

Effekt av trening *in vivo* på fettsyremetabolisme og  
insulinfølsomhet i dyrkede humane myotuber *in vitro*

Masteroppgave for graden Master i farmasi



**Mari Gilde Brubak**

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014



# Effekt av trening *in vivo* på fettsyremetabolisme og insulinfølsomhet i dyrkede humane myotuber *in vitro*

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Mari Gilde Brubak**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Veiledere:

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Stipendiat Jenny Lund



© Mari Gilde Brubak

2014

Effekt av trening *in vivo* på fettsyremetabolisme og insulinfølsomhet i dyrkede humane myotuber *in vitro*

Mari Gilde Brubak

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo



# Forord

Denne oppgaven ble utført på Seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2013 til mai 2014. Oppgaven ble utført i lokalene i Gydas vei 8. Deler av resultatene ble fremført på Farmakologisk vintermøte på Beitostølen, i januar 2014.

Jeg ønsker å rette en spesielt stor takk til veilederen min professor G. Hege Thoresen for veldig god hjelp og hjelpsomme tilbakemeldinger under hele masteroppgaven. Det har vært veldig hyggelig og jobbe sammen med deg. Jeg vil også takke veileder professor Arild C. Rustan for god hjelp gjennom hele masteroppgaven. Jeg vil spesielt rette en stor takk til stipendiat Jenny Lund for å ha kommet med gode råd og hjulpet meg med alt jeg måtte lure på. Jeg vil også takke Camilla Stensrud for god veiledning på laben og svar på alle spørsmål. Stor takk til alle i ”muskelbunten” for et faglig godt miljø og lærerike møter. Takk til kull 2014, for 5 flotte år, som jeg aldri ville ha vært foruten. Her har jeg fått venner for livet. En stor takk vil også rettes til alle de ansatte i Gydas vei 8 for hyggelige lunsjer og et inkluderende fellesskap. Takk til alle dere på masterkontoret, dette har vært det beste året under hele farmasistudiet. Vi greide det !!

En stor takk til mamma og pappa som har støttet meg gjennom hele min skolegang, og har gjort det mulig for meg å satse både på utdanning og friidrett. Sist men ikke minst, en stor takk til min kjære Henrik for at du har støttet meg under hele studiet.

Blindern, mai 2014

Mari Gilde Brubak

# Abstract

**Background:** 347 million people over the world have diabetes, and most of them have diabetes type 2. Physical activity is important in order to prevent and treat diabetes. In this study the fatty acid metabolism and insulin sensitivity were examined in cultured skeletal muscle cells from subjects with normal and impaired glucose metabolism, before and after a period of 12 weeks of extensive strength and endurance training.

**Methods:** Skeletal muscle cells were isolated from *musculus vastus lateralis* of male volunteers. Biopsies were taken before and after an extensive training period consisting of two sessions of endurance training and two sessions of strength training per week. The training period lasted for 12 weeks. Both subjects with normal and impaired glucose metabolism were included in this study. The skeletal muscle cells were cultured and differentiated into multinucleated myotubes. Fatty acid metabolism was studied using radiolabeled [1-<sup>14</sup>C]oleic acid and a substrate oxidation assay. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) agonist GW501516 was added to some of the myotubes four days before measurements of [1-<sup>14</sup>C]oleic acid metabolism. Carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) was added to some of the myotubes the day of the experiment. Expression of genes involved in energy metabolism was investigated with quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Expression of proteins was investigated with Western blotting.

**Results:** Results from studies on human myotubes indicated that an extensive training period of 12 weeks affected fatty acid metabolism and insulin sensitivity in the myotubes. In the group with normal glucose metabolism, but not in the group with impaired glucose metabolism, oleic acid oxidation was increased after training. Oleic acid oxidation was also increased when glucose was added in the group with normal glucose metabolism. No effect of training on metabolic flexibility was observed. GW501516 and FCCP increased the oleic acid oxidation in the myotubes. Insulin increased the phosphorylation of Akt and reduced the phosphorylation of glycogen synthase, before and after the training period, possibly with increased insulin-induced effects after the training period. The mRNA expression of cytokrome c-1 (Cyc1) and “cluster of differentiation 36” (CD36) tended to increase after the training period.



**Conclusion:** Exercise *in vivo* appeared to exert effects on fatty acid metabolism and insulin sensitivity in skeletal muscle cells after 12 weeks of training, and thus some of the effects of training *in vivo* seem to be conserved in human myotubes *in vitro*. However, more data are needed to be able to draw final conclusions.

# Sammendrag

**Bakgrunn:** 347 millioner mennesker i verden har diabetes, og de fleste av disse har diabetes type-2. Fysisk aktivitet er viktig, både for å forebygge og for å behandle diabetes. I denne studien er fetttsyremetabolismen og insulinfølsomheten undersøkt i dyrkede skjelettmuskelceller fra individer med normal eller redusert glukosemetabolisme, før og etter 12 uker med både utholdenhets- og styrketrening.

**Metode:** Skjelettmuskelceller ble isolert fra *musculus vastus lateralis* fra frivillige menn. Biopsiene ble tatt før og etter en treningsintervensjon, bestående av 2 økter med utholdenhets trening og 2 økter med styrketrening i uka. Treningsintervensjonen varte i 12 uker. I denne studien ble både individer med normal og redusert glukosetoleranse inkludert. Skjelettmuskelcellene ble dyrket opp og differensiert til flerkjernede myotuber. Fetttsyremetabolismen ble undersøkt ved å bruke radioaktiv [1-<sup>14</sup>C]oljesyre og substratoksidasjonsforsøk. Peroksisomproliferator-aktivert reseptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ )-agonisten GW501516 ble tilsatt noen av myotubene fire dager før målingene av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre-metabolisme. Carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon (FCCP) ble tilsatt noen av myotubene på forsøksdagen. Ekspresjonen av gener involvert i energimetabolismen ble undersøkt ved å bruke kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR). Uttrykk av proteiner ble undersøkt ved å bruke westernblott.

**Resultater:** Resultater fra studier i dyrkede humane myotuber viser at en treningsintervensjon på 12 uker påvirket oljesyreoksidasjonen og insulinfølsomheten i myotubene. I gruppa med normal glukosemetabolisme, men ikke i gruppa med redusert glukosemetabolisme, ble det observert en økt oljesyreoksidasjon etter treningsintervensjonen. Det ble også observert en økt oljesyreoksidasjon når glukose ble tilsatt, i gruppa med normal glukosemetabolisme. Det ble ikke observert noen målbar effekt av trening på metabolsk fleksibilitet. GW501516 og FCCP økte oljesyreoksidasjonen i de dyrkede myotubene. Insulin førte til en økt fosforylering av Akt og en redusert fosforylering av glykogen syntase, både før og etter treningsintervensjonen, med mulig økte insulin-induserte effekter etter treningsintervensjonen. Det ble også observert en tendens til en økt mRNA-ekspresjon av cytokrom c-1 (Cyc1) og "cluster of differentiation 36" (CD36) etter treningsintervensjonen.

**Konklusjon:** Det ser ut som om trening *in vivo* har en effekt på fettsyremetabolismen og insulinfølsomheten i skjelettmuskelceller etter 12 uker med trening, og det ser ut som om noen av effektene av trening *in vivo* blir bevart i de dyrkede humane myotubene *in vitro*. Mer data trengs for å trekke noen endelige konklusjoner.

# Forkortelser

36B4	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ADP	Adenosindifosfat
AMP	Adenosinmonofosfat
AMPK	AMP-kinase
Angptl4	Angiopoietinlignende protein 4
ATP	Adenosin-5' - trifosfat
bFGF	”Basic fibroblast growth factor”
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert radioaktivitet
CaMK	Calmodulinavhengig proteinkinase
cDNA	Komplementær deoksyribonukleinsyre
CPT-1	Karnitin-palmitoyltransferase 1
CoA	Koenzym A
Cyc	Cytokrom c
ECM	Ekstracellulær matriks
EGF	”Epidermal growth factor”
DMEM	”Dulbecco’ Modified Eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DNMT	DNA-metyltransferaser
DPBS	”Dulbecco’s” fosfatbufret saltvann
DPP-4	Dipeptidylpeptidase 4
FADH <sub>2</sub>	Flavin –adenin-dinukleotid (FAD <sup>+</sup> ) i redusert form
FAT/CD36	”Fatty acid translocase/cluster of differentiation 36”
FATP	”Fatty acid transport protein”
FABP <sub>pm</sub>	”Plasma membrane-associated fatty acid-binding protein”
FABP <sub>c</sub>	”Cytoplasmic fatty acid-binding protein, heart-type”
FBS	Føtalt bovint serum
FCCP	”Carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone”
FCS	Føtalt kalveserum

GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
GIP	Glukoseavhengig insulinotrop polyptid
GIR	Glukoseinfusjonshastighet
GLP-1	Glukagonlignende peptid 1
Glu	Glukose
GLUT	Glukosetransportør
GSK3	Glykogen syntase kinase-3
HAT	Histon acetyl-transferase
HbA <sub>1c</sub>	Glykosylert hemoglobin A1c
HDAC	Histon deacetyl-transferase
HDL	”High-density” lipoprotein
HEPES	”4-(2 hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid”
HF <sub>max</sub>	Maksimal hjertefrekvens
HRP	”Horseradish-peroxidase”
IDF	”The new International Diabetes Federation”
IGT	Svekket glukosetoleranse
IL	Interleukin
IMCL	Intramyocellulære lipider
IRS	Insulinreseptorsubstrat
KMI	Kroppsmasseindeks
LDL	”Low-density” lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
MCD	Malonyl-CoA dekarboksylase
MEF2	”Myocyt enhancer factor 2”
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD <sup>+</sup> ) i redusert form
NCEP ATP III	”National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III”
NIH	Norges idrettshøyskole
NPH-insulin	”Neutral protamine Hagedorn” insulin
OA	Oljesyre
PBS	Fosfatbufret saltvann
PBS-T	Fosfatbufret saltvann med Tween-20
PDC	Pyruvat dehydrogenasekompleks
PKD	Pyruvat dehydrogenasekinase og 3-fosfoinositid-avhengige kinaser
PGC1	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor $\gamma$ koaktivator-1

PI3-kinase	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat
PKB	Proteinkinase B, kalles også Akt
PKC	Proteinkinase C
PLIN	Perlipo
PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
PPRE	Peroksisomproliferator-resonselement
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RNA	Ribonukleinsyre
RXR	Retinoid-X-reseptor
SDS	Natriumdodekylsulfat
Ser	Serin
SGLT	Natrium-avhengig glukosetransportør
TAG	Triacylglyserol
TNF- $\alpha$	Tumornekrose faktor $\alpha$
Thr	Threonin
TLR	Toll-like reseptor
VO <sub>2</sub> max	Maksimalt oksygenopptak
WHO	Verdens helseorganisasjon

