hver øvelse med 10 repetisjoner. Etter åtte ukers trening og ut studien ble byrden økt slik at deltakeren bare klarte å gjennomføre hver øvelse med 8 repetisjoner.

Det ble gjennomført tre ulike styrkeøvelser for å se på deltakernes maksimale styrke: sittende brystpress, beinpress og ”cable pull-down” med vidt grep. Før testen var det 10 minutters oppvarming med sykling eller løping. Testen startet med mange repetisjoner med en byrde tilsvarende 50 % av forventet maksimal styrke, og så ble byrden gradvis tyngre og repetisjonene færre til maksimal styrke ble nådd. Hver deltaker fikk to forsøk på byrden ved maksimal styrke. Resultatene av disse testene er oppført nedenfor i tabell 2.6.

Tabell 2.6: Resultater av styrketreningen i intervensjonsperioden. SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorkode	Gruppe	Compliance (%)	ΔBrystpress-kapasitet (%)	ΔBeinpress-kapasitet (%)	Δ”Cable pull-down”-kapasitet (%)
1	Kontroll	85,7	38,1	11,8	46,5
3	Kontroll	63,6	3,3	-2,1	7,1
8	Kontroll	90,5	11,1	9,8	12,5
13	Kontroll	100,0	11,8	23,1	16,0
<i>Gjennomsnitt ± SEM</i>		<i>85,0 ± 7,7</i>	<i>16,1 ± 7,6</i>	<i>10,6 ± 5,2</i>	<i>20,3 ± 8,6</i>
2	Pasient	95,5	8,6	18,4	10,5
4	Pasient	100,0	6,3	10,1	6,3
17	Pasient	100,0	17,9	27,0	14,7
21	Pasient	86,4	11,1	14,0	2,4
<i>Gjennomsnitt ± SEM</i>		<i>95,5 ± 3,2</i>	<i>10,9 ± 2,5</i>	<i>17,4 ± 3,6</i>	<i>8,5 ± 2,7</i>
<i>Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)</i>		<i>90,2 ± 4,3</i>	<i>10,8 ± 3,8</i>	<i>14,0 ± 4,5</i>	<i>14,4 ± 6,7</i>

Som forventet viser tabell 2.6 at den interindividuelle variabiliteten var ganske stor for begge grupper. Den gjennomsnittlige prosentvise forbedringen til pasientgruppen lå imidlertid lavere enn kontrollgruppens på to av tre tester. Den eneste testen der pasientgruppen hadde en større forbedring enn kontrollgruppen var på beinpresstesten, og det var også mindre spredning. Videre var compliance gjennomsnittlig høyere i pasientgruppen enn i kontrollgruppen og hadde lavere interindividuell spredning. Det er også her viktig å huske på at hver enkelt deltakers mentalitet og psykiske styrke på prøvetakingstidspunktet hadde mye å si for resultatene, og kan være en av årsakene til den interindividuelle spredningen.

2.5 Opprettelse av cellebank

For all celleforskning er det viktig å opprette en cellebank. Fra selve biopsien ble det isolert relativt få muskelceller (satelittceller), og for å kunne utføre forsøk på disse var det derfor nødvendig å oppskalere skjelettmuskelcellene. De oppskalerte cellene (myoblastene) ble oppbevart i en nitrogentank og fungerte som et cellelager.

2.5.1 Oppskalering

Celleampuller (Kryorør) ble tatt opp fra nitrogentanken og raskt tint ved 37 °C på vannbad. Innholdet ble overført til et 50 ml rør og 4 ml utsåingsmedium tilsatt. Røret ble så sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten resuspendert i 4 ml utsåingsmedium. Fire NUNC 75 cm² celleflasker ble brukt til oppskaleringen av hver donor. Hver flaske ble tilsatt 9 ml utsåingsmedium, og 1 ml av cellesuspensjonen ble overført til hver flaske. Fordelte innholdet jevnt utover bunnflaten til flaskene. Anslo ved hjelp av lysmikroskop at det var omtrent 250 000 celler i hver flaske før flaskene ble satt i inkubator ved 37 °C med 5 % CO₂. Utsåingsmedium ble benyttet ettersom dette er rikt på næring, og cellene festet seg dermed lett til overflaten og begynte å vokse. Etter 24 timer ble mediet fjernet og 10 ml proliferasjonsmedium tilsatt. Proliferasjonsmediet fremmet celledeling og proliferasjon, og ble byttet hver 2.-3. dag inntil cellene nådde 50-60 % konfluens. På det tidspunktet ble proliferasjonsmediet erstattet med SkGM-medium for at cellene ikke skulle spontandifferensiere til myotuber. Mediet ble byttet hver 3.-4. dag inntil cellene nådde 80-90 % konfluens. Cellene ble så fryst ned og lagret i nitrogentank for eventuell videre oppskalering eller forsøk på et senere tidspunkt.

2.5.2 Nedfrysning av celler

Mediet som var i celleflaskene ble fjernet og cellene vasket to ganger med 5 ml DPBS eller HBSS (begge uten Ca^{2+} og Mg^{2+}). Tilsatte 2 ml 0,25 % trypsin, og satte flaskene i inkubator ved 37 °C i et par minutter. Deretter ble det sjekket i lysmikroskop om cellene hadde løsnet fra flaskene. Hvis noe fremdeles satt fast ble flaskene slått forsiktig, men bestemt mot håndflaten til alt løsnet. Cellene skulle aldri stå i trypsin lenger enn 5 minutter totalt.

Da cellene hadde løsnet ble 8 ml proliferasjonsmedium tilsatt til hver flaske, og hele flaskeoverflaten ble skylt med denne løsningen. Cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml rør. 20 μl ble tatt ut til et Eppendorfrør, som deretter ble tilsatt 20 μl tryptanblått 0,4 % løsning. Dette ble overført til et tellekammer og talt ved hjelp av den automatiske celletelleren. Resten av cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Ut fra celleantallet ble det beregnet hvor mange ampuller som skulle fryses ned og hvor mye frysemedium som var nødvendig da det totalt skulle være $1,1 \times 10^6$ celler/ml i hver ampulle.

Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet, og cellepelletten resuspendert i frysemediet. Overførte 1 ml av suspensjonen til hver ampulle som umiddelbart ble overført til -20 °C fryser. Etter 30 minutter ble ampullene overført til -80 °C fryser, hvor de fikk stå over natt. Neste dag ble ampullene overført til nitrogentank (-196 °C).

Telling av celler

CountessTM automated cell counter ble benyttet til å estimere antall levende skjelettmuskelceller. Cellesuspensjon og tryptanblått 0,4 % løsning ble blandet i forholdet 1:1 og overført til et tellekammer som så ble satt i celletelleren. Ved å benytte tryptanblått var tellemaskinen i stand til å skille mellom levende og døde celler ettersom de døde cellene ble farget blå. Dette skyldes at tryptanblått er et stort, vannløselig molekyl som ikke kan krysse den intakte cellemembranen til levende celler.

2.6 Celledyrking

2.6.1 Utsåing

Celleampuller ble tatt opp fra nitrogen tanken og raskt tint ved 37 °C på vannbad. Innholdet ble overført til et 50 ml rør og tilsatt 4 ml utsåingsmedium. Røret ble sentrifugert ved 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten resuspendert i 3 ml utsåingsmedium. For å beregne hvor stort volum som var nødvendig til utsåingen ble 20 µl av cellesuspensjonen tatt ut til et Eppendorfrør, tilsatt 20 µl tryptanblått 0,4 % løsningsmiddel og talt ved hjelp av den automatiske celledetektoren. Det nødvendige volumet ble tatt ut til et nytt 50 ml rør og tilsatt utsåingsmedium til totalt 10 ml. Dette ble overført til et 96-brønners Corning® CellBIND® Surface brett med lokk, ved hjelp av reservoar og multikanalpipette. Brettet ble inkubert ved 37 °C med 5 % CO₂ i omtrent 24 timer.

2.6.2 Proliferasjon og differensiering

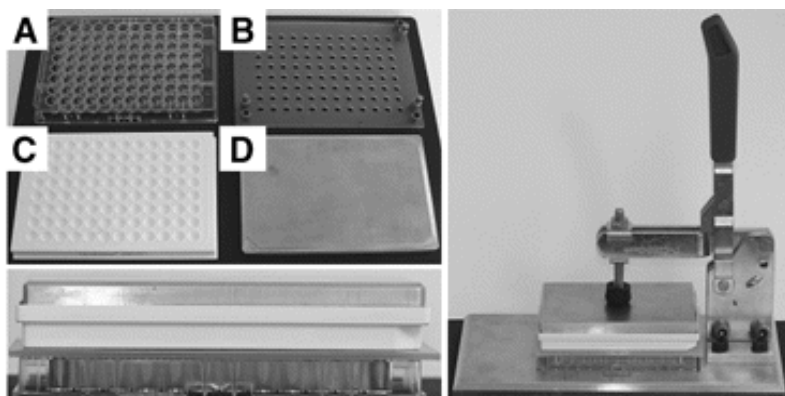
Etter 24 timer ble utsåingsmediet erstattet med proliferasjonsmedium. Proliferasjonsmediet ble byttet hver 2.-3. dag inntil cellene nådde 80-90 % konfluens. Da ble proliferasjonsmediet erstattet med differensieringsmedium som ble byttet hver 2.-3. dag inntil forsøksdagen som var på dag 7 av differensieringen. De siste fire dagene av differensieringsperioden ble mediet tilsatt enten 0,1 % DMSO (negativ kontroll), eller 10 nM GW501516 (positiv kontroll). Ved bruk av lysmikroskop ble det kontrollert at cellene hadde differensiert til flerkjernede myotuber før forsøk ble igangsatt.

2.7 Substratoksidasjonsmetoden

Metoden for substratoksidasjon ble utviklet av Wensaas *et al.* i 2007 [92], og gjør det mulig å måle mengden ¹⁴C-merket glukose og/eller fettsyrer oksidert av skjelettmuskelcellene. Metoden benytter seg av apparaturen fremstilt i figur 2.1.

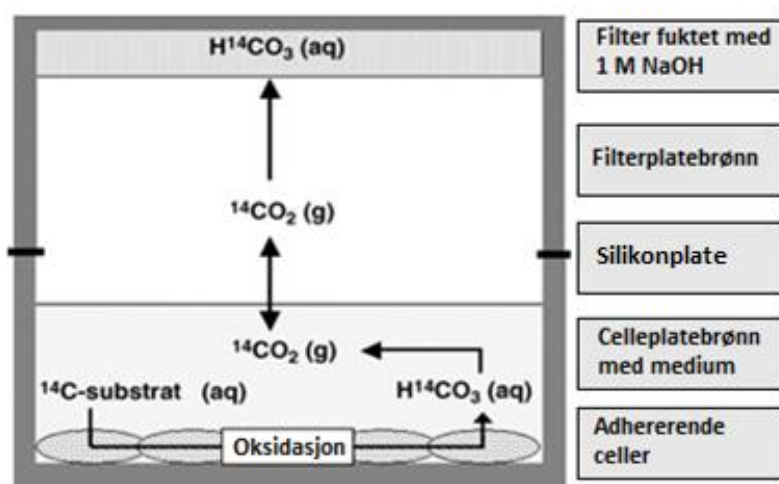
Differensieringsmediet som cellene var i ble fjernet før radioaktivt merket medium ble tilsatt. 96-brønnersbrettet ble plassert nederst i trappingstativet med en silikonplate over, stabilisert med metallknotter i hvert hjørne av brettet. Over silikonplaten ble det plassert et 96-brønners UniFilter® brett, som var fuktet med 20 µl 1 M NaOH. Denne "sandwichen" ble så låst godt

sammen av spaken på trappingstativet. Deretter ble hele stativet satt til inkubering i 4 timer i inkubator ved 37 °C med 5 % CO₂.



Figur 2.1: Bilde av utstyret som ble benyttet for gjennomførelse av substratoksidasjon. A) 96-brønners Corning® CellBIND® Brett. B) Silikonplate med metallknotter. C) 96-brønners UniFilter® Brett. D) Metallplate for å kunne applisere jevnt trykk over hele dyrkingsbrettet. Delene ble samlet i en ”sandwich” som vist på bildet til høyre og fikk trykk applisert ved hjelp av apparatet. Bildet er hentet fra [92].

Etter fire timer ble alle delene tatt fra hverandre og det radioaktive mediet fjernet. Brønnene ble vasket to ganger med 150 µl PBS før 200 µl 0,1 M NaOH ble tilsatt hver brønn for å lysere cellene. Brettet ble satt i fryser ved -20 °C. Filterbrettet ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix tellervæske, og dekket med TopSeal®-A gjennomsiktig plastikkfilm. Brettet fikk stå til inkubasjon i romtemperatur i 2 dager før CO₂ ble målt på Wallac 1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter. Teorien er illustrert nedenfor i figur 2.2.



Figur 2.2: Illustrasjon av teorien bak substratoksidasjonsmetoden. Når et ¹⁴C-merket substrat oksideres vil CO₂ frigjøres som et avfallsprodukt og fanges i det alkaliske filteret øverst i ”sandwichen”. Det som ikke oksideres, men som akkumuleres i cellene, vil forbli i det nederste laget. Modifisert fra [92].

2.7.1 Celleassosiert radioaktivitet

Brettet som hadde stått i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fryser ble satt til tining sammen med restene av de radioaktive mediene i inkubator ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ med 5% CO_2 . $50\text{ }\mu\text{l}$ av lysatet i hver brønn ble overført til et 96-brønners IsoplateTM brett og tilsatt $100\text{ }\mu\text{l}$ Optiphase Supermix tellevæske. Brettet ble dekket med gjennomsiktig TopSeal[®]-A plastikkfilm og fikk stå til inkubasjon i romtemperatur i 2 timer før celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt på Wallac 1450 Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter.

Tanken bak denne metoden er at CA er den mengden radioaktivitet som akkumuleres av cellene, det vil si den mengden som blir værende igjen i det nederste celledaget i figur 2.2. Ved å måle både CO_2 og CA var det mulig å få et estimat på opptaket i cellene ved å slå resultatene fra disse to målingene sammen.

2.7.2 Lipidfiltrasjon

Lipidfiltrasjonsmetoden ble utviklet av Stefan Hallén (AstraZeneca) og er en enkel metode der akkumulerte lipider (triglyserider, kolesterolrestere, fosfolipider og frie fettsyrer) binder seg til et hydrofobt filter og radioaktiviteten kvantifiseres. Dette gir en noe bedre indikasjon på hva som skjer med cellene intracellulært enn hva måling av CA gir da det er lipider, og ikke radioaktivitet i andre molekyler, som måles.

Etter at cellene hadde blitt lysert med $200\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ M}$ NaOH som beskrevet i avsnitt i 2.7 og hadde fått stå i fryser som beskrevet i avsnitt 2.7.1 ble brettet satt til tining sammen med tilhørende rester av radioaktive medier. Filteret på en Multiscreen-plate ble fuktet med $75\text{ }\mu\text{l}$ 70% etanol i 30 sekunder, før etanolen ble filtrert gjennom ved hjelp av en Millipore vakuumsstasjon. Etersom platefilteret er sterkt hydrofobt måtte det fuktes med etanol for at det hydrofile lysatet skulle komme gjennom filteret under filtrasjonen. Passet på at filteret ikke tørket før prosedyren var avsluttet. Deretter ble filteret vasket to ganger med $200\text{ }\mu\text{l}$ destillert vann. Fjernet det overflødig vannet før prøvene ble satt på. $50\text{ }\mu\text{l}$ av hver prøve, avhengig av aktiviteten i prøvene, ble filtrert gjennom før filteret ble vasket seks ganger med $100\text{ }\mu\text{l}$ destillert vann; det overflødig vannet ble fjernet. Fjernet deretter plastcoveret på undersiden av platen og en gjennomsiktig TopSeal[®]-A plastikkfilm ble satt på i stedet. Til slutt ble $100\text{ }\mu\text{l}$ Optiphase Supermix tellevæske tilsatt til hver brønn, en gjennomsiktig TopSeal[®]-A plastikkfilm ble satt på toppen av platen. Platen ble talt etter én times henstand på

lysat/ASM-programmet i Wallac Microbeta Plus, Liquid Scintillation Counter. Brettet ble tatt ut av telleren og kastet med en gang tellingen var ferdig ettersom det kunne bli lekkasje av tellevæske etter kort tid.

2.7.3 Medier brukt i metoden

Det ble benyttet fire ulike medier i denne metoden. For å se på glukosemetabolisme ble følgende medier brukt:

- 200 μM D-[^{14}C (U)]glukose uten tilsatt oljesyre
- 200 μM D-[^{14}C (U)]glukose tilsatt 100 μM oljesyre

For å se på fettsyremetabolisme ble disse mediene brukt:

- 100 μM [1- ^{14}C]oljesyre uten tilsatt glukose
- 100 μM [1- ^{14}C]oljesyre tilsatt 200 μM glukose

2.8 Bradfords metode for måling av proteiner

Bradfords metode for måling av protein er en spektrofotometrisk analytisk metode som baseres på at stoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter farge fra rødt til blått under sure betingelser når den reagerer med basiske og aromatiske aminosyrer [93]. På forhånd var det laget BSA-standarder på 0, 10, 20, 40, 80 og 160 $\mu\text{g/ml}$ løst i 0,1 M NaOH. Binding av fargen til den ukjente proteinkonsentrasjonen i cellehomogenatprøven ble sammenlignet med bindingen av fargen til denne standardrekken av konsentrasjoner.