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Sammendrag.....</b>	<b>X</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>XII</b>
<b>Innholdsfortegnelse .....</b>	<b>XV</b>
<b>1 Innledning .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Diabetes type-2 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Behandling av diabetes type-2.....	2
<b>1.2 Fedme .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Metabolsk syndrom .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Insulinresistens.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Oppbygging av skjelettmuskel.....</b>	<b>8</b>
1.5.1 Muskelfibre.....	9
<b>1.6 Fettsyremetabolismen.....</b>	<b>9</b>
<b>1.7 Glukosemetabolismen.....</b>	<b>12</b>
<b>1.8 Peroxisomproliferator-aktivererte reseptorer .....</b>	<b>13</b>
<b>1.9 Effekter av trening.....</b>	<b>14</b>
1.9.1 Trening som behandling av metabolske sykdommer .....	14
1.9.2 Effekter av trening på fettsyremetabolismen.....	15
1.9.3 Effekter av trening på glukosemetabolismen .....	17
1.9.4 Effekt av trening på muskelfibersammensetning .....	17
1.9.5 Effekter av trening på immunsystemet.....	18
<b>1.10 Metabolsk ”switching” i skjelettmuskel .....</b>	<b>18</b>
<b>1.11 Epigenetikk.....</b>	<b>19</b>
1.11.1 Histonmodifisering .....	19
1.11.2 DNA-metylering.....	20
1.11.3 MicroRNA .....	21
<b>1.12 Angiopoietinlignende protein 4.....</b>	<b>21</b>
<b>1.13 Mål for oppgaven .....</b>	<b>22</b>
<b>2 Materialer og metode.....</b>	<b>23</b>

<b>2.1 Materialer .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Kjemikalier og reagenser.....	23
2.1.2 Utstyr .....	25
<b>2.2 Donorkarakteristika .....</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Treningsintervensjonen.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Styrketrening .....	28
2.3.2 Utholdenhetstrening .....	30
<b>2.4 Celledyrking .....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Utsåing.....	31
2.4.2 Proliferasjon .....	32
2.4.3 Differensiering.....	32
<b>2.5 Substratoksidasjonsforsøk .....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Substratoksidasjonsforsøket .....	34
2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet.....	36
2.5.3 Lipidfiltrering .....	36
<b>2.6 Bradfords metode for proteinmåling .....</b>	<b>37</b>
<b>2.7 Test av ulike coatinger.....</b>	<b>37</b>
<b>2.8 Test av ulike proliferasjonsmedier .....</b>	<b>38</b>
<b>2.9 Westernblotting.....</b>	<b>39</b>
2.9.1 Utsåing til westernblot.....	39
2.9.2 Høsting av celler.....	40
2.9.3 Elektroforese.....	40
2.9.4 Blotting.....	41
2.9.5 Blokking og påsetting av antistoff.....	41
2.9.6 Fremkalling.....	42
2.9.7 Stripping .....	42
<b>2.10 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon.....</b>	<b>43</b>
2.10.1 Utsåing av celler til qPCR .....	43
2.10.2 Høsting av celler til qPCR.....	43
2.10.3 RNA-isolering .....	43
2.10.4 Kvantifisering av RNA-konsentrasjon i prøven.....	44
2.10.5 cDNA-syntetisering.....	44
2.10.6 qPCR.....	44
<b>2.11 Statistikk.....</b>	<b>46</b>
<b>3 Resultater .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Test av ulike coatinger.....</b>	<b>47</b>



<b>3.2 Test av ulike proliferasjonsmedier .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Substratoksidasjonsforsøk .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Effekt av trening <i>in vivo</i> på oljesyremetabolismen <i>in vitro</i> når oljesyre tilsettes akutt.....	51
3.3.2 Effekt av trening <i>in vivo</i> på oljesyremetabolismen <i>in vitro</i> når oljesyre, glukose og FCCP tilsettes akutt.....	52
3.3.3 Effekt av trening <i>in vivo</i> på oljesyremetabolismen <i>in vitro</i> ved formerking med oljesyre .	54
3.3.4 Effekt av trening <i>in vivo</i> på total oljesyremetabolisme <i>in vitro</i> .....	56
3.3.5 Effekt av trening <i>in vivo</i> på metabolsk fleksibilitet.....	57
<b>3.4 Effekt av trening og insulin på fosforylering av ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Effekt av trening og insulin på fosforylering av Akt.....	58
3.4.2 Effekt av trening og insulin på fosforylering av glykogen syntase .....	59
<b>3.5 Effekt av trening på ulike gener som er viktige i fettsyre- og glukosemetabolismen .....</b>	<b>61</b>
<b>3.6 <i>In vivo-in vitro</i>-korrelasjonsanalyser.....</b>	<b>62</b>
<b>4. Diskusjon.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Vurdering av treningsintervensjonsstudien .....</b>	<b>65</b>
<b>4.2 Vurdering av metodene brukt i denne oppgaven .....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Celledyrking .....	65
4.2.2 Substratoksidasjonsforsøkene, qPCR og westernblotting .....	67
<b>4.3 Statistikk.....</b>	<b>67</b>
<b>4.4 Effekten av trening på oljesyremetabolismen .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5 Effekten av trening på metabolsk fleksibilitet .....</b>	<b>69</b>
<b>4.6 Effekten av trening og insulin på fosforylering av proteiner.....</b>	<b>70</b>
4.6.1 Effekten av trening og insulin på fosforylering av Akt.....	70
4.6.2 Effekten av trening og insulin på fosforylering av glykogen syntase .....	71
<b>4.7 Effekten av trening på uttrykket av gener .....</b>	<b>72</b>
<b>4.8 Vurdering av korrelasjonsanalyser.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9 Veien videre .....</b>	<b>73</b>
<b>5 Konklusjon.....</b>	<b>74</b>
<b>Litteraturliste .....</b>	<b>75</b>
<b>Appendiks .....</b>	<b>81</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Diabetes type-2

Det er estimert at 347 millioner mennesker i verden har diabetes, og at 90 % av disse har diabetes type-2 [1]. Diabetes type-1 gir en destruksjon av  $\beta$ -cellene som finnes i pankreas, og det er disse cellene som produserer insulin. Diabetes type-1 har et raskere utbrudd av symptomer, og pasientene må ha tilførsel av insulin. Sykdommen debuterer som oftest i ung alder. Blant eldre er diabetes type-2 mer utbredt, selv om sykdommen stadig sees hos yngre mennesker. Det er insulinmangel og/eller insulinresistens som forårsaker sykdommen [2]. Sykdommen kan også skyldes at insulinproduksjonen i kroppen ikke er tilstrekkelig. Det finnes også en type diabetes som heter svangerskapsdiabetes [3]. De diagnostiske grensene for diabetes mellitus er  $HbA_{1c} \geq 6,5 \%$ , fastende P-glukose  $\geq 7,0$  mmol/l og/eller  $\geq 11,1$  mmol/l 2 timer etter inntak av 75 gram glukose, og/eller tilfeldig P-glukose i kombinasjon med symptomer  $\geq 11,1$  mmol/l [4]. Forholdet mellom konsentrasjonen av glykert hemoglobin og hemoglobin i fullblod defineres som  $HbA_{1c}$ , og økt mengde glukose i blodet gir en høyere grad av glykering. I 2012 ble det anbefalt av Helsedirektoratet at  $HbA_{1c}$  i fullblod kunne brukes til diagnostikk av diabetes, og grenseverdien ble satt til  $\geq 6,5 \%$  [5]. Det er vist en sammenheng mellom nivåene for  $HbA_{1c}$  og gjennomsnittlig glukosekonsentrasjon i plasma [6]. Det finnes både fordeler og ulemper ved å bruke  $HbA_{1c}$  til diagnostikk. At prøven kan tas når som helst på døgnet og at testen ikke påvirkes like mye av diett, sykdom og trening er alle fordeler med å bruke  $HbA_{1c}$  til diagnostikk. Prøven kan også stå lenge før den analyseres. Ulemper med å bruke  $HbA_{1c}$  til diagnostikk kan være at det er en dyr analyse og at den kun gir et indirekte mål på glukosekonsentrasjonen i blodet. Ulike faktorer kan også innvirke på resultatet av testen, og det er stor variasjon i  $HbA_{1c}$  mellom individer [5].

Det er en genetisk predisposisjon for å utvikle diabetes type-2 [2], og forekomsten av diabetes type-2 er høyere hos individer som har en familiehistorie med sykdommen [7]. Det er en klar sammenheng mellom diabetes type-2 og fedme, spesielt intraabdominal fedme [2]. Etnisitet har også en innvirkning på utviklingen av diabetes type-2. I en studie utført av Shai et al. observerte de at risikoen for å utvikle diabetes type-2 er høyere hos kvinner med asiatisk, latino-amerikansk, og afrikansk bakgrunn, enn hos hvite, før og etter at det ble korrigert for kroppsmasseindeks (KMI) [8]. En lavere risiko for å utvikle diabetes er

forbundet med flere faktorer. Disse faktorene er: fysisk aktivitet, optimal kroppsvekt, moderat alkoholinntak, riktig kosthold og å unngå røyking [9].

Diabetes type-2 gir hyperglykemi, men har ofte få andre symptomer [2]. Det skilles mellom akutte komplikasjoner og senkomplikasjoner av diabetes. En akutt komplikasjon som forekommer hyppig hos eldre pasienter (vanligst over 70 år) med diabetes type-2 er hyperglykemi (blodglukose  $> 30$  mmol/l). Hypoglykemi kan oppstå hos pasienter som behandles med insulin eller noen orale antidiabetika. Alvorlig hypoglykemi defineres som en blodglukose på  $\leq 3,9$  mmol/l. Diabetiske senkomplikasjoner kan for eksempel være nefropati, nevropati, retinopati, aterosklerotiske hjerte- og karsykdommer og diabetiske fotsår [10]. Hyperglykemi kan gi gode vekstforhold for bakterier og dårligere funksjon av fagocytter, og dette kan gi tilbakevendende infeksjoner. Senkomplikasjoner kan deles inn i makrovaskulære og mikrovaskulære komplikasjoner. Diabetikere har to til fire ganger så høy risiko for å utvikle kardiovaskulær hjertesykdom. Dette er makrovaskulære komplikasjoner, da det forekommer skade på store blodårer. Mikrovaskulære komplikasjoner, slik som for eksempel retinopati, nefropati og nevropati, oppstår som følge av skade på små blodårer [2].

### **1.1.1 Behandling av diabetes type-2**

Veiledning om riktig kosthold, fysisk aktivitet, røykeslutt og vekttap er sentralt i behandlingen av diabetes. Er det nødvendig kan også legemidler benyttes. Det finnes flere typer legemidler mot diabetes type-2. Sentralt i den orale legemiddelbehandlingen av diabetes type-2 er metformin. Metformin er et biguanid, som virker ved å redusere leverens produksjon av glukose og ved å øke opptaket av glukose i muskler. En alvorlig, men sjelden komplikasjon av behandling med metformin er laktacidose. Metformin akkumuleres hos pasienter med nedsatt nyrefunksjon, så det bør utvises forsiktighet med metforminbehandling hos denne pasientgruppa. Sulfonylureaderivatene og repaglinid øker glukosesensitiviteten til  $\beta$ -cellene i pankreas, slik at mer insulin frigjøres. Glitazoner er peroksisomproliferator-aktiverende reseptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )-agonister, og øker insulinsensitiviteten. Akarbose interfererer med aktiviteten av glucosidase, og dette reduserer fordøyelsen av karbohydrater [2]. En annen gruppe legemidler som kan brukes som tilleggshandling av diabetes type-2 er inkretinmodulatorer. Glukoseavhengig insulinotrop polypeptid (GIP) og glukagonliknende peptid 1 (GLP-1) er viktige signalsubstanser i inkretinsystemet. Inkretinhormonene fører til at mer insulin sekreseres fra pankreas, og gir redusert glukoseproduksjon i lever og økt opptak av

glukose i muskel og fettvev. Det viser seg at individer med diabetes type-2 har reduserte inkretineffekter. GLP-1 brytes ned av dipeptidylpeptidase 4 (DPP-4) og har kort halveringstid. To nye legemiddelklasser av inkretinmodulatorer som nå er godkjent i Norge er GLP-1-analoger (inkretinmimetika) og DPP-4-inhibitorer (gliptiner) [11]. Hemmere av natrium-avhengig glukosetransportør-2 (SGLT2) i nyrene er et nytt konsept for å redusere blodglukose. SGLT2 uttrykkes i den proksimale tubuli, der den reabsorberer omtrent 90 % av filtrert glukose. SGLT1, som finnes i Henleys sløyfe og distale tubuli, reabsorberer resten av glukosen ved normal blodglukose [12]. Det finnes en SGLT2-hemmer på markedet i Norge, dapagliflozin [13]. Pasienter med diabetes type-2 kan også etter en stund trenge tilførsel av insulin [2].

Behandlingsmålene ved behandling av diabetes er HbA<sub>1c</sub> på  $\leq 7,0$  %, P-glukose fastende 4-6 mmol/l, P-glukose ikke fastende 4-10 mmol/l, et blodtrykk på  $< 135/80$  mmol/l og S-”low-density” lipoprotein (LDL)-kolesterol  $\leq 2,5$  mmol/l (1,8 mmol/l ved kjent hjerte-/karsykdom). Det tilstrebes også minst 30 minutter med rask gange eller tilsvarende moderat fysisk aktivitet hver dag, et vekttap på 5-10 % ved fedme/overvekt og røykeslutt [4].

I følge nasjonale faglige retningslinjer for forebygging, diagnostikk og behandling av diabetes skal det først startes opp med å gi råd om en sunnere livsstil. Oppstart med metformin settes i gang, dersom en ikke oppnår de ønskede behandlingsmålene etter 3 måneder med livsstilsråd. Metformin kan kombineres med sulfonylurea eller NPH-insulin, dersom behandlingsmålene fortsatt ikke er oppnådd. Ved sterkt nedsatt insulinproduksjon kan det legges til hurtigvirkende insulin til måltidene eller dele opp dosene av NPH-insulin. Alternative medikamenter kan også legges til, slik som for eksempel glitazoner, GLP-1-analoger og DPP-4-inhibitorer, men dette er mindre godt validerte behandlingsmetoder [4].

## 1.2 Fedme

I følge verdens helseorganisasjon, WHO, er KMI et mål på fedme og overvekt, og denne indeksen brukes på voksne. Ved å dele vekten i kilogram på kvadratet av høyden i meter, beregnes KMI. En KMI på over 25 defineres som overvekt, mens en KMI på over 30 defineres som fedme. I følge tall fra WHO så er over 1,4 milliarder mennesker i verden overvektige. Dette er tall fra 2008, og gjelder voksne 20 år eller eldre. En forhøyet KMI er en risikofaktor for diabetes type-2, kardiovaskulære sykdommer, enkelte kreftsykdommer og

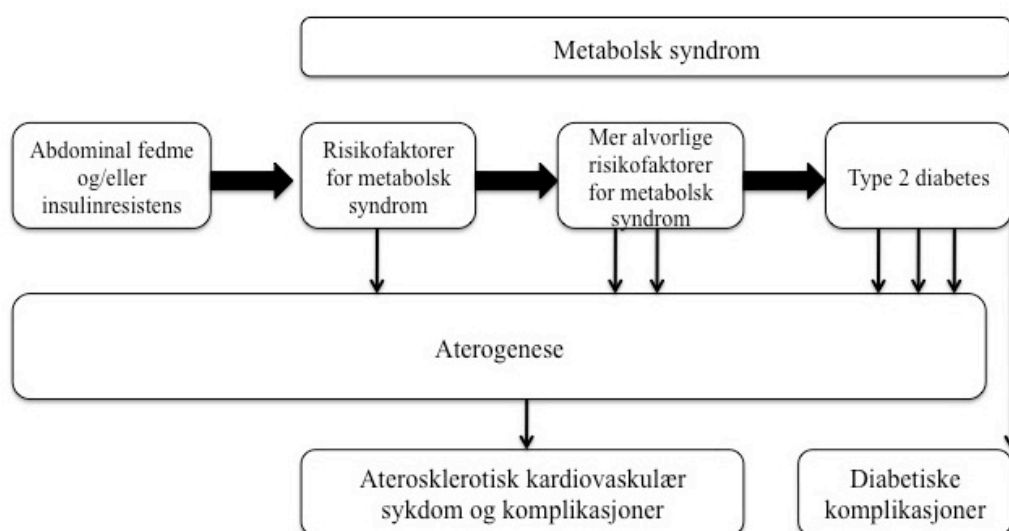
muskel- og skjelettsykdommer. Det er en ubalanse i inntak og bruk av kalorier som er hovedårsaken til fedme [14].

Det finnes kun ett legemiddel på det norske markedet som er godkjent med indikasjonen fedme. Orlistat er en pankreaslipasehemmer og virker i tarmen ved at det reduserer hydrolysen av triglyserider spesifikt, slik at ca. 30% av triglyseridene ikke blir absorbert. Triglyseridene som ikke blir absorbert, skilles ut via avføringen. Indikasjonen for orlistat er helseskadelig fedme med en KMI på  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  eller overvekt med en KMI på  $\geq 28 \text{ kg/m}^2$  med andre risikofaktorer i tillegg. Disse risikofaktorene kan for eksempel være dyslipidemi, diabetes eller hypertensjon. I forhold til placebo har orlistat vist å gi en vektreduksjon på 2-5 kg, når begge gruppene fulgte samme råd angående kosthold og fysisk aktivitet. Størst vekttap får personer som responderer med mer enn 5 % vekttap de første månedene av behandlingen. Orlistat reduserer også forekomsten av diabetes, og bedrer risikofaktorer som LDL kolesterolnivå. En fettfattig kost under behandlingen er anbefalt, siden orlistat kan gi bivirkninger i form av diaré og magesmerter [15].

Adipocytter er cellene som fettvevet er bygget opp av, og disse kan fylles opp av fettdråper [16]. Adipokiner, som er bioaktive peptider, skilles ut av dette fettvevet. Eksempler på adipokiner er leptin, adiponektin, tumornekrose faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) og resistin [2, 17, 18]. Leptin forbedrer insulinsensitiviteten ved å redusere intracellulære lipidnivåer i skjelettmuskel, de pankreatiske  $\beta$ -cellene og lever. I skjelettmuskel vil man få en økt transport av fettsyrer inn til mitokondriene, på grunn av en hemming av malonyl-CoA. Adiponektin hemmer adhesjonen av monocytter til endotelcellene, aktiveringen av endotelceller og makrofagers transformasjon til skumceller. Adiponektin har derfor antiaterogene effekter. Hos individer med fedme eller insulinresistens, har det blitt observert et redusert uttrykk og serumkonsentrasjon av adiponektin. TNF- $\alpha$  hemmer syntesen av adiponektin, ved at adipocytene skiller ut mer frie fettsyrer [17]. Fettvev, kontraherende skjelettmuskel og immunceller (under inflammasjon) skiller ut IL-6, og IL-6 har vist seg å øke fettoksidasjonen hos mennesker [18]. Individer med fedme og insulinresistens har høyere nivåer av IL-6. IL-6 reduserer også utskillelsen av adiponektin [17]. Resistin er med på å forårsake insulinresistens [2].

## 1.3 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom kalles insulinresistenssyndromet eller syndrom X [19]. Aterogen dyslipidemi, hypertensjon, forhøyede nivåer av plasmaglukose, pro-inflammatorisk- og pro-trombotisk tilstand er alle risikofaktorer for metabolsk syndrom, og syndromet forbindes med en forhøyet risiko for å utvikle diabetes og kardiovaskulær sykdom [20]. Hovedårsakene til metabolsk syndrom er insulinresistens og abdominal fedme [21], og det at insulinresistens kan forårsakes av fedme er godt kjent. En mener at den økende forekomsten av fedme i verden er grunnen til den stadig økende prevalensen av metabolsk syndrom [20]. Progresjonen av metabolsk syndrom er oppsummert skjematisk i figur 1.1.



**Figur 1.1: Progresjonen av metabolsk syndrom.** Tilstanden starter med abdominal fedme og/eller insulinresistens, og utvikler seg over tid med flere og mer utalte risikofaktorer. Hos mange oppstår det aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom. Metabolsk syndrom utvikler seg senere til diabetes type-2, som igjen gir økt risiko for aterosklerotisk kardiovaskulær sykdom. Modifisert fra [20].

Det finnes ulike definisjoner på metabolsk syndrom. Definisjonene har mye til felles og under er tre definisjoner omtalt i detalj.