Etter lysering av myotubene som beskrevet i avsnitt 2.7 ble 50 μl overført fra hver brønn i 96-brønnersbrettet til en 96-brønners mikrotiterplate. De to første kolonnene på platen holdt proteinstandardene, to paralleller av hver standard med 50 μl i hver brønn. Hver brønn, både standarder og prøver, ble tilsatt 200 μl Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate (fortynnet 1:5 i destillert vann). Mikrotiterplaten ble satt inn i Wallac VictorTM og absorbansen til prøvene målt ved 595 nm. Ved hjelp av den polynomiale standardkurven som maskinen genererte ble de ukjente proteinkonsentrasjonene i prøvene estimert.

2.9 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR), også kjent som real-time revers-transkriptase-polymerase-kjedereaksjon, er en kvantitativ metode som kan benyttes til å undersøke endringer i mRNA-uttrykk. I denne oppgaven ble qPCR benyttet for å se på ekspresjonen av viktige gener som er involvert i glukose- og fettsyremetabolisme. Videre var det mulig å se på effektene av treningen på gennivå og sammenligne disse resultatene med resultatene fra oksidasjonsforsøkene og med de fysiologiske parametrene.

Cellene ble dyrket til flerkjernede myotuber ut fra samme prosedyre som beskrevet i avsnitt 2.6, men i stedet for å bli dyrket opp i 96-brønnersbrett ble 25 cm² NUNC celleflasker benyttet, med 150 000 celler/ml og et totalvolum på 3 ml i hver flaske. Cellene ble også her forbehandlet med enten 0,1 % DMSO (negativ kontroll) eller 10 nM GW501516 (positiv kontroll) de siste fire dagene av differensieringsperioden før høsting.

2.9.1 Høsting av celler

Høstet cellene etter 7 dagers differensiering. Differensieringsmediet ble fjernet og cellene vasket to ganger med 2 ml HBSS uten Ca²⁺ og Mg²⁺. Deretter ble hver flaske tilsatt 500 µl lysisbuffer fra Agilent. Til slutt ble cellene skrapet løs og overført til autoklaverte Eppendorfrør. Rørene ble fryst ved -80°C.

2.9.2 Isolering av RNA

Metoden er utviklet av Agilent Technologies [94]. Cellehomogenatet ble sentrifugert gjennom mini-prefiltrasjonskolonnen i 3 minutter ved 16000 × g for å fjerne de største proteinene og forurensningene. Filtratet ble tilsatt et tilsvarende volum 70 % etanol og blandet før kolonnen ble inkubert i romtemperatur i 5 minutter. Denne blandingen ble så overført til mini-isolasjonskolonnen og sentrifugert i 30 sekunder ved 16000 × g. Dette ble gjort i to omganger da kolonnen maksimalt kunne holde 700 µl. Siden etanol var tilsatt ga dette optimale bindingsforhold for RNA til kolonnen. Filtratet ble kastet da RNAet nå satt i kolonnen. Kolonnen ble vasket to ganger med tillaget vaskeløsning, som også inneholdt etanol, for å få med de siste restene. Filtratet ble kastet og kolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 16000 × g, uten noen løsning tilsatt, for å tørke. Deretter ble kolonnen overført til samlingsrøret. 20 µl nukleasefritt vann ble tilsatt, og kolonnen fikk stå til inkubasjon i romtemperatur i 1 minutt

før sentrifugering i 1 minutt ved $16000 \times g$. Isolert RNA ble eluert ut med vannet og oppbevart ved -80°C inntil videre cDNA-syntese.

2.9.3 Spektrofotometrisk kvantifisering av RNA

RNA-konsentrasjonen i hver prøve ble kvantifisert ved å måle absorbans ved 260 nm (A_{260}) på NanoDropTM Lite spektrofotometer. Etter å ha etablert en blank prøve (basert på nukleasefritt vann) ble 1 μl prøve applisert på den nedre sokkelen og absorbans målt. Konsentrasjonen ble automatisk avlest som ng/ μl . NanoDropTM Lite ga også et mål på renheten i prøven ved at absorbans ble målt både ved 260 nm og 280 nm. Ved 280 nm ble proteininnholdet målt og ratioen A_{260}/A_{280} belyste dermed renheten i prøven. Ratio $\sim 2,00$ var det optimale å oppnå, mens ratio $< 2,00$ indikerte høyere innhold av proteiner enn RNA i prøven. Ratioen burde være mellom 1,80 og 2,00 for å sikre høy nok renhet. Prosedyren ble avsluttet ved å rengjøre begge sokkene med deionisert vann.

2.9.4 cDNA-syntese

Før målgenene kunne kvantifiseres ved å benytte qPCR måtte RNA revers transkribes til cDNA-kopier. Kittet som ble brukt for reaksjonen var "TaqMan Reverse Transcription Reagents". Et volum tilsvarende $\leq 1 \mu\text{g}$ RNA ble tatt ut av hver prøve og overført til et mini-ependorfrør (MicroAmp[®]). Nukleasefritt vann ble tilsatt så volumet ble 13,2 μl . Hver prøve ble tilsatt 6,8 μl reaksjonsblanding og plassert i Thermal Cycler 9600 for cDNA-syntese. Betingelsene som ble brukt under syntesen var eksponering ved 25°C i 10 minutter for heksamer/templat priming, så eksponering ved 37°C i 80 minutter for revers transkripsjon, og til slutt eksponering ved 85°C i 5 minutter for inaktivering av revers transkriptase.

2.9.5 qPCR

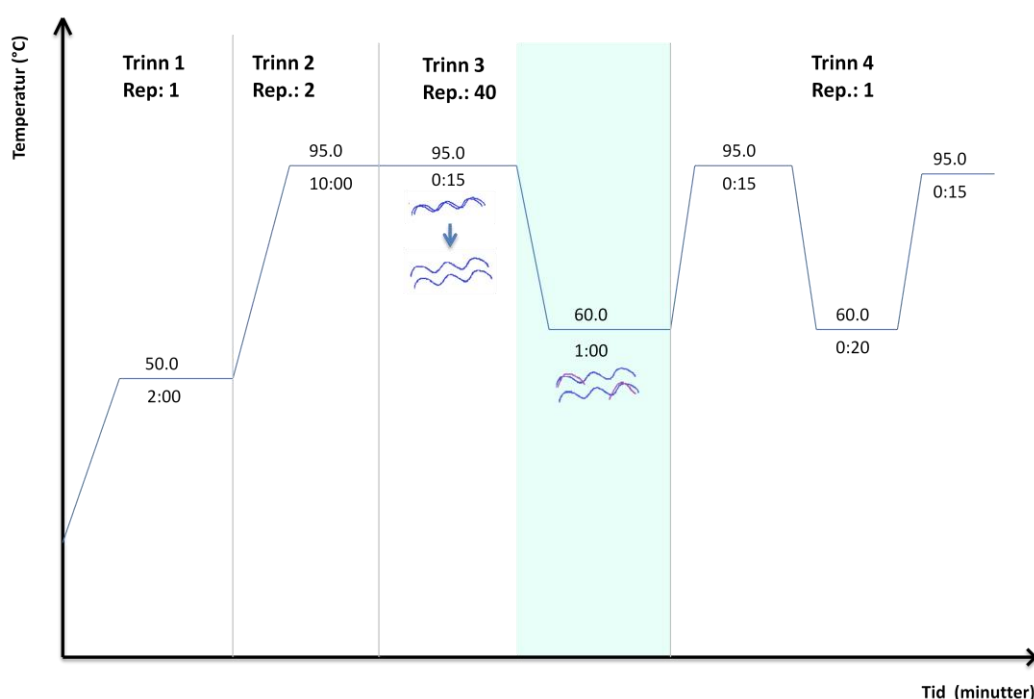
qPCR er som andre PCR-teknikker basert på multisyklisk amplifisering av DNA (figur 2.5), og under en karakteristisk andel av syklusene foregår amplifiseringen av templat DNA eksponentielt. For å få en kvantifisering av genekspresjonen må kvantifiseringen gjøres i den delen av qPCR-reaksjonen hvor amplifiseringen er eksponentiell. Dette gjøres gjennom en produktkvantifisering i hver syklus av PCR-reaksjonen, og kvantifiseringen baseres så på å finne den syklusen hvor produktmengden overgår en detekterbar terskelverdi (Ct-verdien). Terskelen settes der hvor økningen i fluorescens, og dermed cDNA, er eksponentiell. Jo

tidligere det blir dannet en detekterbar mengde produkt, jo mer templat har det opprinnelig vært til stede i prøven, og jo mer mRNA for genet var tilstede i cellen ved RNA-isoleringen. Etter omtrent 20-25 sykluser vil mengden DNA vanligvis ha nådd minste detekterbare grense, Ct, og fluorescensen kan detekteres. SYBR Green binder seg til dobbeltrådig DNA, og gir en kraftig forsterket fluorescens. For å korrigere for variable totale mengder RNA i hver prøve brukes referansegener. I denne oppgaven ble de endogene kontrollene 36B4 og GAPDH brukt til dette. Dette er gener som har samme kopi-tall i alle celler, og som er uttrykt på et stabilt nivå i alle celler. Referansegenene skulle ikke påvirkes av eksperimentet. Genene det ble testet for er listet opp i tabell 2.7.

Tabell 2.7: Oversikt over primere benyttet til qPCR. PDK4, pyruvat dehydrogenasekinase isoenzym 4; Angptl4, angiopoietinlignende protein 4; CPT1A, karnitin palmitoyltransferase-1 isoenzym A; PLIN2, perilipin 2; CD36, "cluster of differentiation" 36; Cyc1, cytokrom c-1; PGC1 α , peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1 α ; PPAR δ , peroksisomproliferator-aktivert reseptor δ ; IL-6, interleukin 6; 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; GAPDH, glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase; F, forward; R, reverse.

Gener	Genbanknummer	Primere
PDK4	BC040239	F: 5' TTTCCAGAACCAACCAATTCACA-3' R: 5' -TGCCCCGATTGCATTCTTA-3'
Angptl4	NM139314	F: 5' -CCTCCGCAGGGACAAGAA-3' R: 5' -GTGGGATGGAGCGGAAGTACT-3'
CPT1A	L39211	F: 5' -TGCTTTACAGGCGCAAACACTG-3' R: 5' -TGGAATCGTGGATCCCAA-3'
PLIN2	NM001122	F: 5' -GGTGATGGCAGGCGACAT-3' R: 5' -TAGAAGTGAGGAGGCTGTCAGACA-3'
CD36	L06850	F: 5' -AGTCACTGCGACATGATTAATGGT-3' R: 5' -CTGCAATACCTGGCTTTTCTCAA-3'
Cyc1	NM001916	F: 5' -CTGCCAACACGGAGCATT-3' R: 5' -CGTGAGCAGGGAGAAGACGTA-3'
PGC1 α	NM013261.3	F: 5' -AAAGGATGCGCTCTCGTTCA-3' R: 5' -TCTACTGCCTGGAGACCTTGATC-3'
PPAR δ	BC002715	F: 5' -AGCATCCTCACCGGCAA-3' R: 5' -ATGTCTCGATGTCGATGTCGTGGATCAC-3'
IL-6	NM000600	F: 5' -CGGGAACGAAAGAAAGAGAAGCTCTAT-3' R: 5' -AGGCGCTTGTGGAGAAGGA-3'
36B4	M17885	F: 5' -CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R: 5' -AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
GAPDH	NM002046	F: 5' -TGCACCACCACCTGCTTAGC-3' R: 5' -GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

2 µl fra hver prøve ble tatt ut for å lage cDNA-miks. Denne blandingen ble fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann (standard 1000), og denne ble igjen fortynnet 1:2 til tre ulike konsentrasjoner (standard 500, 250 og 125). Disse fire fortynningene dannet til sammen grunnlaget for standardkurven og mengden amplifisert cDNA i hver prøve ble beregnet ut fra denne standardkurven. Hver prøve ble fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann. Overførte 2,5 µl av standardene, fortynnete prøver og nukleasefritt vann (negativ kontroll) til en MicroAmp[®] Optical Reaction Plate. 22,5 µl tillaget reaksjonsblanding (se appendiks), med riktige primere til det genet som skulle kjøres hver gang, ble tilsatt brønnene. Deretter ble brettet satt inn i ABI PRISM 7000. qPCR-reaksjonen er illustrert nedenfor i figur 2.5.



Figur 2.5: Illustrasjon av qPCR-reaksjonen. 44 sykluser ble kjørt, der ett utgjorde dissosiasjonsfasen. Trinn 1 og 2) Gradvis oppvarming og begynnende denaturering. Trinn 3) Amplifisering gjennom 40 sykluser. Hver syklus bestod av en denatureringsfase (95 °C i 15 sekunder) for denaturering av cDNA, det vil si at DNA-tråden ble separert. Deretter fortsatte syklusen med en hybridiseringsfase (60 °C i 1 minutt) der primeren ble festet til den komplementære sekvensen til målgenets DNA (anneling av primer), og deretter ble DNAet amplifisert i en polymeriseringsfase. Trinn 4) Dissosiasjonsfasen. Her ble dissosiasjonskurven produsert ved at primeren festet seg ved et bestemt smeltepunkt. Dette sa noe om hvor mange produkter primeren ga; den skulle helst gi kun ett produkt ettersom det kun skulle være én topp. Dette trinnet tillot oppdagelse av uspesifikke produkter da det ble målt binding ved hver temperatur.

2.10 Statistikk

Samtlige data i denne oppgaven er presentert som gjennomsnitt \pm SEM (standardfeilen til gjennomsnittet). Gjennomsnittsverdien for hver donor ble beregnet ut fra 2 paralleller i qPCR-forsøkene og 8-16 paralleller i substratoksidasjonsforsøkene avhengig av forbehandling og radioaktivt medium. De fleste statistiske analysene ble gjennomført i GraphPad Prism 5 med både en paret parametriske Students t -test og en paret ikke-parametriske test ("Wilcoxon matched-pairs signed rank" test). Ikke-parametriske test ble foretrukket ved vurdering av resultatene da linearitet ikke kunne antas. Signifikansnivå ble satt til 0,05 ($\alpha = 0,05$). Analysene for å se på samlet effekt ble utført i SPSS med en statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis"). Korrelasjonsanalysene ble gjennomført i GraphPad Prism 5, både med Pearsons test for korrelasjon og Spearmans test for korrelasjon. Spearmans korrelasjonstest ble brukt ved tolkning av resultatene da denne, i motsetning til Pearsons korrelasjonstest, er ikke-parametriske. For alle korrelasjonene ble det benyttet et signifikansnivå (α) på 5 %. Videre er korrelasjonskoeffisienten, ρ , oppgitt for hver av korrelasjonene. ρ er negativ når assosiasjonen mellom x og y er negativ, og positiv når assosiasjonen mellom x og y er positiv. En perfekt korrelasjon har $\rho = 1$ eller $\rho = -1$; da er alle punktene på en rett linje og de følger en lineær sammenheng.

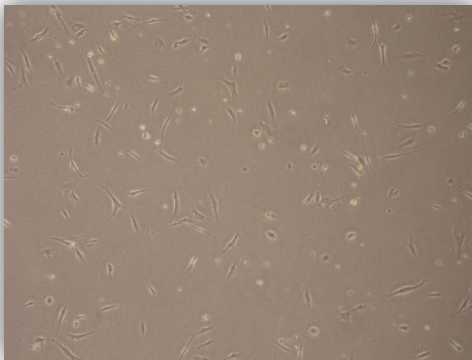
Det var, som vist i tabell 2.1, åtte deltakere i studien; fire deltakere i kontrollgruppen og fire deltakere i pasientgruppen. Ved substratoksidasjonsforsøk på kontroll 8 ble det oppnådd svært avvikende resultater i forhold til hva som ble oppnådd for de øvrige deltakerne, og resultatene lå mange standardavvik utenfor. Resultatene til kontroll 8 ble derfor ekskludert fra alle figurer og tabeller i denne masteroppgaven. Det er viktig å påpeke at skjelettmuskelcellene fra den avvikende donoren ble dyrket opp to uavhengige ganger, og resultatene var like ved begge forsøk, men svært avvikende fra de andre donorene.

3 Resultater

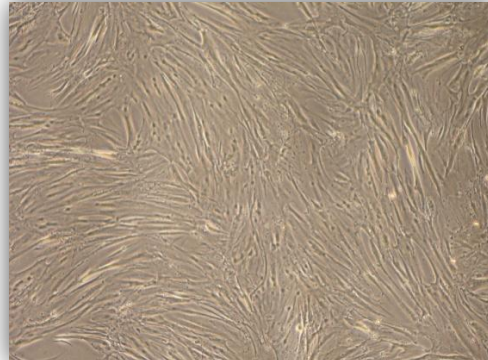
3.1 Dyrking av skjelettmuskelceller til forsøk

Figur 3.1 viser utviklingen fra utsåing til forsøk og viser at det ble dannet flerkjernede myotuber. Det ble tatt bilder av både 96-brønnersbrettene og 25 cm² flaskene, men ettersom hver brønn i brettene var så liten ble det vanskelig å ta gode bilder. Utviklingen fra utsåing til differensiering er derfor representert ved fire av bildene fra flaskene sådd ut til PCR.