WHO sin definisjon innebærer at pasienten skal ha glukoseintoleranse, svekket glukosetoleranse (IGT) eller diabetes mellitus og/eller insulinresistens sammen med to eller flere av disse risikofaktorene: svekket glukoseregulering eller diabetes, insulinresistens,

hypertensjon ( $\geq 140/90$  mmHg), forhøyede nivåer av plasma triglyserider ( $\geq 1,7$  mmol l<sup>-1</sup>, 150 mg dl<sup>-1</sup>) og/eller lave nivåer av "high-density" lipoprotein (HDL) kolesterol ( $< 0,9$  mmol l<sup>-1</sup>, 35 mg dl<sup>-1</sup> for menn,  $< 1$  mmol l<sup>-1</sup>, 39 mg dl<sup>-1</sup> for kvinner), abdominal fedme (KMI  $> 30$  kg m<sup>-2</sup> og/eller midje-hofte-ratio  $> 0,85$  for kvinner og  $> 0,90$  for menn) eller mikroalbuminuri ( $\geq 20$   $\mu$ g min<sup>-1</sup> eller albumin:kreatinin ratio  $\geq$  mg g<sup>-1</sup>) [22].

The new International Diabetes Federation (IDF) definerer det slik at et individ har metabolsk syndrom dersom det har abdominal fedme (for etniske europeere et midjemål  $\geq 94$  cm for menn og  $\geq 80$  cm for kvinner) og to av disse risikofaktorene: forhøyede triglyseridnivåer ( $\geq 150$  mg/dl, 1,7 mmol/L) eller at behandling for forhøyede triglyseridnivåer er initiert, redusert HDL kolesterol ( $< 40$  mg/dl, 1,03 mmol/L, hos menn, og  $< 50$  mg/dl, 1,29 mmol/L, hos kvinner) eller at behandling for lave HDL kolesterolnivåer er initiert, hypertensjon (systolisk blodtrykk  $\geq 130$  mmHg eller diastolisk blodtrykk  $\geq 85$  mmHg) eller at behandling for allerede oppdaget hypertensjon er initiert, eller tidligere diagnostisert diabetes type-2 eller forhøyet fastende plasmaglukose ( $\geq 100$  mg/dl, 5,6 mmol/L,) [21].

National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) definerer metabolsk syndrom slik at hvis pasienten har 3 eller flere av følgende risikofaktorer har pasienten syndromet: abdominal fedme (midjemål  $\geq 102$  cm for menn, og  $\geq 88$  cm hos kvinner), forhøyede plasmanivåer av triglyserider ( $\geq 1,7$  mmol/L, 150 mg/dl) eller initiert legemiddelbehandling for forhøyede plasmanivåer av triglyserider, redusert HDL kolesterol ( $< 40$  mg/dl, 1,03 mmol/L, hos menn, og  $< 50$  mg/dl, 1,3 mmol/L, hos kvinner) eller initiert legemiddelbehandling for redusert HDL kolesterol, hypertensjon (systolisk blodtrykk  $\geq 130$  mmHg eller diastolisk blodtrykk  $\geq 85$  mmHg) eller initiert legemiddelbehandling for hypertensjon, forhøyet fastende glukose ( $\geq 100$  mg/dl) eller initiert legemiddelbehandling mot forhøyet glukose [23].

Behandlingen av metabolsk syndrom tar sikte på å redusere risikoen for å utvikle kardiovaskulær sykdom og diabetes. Livsstilsendringer er førstelinjebehandling ved metabolsk syndrom, mens legemiddelbehandling kan initieres hos individer med høy risiko for kardiovaskulære sykdommer og der hvor livsstilsendringer ikke er tilstrekkelig. Legemiddelbehandlingen tar sikte på å redusere de enkelte risikofaktorene [21].

## 1.4 Insulinresistens

Insulin er et peptidhormon [16], og det er  $\beta$ -cellene i de Langerhanske øyene i pankreas som syntetiserer insulin. Først syntetiseres preproinsulin som raskt konverteres til proinsulin. Proinsulin danner så insulin og C-peptid i like mengder, som pakkes i granulater i pankreas. Insulin er satt sammen av to kjeder, en A-kjede og en B-kjede som er bundet sammen med to disulfidbroer. Insulinfrigjøring stimuleres av glukose [2]. Insulin fører til økt glukosetransport i ulike vev, slik som fettvev og skjelettmuskel, på grunn av en rekruttering av glukosetransportør nummer 4 (GLUT4) til cellemembranen [16].

Individer med fedme og/eller diabetes type-2 har ofte høye konsentrasjoner av fettsyrer i plasma, og dette kan knyttes til insulinresistens. Oksidasjon og opptak av glukose hemmes av høye konsentrasjoner av fettsyrer i plasma [24]. Mange med diabetes type-2 har abdominal fedme. Det skjer en frigjøring av frie fettsyrer på grunn av at abdominalt fettvev er resistent mot den antilipolytiske effekten av insulin. I muskel og i lever vil disse frie fettsyrene føre til insulinresistens. Dette vil gi en hemming av insulinmediert glukoseopptak i muskel, og en økt glukoneogenese i lever, som igjen vil føre til økte mengder sirkulerende glukose. Insulinresistens kan også forårsakes av overflødig fettvev, da adipocytene ikke vil lagre ekstra fett hvis de blir for store. Fettet vil istedenfor lagres i muskler, lever og pankreas [2].

Roden et al. demonstrerte at insulinresistens hos mennesker blir induert av frie fettsyrer, som hemmer glukosetransport og glukosefosforylering [25]. Dette fører til at hastigheten av glukoseoksidasjon og glykogensyntese i muskler reduseres med omtrent 50 %. Randle et al. hadde tidligere postulert en mekanisme som gikk ut på at økt fettoksidasjon gir inaktivering av pyruvatdehydrogenase, som igjen gir en akkumulering av glukose-6-fosfat og en hemming av fosfofruktokinase. Dette vil gi et redusert glukoseopptak på grunn av en hemming av heksokinase II [25]. Denne hypotesen ble lagt frem i 1963, og kalles glukose-fettsyrehypotesen [24]. Denne hypotesen foreslår at det er tilgjengeligheten av fettsyrer som bestemmer balansen mellom glukose- og fettsyreoksidasjon. I kontrast til denne hypotesen fant en studie ut at det er tilgjengeligheten av glukose som bestemmer balansen mellom glukose- og fettsyreoksidasjon, og ikke fettsyrer [26].



## 1.5 Oppbygging av skjelettmuskel

Skjelettmuskulaturen består av omtrent 600 muskler, som igjen består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Muskelcellene, som også kalles muskelfibre, har en lengde på noen få centimeter, en diameter på 0,01-0,1 mm, og har mange cellekjerner som ligger etter hverandre. Selve muskelen er bygget opp av mange grupper av muskelfibre, som er omgitt av en grov bindevevshinne. Gruppene av muskelfibre er omgitt av en tykk bindevevshinne, mens hver enkelt muskelfiber er omgitt av en tynnere hinne. Bindevevshinnene inneholder kollagenfibre, blodårer og nerver. Skjelettmusklene kalles tverrstripet muskulatur, på grunn av at de har et repeterende mønster av mørke og lyse bånd som ligger på tvers av fibre [16].

Myofibriller er sylindriske strukturer på 1-2  $\mu\text{m}$ , som utgjør ca 80 % av muskelfibrenes masse. Myofibriller består av proteinene aktin og myosin, som er to typer myofilamenter. Disse myofilamentene er ordnet i et gjentakende mønster langs hver myofibrill. En sarkomer er den minste enheten i dette mønsteret, og utgjør det tverrstripede mønsteret. Antallet sarkomerer vil øke dersom muskelen vokser i lengde, mens antallet parallelle sarkomerer vil øke dersom muskelen vokser i diameter [16].

Når det skjer en muskelkontraksjon, vil myofilamentene forskyves i forhold til hverandre og sarkomerene blir forkortet. Det skjer en økt overlapping mellom aktin og myosinfilamentene. Myosinhodene binder seg til aktin, og bøyer seg mot midten av myosinfilamentene. Myosinhodene retter seg så opp igjen, ved å slippe taket. Denne prosessen gjentas flere ganger. Myosinhodene binder ATP, ATP blir deretter hydrolysert til ADP og fosfat, og det overføres energi til myosinhodene. Ved høy  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjon inne i muskelcellen, vil myosinhodene binde seg til aktin. Den høye  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjonen kommer fra frigjøring av  $\text{Ca}^{2+}$  fra sarkoplasmatiske retikulum, som følge av et aksjonspotensial som sprer seg gjennom T-rørsystemet. Myosinhodene bøyer seg, på grunn av en binding til aktin. Myosinhodene løsner fra aktinet, når de på ny binder seg til ATP. Dette er en konsentrisk muskelkontraksjon, og fører til at sarkomeren blir kortere. En eksentrisk kontraksjon vil skje dersom muskelfiberen aktiveres mens den strekkes [16].

Fra biopsier fra skjelettmuskelceller, kan satelittceller isoleres. Satelittcellene kan aktiveres til prolifererende myoblaster. Disse myoblastene kan videre differensieres til flerkjernede

myotuber, og metabolisme i skjelettmuskel kan studeres i disse cellene [27]. Satelittceller ble for første gang sett ved elektronmikroskopi av Alexander Mauro i 1961. Mauro brukte muskelfiber fra *musculus tibialis anticus* fra frosk [28]. Satelittceller aktiveres av skader, intensiv trening eller under postnatal muskelvekst [29].

### **1.5.1 Muskelfibre**

Det finnes ulike typer muskelfibre, og disse deles inn etter hvor raskt muskelfiberen kan trekke seg sammen, som igjen avhenger av hvor raskt myosin kan spalte ATP. Muskelfibrene kan deles inn i to hovedtyper. Den ene typen er langsomme muskelfibre, som kalles type I. Den andre typen er raske muskelfibre, som kalles type II, som videre kan deles inn i undergrupper. Type IIa kalles for raske oksidative fibre, mens type IIb kalles raske glykolytiske fibre. Type IIa danner ATP ved hovedsakelig oksidativ fosforylering, mens type IIb bruker i hovedsak glykolyse. Langsomme oksidative fibre er et annet navn for type I-muskelfibre [16]. Det er forskjell på de ulike muskelfibertypene, både på insulinsensitiviteten, og evnen de har til å oksidere glukose og fettsyrer. Type I-muskelfibre har en større kapasitet for glukose og fettsyreoksidasjon, og er mer insulinsensitive. Type II-muskelfibre har lavere kapasitet for fettsyreoksidasjon, i tillegg til at de er mindre sensitive for insulin. Type II-muskelfibre har færre mitokondrier [30]. Type I-muskelfibre har vist seg å uttrykke mer GLUT4, enn type II-muskelfibre [31].

En studie utført av Tanner et al. i 2001 viste en sammenheng mellom fedme og muskelfibertype [32]. I denne studien hadde kvinner med fedme en høyere andel type IIb-muskelfibre og en lavere andel type I-muskelfibre enn sine kvinnelige tynne kontrollere. De fant også ut at kvinner med fedme av afro-amerikansk etnisitet hadde en lavere prosentvis andel av type I-muskelfibre enn kvinner med fedme av europeisk etnisitet. Afro-amerikanske kvinner med fedme hadde også en prosentvis høyere andel type IIb-muskelfibre, enn kvinner med fedme av europeisk etnisitet [32].

## **1.6 Fettsyremetabolismen**

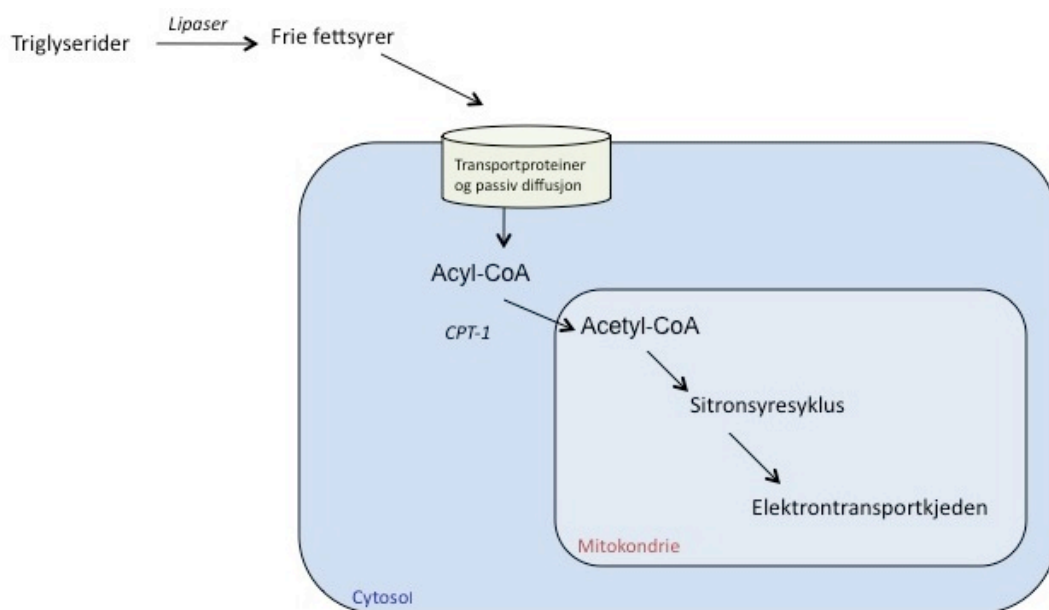
De viktigste reservoarene og kildene til brennstoff i kroppen er triglyserider som er lagret i fettvevet og frie fettsyrer i plasma. Det dominerende lipidet fra kosten er triglyserider. Oksidasjonen av fettsyrer skjer hovedsakelig i skjelettmuskel. Lipaser vil reagere med triglyseridene og det dannes tre molekyler av frie fettsyrer og et glyserolmolekyl. De frie

fettsyrene vil videre aggregere og danne miceller. Disse micellene vil bli tatt opp av enterocytter hvor det dannes kylomikroner, ved at triglyseridene reesterifiseres. Kylomikronene vil gå via lymfen, ut i sirkulasjonssystemet og reagere med lipoprotein lipase (LPL). LPL finnes i blant annet i fettvev, lever, hjerte- og skjelettmuskel, hvor det er bundet til endotelcellene. Det blir nå frigjort frie fettsyrer som vil bli tatt opp i disse organene. Frie fettsyrene vil reesterifiseres, og lagres som triglyserider i fettvevet. Det er lever og hjerte- og skjelettmuskel som er hovedorganene for oksidasjon av frie fettsyrer. Frie fettsyrer kan i leveren omdannes til ketonlegemer. Når tilgangen på glukose i kroppen er begrenset kan hjerne og muskler oksidere ketonlegemene [24]. Frie fettsyrene vil enten oksideres i mitokondriene, lagres som lipiddråper, eller brukes til å syntetisere triglyserider i skjelettmusklene [33]. Perlipin 2 (PLIN2) er et protein som er uttrykt i stor grad i skjelettmuskel. Økt lagring av lipider i skjelettmusklene er karakteristisk for individer med diabetes type-2, og en teori er at dette fører til insulinresistens [34]. Hos individer med fedme observeres det en økt akkumulering av lipider [35]. Imidlertid observeres det også en overdreven lagring av intramyocellulære lipider (IMCL) hos godt trente idrettsutøvere til tross for at de har bedre insulinsensitivitet. Det er dette som kalles "the athletes paradox" [36]. En tror at PLIN2 er involvert i lagringen av IMCL som triacylglyserol (TAG). Til tross for økt TAG-innhold i skjelettmuskel ved diabetes type-2, er det hos individer med diabetes type-2 funnet lavere uttrykk av PLIN2-genet i forhold til individer i kontrollgruppen som bare hadde fedme [34].

De langkjedede fettsyrene blir ved hjelp av proteinmediert transport og passiv diffusjon tatt opp i skjelettmusklene. Viktige proteiner her er "fatty acid translocase/cluster of differentiation 36" (FAT/CD36), "fatty acid transport proteins 1 and 4" (FATP1/4) og "plasma membrane-associated fatty acid-binding protein" (FABPpm). Disse proteinene er alle uttrykt i skjelettmuskel og er med på å regulere fettsyreopptaket i musklene [37].

Fettsyrene binder seg reversibelt til "cytoplasmic fatty acid-binding protein, heart-type isoform" (FABPc) inne i myocytene. FABPc transporterer fettsyrer gjennom de ulike delene av cellen og beskytter mot lipotoksisk akkumulering av frie fettsyrer [37]. Hjertetype FABP uttrykkes i skjelettmuskel og hjerne, men uttrykket er høyest i hjertet. I en studie utført av Luiken et al. observerte de at opptaket av langkjedede fettsyrer i skjelettmuskel var redusert hos homozygote hjertetype FABP-null-mus [38].

Fettsyrene kan enten bli lagret eller oksidert inne i skjelettmuskelcellene. Fettsyrene bindes til coenzym A (CoA), ved hjelp av acyl-CoA-syntetase, som er en katalysator for denne prosessen. Karnitin-palmitoyltransferase 1 (CPT-1) medierer transporten av acyl-CoA inn til mitokondriene [37]. I mitokondriene blir fettsyrene gjort om til acetyl-CoA, og i denne prosessen dannes det i tillegg ett molekyl av NADH og ett molekyl av FADH<sub>2</sub>. Det vil videre foregå en oksidasjon av acetylgruppene til CO<sub>2</sub> og H<sub>2</sub>O i sitronsyresyklusen, før de går videre til elektrontransportkjeden [39], som er beskrevet i detalj i avsnitt 1.7. Figur 1.2 viser en forenklet oversikt over fettsyremetabolismen.



**Figur 1.2: Forenklet oversikt over fettsyremetabolismen i skjelettmuskelceller.** Lipoprotein lipase og lipaser i fettvevet vil reagere med triglyserider og det dannes frie fettsyrer. De frie fettsyrene blir transportert inn i cytosol ved hjelp av transportproteiner eller passiv diffusjon. Her omdannes de frie fettsyrene til acyl-CoA, som transporteres videre inn i mitokondriene ved hjelp av CPT-1. Her blir det dannet acetyl-CoA som videre går inn i sitronsyresyklusen og elektrontransportkjeden. Fettsyrene kan også bli lagret.

Fettsyreoksidasjonen hemmes ved økt tilgang til glukose [40]. Det er blitt observert en redusert fettsyreoksidasjon hos individer med ekstrem fedme eller tidligere ekstrem fedme [41]. Det er også blitt observert redusert oksidasjon av fettsyrer fra plasma hos individer med diabetes type-2, i forhold til en kontrollgruppe med individer med kun fedme [42].

## 1.7 Glukosemetabolismen

Sukker er det viktigste molekylet som brukes som drivstoff i kroppen. Sukker, proteiner og fett som kommer inn via kosten må brytes opp i mindre enheter før cellene i kroppen kan nyttegjøre seg av dem, og denne prosessen kalles katabolisme. Her degraderes komplekse molekyler til enklere enheter ved hjelp av enzymer. Katabolisme kan deles inn i tre steg. Det første steget kalles fordøyelsen, og skjer enten i lysosomer eller på utsiden av cellene. Her dannes monomere sukkerenheter av polysakkarider, som videre går inn i cytosol [39]. Den dominante glukosetransportøren i humane skjelettmuskler er GLUT4, og er viktig for opptak av glukose i muskel. Stuart et al. fant at GLUT4, GLUT5 og GLUT12 er de glukosetransportørene det var mest av i humane skjelettmuskler [43].

Insulin skiller ut ved økt glukosekonsentrasjon i blodet [16]. Insulinreseptoren består av to  $\alpha$ -subenheter og to  $\beta$ -subenheter. Når insulin bindes til  $\alpha$ -subenheten på insulinreseptoren på skjelettmuskelfibrenes cellemembran, stimulerer dette aktiviteten av tyrosinkinase på den intracellulære  $\beta$ -subenheten. Dette fører til en tyrosinfosforylering av insulinreseptorsubstrat (IRS) 1 til 4 som følge av en transfosforylering av insulinreseptoren. IRS-molekylet interagerer med fosfatidylinositol (PI)-3-kinase (PI3-kinase), og ulike 3-fosfoinositid-avhengige kinaser (PDK) aktiveres på grunn av en generering av fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3) [44]. PDK finnes i 4 ulike isoformer, PDK1-4 [45]. PDK4 uttrykkes blant annet i skjelettmuskel [46], og gir en redusert oksidasjon av karbohydrater, ved en hemming av pyruvatdehydrogenase-komplekset (PDC) [47]. Mennesker og rotter med insulinresistens har økt ekspresjon av PDK4 i skjelettmuskel [45]. Akt blir påvirket av PDK1, og en tror at Akt har en viktig funksjon innen regulering av glukosetransport [48]. Akt kalles også proteinkinase B [44], og i pattedyr finnes det tre isoformer av Akt, Akt1-3 (eller PKB $\alpha$ ,  $\beta$ , og  $\gamma$ ). Disse isoformene kodes av forskjellige gener [49]. Det kreves en fosforylering av Thr<sup>308</sup> og Ser<sup>473</sup> for å aktivere Akt [50]. Akt er et signalprotein som er viktig for aktivering av proteinsyntese, glykogensyntese og GLUT4-translokasjon [44]. Akt er en serin/threoninkinase, og kan fosforylere glykogen syntase kinase-3 (GSK3). Dette fører til en økt syntese av glykogen, på grunn av mindre aktivitet av GSK3 mot glykogen syntase. Glykogen syntase hemmes av GSK3. Akt hemmer AS160, som er et Rab-GTPase-aktiverende protein, og slik reguleres opptaket av glukose [49].