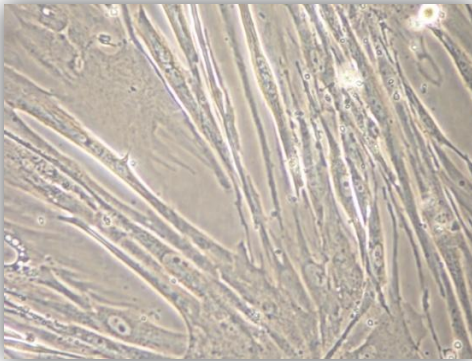
A



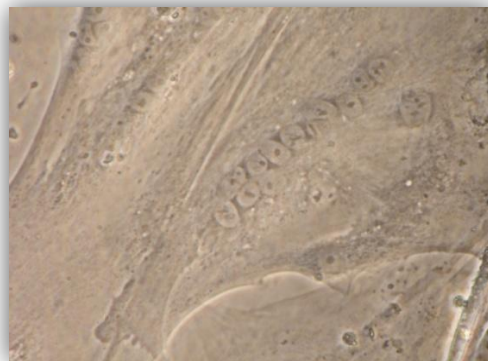
B



C



D



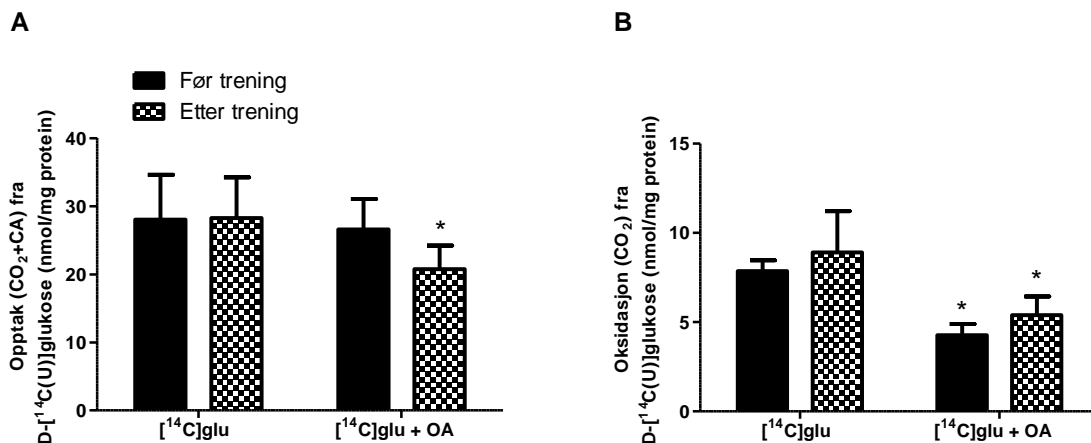
Figur 3.1: Bilder fra celledyrkingsprosessen. Alle bildene er fra biopsien tatt etter treningsintervensjonen fra donor 17 og cellene er i passasje 3. A) Bilde av muskelcellene etter 1 døgn i utsåingsmedium, før bytte til proliferasjonsmedium. Bildet ble tatt med 4x forstørrelse. B) Bilde av muskelcellene etter 7 dager i proliferasjonsmedium, før bytte til differensieringsmedium. Bildet ble tatt med 4x forstørrelse. C) Bilde av muskelcellene etter 7 dager i proliferasjonsmedium, før bytte til differensieringsmedium. Bildet ble tatt med 20x forstørrelse og viser at det ikke var dannet flerkjernede myotuber enda. D) Bilde av muskelcellene etter 3 dager i differensieringsmedium, rett etter første forbehandling med DMSO. Bildet ble tatt med 40x forstørrelse og det er mulig å se at skjelettmuskelcellene hadde differensiert og blitt til flerkjernede myotuber.

3.2 Oksidasjon og opptak av glukose

Det er beskrevet at trening øker opptak av glukose, mens effekten av trening på glukoseoksidasjon *in vivo* er liten [16]. Det var derfor ønskelig å se hvilke effekter treningsintervensjonen hadde på glukosemetabolismen i denne studien.

3.2.1 Effekter av trening *in vivo* på glukosemetabolismen *in vitro*

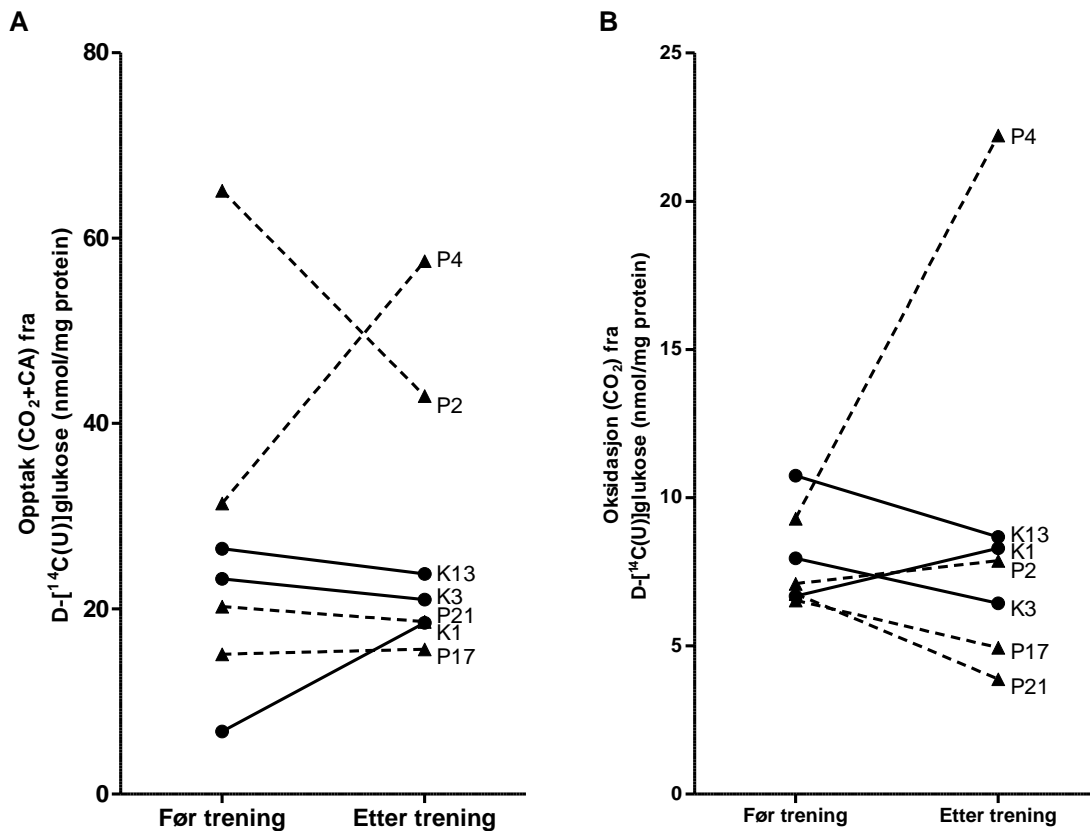
Ved å måle CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) fra radiomerket glukose i myotuber, dyrket opp fra celler isolert fra muskelbiopsi fra hver deltaker før og etter treningsintervensjonen, ble det undersøkt hvilke effekter treningsintervensjonen hadde på glukosemetabolismen. Resultatene er presentert i figur 3.2.



Figur 3.2: Treningseffekter på glukosemetabolismen i myotubene. A) Opptaket av glukose (CO₂+CA). B) Glukoseoksidasjonen (CO₂). På forsøksdagen ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μM D-[¹⁴C(U)]glukose ([¹⁴C]glu) ± 100 μM oljesyre (OA) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 7 uavhengige forsøk (n = 7). * p < 0,05 i forhold til uten tilsatt oljesyre.

Som vist i figur 3.2A var opptaket av glukose ([¹⁴C]glu) uforandret i cellene etter trening. Ved akutt behandling med oljesyre i fire timer ([¹⁴C]glu+OA) ble glukoseopptaket signifikant redusert etter trening i forhold til uten tilsatt oljesyre. Som vist i figur 3.2B var det ingen endring i glukoseoksidasjonen ([¹⁴C]glu). Når oljesyre ble tilsatt mediet ([¹⁴C]glu+OA) ble glukoseoksidasjonen signifikant redusert både før og etter trening i forhold til uten tilsatt oljesyre.

Det var også interessant å se hvordan hver enkelt deltaker responderte på treningsintervensjonen og om det var mulig å se eventuelle gruppeforskjeller på tross av at det var svært få deltakere i hver gruppe. Disse dataene er presentert i figur 3.3.

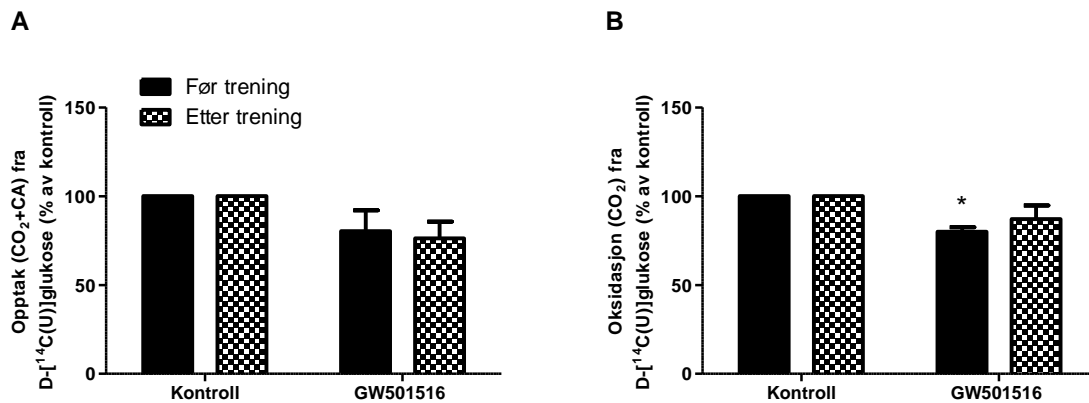


Figur 3.3: Donorforskjeller i glukoseopptak og -oksidasjon i myotubene etter treningsintervensjonen. A) Opptaket av glukose (CO₂+CA). B) Glukseoksidasjonen (CO₂). Resultatene er presentert som gjennomsnitt for hver enkelt deltaker i studien. Heltrukket linje med kulepunkt representerer en deltaker i kontrollgruppen (K), mens stiplet linje med trekantpunkt representerer en deltaker i pasientgruppen (P).

Som vist i figur 3.3A ble glukoseopptaket redusert for alle deltakerne med unntak av én deltaker i kontrollgruppen (K1) og to deltakere i pasientgruppen (P4 og P17). For de deltakerne som hadde et redusert opptak av glukose etter trening, var reduksjonen relativt liten. Én deltaker (P2) lå i utgangspunktet mye høyere enn de andre deltakerne før trening, men han var også den med kraftigst reduksjon i opptaket av glukose. I figur 3.3B er glukseoksidasjonen presentert. Alle deltakerne i kontrollgruppen med unntak av deltaker K1 hadde en redusert glukseoksidasjon etter trening. Deltaker P4 i pasientgruppen hadde den kraftigste økningen i glukseoksidasjon, tilsvarende som for glukseopptak, men deltaker P2 hadde også en svak økning av glukseoksidasjonen. De andre deltakerne i pasientgruppen hadde en svakt redusert glukseoksidasjon etter trening.

3.2.2 Effekter av forbehandling med PPAR δ -agonisten GW501516 på glukosemetabolismen *in vitro*

Det er varierende funn i ulike studier om forbehandling med GW501516 reduserer eller øker glukosemetabolismen i skjelettmuskelceller [95, 96]. Det var derfor ønskelig å undersøke hvilke effekter behandling med GW501516 hadde på glukosemetabolismen i myotubene i denne studien. Celler behandlet med 0,1 % DMSO ble benyttet som kontroll.



Figur 3.4: Effekt av forbehandling med GW501516 på glukosemetabolismen i humane myotuber før og etter treningsintervensjonen. A) Opptak av glukose (CO₂+CA). B) Glukseoksidasjon (CO₂). Cellene var forbehandlet med 10 nM GW501516 de fire siste dagene av differensieringsperioden. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D-[¹⁴C(U)]glukose og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 7 uavhengige forsøk (n = 7). Data er oppgitt som relative verdier hvor DMSO-kontroll er satt til 100 %. * p < 0,05 i forhold til kontroll.

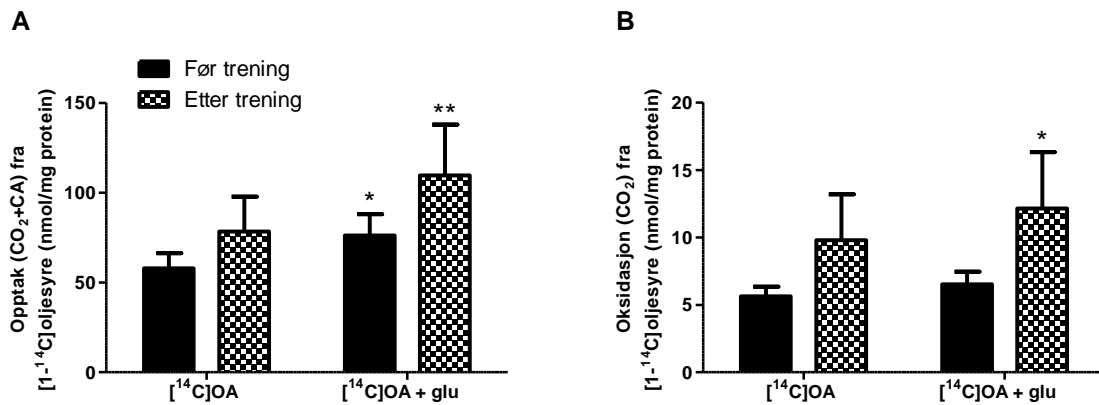
Behandling av myotubene med GW501516 så ut til å gi en reduksjon av både opptaket og oksidasjonen av glukose i forhold til kontrollene, som vist i henholdsvis figur 3.4A og 3.4B, men det var kun reduksjonen av glukoseoksidasjon før trening som var signifikant. Ved blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") i SPSS var det en signifikant GW501516-indusert reduksjon av glukoseopptaket med p = 0,012 (data ikke presentert).

3.3 Oksidasjon og opptak av oljesyre

Tidligere studier har vist at trening øker både opptak og oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskel [57]. Det var derfor ønskelig å se om disse effektene også var til stede i denne studien.

3.3.1 Effekter av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro*

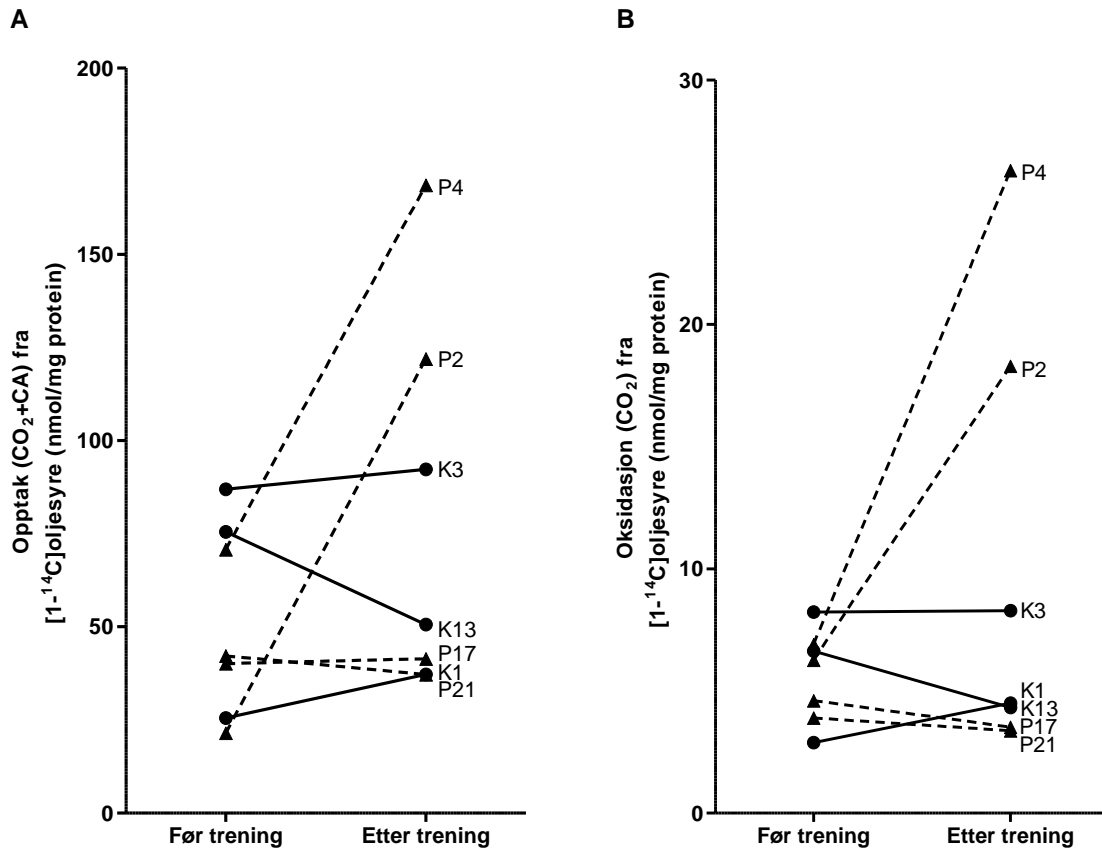
Ved å måle CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) fra radiomerket oljesyre i myotuber, dyrket opp fra celler isolert fra muskelbiopsi fra hver deltaker før og etter treningsintervensjonen, ble det undersøkt hvilke effekter treningsintervensjonen hadde på oljesyremetabolismen.