Det andre steget i katabolismen kalles glykolyse. Her blir det dannet to pyruvatmolekyler av et glukosemolekyl, og det dannes i tillegg ATP og NADH. Pyruvatmolekylene blir videre transportert inn til mitokondrienes matrix, hvor de blir konvertert til CO<sub>2</sub> og acetyl-CoA ved hjelp av et stort enzymkompleks. Det er i mitokondriene det tredje steget finner sted. Her dannes det sitrat, ved at acetylgruppa i acetyl-CoA omdannes til oxaloacetat. Sitrat går videre inn i sitronsyresyklusen. Her dannes det CO<sub>2</sub> og NADH, som er en høy-energi elektron bærer. Høy-energi elektronene fra NADH går inn i elektrontransportkjeden, der det dannes ATP. H<sub>2</sub>O dannes ved at elektroner fra transportkjeden binder seg til O<sub>2</sub>. I eukaryote celler kalles denne prosessen oksidativ fosforylering [39]. Cytokrom b-c<sub>1</sub>-komplekset, NADH dehydrogenase-komplekset og cytokrom oksidase-komplekset er alle store enzymkomplekser i elektrontransportkjeden. NADH dehydrogenase-komplekset tar imot elektroner fra NADH og sender de videre til ubiquinon. Ubiquinon sender elektronene videre til cytokrom b-c<sub>1</sub>-komplekset, som igjen sender de videre til cytokrom c (Cyc). Cytokrom oksidase-komplekset tar i mot elektronene fra Cyc, og gir de fra seg til oksygen [51].

I muskler og lever kan glukose lagres som glykogen [39]. Glukose vil fosforyleres raskt ved hjelp av heksokinase II, til glukose-6-fosfat etter opptak, og det dannes videre glukose-1-fosfat. Glukose-1-fosfat konverteres til glukose igjen ved hjelp av glukose-1-fosfat uridylyltransferase (uridin difosfat). Glukosegrupper blir lagt til den forgrenede glykogenpartikkelen, ved hjelp av uridin-difosfat-glukose-glykogen-glukosyltransferase, også kalt glykogen syntase [52]. Glykogen lagres i cytoplasma som store forgrenede polysakkarider. Glykogen kan videre brytes ned og det produseres glukose-1-fosfat, når kroppen trenger ATP. Glukose-1-fosfat omdannes videre til glukose-6-fosfat, som så går inn i den glykolytiske signalveien. Glukose-6-fosfat aktiverer enzymet glykogen syntase, som er nevnt ovenfor. Glukose-6-fosfat hemmer også enzymet glykogen fosforylase som katalyserer nedbrytningen av glykogen [39]. Insulin og trening kan stimulere glykogen syntase, og aktiviteten av glykogen syntase øker ved defosforylering av ulike seter [53]. En *in vivo*-studie fant at individer med fedme med og uten diabetes hadde en redusert insulinstimulert glykogen syntase-aktivitet [54].

## 1.8 Peroxisomproliferator-aktiverte reseptorer

Peroxisomproliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) er kjernereseptorer som er ligandavhengige, og består av tre undergrupper. Disse undergruppene er PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  og

PPAR $\delta$ . Uttrykket av PPAR $\alpha$  er størst i skjelettmuskel, nyre, lever og hjerte, mens PPAR $\gamma$  først og fremst uttrykkes i fettvev. Her spiller den en viktig rolle for lagring av lipider og adipogenese. PPAR $\delta$  er uttrykt i store deler av kroppen, og i skjelettmuskel er PPAR $\delta$  mer uttrykt enn PPAR $\alpha$ . Oksidative type I-muskelfibre har et høyere uttrykk av PPAR $\delta$  enn type II-muskelfibre [47].

PPAR heterodimeriserer med retinoid-X-reseptorer (RXR), og slik påvirkes transkripsjonen i kjernen. Komplekset med PPAR og RXR binder seg videre til et peroksisomproliferator responselement (PPRE) i den regulatoriske delen av et gen. Det finnes fire ulike funksjonelle domener på PPAR. Disse domenene er A/B, C, D og E/F, og det er E/F domenet som er viktig for interaksjonen med ulike kofaktorer og heterodimerisering med RXR. Kofaktorer har innflytelse på transkripsjonsaktiviteten og er nødvendige for at PPAR skal utøve sin aktivitet. Det finnes både korepressorer og koaktivatorer. Et eksempel på en koaktivator er PPAR $\gamma$  koaktivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ). PGC1 $\alpha$  er en transkripsjonell koaktivator, og forsterker transkripsjonen av målgener. Langkjedede fettsyrer, eikosanoider og leukotriener er alle eksempler på ligander som aktiverer PPAR [47].

En mengde gener som er involvert i fettsyremetabolismen har vist seg å være regulert av PPAR $\delta$ . Oksidasjonen av fettsyrer i skjelettmuskler øker ved aktivering av PPAR $\delta$  [47]. GW501516 er en selektiv PPAR $\delta$ -agonist. Studier gjort på humane myotuber viser at GW501516 økte oljesyreoksidasjonen og oppregulerte gener som er involvert i lipidmetabolisme og fettsyreoksidasjon. GW501516 reduserte også glukoseoksidasjonen og glukoseopptaket [55]. Studier gjort på L6 myotuber fra rotter viser et økt uttrykk av PGC1- $\alpha$  CPT-1 og en økt fettsyreoksidasjon ved bruk av GW501516 [56].

## **1.9 Effekter av trening**

### **1.9.1 Trening som behandling av metabolske sykdommer**

Fysisk inaktivitet bidrar til utviklingen av kroniske metabolske sykdommer, og metabolske sykdommer kan derfor forebygges med fysisk aktivitet [57]. En forbedring av insulinsensitiviteten, bedre glykemisk kontroll, bedre endotel funksjon og bedre vaskulær struktur er alle eksempler på fordeler som oppnås med trening. Trening reduserer også blodtrykket, triglyseridnivåene og lipoproteiner i plasma [58]. En forbedring i glukosetoleransen og en vektnedgang oppnås ved regelmessig utholdenhetstrening [59]. De

nasjonale faglige retningslinjene for forebygging, diagnostikk og behandling av diabetes anbefaler at alle diabetespasienter utfører en form for aktivitet i moderat intensitet i minst 30 minutter hver dag [4].

Det er vist at risikoen for å utvikle diabetes type-2 ble redusert hos risiko-individer ved omfattende livsstilsendringer. Omfattende livsstilsendringer betydde i denne sammenheng forandringer i kostholdet, trening og minst en annen komponent. Den andre komponenten kunne være rådgivning, røykeslutt og lignende [60]. Det er funnet en liten til moderat effekt av trening på insulinresistens og fastende insulin hos barn og ungdom, så hos denne gruppa er det dermed god grunn til å bruke fysisk aktivitet både som behandling og forebygging av diabetes type-2 [61].

### **1.9.2 Effekter av trening på fettzyremetabolismen**

Trening øker opptaket og oksidasjonen av fettzyrer [62], og ved trening på lav eller moderat intensitet observeres det en økning i fettzyreoksidasjonen. Ved 65 % av maksimalt oksygenopptak ( $VO_{2max}$ ) når fettzyreoksidasjonen en topp. Fettoksidasjonen reduseres derimot ved trening på høyere intensiteter [63]. I kontrast til dette, viste en studie publisert i 2007 at treningsintensiteten, selv ved treningsintensiteter på 85 % av  $VO_{2max}$ , ikke påvirket fettzyreoksidasjonen. Dette var undersøkelser gjort kun på en begrenset muskel [64]. Ved trening på lav intensitet (25 % av  $VO_{2max}$ ) kommer fettzyrene som oksideres fra plasma og perifer lipolyse, mens ved moderat intensitet (65 % av  $VO_{2max}$ ) kommer fettzyrene fra både plasma og intramuskulær lipolyse. Det er intramuskulære triglyserider som bidrar mest til oksidasjonen av fettzyrer ved trening på høy intensitet (> 80% av  $VO_{2max}$ ) [24]. Restriksjoner i fettvevets blodgjennomstrømming og/eller økt reesterifisering av fettzyrer fører til redusert opptak og oksidasjon av fettzyrer fra plasma når treningsintensiteten er høy [64].

Det observeres en redusert konsentrasjon av malonyl-CoA i muskler etter trening. CPT-1 hemmes allosterisk av malonyl-CoA, og dette fører til en redusert transport inn i mitokondriene av langkjedede "fatty acyl-CoA". Omdanningen av cytosolisk acetyl-CoA og  $CO_2$  til malonyl-CoA, katalyseres av enzymet Acetyl-CoA karboksylase (ACC). Muskelkontraksjoner aktiverer AMP kinase (AMPK) som igjen hemmer ACC. Studier indikerer at insulinresistens kan ha en sammenheng med økte verdier av malonyl-CoA, og trening vil derfor være med på å øke insulinsensitiviteten. Rottestudier viser at



konsentrasjonen av malonyl-CoA dekarboksylase (MCD) kan økes ved en induksjon av AMPK. MCD er viktig for malonyl-CoA turnover i skjelettmuskel og hjertemuskel. I en studie utført av Kuhl et al. fant de ut at en treningsintervensjon på 12 uker reduserte konsentrasjonen av malonyl-CoA, og økte uttrykket og aktiviteten av MCD hos mennesker [65].

Det er en sammenheng mellom mitokondriell dysfunksjon i skjelettmuskel og tilstander som innebærer insulinresistens. Ved sykdommer som diabetes type-2 og fedme ser man at mitokondriene er reduserte i både antall og størrelse, og man kan finne mitokondrier som er degenererte. Størrelsen og antallet av mitokondrier i skjelettmuskel vil øke som en respons på trening, og dette er med på å øke aktiviteten til Krebs syklus,  $\beta$ -oksidasjon, og elektrontransportkjeden. Dette vil gi en økt oksidasjon av frie fettsyrer. Dette er igjen avhengig av treningsintensiteten [58].

Ekspressjonen av gener og proteiner som er viktige i karbohydratmetabolisme, fettsyremetabolisme og insulinsignalveien reguleres også av muskelkontraksjoner. Trening vil på kort sikt gi økt lipidoksidasjon ved et økt uttrykk av FAT/CD36 og CPT-1 [58]. I en studie publisert av Tunstall et al. i 2002 observerte de at en 9 dagers treningsintervensjon på sykkel gav en økning i fettsyreoksidasjonen. De konkluderte med at denne økningen mest sannsynlig var assosiert med et økt uttrykk av CPT-1- og FAT/CD36-mRNA [66]. En studie utført av Russell et al. i 2006 viste at 6 uker med utholdenhetstrening gav en økt mRNA-ekspressjon av PPAR $\gamma$ -koaktivator-1 (PGC-1) og PPAR $\alpha$ . Ekspressjonen av PGC-1 var høyest i type IIa-muskelfibre, mens ekspressjonen av PPAR $\alpha$  var høyest i type I-muskelfibre, både før og etter trening [67]. For ulike histonmodifiserende og kromatinremodellerende enzymer som kan endre kromatinstrukturen, fungerer PGC-1 $\alpha$  som en plattform. For eksempel vil ulike histonacetyltransferase (HAT)-komplekser reagere med N-terminal del av PGC-1 $\alpha$  og dette vil føre til en acetylering av histoner og remodellering av kromatinstrukturen. Dette vil gjøre strukturen blir mer mottakelig for transkripsjonell aktivering. PGC-1 $\alpha$  uttrykkes i skjelettmuskel. Stimuli av oksidativ metabolisme og mitokondriell biogenese er hovedfunksjonene til PGC-1 $\alpha$ . mRNA-innholdet av blant annet FAT/CD36 og CPT-1 økes også av PGC-1 $\alpha$  [68]. Individuer med diabetes og individer som ikke har diabetes, men som har sykdommen i familien, har et redusert uttrykk av PGC-1 $\alpha$  og PGC-1 $\beta$  i skjelettmusklene [69]. En studie publisert av Pilegaard et al. i 2003 viste at styrketrening på knestrekkeren i 4

uker gav økt transkripsjon og mRNA-nivå av PGC-1 $\alpha$ . Effekten var forbigående med en topp 2 timer etter avsluttet treningsøkt [70].

### **1.9.3 Effekter av trening på glukosemetabolismen**

Muskelkontraksjoner fører til at IL-6 frigjøres fra myocytter [71]. IL-6 vil i skjelettmuskelceller føre til et økt glukoseopptak, både basalt og insulinstimulert. IL-6 vil også føre til økte nivåer av GLUT4 på celleoverflaten, på grunn av økt translokasjon til plasmamembranen [72]. De viktigste stimuliene til GLUT4-translokasjon er muskelkontraksjoner og insulin [44]. Det finnes ulike mekanismer som forklarer hvordan muskelkontraksjoner kan påvirke glukosetransport, og disse mekanismene er ikke avhengige av insulin. En økning i AMP/ATP og kreatin/fosfokreatin-ratioene aktiverer AMPK. Man får lavere konsentrasjoner av ATP og fosfokreatin i skjelettmusklene som følge av muskelkontraksjoner, og dette vil derfor føre til en aktivering av AMPK. Denne aktiveringen er avhengig av intensiteten på treningen, der høyere intensitet gir mer aktivering. Det skjer også en frigivelse av kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) fra sarkoplasmatiske retikulum, som følge av muskelkontraksjoner. En tror at økt GLUT4-translokasjon og glukosetransport kommer av den økte konsentrasjonen av  $\text{Ca}^{2+}$ , men mekanismen bak dette er enda ikke klarlagt. Det er lite sannsynlig at systemer for glukosetransport aktiveres direkte av kalsiumioner. Dette er på grunn av at etter hver muskelkontraksjon er  $\text{Ca}^{2+}$ -konsentrasjonen i cytoplasma bare økt i en veldig kort periode. Etter at muskelkontraksjonen har avtatt, sees derimot en økt glukosetransport i muskel i lengre tid etterpå. Det er dermed grunn til å anta at GLUT4-translokasjon kan komme av kalsiumregulerte intracellulære proteiner, slik som calmodulin, calmodulinavhengige proteinkinase (CaMK)-familien og proteinkinase C (PKC)-familien. Det er vist at det skjer en reduksjon i kontraksjonsstimulert glukoseopptak ved å hemme CaMK-signalveien. PKC-aktiviteten øker ved muskelkontraksjoner [73].

### **1.9.4 Effekt av trening på muskelfibersammensetning**

Utholdenhetstrening promoterer en konvertering fra type IIa-muskelfibre til type IIb-muskelfibre [74]. Idrettsutøvere innenfor utholdenhetsidretter har predominant langsomme muskelfibre, mens idrettsutøvere som bedriver sprint har predominant raske muskelfibre. Dette gjelder muskelbiopsier tatt fra beinmuskulaturen [75]. Det er usikkert om dette kommer av at individer med en muskelsammensetning som passer utholdenhets- eller sprintøvelsene,

foretrekker disse idrettene, eller om det er selve treningen som påvirker muskelfibersammensetningen.

### **1.9.5 Effekter av trening på immunsystemet**

Utviklingen av metabolske sykdommer fra fedme kan knyttes til inflammasjon. Fedme fører til en endring i immuncelleprofilen i fettvevet, fra en anti-inflammatorisk profil, til en mer pro-inflammatorisk profil. Denne endringen kan bidra til lokal og systemisk insulinresistens, på grunn av lokal inflammasjon. Trening fører til vekttap eller forebygging av en vektøppgang, og slik vil trening virke inn på endringer i fettvevets immuncelleprofil og motvirke insulinresistens [57].

Det er funnet et økt uttrykk av CD11b og CD11c (markører for makrofager) i skjelettmuskelbiopsier fra mennesker med overvekt/fedme og diabetes type-2. Dette kan være et fenomen som er aldersavhengig, da denne sammenhengen ikke var signifikant etter at det ble korrelert for alder [76]. En hypotese, postulert av Lancaster og Febbraio, foreslår at trening gir en anti-inflammatorisk effekt som kommer fra en reduksjon i skjelettmusklens lipidinnhold som en følge av økt utnyttelse av fettsyrer. Dette vil gi en reduksjon i aktiveringen av pro-inflammatoriske signaleringsveier på grunn av en reduksjon i rekrutteringen av makrofager og andre immunceller [57].

Toll-like reseptorer (TLR) er en familie av signalreseptorer som uttrykkes på ulike celler, og TLR4 uttrykkes på makrofager [77]. Utviklingen av tilstander som diabetes type-2, fedme og insulinresistens blir foreslått å ha en sammenheng med en aktivering av TLR4. Mettede fettsyrer og LDL er eksempler på ligander for TLR, og nivåene av disse ligandene kan reduseres ved trening. Uttrykket av TLR4 på monocyttoverflaten har vist seg å reduseres ved trening. Fetuin A, som skilles ut av leveren, er et protein som fremmer presentasjonen av fettsyrer for TLR4. Nivåene har fetuin A har vist seg å reduseres ved trening [57].

## **1.10 Metabolsk ”switching” i skjelettmuskel**

Metabolsk fleksibilitet er evnen cellene har til å bytte fra predominant lipidoksidering i fastende tilstand, til økt glukoseoksidasjon og undertrykkelse av lipidoksidasjon når de blir utsatt for insulin, som etter et måltid. Dette er noe som er med på å karakterisere friske humane skjelettmuskler [78]. I insulinresistens observeres en redusert metabolsk fleksibilitet.

Studier utført av Ukropcova et al. i 2005 viser at metabolsk "switching" er en egenskap som finnes hos skjelettmuskler, og at noe av det første som skjer i utviklingen av fedme og insulinresistens kan være defekter i metabolsk "switching" [79]. Skjelettmusklene er på grunn av sin størrelse og energibehov et metabolsk aktivt organ som er viktig i kroppens homeostase [80]. Det skjer en økt fettsyreoksidasjon i fastende tilstand og under vedvarende trening, mens det er oksidasjonen av glukose som dominerer etter et måltid. Evnen cellene har til å undertrykke fettsyreoksidasjon når det tilsettes glukose akutt kalles suppressibilitet. Mens cellenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen når det er økt tilgang på fettsyrer i kroppen kalles adapterbarhet [78].

Redusert lipidoksidasjon i fastende tilstand er ofte knyttet til sykdommer og tilstander som fedme, diabetes type-2 og insulinresistens. Det samme er en svekket veksling fra lipid- til glukoseoksidasjon etter måltid, og en redusert evne under trening til å øke lipidoksidasjonen. Man tror at en svikt i denne metabolske fleksibiliteten spiller en viktig rolle i tidlig utvikling av diabetes type-2, da det også hos individer med svekket glukosetoleranse er observert en redusert veksling fra lipid- til glukoseoksidasjon etter måltid [78].

## **1.11 Epigenetikk**

Epigenetikk er forandringer i genfunksjonen, uten at nukleotidsekvensen endres. Epigenetiske forandringer kan påvirkes av miljøet og er arvelige [81]. Epigenetiske faktorer kan deles inn i tre ulike mekanismer: histonmodifisering, DNA-metylering og microRNA [82].

### **1.11.1 Histonmodifisering**

I eukaryote celler er DNAet pakket sammen med histoner for å danne kromatin. Histonmodifiserende enzymer kan modifisere NH<sub>2</sub>-terminalen på histonene, og dette kan resultere i acetylering, metylering, fosforylering, sumoylering eller ubiquitinerings. Disse modifiseringene er viktige for replikering, rekombinasjon og organisering av kromosomet. De er også viktige for å bestemme DNAets tilgjengelighet for transkripsjonsmaskineriet [82]. I denne oppgaven vil kun histonacetylering bli omtalt.

HATs legger til acetylgrupper til lysinresiduet på histonendene, mens histon-deacetyltransferase (HDAC) fjerner disse acetylgruppene. Det skjer en økt gentranskripsjon

ved økt histonacetylering, men mekanismen bak dette er ikke fullstendig klarlagt. En mekanisme som er foreslått er at histonacetylering fjerner positive ladninger på histonendene. Histonendene er positivt ladd, og vil binde negativt ladd DNA. Det vil da dannes en struktur som har lav transkripsjonell aktivitet, på grunn av at den er mer kondensert. Når de positive ladningene fjernes, vil kromatinstrukturen slappe av og transkripsjonsmaskineriet kan få tilgang til DNAet. En annen mekanisme som er foreslått er histonkode-hypotesen, der transkripsjonen reguleres ved at flere histonmodifiseringer virker sammen. En annen mekanisme går ut på at bromodomene-proteiner kan virke som transkripsjonelle aktivatorer, og at histonacetylering kan rekruttere disse proteinene [82].