Figur 3.5: Effekter av treningen på oljesyremetabolismen i myotubene. A) Opptaket av oljesyre (CO₂+CA). B) Oljesyreoksidasjonen (CO₂). På forsøksdagen ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μM [¹⁴C]oljesyre ([¹⁴C]OA) ± 200 μM glukose (glu). CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 7 uavhengige forsøk (n = 7). * p < 0,05 i forhold til ikke tilsatt glukose. ** p < 0,01 i forhold til ikke tilsatt glukose.

Som vist i figur 3.5A var opptaket av oljesyre ([¹⁴C]OA) tilsynelatende økt etter trening, men økningen var ikke signifikant. Ved tilsetning av glukose til mediet under inkubasjonen i fire timer ([¹⁴C]OA+glu) økte opptaket av oljesyre både før og etter trening, og opptaket var også i nærvær av glukose størst etter trening. Økningen i oljesyreopptak ved tilsetning glukose var signifikante både før og etter treningsintervensjonen med henholdsvis p < 0,05 og p < 0,01. Som vist i figur 3.5B tenderte også oljesyreoksidasjonen ([¹⁴C]OA) til å øke etter trening, men økningen var ikke signifikant. Når glukose ble tilsatt mediet ([¹⁴C]OA+glu) økte oljesyreoksidasjonen, men det var kun økningen i oljesyreoksidasjon etter treningsintervensjonen som var signifikant.

Det var også her ønskelig å se hvordan hver enkelt deltaker responderte på treningsintervensjonen, og om det var mulig å se eventuelle gruppeforskjeller. Disse dataene er presentert i figur 3.6.

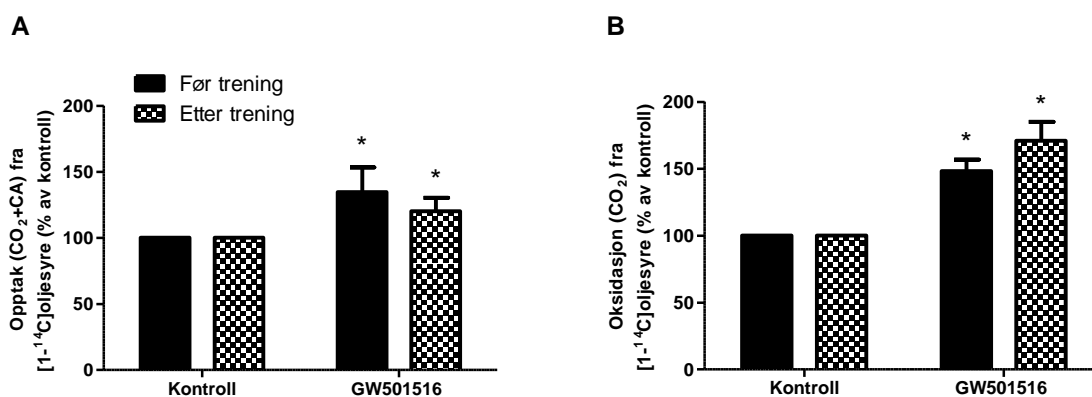


Figur 3.6: Donor- og gruppeforskjeller i opptak og oksidasjon av oljesyre etter treningsintervensjonen. A) Opptaket av oljesyre (CO_2+CA). B) Oljesyreoksidasjonen (CO_2). Resultatene er presentert som gjennomsnitt for hver enkelt deltaker i studien. Heltrukket linje med kulepunkt representerer en deltaker i kontrollgruppen (K), mens stiplet linje med trekantpunkt representerer en deltaker i pasientgruppen (P).

Som vist i figur 3.6A økte oljesyreopptaket for alle deltakerne med unntak av én deltaker i kontrollgruppen (K13) og én deltaker i pasientgruppen (P21). Oljesyreopptaket til de to deltakerne P2 og P4 økte ganske mye som følge av treningen, mens for de andre deltakerne var økningen mer moderat. I figur 3.6B vises donor- og gruppeforskjellene i oljesyreoksidasjon. Deltaker K13 hadde en redusert oljesyreoksidasjon etter trening sammenlignet med før, men reduksjonen var nokså moderat. De andre deltakerne i kontrollgruppen hadde en svak økning i oljesyreoksidasjonen etter trening. Videre hadde deltakerne P2 og P4 den kraftigste økningen i oljesyreoksidasjon, tilsvarende som for oljesyreopptaket. De andre deltakerne i pasientgruppen hadde en svakt redusert oljesyreoksidasjon etter treningsintervensjonen.

3.3.2 Effekter av forbehandling med PPAR δ -agonisten GW501516 på oljesyremetabolismen *in vitro*

Tidligere studier har vist at forbehandling med GW501516 øker oksidasjon av fettsyrer i skjelettmuskelceller [74, 96], mens det ikke er så mye data tilgjengelig på opptak av fettsyrer. Det var derfor ønskelig å undersøke hvilke effekter behandling med GW501516 hadde på oljesyremetabolismen i myotubene i denne studien.

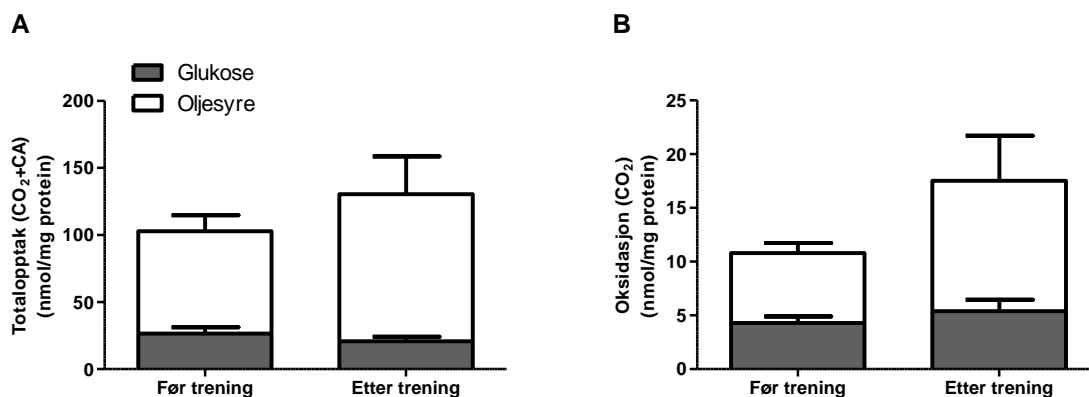


Figur 3.7: Effekt av forbehandling med GW501516 på oljesyremetabolismen i myotubene. A) Opptak av oljesyre (CO₂+CA). B) Oljesyreoksidasjon (CO₂). Cellene var forbehandlet med 10 nM GW501516 de siste fire dagene av differensieringsperioden. På forsøksdagen ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μM [1-¹⁴C]oljesyre og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 7 uavhengige forsøk (n = 7). Data er oppgitt som relative verdier hvor DMSO-kontroll er satt til 100 %. * p < 0,05 i forhold til kontroll.

Som vist i figur 3.7 ga forbehandling med GW501516 en signifikant økning av både opptaket og oksidasjonen av oljesyre i skjelettmuskelcellene i forhold til kontroll som kun var behandlet med 0,1 % DMSO. Ved blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") i SPSS var det tendens til GW501516-indusert økning av oljesyreoksidasjonen etter treningsintervensjonen med p = 0,077 (data ikke presentert).

3.4 Totalopptak og -oksidasjon av energisubstrater i myotubene

Det er mulig å slå sammen deler av resultatene fra forsøkene på glukose- og oljesyremetabolismen ([¹⁴C]glu+OA og [¹⁴C]OA+glu) og derved få et bilde av totalt opptak og oksidasjon av disse energisubstratene i myotubene.

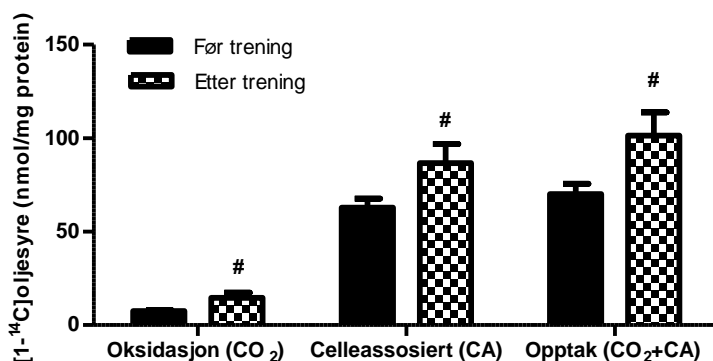


Figur 3.8: Totalopptak og -oksidasjon av glukose og oljesyre i myotubene. Ved å slå sammen grafene for $[^{14}\text{C}]\text{glu}+\text{OA}$ og $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{glu}$ fra figurene 3.2 og 3.5 er det mulig å se på totalopptak og -oksidasjon av substratene. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$).

Som vist i figur 3.8A var det en tendens til økt totalopptak av substratene etter trening. Videre, som vist i figur 3.8B, var det også tendens til økt totaloksidasjonen av substratene. Resultatene indikerer dermed en generell oppregulering av energimetabolismen i myotubene etter treningsintervensjonen.

3.5 Samlet effekt på fettsyremetabolismen

Ved hjelp av statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") var det mulig å se på resultatene fra forsøkene på oljesyremetabolismen ($[^{14}\text{C}]\text{OA}$, $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{GW501516}$, $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{glu}$ og $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{glu}+\text{GW501516}$) samlet og derved få et mer samlet bilde av effekten som treningen hadde på fettsyremetabolismen i myotubene.

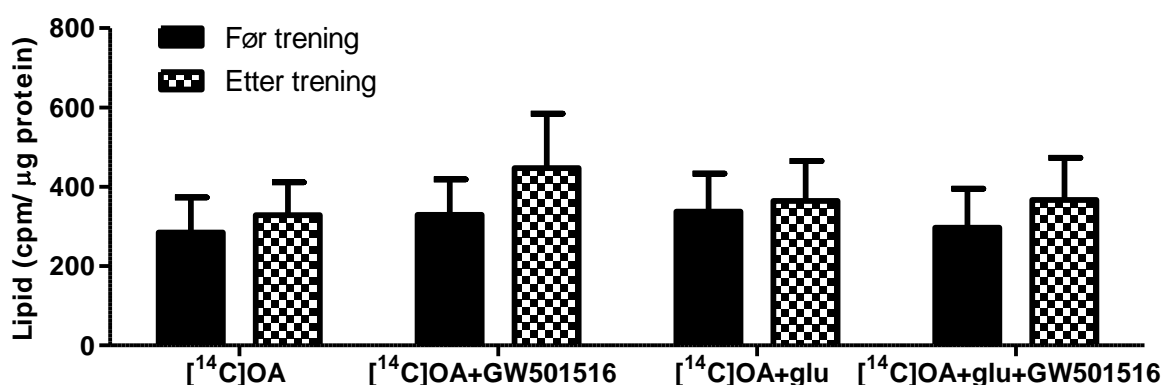


Figur 3.9: Samlet effekt på fettsyremetabolismen i myotubene. Ved å behandle tallene for $[^{14}\text{C}]\text{OA}$, $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{glu}$, $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{GW501516}$ og $[^{14}\text{C}]\text{OA}+\text{glu}+\text{GW501516}$ med statistisk blandet modellanalyse i SPSS var det mulig å se på samlet treningseffekt på fettsyremetabolismen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$). # $p < 0,05$ i forhold til før treningsintervensjonen.

Som vist i figur 3.9 var det en signifikant økning i både oksidasjonen (CO_2), celleassosiert radioaktivitet (CA) og opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) av oljesyre som følge av treningsintervensjonen. Ved å se på resultatene fra forsøkene på glukosemetabolismen samlet ble det ikke observert noen signifikante endringer i glukosemetabolismen som følge av treningsintervensjonen (data ikke vist).

3.6 Lipidfiltrasjon

Lipider som tas opp i skjelettmuskelceller kan lagres som triglyserider, kolesterolestere, fosfolipider eller frie fettsyrer [97]. Ved lipidfiltrasjon binder lipidene seg til en hydrofob membran, og radioaktivitetsmengden til de akkumulerte lipidene måles. Ved å gjøre lipidfiltrasjon på cellelysaten fra substratoksidasjonsforsøkene ble det oppnådd en indikator på hvor mye som faktisk var akkumulerte lipider, og hva som eventuelt hadde skjedd intracellulært. Resultatet fra forsøket er slått sammen for alle deltakerne ($n = 7$) og er vist nedenfor i figur 3.10.

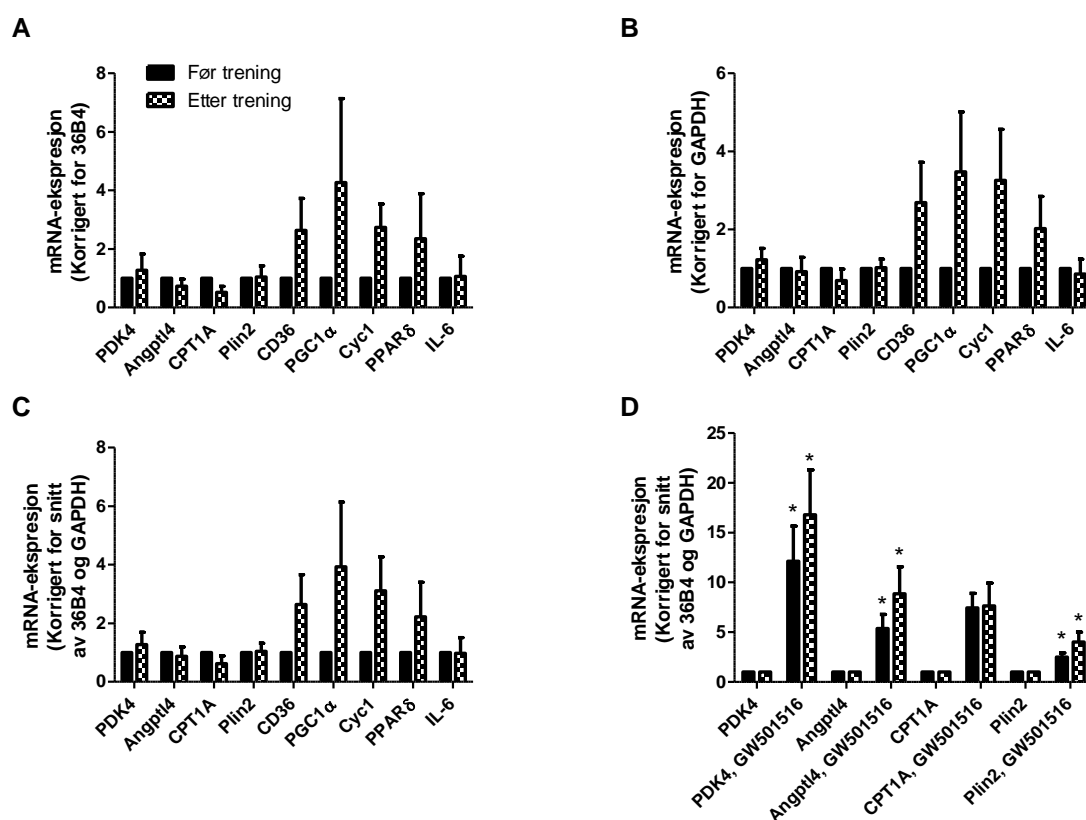


Figur 3.10: Mengde akkumulerte lipider i cellelysaten. Ved å gjøre lipidfiltrasjon på cellelysaten etter substratoksidasjonsforsøkene ble det oppnådd estimat på mengden akkumulerte lipider i skjelettmuskelcellene. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$).

Det virker som at treningsintervensjonen har gjort noe med lipidakkumuleringen i skjelettmuskel ettersom det var tendens til økt akkumulering av lipider etter trening. Videre viste resultatene at PPAR δ -agonisten GW501516 så ut til å øke lipidakkumuleringen ytterligere. Ingen av økningene var imidlertid signifikante. Resultatene fra lipidfiltrasjonen på hver enkelt deltaker var variable; tre av de fire deltakerne i pasientgruppen har høyere lipidakkumulering etter trening, og to av tre deltakere i kontrollgruppen har høyere lipidakkumulering etter trening (data ikke vist).

3.7 Effekter av trening på genekspressjon

Muskelkontraksjoner påvirker gen- og proteinekspressjon involvert i både karbohydrat- og lipidmetabolisme [98]. Det var derfor ønskelig å se hvilke effekter treningsintervensjonen i denne studien hadde på gener involvert i energimetabolismen. Det var også ønskelig å se på effekt av behandling med PPAR δ -agonisten GW501516 på gener som er kjent for å reguleres av PPAR δ . Det ble valgt ut 10 gener som ble analysert med qPCR: PDK4, Angptl4, CPT1A, PLIN2, CD36, PGC1 α , Cyc1, CoxIV, PPAR δ , og IL-6. Standardkurven som ble generert for CoxIV ble imidlertid ikke lineær og dataene kunne ikke benyttes. Det er derfor kun resultater fra 9 gener som presenteres. To ulike endogene kontrollere ble benyttet: syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4) og glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase (GAPDH). Resultatene av analysene er presentert i figur 3.11.



Figur 3.11: Resultater fra qPCR-forsøkene. A) mRNA-ekspressjon når normalisert for den endogene kontrollen 36B4. B) mRNA-ekspressjon når normalisert for den endogene kontrollen GAPDH. C) mRNA-ekspressjon når normalisert for gjennomsnittet av de endogene kontrollene 36B4 og GAPDH. D) mRNA-ekspressjon for gener som påvirkes av GW501516 når normalisert for et gjennomsnitt av de endogene kontrollene 36B4 og GAPDH. Resultatet fra cellene som bare var behandlet med 0,1 % DMSO (kontroll) ble satt til 1 og verdiene for GW501516-effekten ble korrigert ut fra denne kontrollen. * $p < 0,05$ i forhold til kontroll.

I figur 3.11A-C er resultatene for alle 9 genene presentert, men de er normalisert på ulike måter. I figur 3.11A ble dataene normalisert for 36B4, i figur 3.11B ble dataene normalisert for GAPDH og i figur 3.11C ble dataene normalisert for gjennomsnittet av 36B4 og GAPDH. I alle de tre figurene ble ekspresjonen av hvert enkelt gen før treningsintervensjonen satt til 1, og ekspresjon av genet etter trening ble relatert til dette. Ved alle de tre måtene å normalisere på tenderte ekspresjonen av genene CD36, PGC1 α , Cyc1 og PPAR δ til å være økt etter treningsintervensjonen.

I figur 3.11D vises effektene av behandling med 10 nM GW501516 på gener som reguleres av PPAR δ . Celler behandlet med 0,1 % DMSO ble brukt som kontroll og ble satt til 1, og genekspresjonen i cellene behandlet med GW501516 ble relatert til kontrollen. Genekspresjonen økte kraftig for alle genene etter behandling med GW501516, og det var en signifikant GW501516-indusert økning både før og etter treningsintervensjonen for alle genene, med unntak av CPT1A, med $p < 0,05$ i forhold til kontroll.

3.8 Korrelasjonsanalyser

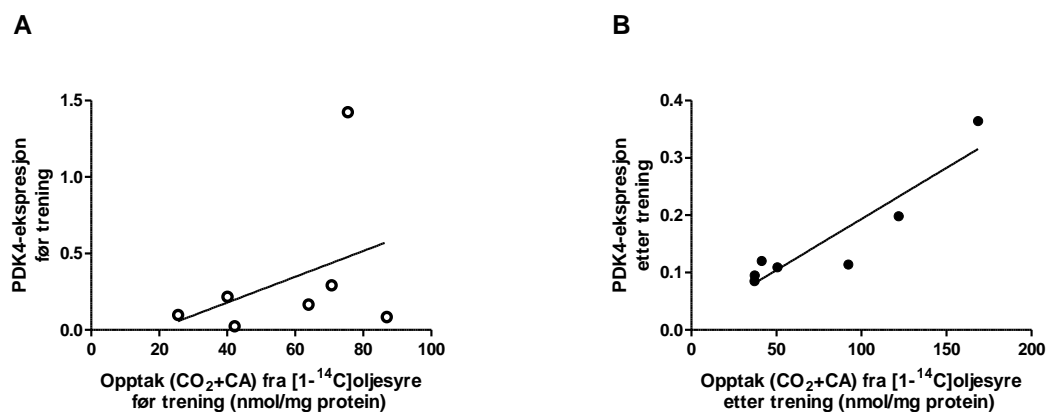
Både fysiologiske parametre og treningsresultater var tilgjengelig fra intervensjonsstudien. Det var derfor ønskelig å gjøre korrelasjonsanalyser for å se om det var noen sammenheng innad i celledata og også mellom celledata og *in vivo*-data. Korrelasjonsanalysene er basert på resultater fra 7 deltakere. Alle resultatene som vises er fra de ikke-parametriske korrelasjonsanalysene (Spearman's test for korrelasjon). Regresjonslinjen i figurene er imidlertid basert på lineær korrelasjon og har dermed ikke noe med p -verdien å gjøre. Regresjonslinjen er kun satt på som et hjelpemiddel for å lettere kunne se korrelasjonene. For alle korrelasjonene ble det benyttet et signifikansnivå (α) på 5 %.

3.8.1 Korrelasjon mellom ulike *in vitro*-celldata

Genekspresjonsdataene som ble brukt ble korrigert for et gjennomsnitt av de endogene kontrollene 36B4 og GAPDH. Resultatene fra disse korrelasjonsanalysene er presentert på de neste sidene.

PDK4-ekspressjon og oljesyreopptak etter trening

Ved korrelasjonsanalyser mellom resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene og qPCR-forsøkene ble det funnet én signifikant korrelasjon som omhandlet ekspressjon av PDK4.

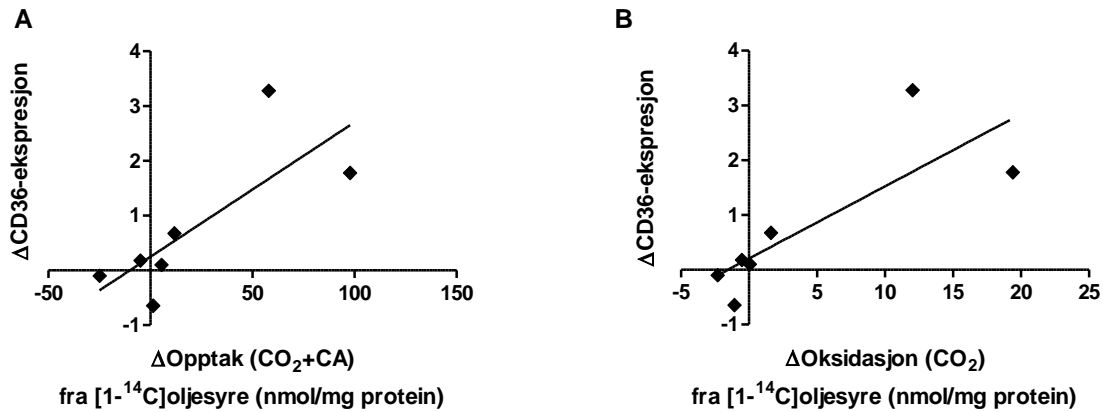


Figur 3.12: Korrelasjon mellom PDK4-ekspressjon og oljesyreopptak. A) Ikke-signifikant korrelasjon ($p = 0,66$ og $\rho = 0,2143$) mellom ekspressjon av PDK4 og oljesyreopptak før treningsintervensjonen. B) Signifikant korrelasjon med $p < 0,05$ og $\rho = 0,8929$ mellom ekspressjon av PDK4 og oljesyreopptak etter treningsintervensjonen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra 7 uavhengige forsøk.

Som vist i figur 3.12B var det en positiv korrelasjon mellom økende oljesyreopptak og økende ekspressjon av PDK4 etter treningsintervensjonen. Korrelasjonen mellom oljesyreopptak og PDK4-ekspressjon før trening, som vist i figur 3.12A, var imidlertid ikke signifikant.

CD36-ekspressjon og opptak og oksidasjon av oljesyre

Ved korrelasjonsanalyser mellom resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene og qPCR-forsøkene ble det som vist i figur 3.13 funnet to signifikante korrelasjoner som omhandlet ekspressjon av CD36.

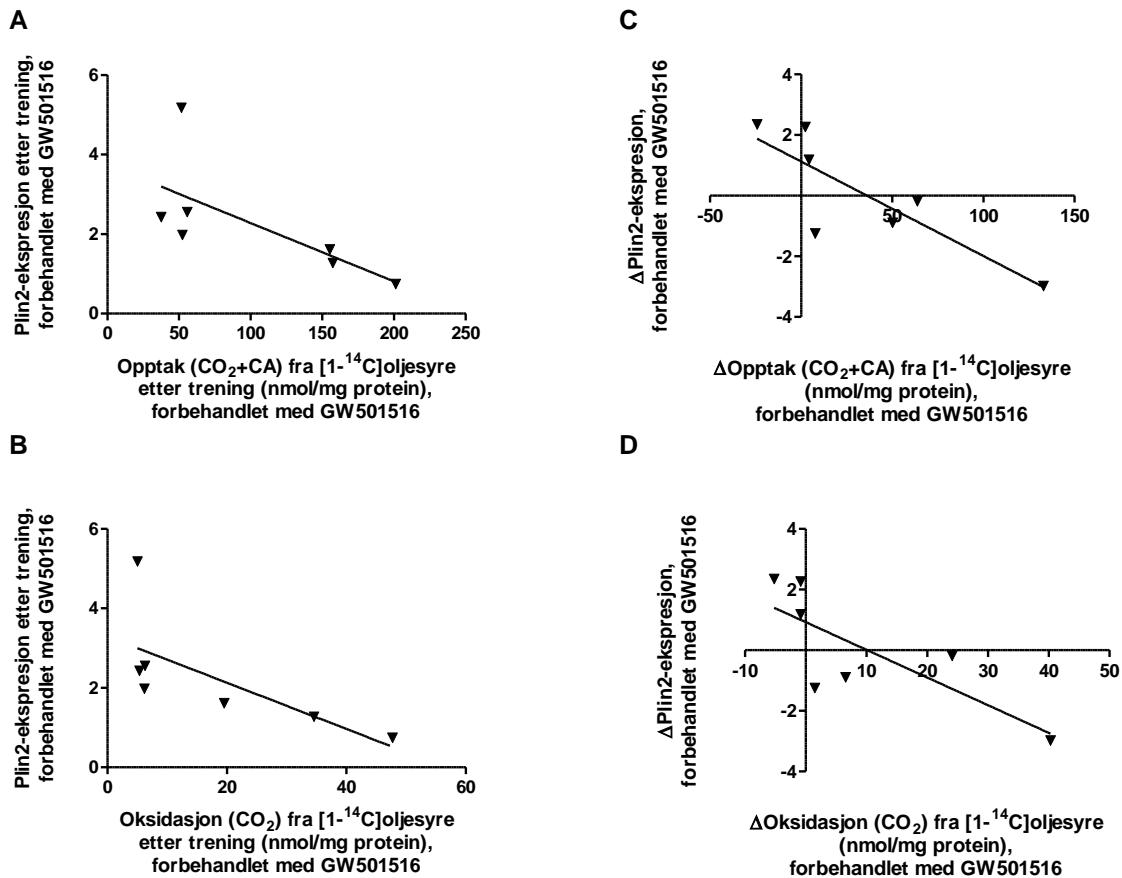


Figur 3.13: Korrelasjon mellom Δ CD36-ekspresjon og Δ oljesyreopptak og -oksidasjon. A) Signifikant korrelasjon mellom Δ CD36-ekspresjon og Δ oljesyreopptak. B) Signifikant korrelasjon mellom Δ CD36-ekspresjon og Δ oljesyreoksidasjon. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$). Begge korrelasjonene var signifikante med $p < 0,05$ og har korrelasjonskoeffisientene $\rho_A = 0,7857$ og $\rho_B = 0,8929$.

Som vist i figur 3.13A var det en signifikant, positiv korrelasjon mellom Δ oljesyreopptak og Δ CD36-ekspresjon ($\Delta =$ resultat etter treningsintervensjonen – resultat før treningsintervensjonen). Som vist i figur 3.13B var det også en signifikant, positiv korrelasjon mellom Δ oljesyreoksidasjon og Δ CD36-ekspresjon. De fleste deltakerne i studien hadde imidlertid ikke veldig stor forbedring i oljesyreoksidasjon, noen hadde til og med redusert oljesyreoksidasjon etter treningsintervensjonen, men som vist av figuren var det to deltakere med en kraftig forbedret oljesyreoksidasjon, og det var også disse deltakerne som hadde den største økningen i ekspresjonen av CD36 etter intervensjonsperioden.

PLIN2-ekspresjon og oljesyreopptak og -oksidasjon

Ved korrelasjonsanalyser mellom resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene og qPCR-forsøkene ble det funnet flere signifikante korrelasjoner mellom PLIN2 og oljesyremetabolisme. Korrelasjonene som vises i figur 3.14 var signifikante når cellene var behandlet med PPAR δ -agonisten GW501516.



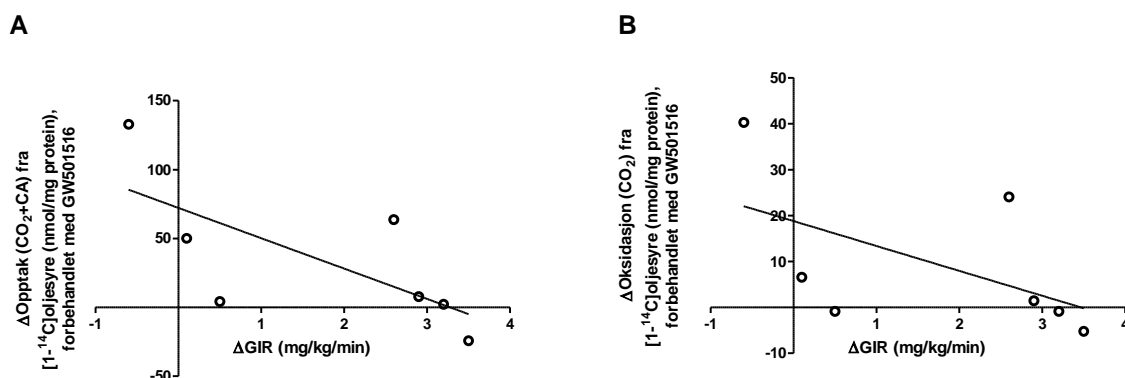
Figur 3.14: Ekspresjon av PLIN2 og oljesyremetabolisme. A) PLIN2-ekspresjon etter treningsintervensjonen korrelerte negativt med oljesyreopptak etter treningsintervensjonen. B) PLIN2-ekspresjon etter treningsintervensjonen korrelerte negativt med oljesyreoksidasjon etter treningsintervensjonen. C) ΔPLIN2-ekspresjon korrelerte negativt med Δoljesyreopptak. D) ΔPLIN2-ekspresjon korrelerte negativt med Δoljesyreoksidasjon. Korrelasjonene ble kun observert når cellene hadde vært forbehandlet med 10 nM GW501516 de siste fire dagene av differensieringsperioden. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra 7 uavhengige forsøk (n = 7). Korrelasjonene var signifikante med $p < 0,05$, og hadde korrelasjonskoeffisientene $\rho_A = -0,8214$, $\rho_B = -0,8929$, $\rho_C = -0,8571$ og $\rho_D = -0,8469$.

Som vist i figur 3.14A og 3.14B var det negativ korrelasjon både mellom oljesyreopptak og PLIN2-ekspresjon etter trening, og oljesyreoksidasjon og PLIN2-ekspresjon etter trening. Som vist i figur 3.14C og 3.14D var det også negativ korrelasjon både mellom Δoljesyreopptak og ΔPLIN2-ekspresjon, og Δoljesyreoksidasjon og ΔPLIN2-ekspresjon. Det var også en negativ signifikant korrelasjon mellom Δoljesyreopptak og ΔPLIN2-ekspresjon når cellene ikke hadde vært forbehandlet med GW501516 med $p = 0,0480$ og $\rho = -0,7857$ (data ikke presentert).

3.8.2 *In vivo-in vitro* korrelasjoner

Korrelasjon mellom glukoseinfusjonshastighet og oljesyremetabolisme

Ved korrelasjonsanalyser mellom alle tilgjengelige fysiologiske parametre og energi- og metabolisme i myotubene før treningsintervensjonen, etter treningsintervensjonen og som Δ -verdier ble det funnet to signifikante korrelasjoner.

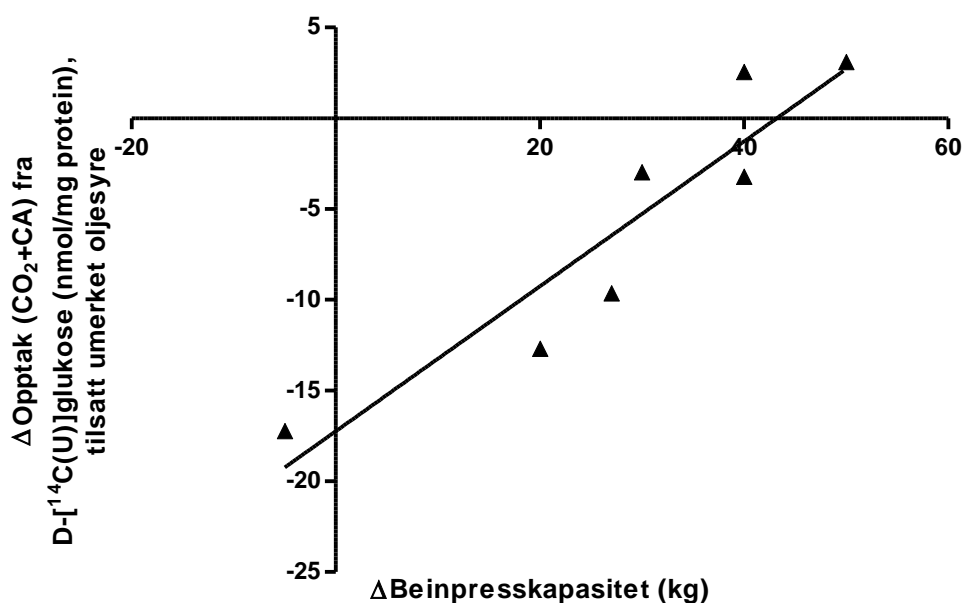


Figur 3.15: Korrelasjon mellom Δ GIR og Δ oljesyreopptak og -oksidasjon. A) Korrelasjon mellom Δ GIR og Δ oljesyreopptak etter forbehandling med 10 nM GW501516 de siste fire dagene av differensieringsperioden. B) Korrelasjon mellom Δ GIR og Δ oljesyreoksidasjon etter forbehandling med 10 nM GW501516 de siste fire dagene av differensieringsperioden. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$). $p_{A,B} < 0,05$, $\rho_A = -0,7748$ og $\rho_B = -0,8214$.

Som vist i figur 3.15A var det en negativ korrelasjon mellom Δ oljesyreopptak når cellene var forbehandlet med PPAR δ -agonisten GW501516 og Δ GIR. Figur 3.15B viser at det også var en negativ korrelasjon mellom Δ oljesyreoksidasjon når cellene var forbehandlet med PPAR δ -agonisten GW501516 og Δ GIR.

Korrelasjon mellom beinpresskapasitet og glukoseopptak

Ved korrelasjonsanalyser mellom treningsresultatene (fra både utholdenhets- og styrkeøvelsene) og energimetabolisme i myotubene før treningsintervensjonen, etter treningsintervensjonen og som Δ -verdier, ble det funnet en positiv korrelasjon mellom Δ glukoseopptak (når det radiomerkede glukosemediet var tilsatt oljesyre) og Δ beinpresskapasitet (figur 3.16).



Figur 3.16: Korrelasjon mellom Δbeinpresskapasitet og Δglukoseopptak. Korrelasjon mellom Δbeinpresskapasitet og Δglukoseopptak når det radioaktive mediet ($200 \mu\text{M D-}^{14}\text{C(U)}\text{glukose}$) var tilsatt $100 \mu\text{M}$ oljesyre. Resultatet er presentert som gjennomsnitt fra 7 uavhengige forsøk ($n = 7$). $p < 0,01$ og $\rho = 0,9370$.

Som vist i figuren var det kun to deltakere som hadde økt glukoseopptak (når oljesyre var tilsatt mediet) etter treningsintervensjonen, mens de fem andre deltakernes glukoseopptak i nærvær av oljesyre var dårligere etter treningsintervensjonen. Det var kun én deltaker som hadde lavere beinpresskapasitet etter treningsintervensjonen, og det var også denne deltakeren som hadde lavest glukoseopptak (når oljesyre var til stede). For de øvrige deltakerne observeres det at på tross av at de hadde økt beinpresskapasiteten sin (~ 20 kg eller mer) så hadde de ikke nødvendigvis økt glukoseopptak i nærvær av oljesyre.

Korrelasjon mellom fysiologiske parametre og genekspressjon

Ved korrelasjonsanalyser mellom de fysiologiske parametrene som ble målt på hver deltaker før og etter treningsintervensjonen og resultatene fra qPCR-analysene ble det funnet flere korrelasjoner som var signifikante. Disse er vist i tabell 3.1. Ved korrelasjonsanalyser for de to gruppene hver for seg var det ingen signifikante korrelasjoner, hverken for kontrollgruppen ($n = 3$) eller pasientgruppen ($n = 4$).

Tabell 3.1: Signifikante korrelasjoner mellom ulike fysiologiske parametre og mRNA-ekspressjon av ulike gener i myotuber. Angptl4, angiopoietinlignende protein 4; S-insulin, seruminsulin; CD36, "cluster of differentiation 36"; PGC1 α , peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1 α ; KMI, kroppsmasseindeks; SMM, skjelettmuskelmasse; WHR, "waist-to-hip" ratio; PPAR δ , peroksisomproliferator-aktivert reseptor δ ; CPT1A, karnitin palmitoyltransferase-1 isoform A. n = 7.

Signifikante korrelasjoner (p < 0,05)	p-verdi	Spearman's korrelasjonskoeffisient (ρ)
Før treningsintervensjonen		
Kroppsvekt (kg) og Angptl4-ekspressjon	0,0480	0,7857
S-insulin (pmol/l) og CD36-ekspressjon	0,0333	0,8857
Etter treningsintervensjonen		
Fastende glukosenivå (mmol/l) og Angptl4-ekspressjon	0,0341	0,8214
Kroppsvekt (kg) og PGC1 α -ekspressjon	0,0123	0,8929
KMI (kg/m ²) og PGC1 α -ekspressjon	0,0123	0,8929
SMM (kg) og PGC1 α -ekspressjon	0,0123	0,8929
WHR og PGC1 α -ekspressjon	0,0067	0,9370
Fettprosent (%) og PGC1 α -ekspressjon	0,0480	0,7857
Visceral fettmengde (cm ²) og PGC1 α -ekspressjon	0,0123	0,8929
Δ (Resultat etter treningsintervensjonen – resultat før treningsintervensjonen)		
Δ SMM (kg) og Δ PPAR δ -ekspressjon	0,0238	-0,8469
Δ S-insulin (pmol/l) og Δ CPT1A-ekspressjon	0,0123	0,8929

Korrelasjon mellom treningsresultater og genekspressjon

Ved korrelasjonsanalyser mellom resultatene fra utholdenhets- og styrketestene (tabell 2.5 og 2.6), og resultatene fra genekspressjonsanalysene ble det funnet noen korrelasjoner som var signifikante. Disse er vist i tabell 3.2. Ved korrelasjonsanalyser for de to gruppene hver for seg var det ingen signifikante korrelasjoner.

Tabell 3.2: Oversikt over signifikante korrelasjoner mellom ulike resultater fra utholdenhets- og styrketestene og mRNA-ekspressjonen av ulike gener i myotuber. VO_{2max} , maksimalt oksygenopptak; PGC1 α , peroksisomproliferator-aktivert reseptor γ koaktivator-1 α ; Cyc1, cytokrom c. n = 7.

Signifikante korrelasjoner ($p < 0,05$)	p-verdi	Spearman's korrelasjonskoeffisient (ρ)
ΔVO_{2max} og $\Delta Cyc1$ -ekspressjon	0,0238	0,8571
Brystpresskapasitet og PGC1 α -ekspressjon etter treningsintervensjonen	0,0123	0,8929
"Cable pull-down" kapasitet og PGC1 α -ekspressjon etter treningsintervensjonen	0,0028	0,9643
Beinpresskapasitet og PGC1 α -ekspressjon etter treningsintervensjonen	0,0123	0,8729

4 Diskusjon

4.1 Vurdering av metodikken

4.1.1 Treningsstudien

Treningsintervensjonsstudien var allerede ferdig før oppstart med denne masteroppgaven. Studien var en parallellfordelt, ikke-randomisert intervensjonsstudie for å se på effekter av trening hos personer med hyperglykemi (nedsatt glukosetoleranse) og personer med normoglykemi. Ved å benytte de valgte inklusjons- og eksklusjonskriteriene (se appendiks) ble både deltakernes og studiens sikkerhet og validitet sikret, og studiens formål ble oppnådd på en god måte.

Med tanke på validiteten av resultatene fra styrketestene som ble gjennomført for å undersøke maksimal styrke er det flere aspekter som må vurderes. For det første fikk hver deltaker en individuelt overvåket økt for å justere utstyret og for å lære teknikkene før treningsintervensjonens start. Dette var svært viktig for resultatenes styrke. Styrketestene ble innledet av 10 minutters aerob oppvarming. Før første styrketest gjennomførte deltakerne en styrketreningsøkt. Dette kan være en fordel både med tanke på at deltakerne da fikk litt ekstra øvelse på apparatene, men også en ulempe ettersom deltakerne kanskje var mer slitne og ikke på sitt maksimale fysiske og psykiske. Imidlertid ble deltakerne hele tiden oppmuntret i løpet av testene, og vektene ble gradvis tyngre. Deltakerne fikk to forsøk på den tyngste vekten de kunne klare hvis de ikke klarte det på første forsøk. Deltakerne fikk 3 minutters hvile mellom hvert forsøk. Det at de fikk et nytt forsøk var viktig ettersom ved forsøk to vil deltakerne gjerne være bedre forberedt, og ha en bestemt innstilling psykisk, for å klare forsøket.

Med tanke på validiteten av resultatene fra utholdenhetstesten som ble gjennomført for å undersøke maksimalt oksygenopptak er det også her noen aspekter som må vurderes. Utholdenhetstreningen bestod av spinning i form av intervalltrening. Hver deltaker var utstyrt med en hjerterytmemonitor og treningsinstruktørene spurte om hjerterytmen i løpet av øktene for å kunne oppmuntre deltakerne til eventuelt å øke intensiteten så de var ved ønsket hjerterytme under alle treningsøktene og under utholdenhetstestene. Før treningsintervensjonsperioden startet ble maksimalt oksygenopptak testet to ganger. Det var

minst tre dager mellom de to VO₂max-testene. Etter treningsintervensjonsperioden ble det kun gjennomført én VO₂max-test. Som en forberedelse til de første utholdenhetstestene gjennomførte deltakerne en 30 minutters sykkeltest for å bli kjent med hvordan den virkelige testen for maksimalt oksygenopptak ville foregå, og for at den estimerte intensiteten korresponderte med hva hovedtesten krevde. Denne forberedelsestesten var viktig da det i starten kan være litt uvant å måtte sykle såpass hardt uten å kunne puste gjennom nesten, men via en maske til munnen. Det var også svært viktig for resultatenes styrke. Før selve testene gjennomførte deltakerne en standardisert oppvarming med gradvis økende intensitet.

4.1.2 Oppdyrking og differensiering av skjelettmuskelceller (myotuber)

Satelittceller kan isoleres fra skjelettmuskelbiopsier [99, 100], dyrkes opp til myoblaster ved å aktiveres til proliferasjon, og så differensieres til flerkjernede myotuber [28]. Ettersom myotuber har vist å ha tilsvarende morfologi [101] og metabolisme [102-104] som skjelettmuskel *in vivo* anses dette som en god *in vitro*-modell for humane skjelettmuskelceller. Fysiologiske faktorer som for eksempel endokrin påvirkning fjernes, og med denne modellen er det mulig å kontrollere det ekstracellulære miljøet svært nøye. Det er også mulig å avgrense forsøket til en bestemt periode der de fysiologiske faktorene er så godt kjent som mulig, for eksempel som i denne studien der biopsier var tatt på et tidspunkt som sannsynliggjorde at det var mulig å finne effekter av en treningsintervensjon. Humane satelittceller har videre det beste genetiske grunnlaget for å undersøke humane sykdommer slik som fedme, insulinresistens og T2D sammenlignet med skjelettmuskelceller fra dyr. Mange metabolske karakteristika til muskelcelledonorene blir bevart når satelittcellene isoleres og dyrkes opp *in vitro* [102, 104, 105]. Både genetikk og epigenetikk er sannsynlige årsaker til at cellene bevarer en del av sine *in vivo*-karakteristika, Det er kjent at trening, diett og familiehistorikk med T2D påvirker graden av DNA-metylering i skjelettmuskel [90]. Barrès *et al.* observerte at akutt trening *in vivo* induserte hypometylering av promotorer av flere gener relatert til metabolisme [106]. Det er viktig å påpeke at cellene det er blitt gjort forsøk på i denne masteroppgaven aldri har kontrahert ettersom de er dyrket opp fra hvilende satelittceller. Det er imidlertid godt beskrevet at stamceller fra skjelettmuskel er under epigenetisk kontroll [107], så epigenetikk er trolig en del av forklaringen på effektene som ses fra forsøkene, og som gjør at de fysiologiske endringene som har skjedd *in vivo* som følge av treningsintervensjonen bevares i satelittcellene som dyrkes opp til myotuber *in vitro*. Det er

kjent at utviklingen og differensieringen av skjelettmuskel også er under epigenetisk kontroll [108].

Ulemper med cellemodellen er at når den sammenlignes med situasjonen *in vivo* så er det mye lavere insulinstimulert glukoseopptak i myotuber [31], og dessuten er ekspresjonen av de glykolytiske type II-fibre mer fremtredende enn de oksidative type I-fibre [101]. For å få cellemodellen til å ligne mest mulig på situasjonen *in vivo* burde den avhenge mer av oksidativ metabolisme. En av måtene å oppnå dette på er å tilsette en PPAR-aktivator til dyrkingsmediet [62]. Under differensieringen av skjelettmuskelcellene i denne masteroppgaven ble PPAR δ -agonisten GW501516 tilsatt dyrkingsmediet til noen brønner/flasker de siste fire dagene av differensieringsperioden. Dessuten mangler naturlig nok myotuber dyrket *in vitro* mikromiljøet og kommunikasjonen som foregår med andre celler *in vivo*, for eksempel kommunikasjonen med nerveceller.

4.1.3 Metodene brukt for å måle energimetabolisme og genekspresjon

I substratoksidasjonsforsøkene var radiomerket glukose eller oljesyre tilsatt for å se på energimetabolismen i myotubene. Denne metoden ble utviklet av Wensaas *et al.*[92], og er godt validert. Det samme er Bradfords metode for måling av protein [93] og qPCR-analysen. Lipidfiltrasjonsmetoden utviklet av Stefan Hallén (ikke-publisert metode) er et alternativ til måling av celleassosiert radioaktivitet (CA), og gir et noe bedre mål på om det faktisk er lipider som måles ved CA. Det er imidlertid en grov metode sammenlignet med å måle ulike lipidklasser for eksempel ved tynnsløtt eller GC-MS. Ved å dividere resultatene fra lipidekstraksjonen med resultatene fra målingene av CA ble det observert at lipidene utgjorde omtrent 25 % av CA for alle fire radioaktive medier både før og etter treningsintervensjonen (data ikke presentert), og lipidfiltrasjonsmetoden anses derfor som pålitelig.

4.1.4 Analyse av data og statistikk

Den statistiske hypotesetesten som ble mest benyttet i denne masteroppgaven var den ikke-parametriske testen "Wilcoxon matched-pairs signed rank test". Den ble benyttet da normalfordelte data ikke kunne antas og det var et lite antall observasjoner. For å se på samlede effekter ble imidlertid statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") ved hjelp av dataprogrammet SPSS benyttet. Dette var fordi med denne modellen er det mulig å undersøke flere parametre (variabler) samtidig og det er mulig å se på hele datasettet under ett

for å få den samlede effekten. Ved å benytte denne modellen fås også større antall frihetsgrader og dermed blir datasettet utnyttet mer effektivt.

For korrelasjonsanalysene ble Spearmans test for korrelasjon benyttet. Spearmans korrelasjonstest er en ikke-parametrisk test for statistisk samvariasjon mellom to variabler. Testen måler hvor godt forholdet mellom de to variablene kan forklares ved hjelp av en monoton funksjon. En perfekt korrelasjon på +1 eller -1 forekommer når alle variablene følger en perfekt monoton funksjon av den tilhørende parede variabelen. Spearmans korrelasjonskoeffisient, ρ , definerer altså korrelasjonens styrke og retning.

4.2 Glukosemetabolisme og treningseffekter

Resultatene viste at treningsintervensjonen ikke ga noen signifikant endring i glukoseoksidasjonen. Det er som vist i figur 3.2B en ikke-signifikant økning, men det er ganske stor variasjon i deltakernes glukoseoksidasjon etter treningsintervensjonen. Videre viste resultatene at treningsintervensjonen ikke ga noen forandring i opptaket av glukose.

Studier har vist at aerob trening påvirker ekspresjonen og translokasjonen av GLUT4 [17]. GLUT4 er som nevnt tidligere en av de viktigste glukosetransportørene i skjelettmuskel, og når mer GLUT4 er tilgjengelig medieres et økt glukoseopptak som igjen kan mediere økt glukoseoksidasjon. Resultatene viste ingen effekt på glukoseopptaket, men det var tendens til økt glukoseoksidasjon. Det er ikke kjent at det er gjort forsøk tidligere på å dyrke opp skjelettmuskelceller *in vitro* for deretter å se på effekter av *in vivo* trening på energimetabolisme etter at cellene har gjennomgått flere celledelinger.

IL-6 er blitt assosiert med økt glukoseopptak under trening [50]. Ekspresjon av IL-6 er tidligere sett å øke som følge av muskelkontraksjoner [47], men varierer med intensitet og varighet av treningen, utholdenhetskapasitet og hvor stor andel av skjelettmuskelmassen som benyttes i løpet av treningsøkten [48]. Resultatene fra qPCR-analysene viste at ekspresjonen av IL-6 var uforandret etter treningsintervensjonen.

Ved tilsetning av umerket oljesyre til det radioaktivt merkede glukosemediet viste resultatene at glukoseopptaket før treningsintervensjonen ikke forandret seg stort, men glukoseopptaket etter treningsintervensjonen ble signifikant redusert. Tilsetningen av oljesyre førte videre til at glukoseoksidasjonen ble signifikant redusert både før og etter treningsintervensjonen. Dette

stemmer med hva som forventes ut fra hypotesen til Randle *et al.* om glukose-fettsyre syklusen [51].

Behandling av cellene med PPAR δ -agonisten GW501516 tenderte til redusert opptak og oksidasjon av glukose både før og etter treningsintervensjonen. Glukoseoksidasjonen før treningsintervensjonen ble signifikant redusert. Med statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") i SPSS ble en samlet GW501516-indusert reduksjon av glukoseopptaket observert. Det varierende konklusjoner på GW501516 sine effekter på glukosemetabolismen. Krämer *et al.* rapporterte om økt glukoseopptak etter behandling av humane myotuber med GW501516 [95]. Dimopoulos *et al.* observerte imidlertid ingen effekter på glukosemetabolismen i rottemyotuber etter behandling med GW501516 [96].

4.3 Oljesyremetabolisme og treningseffekter

Resultatene viste at treningsintervensjonen ikke ga noen signifikante forandringer i opptaket eller oksidasjonen av oljesyre. Ved tilsetning av glukose til det radioaktive oljesyremediet ble det en signifikant, glukoseindusert økning av oljesyreopptaket både før og etter treningsintervensjonen. Ved tilsetning av glukose til det radioaktivt merkede oljesyremediet viste resultatene at oljesyreoksidasjonen ble signifikant økt etter treningsintervensjonen. En mulig årsak til dette er at det skjer anaplerose av pyruvat til oksalacetat for at Krebs syklus skal holdes i gang [109].

Når dataene ble analysert med statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") ga treningsintervensjonen en signifikant økning i både opptaket og oksidasjonen av oljesyre. Studier *in vivo* har vist at trening av mild til moderat intensitet kan gi inntil 10 gangers økning av fettsyreoksidasjonen [57].

Resultatene viste at PPAR δ -agonisten GW501516 ga en signifikant økning av både opptak og oksidasjon av oljesyre, både før og etter treningsintervensjonen. Dette stemmer med den forventede effekten av aktivering av PPAR δ [92]. Treningsindusert økning av lipidoksidasjon er assosiert med økt ekspresjon av CD36/FAT og CPT1. Det er sannsynlig at intracellulær kalsiumfluks ($[Ca^{2+}]_i$) og "ATP-turnover", der sistnevnte fører til aktivering av AMPK, er de viktigste kontraksjonsmedierte signalkaskadene som bidrar til endringene i genekspresjon og også mitokondriell biogenese. Den AMPK-regulerte genekspresjonen øker imidlertid ikke ekspresjonen av alle mitokondrielle enzymer [16]. Som vist i resultatene fra qPCR-forsøkene

var det tendens til økt ekspresjon av CD36, og også av PPAR δ , etter treningsintervensjonen. Δ CD36-ekspresjon korrelerte også med både Δ oljesyreopptak og Δ oljesyreoksidasjon.

Tidligere studier har vist at ekspresjonen av PGC1 α øker etter trening. Økt ekspresjon av PGC1 α er tidligere blitt assosiert med økt fetttsyreoksidasjon [70]. Videre er det sett at ekspresjonen av PPAR δ i skjelettmuskel øker som følge av trening. Denne oppreguleringen er blitt assosiert med forbedringene i kliniske parametre som observeres hos mennesker med metabolske sykdommer etter treningsintervensjon [16]. Resultatene fra qPCR-forsøkene viste tendens til økt ekspresjon av både PGC1 α og PPAR δ etter treningsintervensjonen, selv om økningene ikke var signifikante.

4.4 Korrelasjonsvurderinger

4.4.1 Korrelasjon mellom ulike *in vitro*-data

Resultatene oppsummert i figur 3.12B viste at det var en signifikant positiv korrelasjon mellom ekspresjon av PDK4 og oljesyreopptak etter trening, det vil si jo større oljesyreopptak etter trening, jo høyere ekspresjon av PDK4. Det er kjent at økt ekspresjon av PDK4 hemmer pyruvatomdannelse til acetyl-CoA (ved hemming PDC), og dette fører til redusert oksidasjon av glukose og et skifte over til fetttsyreoksidasjon [34]. Fra qPCR-analysene ble det observert en økt ekspresjon av CD36 etter trening, noe som kan øke opptaket av fettsyrer i cellene. Fettsyrer er endogen aktivator av PPAR δ og dermed kan ekspresjonen av PDK4 og CD36 øke. Samspillet mellom PDK4, CD36 og PPAR δ , som illustrert i figur 1.3, er derfor en potensiell forklaring på korrelasjonen.

Resultatene viste også at det var en signifikant, positiv korrelasjon mellom forbedring i opptak og oksidasjon av oljesyre og økning i ekspresjonen av CD36 som følge av treningsintervensjonen. Dette stemmer overens med resultater fra tidligere studier [110-112]. CD36/FAT er en av hovedtransportørene for opptak av fettsyrer i skjelettmuskel. Under trening er det sett at CD36/FAT translokeres fra intracellulære lagringsvesikler til cellemembranen. Når flere CD36-transportører er tilgjengelige i cellemembranen kan dette mediere et økt oljesyreopptak, og når mer oljesyre er tilgjengelig kan også mer oksideres [57]. Resultatene fra qPCR-analysene viste en økt CD36-ekspresjon som følge av treningsintervensjonen, men denne var ikke signifikant.

I tillegg ble det funnet negative korrelasjoner mellom oljesyremetabolisme og ekspresjon av PLIN2. Korrelasjonene var kun signifikante i nærvær av PPAR δ -agonisten GW501516. PLIN2 er et PPAR δ -mediert gen og dette kan være en forklaring på hvorfor forbehandling med GW501516 førte til signifikans for korrelasjonen, ved at effektene da kom tydeligere frem. Jo høyere opptak og oksidasjon av oljesyre deltakerne hadde etter treningsintervensjonen (figur 3.14A og 3.14B) eller jo større forbedring de hadde i opptak og oksidasjon som følge av treningsintervensjonen (figur 3.14C og 3.14D), jo lavere ekspresjon eller forbedring i ekspresjon av PLIN2 hadde de. Knockdown av PLIN2-genet i mus er blant annet assosiert med redusert dannelse av lipiddråper og redusert lagring av TAG. Videre er det observert at ved overekspresjon av PLIN2 *in vitro* øker den intramyocellulære TAG-lagringen parallelt med økt insulinsensitivitet [9]. Ut fra dette er en mulig forklaring på figur 3.14B og 3.14D at når ekspresjonen av PLIN2 er høy prioriteres økt lagring av TAG og da trenger ikke så mye å gå til fettsyreoksidasjon. En annen forklaring er at PLIN2 er assosiert med innpakkingen av lipiddråpene, og når ekspresjonen av PLIN2 er lav vil derfor mindre av lipidene pakkes inn og dermed kan mer oksideres. Alle funksjonene til PLIN2 er foreløpig ikke kjent, og det er vanskelig å forklare den negative korrelasjonen til opptak av oljesyre på nåværende tidspunkt da det i utgangspunktet var forventet å vise en positiv korrelasjon ettersom korrelasjonene mot oksidasjon var inverse. Bosma *et al.* har sett resultater på at ekspresjonen av PLIN2 øker når den intramyocellulære lagringskapasiteten øker (ikke-publiserte data). Høy lagringskapasitet kan kanskje skyldes høyt opptak av lipider til skjelettmuskel, noe som kan være en forklaring på korrelasjonene som ses i figur 3.14 A og 3.14C. Flere forsøk er imidlertid nødvendig for å komme med sikrere forklaringer på sammenhengene som ses.

4.4.2 *In vivo-in vitro* korrelasjoner

Glukoseinfusjonshastighet og oljesyremetabolisme

Resultatene viste at det var en signifikant invers korrelasjon mellom forandring i glukoseinfusjonshastighet (GIR) *in vivo* og forandring i opptak og oksidasjon av oljesyre *in vitro*. Det vil si at jo mer deltakerne hadde forbedret insulinfølsomheten sin jo mindre økning hadde de i opptak og oksidasjon av oljesyre i muskelcellene som følge av treningsintervensjonen. Korrelasjonen var kun signifikant når cellene var blitt forbehandlet med PPAR δ -agonisten GW501516. En mulig årsak til korrelasjonen kan være at det har

skjedd et skifte mot glukosemetabolisme *in vivo*, som gjør at mindre fettsyrer tas opp og oksideres, og at denne effekten er blitt bevart *in vitro*. GW501516 er relatert til fettsyremetabolisme, så årsaken til at korrelasjonene kun er signifikante når GW501516 er til stede kan være at effektene på lipidmetabolismen kommer tydeligere fram da.

Beinpresskapasitet og glukoseopptak

Resultatene viste at det var en signifikant positiv korrelasjon mellom forbedring i beinpresskapasitet *in vivo* og forbedring i opptak av glukose *in vitro*, det vil si at jo større deltakernes forbedring i beinpresstesten var, jo større forbedring hadde de i opptaket av glukose. Korrelasjonen var kun signifikant når oljesyre var tilsatt det radioaktive glukosemediet. For fem av sju deltakere var glukoseopptaket i nærvær av oljesyre lavere etter trening enn før. En mulig forklaring på dette er at oljesyre, som beskrevet tidligere, har vist å redusere opptak av glukose i skjelettmuskel. Videre har styrkeøvelser i form av beinpress vist å øke insulinmediert glukoseopptak i skjelettmuskel hos type 2-diabetikere [113]. Effektene har dermed muligens blitt bevart *in vitro* i myotubene.

Fysiologiske parametre og genekspresjon i myotuber

Før treningsintervensjonen var det en positiv korrelasjon mellom økende S-insulin (målt under "clamp"-analysens siste 30 minutter) og økende CD36-ekspresjon i muskelcellene, altså jo høyere S-insulin, jo høyere ekspresjon av CD36. Dette stemmer med resultatene i studien til Handberg *et al.* [114]. Insulin er et av kroppens viktigste lagringshormoner, og CD36 er viktigste transportør som medierer opptak av fettsyrer i skjelettmuskel. Dette er derfor en mulig forklaring på korrelasjonen som vises.

Det ble også funnet en invers korrelasjon mellom Angptl4-ekspresjon i muskelcellene og kroppsvekt før treningsintervensjonen. Dette tilsier at jo høyere kroppsvekt, jo lavere Angptl4-ekspresjon. Høy kroppsvekt er gjerne assosiert med høyt fettinnhold i kroppen. Angptl4 induseres av faste [59] og høye triglyseridnivåer i blod [61], noe som er med på å forklare korrelasjonen.

Etter treningsintervensjonen ble det funnet en signifikant korrelasjon mellom Angptl4-ekspresjon i muskelcellene og fastende glukosenivå; jo høyere fastende glukosenivå, jo høyere ekspresjon av Angptl4. Xu *et al.* fant at overekspresjon av Angptl4 merkbart reduserte

glukosenivåene i blodet og forbedret glukosetoleransen [59]. Studiene til Xu *et al.* er imidlertid gjort på mus og ikke på mennesker.

Etter trening var det også seks signifikante korrelasjoner som involverte ekspresjon av PGC1 α . Ekspresjonen av PGC1 α i myotubene korrelerte positivt med vekt, KMI, skjelettmuskelmasse (SMM), "waist-to-hip" ratio (WHR), fettprosent og visceral fettmengde; jo høyere deltakernes vekt, KMI, SMM, WHR, fettprosent og visceral fettmengde var, jo høyere var ekspresjonen av PGC1 α . Dette er parametre som alle representerer grad av fedme, så det er rimelig at alle disse korrelerer samtidig med PGC1 α . Hvorfor PGC1 α er økt ved fedme er ikke klarlagt, men en mulig årsak er at ekspresjonen av PGC1 α er økt for å øke fettforbrenningskapasiteten i skjelettmuskel.

Det var også en korrelasjon mellom forandring i SMM og forandring i mRNA-nivå av PPAR δ , ved at jo mer deltakerne hadde redusert sin SMM som følge av treningsintervensjonen, jo større var ekspresjonen av PPAR δ som følge av treningen. Fem av sju deltakere hadde økt SMM som følge av treningsintervensjonen, og fire av disse hadde høyere ekspresjon av PPAR δ . PPAR δ er den PPAR med høyest ekspresjon i skjelettmuskel, og det er kjent at ekspresjonen av PPAR δ øker som følge av trening [115].

Den siste signifikante korrelasjonen viste en sammenheng mellom treningsinduserte endringer i S-insulin og CPT1A-ekspresjon i muskelcellene; med økende S-insulin som følge av treningsintervensjonen fulgte en økt CPT1A-ekspresjon. Trening har vist å redusere konsentrasjonen av malonyl-CoA, noe som igjen øker aktiviteten av CPT1A [53]. Hvilken rolle CPT1A spiller vedrørende regulering av S-insulin er ikke klarlagt.

Resultater av treningstestene og genekspresjon

Det var en positiv korrelasjon mellom $\Delta\text{VO}_2\text{max}$ og ΔCyc1 -ekspresjon, det vil si at jo mer deltakerne hadde økt sin VO_2max som følge av 12 ukers trening, jo mer hadde ekspresjonen av Cyc1 økt. Utholdenhetstrening øker skjelettmuskels aerobe metabolske kapasitet når utført på fast basis. En viktig årsak til dette er at mitokondrienes energigenererende systemer endres. Cyc1 er en viktig komponent i ETK [43]. Hickson *et al.* fant at konsentrasjonen av Cyc1 i *musculus plantaris* økte med økende treningsmengde i uken hos rotter [116].

Det var også positive korrelasjoner mellom resultatene fra alle tre styrketestene (brystpress, ”cable pull-down” og beinpress) og ekspresjonen av PGC1 α i myotubene etter treningsintervensjonen. I studier gjort på mus er det sett en sammenheng mellom ekspresjonen av PGC1 α og styrketrening [117]. Dette kan dermed være en mulig forklaring på effektene som ses i denne studien.

4.5 Veien videre

Dessverre er det ikke mulig å rekke å gjøre alle ønskelige forsøk. I denne masterperioden er det blitt prioritert å gjøre substratoksidasjonsforsøk og proteinmåling på alle donorene som var til rådighet, og i tillegg lipidfiltrasjon og qPCR på de samme donorene. Det er imidlertid ønskelig på et senere tidspunkt å kunne gjennomføre analyser av proteinekspresjon ved hjelp av Western blotting på de samme donorene for kanskje å få ytterligere forklaringer på effektene som ses. Det hadde også vært interessant å se på lipiddistribusjon for å kunne si mer om den spesifikke lipidakkumuleringen i myotubene endres etter trening. Videre er det ønskelig å studere mulige epigenetiske endringer i myotubene som følge av treningsintervensjonen. For å få et mer fullstendig bilde av fettsyreopptaket og total fettsyreoksidasjon i myotubene ville det være interessant å måle mengden syreløselige metabolitter (ASM) fra β -oksidasjonen.

Arbeidet i denne masteroppgaven er basert på resultater fra kun åtte deltakere, fire deltakere fra kontrollgruppen og fire deltakere fra ”pasientgruppen”. Imidlertid hadde en av deltakerne i kontrollgruppen svært avvikende oksidasjonsresultater i myotubene dyrket opp fra biopsien tatt før treningsintervensjonen. Det ble derfor besluttet å ekskludere denne donoren fra resultatene og fra videre forsøk så de samme deltakerne kunne følges gjennom alle undersøkelsene. Det er blitt gjennomført en ny runde i denne studien med 14 nye deltakere. Det er derfor ønskelig å kunne gjennomføre de samme forsøkene på myotubene fra biopsiene til disse deltakerne. Dermed vil antall n økes og det er kanskje mulig å få større validitet til eventuelle resultater som ses, og trekke sikrere konklusjoner.

5 Konklusjon

En kombinasjon av styrketrening og utholdenhetstrening av flere ukers varighet *in vivo* ga effekter på insulinfølsomhet, kroppsmasseindeks, utholdenhet og styrke. Studiene på muskelceller tyder på at disse effektene kan bevares *in vitro*, primært i form av effekter på fettsyremetabolismen; treningsintervensjonen ga økt opptak og oksidasjon av fettsyrer i myotubene. Forbedring av oljesyremetabolismen i myotubene viste invers korrelasjon med forbedring av insulinfølsomhet (GIR) som følge av treningsintervensjonen. Forbedring i glukoseopptak korrelerte positivt med forbedring i beinpresskapasitet etter treningsintervensjonen. Treningsintervensjonen førte til økt ekspresjon av noen viktige gener involvert i energimetabolisme i skjelettmuskel (CD36, PGC1 α , Cyc1 og PPAR δ).

Behandling med PPAR δ -agonisten GW501516 hadde hemmende effekt på glukosemetabolismen i myotubene og førte samtidig til en økning av oljesyremetabolismen i myotubene. GW501516-behandling førte til en økning i ekspresjonen av kjente målgener for PPAR δ . Det var ingen tilleggseffekt av GW501516 på oljesyremetabolismen som følge av treningsintervensjonen.

Referanser

1. World Health Organization. *BMI classification*. 2013 [cited 2013 5. March]; Available from: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html.
2. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2013 [cited 2013 11. March]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
3. World Health Organization. *WHO Global Infobase*. 2010 11.03.13 [cited 2013 14. March]; Available from: https://apps.who.int/infobase/Comparisons.aspx?l=&NodeVal=WGIE_BMI_5_cd.0704&DO=1&DDLReg=ALL&DDLSex=1&DDLAgeGrp=15-100&DDLYear=2010&DDLMethod=INTMDCTM&DDLCateNum=6&TxtBxCtmNum=20%2c35%2c50%2c65%2c80&CBLC1=ON&CBLC3=ON&CBLC4=ON&CBLC6=ON&CBLC8=ON&CBLC10=ON&DDLMapsize=800x480&DDLMapLabels=none&DDLTmpRangBK=0&DDLTmpColor=-3342388.
4. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. 2010: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.
5. International Diabetes Federation, *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*, 2006
6. James, P.T., *Obesity: the worldwide epidemic*. Clinics in dermatology, 2004. **22**(4): p. 276-280.
7. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nature medicine, 2006. **12**(1): p. 75-80.
8. Walker, R. and C. Whittlesea, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Fourth ed. 2007, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone Elsevier.
9. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-2690.
10. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. British Journal of Nutrition, 2004. **92**(03): p. 347-355.
11. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2005. **115**(5): p. 911.
12. Kalupahana, N.S., N. Moustaid-Moussa, and K.J. Claycombe, *Immunity as a link between obesity and insulin resistance*. Molecular aspects of medicine, 2012. **33**(1): p. 26-34.
13. Greenberg, A.S. and M.S. Obin, *Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism*. The American journal of clinical nutrition, 2006. **83**(2): p. 461S-465S.
14. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(12): p. 1821.
15. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1111-1119.
16. O'Gorman, D.J. and A. Krook, *Exercise and the Treatment of Diabetes and Obesity*. Endocrinology & Metabolism Clinics Of North America, 2008. **37**(4): p. 887-903.
17. Henriksen, E.J., *Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance*. Journal of Applied Physiology, 2002. **93**(2): p. 788-96.
18. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
19. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglige retningslinjer: Diabetes - Forebygging, diagnostikk og behandling*, 2009.

20. Stern, M.P., et al., *Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease?* Diabetes care, 2004. **27**(11): p. 2676-2681.
21. Norsk elektronisk legehåndbok. *Norsk elektronisk legehåndbok*. 25.02.2013 [cited 2013 3. April]; Available from: <http://legehandboka.no/>.
22. World Health Organization. *Diabetes Fact Sheet N°312*. 2012 [cited 2013 5. March]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
23. Alberti, K.G.M.M., P. Zimmet, and J. Shaw, *International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention*. Diabetic Medicine, 2007. **24**: p. 451-463.
24. World Health Organization Regional Office for Europe. *Diabetes* [cited 2013 5. March]; Available from: <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/diabetes>.
25. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Update 2012*. 2012 [cited 2013 11. March]; Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>.
26. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 1st ed. 2001, Oslo, Norway: Gyldendal Norsk Forlag.
27. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1961. **9**(2): p. 493-495.
28. Blau, H.M. and C. Webster, *Isolation and characterization of human muscle cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(9): p. 5623-5627.
29. Zammit, P.S., T.A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, *The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2006. **54**(11): p. 1177-1191.
30. Seale, P. and M.A. Rudnicki, *A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells*. Developmental biology, 2000. **218**(2): p. 115-124.
31. Al-Khalili, L., et al., *Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(5): p. 991-998.
32. Muoio, D.M., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor- α regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 901-909.
33. Berggren, J.R., C.J. Tanner, and J.A. Houmard, *Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism*. Exercise and sport sciences reviews, 2007. **35**(2): p. 56-61.
34. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacological Reviews, 2009. **61**(3): p. 373-93.
35. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(7): p. 1699.
36. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. Journal of lipid research, 2010. **51**(8): p. 2090-2104.
37. Kelley, D.E., et al., *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1999. **277**(6): p. E1130-E1141.
38. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 2nd ed. 2004, NY, USA: Garland Science.
39. Tremblay, F., M.-J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. Frontiers in Bioscience, 2003. **8**: p. d1072-d1084.
40. Houmard, J.A., et al., *Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1991. **261**(4): p. E437-E443.

41. Hughes, V.A., et al., *Exercise increases muscle GLUT-4 levels and insulin action in subjects with impaired glucose tolerance*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1993. **264**(6): p. E855-E862.
42. Kurth-Kraczek, E.J., et al., *5'AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle*. Diabetes, 1999. **48**(8): p. 1667-1671.
43. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. Journal of neurochemistry, 2002. **80**(5): p. 780-787.
44. Hawley, J.A., *Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2004. **20**(5): p. 383-393.
45. Goodyear, L.J., M.F. Hirshman, and E.S. Horton, *Exercise-induced translocation of skeletal muscle glucose transporters*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1991. **261**(6): p. E795-E799.
46. Trayhurn, P., C.A. Drevon, and J. Eckel, *Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle-adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk*. Archives of physiology and biochemistry, 2011. **117**(2): p. 47-56.
47. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiological reviews, 2008. **88**(4): p. 1379-1406.
48. Pedersen, B.K., et al., *Role of myokines in exercise and metabolism*. Journal of applied physiology, 2007. **103**(3): p. 1093-1098.
49. Pedersen, B., et al., *The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor?* Proceedings of the Nutrition Society, 2004. **63**(2): p. 263-268.
50. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-2697.
51. Randle, P., et al., *The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. The Lancet, 1963. **281**(7285): p. 785-789.
52. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-683.
53. Rasmussen, B.B. and R.R. Wolfe, *Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle*. Annual review of nutrition, 1999. **19**(1): p. 463-484.
54. Kiens, B., *Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance*. Physiological reviews, 2006. **86**(1): p. 205-243.
55. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. **1486**(1): p. 1-17.
56. Wolfe, R.R., et al., *Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1990. **258**(2): p. E382-E389.
57. Turcotte, L.P. and J.S. Fisher, *Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise*. Physical Therapy, 2008. **88**(11): p. 1279-96.
58. Miyoshi, H., et al., *Hormonal control of substrate cycling in humans*. Journal of Clinical Investigation, 1988. **81**(5): p. 1545.
59. Xu, A., et al., *Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(17): p. 6086-6091.
60. Robciuc, M.R., et al., *Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46212.

61. Köster, A., et al., *Transgenic angiopoietin-like (angptl) 4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism*. *Endocrinology*, 2005. **146**(11): p. 4943-4950.
62. Wang, Y.-X., et al., *Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR δ* . *PLoS biology*, 2004. **2**(10): p. e294.
63. Mrad, J.A., et al., *Skeletal muscle composition in dietary obesity-susceptible and dietary obesity-resistant rats*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1992. **262**(4): p. R684-R688.
64. Hickey, M., et al., *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 1995. **268**(3): p. E453-E457.
65. Tanner, C.J., et al., *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002. **282**(6): p. E1191-E1196.
66. Lillioja, S., et al., *Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man*. *Journal of Clinical Investigation*, 1987. **80**(2): p. 415.
67. Berchtold, M.W., H. Brinkmeier, and M. Müntener, *Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease*. *Physiological reviews*, 2000. **80**(3): p. 1215-1265.
68. Ruas, J.L., et al., *A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy*. *Cell*, 2012. **151**(6): p. 1319-1331.
69. Short, K.R., et al., *Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity*. *Diabetes*, 2003. **52**(8): p. 1888-1896.
70. Arany, Z., *PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease*. *Current opinion in genetics & development*, 2008. **18**(5): p. 426-434.
71. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. *Journal of Clinical Investigation*, 2005. **115**(7): p. 1934.
72. Wagner, K.D. and N. Wagner, *Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010. **125**(3): p. 423-35.
73. Reilly, S.M. and C.-H. Lee, *PPAR δ as a therapeutic target in metabolic disease*. *FEBS letters*, 2008. **582**(1): p. 26-31.
74. Tanaka, T., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2003. **100**(26): p. 15924-9.
75. Xu, H.E., et al., *Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors*. *Molecular cell*, 1999. **3**(3): p. 397-403.
76. Burri, L., G.H. Thoresen, and R.K. Berge, *The role of PPAR α activation in liver and muscle*. *PPAR research*, 2010. **2010**.
77. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease*. *Nature*, 2000. **405**(6785): p. 421-424.
78. Yessoufou, A. and W. Wahli, *Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels*. *Swiss Medical Weekly*, 2010. **140**: p. w13071.
79. Keller, H., et al., *Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1993. **90**(6): p. 2160-4.

80. Kersten, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting*. The Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(11): p. 1489-98.
81. Feige, J.N., et al., *From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions*. Progress in Lipid Research, 2006. **45**(2): p. 120-59.
82. Rosen, E.D., et al., *PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro*. Molecular Cell, 1999. **4**(4): p. 611-7.
83. Semple, R.K., V.K.K. Chatterjee, and S. O Rahilly, *PPARgamma and human metabolic disease*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(3): p. 581.
84. Oliver, W.R., Jr., et al., *A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2001. **98**(9): p. 5306-11.
85. Wang, Y.X., et al., *Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity*. Cell, 2003. **113**(2): p. 159-70.
86. Lee, C.H., et al., *PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2006. **103**(9): p. 3444-9.
87. Heiberg, A. *Epigenetikk*. Store norske leksikon 2009 [cited 2013 19. March]; Available from: http://snl.no/.sml_artikkel/epigenetikk.
88. Ling, C. and L. Groop, *Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2718-2725.
89. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs*. Pediatric research, 2007. **61**(5, Part 2): p. 24R.
90. Nitert, M.D., et al., *Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3322-3332.
91. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693.
92. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. Journal of Lipid Research, 2007. **48**(4): p. 961-7.
93. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
94. Agilent Technologies, *Agilent Total RNA Isolation Mini Kit Protocol*, 2005.
95. Krämer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ* . Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1157-1163.
96. Dimopoulos, N., et al., *The PPAR δ agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. Federation of European Biochemical Societies FEBS letters, 2007. **581**(24): p. 4743-4748.
97. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Scandinavian Physiological Society, 2005. **183**(1): p. 31-41.
98. Egan, B. and J.R. Zierath, *Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation*. Cell metabolism, 2013. **17**(2): p. 162-184.
99. Yasin, R., et al., *A quantitative technique for growing human adult skeletal muscle in culture starting from mononucleated cells*. Journal of the neurological sciences, 1977. **32**(3): p. 347-360.

100. Bonavaud, S., et al., *Preparation of isolated human muscle fibers: a technical report*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2002. **38**(2): p. 66-72.
101. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia*, 2001. **109**(11): p. 735-744.
102. Henry, R.R., et al., *Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects: comparison using human skeletal muscle cell cultures*. *Diabetes*, 1995. **44**(8): p. 936-946.
103. Jacobs, A.E., A. Oosterhof, and J.H. Veerkamp, *Palmitate oxidation and some enzymes of energy metabolism in human muscles and cultured muscle cells*. *International Journal of Biochemistry*, 1987. **19**(11): p. 1049-1054.
104. Thompson, D.B., R. Pratley, and V. Ossowski, *Human primary myoblast cell cultures from non-diabetic insulin resistant subjects retain defects in insulin action*. *Journal of Clinical Investigation*, 1996. **98**(10): p. 2346.
105. Gaster, M., et al., *The Diabetic Phenotype Is Conserved in Myotubes Established From Diabetic Subjects Evidence for Primary Defects in Glucose Transport and Glycogen Synthase Activity*. *Diabetes*, 2002. **51**(4): p. 921-927.
106. Barres, R., et al., *Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle*. *Cell metabolism*, 2012. **15**(3): p. 405-411.
107. Sousa-Victor, P., P. Muñoz-Cánoves, and E. Perdiguero, *Regulation of skeletal muscle stem cells through epigenetic mechanisms*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011. **21**(4): p. 334-342.
108. Bharathy, N., B.M. Ling, and R. Taneja, *Epigenetic regulation of skeletal muscle development and differentiation*. *Subcellular Biochemistry*, 2012. **61**: p. 139-50.
109. Owen, O.E., S.C. Kalhan, and R.W. Hanson, *The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(34): p. 30409-30412.
110. Ibrahim, A., et al., *Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(38): p. 26761-26766.
111. Holloway, G.P., et al., *Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise*. *The Journal of Physiology*, 2006. **571**(1): p. 201-210.
112. Tunstall, R.J., et al., *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle*. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2002. **283**(1): p. E66-E72.
113. Holten, M.K., et al., *Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2004. **53**(2): p. 294-305.
114. Handberg, A., et al., *Identification of the Oxidized Low-Density Lipoprotein Scavenger Receptor CD36 in Plasma A Novel Marker of Insulin Resistance*. *Circulation*, 2006. **114**(11): p. 1169-1176.
115. Luquet, S., et al., *Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2005. **1740**(2): p. 313-317.
116. Hickson, R.C., *Skeletal muscle cytochrome c and myoglobin, endurance, and frequency of training*. *Journal of Applied Physiology*, 1981. **51**(3): p. 746-749.

117. Sayer, A.A., et al., *Grip strength and the metabolic syndrome: findings from the Hertfordshire Cohort Study*. Oxford Journals of Medicine QJM, 2007. **100**(11): p. 707-713.

Appendiks

1. Medier til celledyrking

1.1

Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 g glukose

50 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml

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

1.2

Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 glukose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

10 ml Ultrosor G

2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml

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

1.3

Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 g glukose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml

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

25 pmol insulin

1.4

SkGM – dyrkingsmedium

500 ml SkBM medium fra Lonza

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone[®] (250 µg/ml Amfotericin)

5,0 ml L-Glutamin

SkGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (5,0 ml Fetuinb, 5,0 ml BSA, 0,5 ml Dexamethasone, 0,5 ml GA-1000, 0,5 ml hEGF)

1.5

Frysemedium (per fryserør)

0,53 ml SkGM

0,33 ml FCS/FBS

133,3 µl 20 % DMSO

Lages umiddelbart før bruk og holdes avkjølt.

2. Medier til substratoksidasjonsmetoden

2.1

Radioaktiv glukose, ingen fettsyre

200 µM [¹⁴C(U)]glukose (0,58 µCi/ml)

8 µl L-karnitin

ad. 8 ml DPBS m/HEPES pH 7,3

2.2

Radioaktiv glukose, 100 μ M fettsyre

3,2 ml av medium 2.1

53,28 μ l OA

2.3

Radioaktiv fettsyre, ingen glukose

100 μ M [14 C]OA (0,5 μ Ci/ml)

121,28 μ l OA

24 μ l BSA

8 μ l L-karnitin

ad. 8 ml DPBS m/ HEPES pH 7,3

2.4

Radioaktiv fettsyre, 200 μ M glukose

3,2 ml av medium 2.3

6,4 μ l glukose

3. Reaksjonsblanding for cDNA-syntetisering

Reaksjonsblanding (per prøve)

13,2 µl DEPC-dH₂O + prøve

2,0 µl 10 x TaqMan RT Buffer

0,8 µl 25 x 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: 20 µl per rør.

4. Løsninger til qPCR

4.1

Standarder

- cDNA-mix: 2 µl av hver prøve (28 prøver; gir totalvolum på 56 µl)
- Standard 1000: 36 µl cDNA-mix
144 µl dH₂O
- Standard 500: 90 µl standard 1000
90 µl dH₂O
- Standard 250: 90 µl standard 500
90 µl dH₂O
- Standard 125: 90 µl standard 250
90 µl dH₂O

4.2

Fortynning av primere

Stock har konsentrasjon på 300 μM . Primer til qPCR skal ha konsentrasjon 30 μM .

10 μl primer

90 μl dH₂O

4.3

Fortynning 1:5 av cDNA-prøver

- Alle kontroller (DMSO): 2,5 μl x 2 paralleller x 12 gener = 60 μl . Lager 65 μl for å ha overskudd.

13 μl prøve

52 μl dH₂O

- Alle GW501516-behandlede prøver: 2,5 μl x 2 paralleller x 6 gener = 30 μl . For å ha overskudd lages 35 μl .

7 μl prøve

28 μl dH₂O

4.4

SYBR Green PCR-mix (per prøve)

12,5 μl SYBR Green Master Mix

0,25 μl Forward primer (se tabell 2.4)

0,25 μl Reverse primer (se tabell 2.4)

9,5 μl nukleasefritt vann

Totalt: 22,5 μl per prøve

5. Inklusjons- og eksklusjonskriterier for deltakelse i treningsintervensjonsstudien

Inklusjonskriterier

Menn i alderen 40 til 58 år med nordisk etnisitet. Videre måtte de ved undersøkelser komme i én av to mulige grupper:

- Gruppen med redusert glukosemetabolisme: KMI 27-32 kg/m² og unormal glukosemetabolisme, definert som
 - Økt fastende glukose (OGTT \geq 5,6 mmol/l)
 - Redusert glukosetoleranse (2 timers OGTT \geq 7,8 mmol/l)
 - T2D (ikke-medisinert, HbA1c \leq 7,5 %)
- Kontrollgruppen: KMI 19-25 kg/m², normal glukosemetabolisme og ingen førstegradsslektning med T2D

Eksklusjonskriterier

- Type 1-diabetiker eller medisinert type 2-diabetiker
- Systolisk blodtrykk \geq 160 mmHg eller diastolisk blodtrykk \geq 90 mmHg
- Alvorlig blod- eller nyresykdom eller kronisk hemmet nyrefunksjon (GFR < 50 ml/min)
- Alvorlig leversykdom eller ALAT > 3 ganger øvre normale grense
- Kronisk inflammatorisk sykdom i aktiv fase eller langvarig bruk av kortikosteroider de siste 3 måneder
- Bruk av antidiabetika, lipidsenkende legemidler, antihypertensiva, acetylsalisylsyre eller andre legemidler som studiens ansvarlige lege ikke fant passende
- Mental lidelse (psykiatrisk eller organisk cerebral sykdom), legemiddel- eller alkoholmisbruk som gjør personen ute av stand til å forstå naturen, omfanget og mulige konsekvenser av studien

- KMI utenfor inklusjonskriteriene
- Røyker
- Medisinsk eller annen lidelse som etter forskerens vurdering kunne bringe deltakerens sikkerhet i fare eller studien i fare under evaluering av intervensjonen for effektivitet og sikkerhet
- Trener jevnlig (mer enn 1 gang i uken)