Trening induserer histonmodifisering. ”Myocyt enhancer factor 2” (MEF2) regulerer ekspresjonen av GLUT4. Under hvile vil HDAC5 i kjernen interagere med MEF2. HDAC5 deacetylerer videre histonendene på GLUT4-genet, og man får en redusert GLUT4 ekspresjon. Etter trening vil en AMP-aktivert proteinkinase fosforifilere HDAC5, slik at HDAC5 dissoisierer fra MEF2 og eksporteres til cytosol. MEF2 kan nå interagere med PGC1 $\alpha$  og HAT, og føre til økt acetylering av histonene i GLUT4-genet. Dette vil gi et økt uttrykk av genet, og trening vil dermed være med på å øke ekspresjonen av GLUT4. Som en respons på akutt trening vil Ca<sup>2+</sup>/CaMK også modulerere MEF2-aktiviteten, ved hjelp av histonacetylering [82].

### 1.11.2 DNA-metylering

Målet for DNA-metylering i virveldyr er cytosinresiduer i CG-dinukletotider. Ved en rekruttering av proteiner som binder spesifikt til metylert CG som igjen rekrutterer HDACs og korepressorer, kan det oppnås en stans i transkripsjonen. Stansen kan også oppnås ved å undertrykke bindingen av transkripsjonsfaktorer, og dermed inaktivere genet. Aktiviteten av metyltransferaser er viktig for DNA-metylering. Det finnes to grupper av DNA metyltransferaser (DNMT), og det er DNMT1 og DNMT3a og DNMT3b. DNMT1 vedlikeholder metyleringen ved å kopiere DNA-metyleringsmønsteret mellom cellegenerasjoner i replikeringen. DNMT3a og DNMT3b er viktig for *de novo* metylering [82]. Studier viser at DNA-metyleringsmønsteret i humane skjelettmuskler og fettvev endres ved trening, og dette kan føre til forbedret metabolisme og endret genuttrykk [81].

### 1.11.3 MicroRNA

MicroRNA (miRNA) er en familie med ikke-kodende RNA, som består av 21-25 nukleotider [83]. Det er RNA polymerase II som transkriberer miRNA til primære miRNA. RNase III Drosha og DGCR8 proseserer miRNA i kjernen, og det dannes en forløper til miRNA, som transporteres til cytoplasma. Her proseseres de til ferdig funksjonelt miRNA ved hjelp av RNase III Dicer [84]. miRNA regulerer genuttrykket på posttranskripsjonelt nivå, negativt. Den dominante mekanismen for denne negative reguleringen er at miRNA er en repressor for translasjonen. En annen mekanisme kan være direkte kløyving mRNA. *lin-4* i *Caenorhabditis elegans* var det første miRNA som ble beskrevet [83].

## 1.12 Angiopoietinlignende protein 4

Angiopoietinlignende protein (Angptl) familien består av Angptl1-7. Angptl4 uttrykkes i stor grad i lever, fettvev, plasma, placenta, tynntarm og hjerte hos mennesker [85]. I denne oppgaven vil bare aktiviteten av Angptl4 på lipidmetabolismen bli omtalt. Aktiviteten av LPL hemmes av Angptl4. Det diskuteres hva mekanismen bak dette kan være. Noen av mekanismene som er foreslått er en direkte interaksjon mellom LPL og Angptl4 inne i cellen, at Angptl4 stimulerer en omdannelse av den aktive LPL-dimeren til den inaktive LPL-monomeren eller at Angptl4 virker som en kompetitiv hemmer av LPL. Både faste og stimulering fra PPAR $\delta$ - og RXR-agonister øker uttrykket av Angptl4 i skjelettmuskel [86].

## 1.13 Mål for oppgaven

Fysisk aktivitet brukes både forebyggende og i behandlingen av metabolske sykdommer. Målet med denne oppgaven er å undersøke om trening *in vivo* vil påvirke fetttsyremetabolismen og insulinfølsomheten i dyrkede humane myotuber *in vitro*. Tidligere studier utført av Bourlier et al viser at utholdenhetstrening gir endringer i glukosemetabolismen i dyrkede humane myotuber [87].

Delmål for denne oppgaven:

- Undersøke effekten av trening på fetttsyreopptak, fetttsyreoksidasjon og metabolsk fleksibilitet i humane myotuber.
- Undersøke effekten av trening på akkumulering av oljesyre i lipider i humane myotuber.
- Undersøke effekten av trening på insulinfølsomheten i humane myotuber, målt som insulinstimulert Akt fosforylering og glykogen syntase defosforylering.
- Undersøke effekten av trening på uttrykk av noen gener involvert i fetttsyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber.

I tillegg var det ønskelig å studere noen celledyrkningsbetingelser for å øke cellenes delingshastighet.

Delmål for denne oppgaven:

- Undersøke hvordan ulike celledyrkningsflasker og coatinger har innvirkning på hvordan humane myoblaster prolifererer.
- Undersøke hvordan ulike proliferasjonsmedier har innvirkning på hvordan humane myoblaster vokser.

# 2 Materialer og metode

## 2.1 Materialer

### 2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Under følger en alfabetisk oversikt over de kjemikalier og reagenser som er benyttet i denne oppgaven:

Actrapid<sup>®</sup> Penfill<sup>®</sup> 100 IE/ml, Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark).

Akt Antibody (PKB total), Cell Signaling Technology<sup>®</sup> Inc. (Danvers, MA, USA).

Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody, Cell Signaling Technology<sup>®</sup> Inc. (Danvers, MA, USA).

bFGF ("Basic fibroblast growth factor"), Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA).

BioWhittaker<sup>®</sup> PBS Phosphate Buffered Salin, Lonza (Verviers, Belgia).

Bovint serumalbumin (BSA), Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

Bromfenolblått, Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

GW501516, fremstilt av Calin C. Ciocoiu (Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Norge).

Dexametason, Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

Dimetylsulfoksid (DMSO), Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM m/Glutamax m/1,0 g/liter glukose), Gibco<sup>®</sup> Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).

Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS uten Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>), Gibco<sup>®</sup> Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).

EGF (Epidermal growth factor), Gibco<sup>®</sup> Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).

Ekstracellulær matriks (ECM), Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

FCCP (carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon), Sigma-Aldrich<sup>™</sup> (St. Louis, MO, USA).

Fungizone<sup>®</sup> (250 µg/ml amphotericin B), Gibco<sup>®</sup> Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).



Føtalt kalveserum, Gibco® Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).

Føtalt storfeserum, Gibco® Invitrogen (Gibco Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia).

D(+)-Glukose-Monohydrat, MERCK (Damstadt, Tyskland).

Glycogen Synthase Antibody (GS-total), Cell Signaling Technology® Inc. (Danvers, MA, USA).

HEPES, Sigma-Aldrich™ (Shelton, Scotland, USA).

L-Karnitin hydroklorid, Sigma-Aldrich™ (Shelton, Scotland, USA).

Lysis Solution, 50 ml, Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA).

β-merkaptoetanol, Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA).

NaOH, MERCK (Damstadt, Tyskland)

Nuclease-free H<sub>2</sub>O, 25 ml, Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA).

[<sup>14</sup>C]oleic acid 100μCi/ml, PerkinElmer® (Boston. MA, USA).

Oljesyre, Sigma-Aldrich™ (Shelton, Scotland, USA).

OptiPhase supermix, PerkinElmer™ (Wallham, MA, USA).

Penicillin-streptomycin (10 000 IE/ml), Thermo Scientific (Logan, UT, USA)

Phosphatase inhibitor Cocktail 1, Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA).

Phosphatase inhibitor Cocktail 2, Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA).

Phospho-Akt (Ser 473) Antibody, Cell Signaling Technology® Inc. (Danvers, MA, USA).

Phospho-Glycogen Synthase (Ser641) Antibody, Cell Signaling Technology® Inc. (Danvers, MA, USA).

Power SYBR® Green PCR Master Mix, 5 ml, Applied Biosystems™ (Warrington, Storbritannia).

Precision Plus Standard Blue, Cell Signaling Technology® Inc. (Danvers, MA).

Primere (36B4, Anplt4, CD36, Cyc1, GAPDH, IL-6, PDK4, PGC1α, PLIN2 og PPARδ), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA)

SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific (Rockford, USA).

SuperSignal® West Dura Luminol/Enhancer Solution, Thermo Scientific (Rockford, USA).

Tryptanblått 0,4 % løsning, Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA).

Ultrosor™G, Pall Life Sciences (Cergy-Saint. Christophe, Frankrike).

Wash solution 25 ml, Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA).

## 2.1.2 Utstyr

Under følger en alfabetisk oversikt over det utstyret som er benyttet i denne oppgaven:

AbiPrism 7000 Sequence Detection System, AB Applied Biosystems (Stockholm, Sverige).

Agilent Total RNA Isolation Mini Kit, Agilent Technologies Inc (Cedar Creek, TX, USA).

Cell scrapers 24 cm, TPP<sup>®</sup>/MIDSCI<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA).

15 ml Centrifuge Tube, Centristar<sup>™</sup>, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

50 ml Centrifuge Tube, Centristar<sup>™</sup>, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

Centristar<sup>™</sup> Cap 15 ml, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

Centristar<sup>™</sup> Cap 50 ml, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

ChemiDoc MP gel Imaging System, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> Surface 25 cm<sup>2</sup> flasker, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> Surface 96-brønners Brett med lokk, Corning Inc. (Corning, NY, USA).

Countess<sup>™</sup> automated cell counter, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup> (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA).

Countess<sup>™</sup> counting chamber slides, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>™</sup> (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA).

Criterion Blotter, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Criterion<sup>™</sup> Cell, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Criterion TGX 10 % akrylamid separasjonsgel, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Digital Dry Bath, Labnet International Inc. (Edison, NJ, USA)

Fiberpad 9,5 x 15,2 cm, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Isoplate<sup>™</sup>-96, PerkinElmer<sup>™</sup> (Waltham, MA, USA).

Heraecus Fresco 21 Centrifuge, Thermo Scientific (Roskilde, Danmark).

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems<sup>™</sup> (Foster City, NY, USA).

Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010, Kubota Corporation (Tokyo, Japan).

MicroAmp<sup>®</sup> Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems<sup>™</sup> (Foster City, NY, USA).

MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free, Applied Biosystems<sup>™</sup> (Foster City, NY, USA).

1450 Microbeta Plus Scintillation counter, AB Applied Biosystems (Stockholm, Sverige).

Millipore, 0,45µM, rule, Immobilon-P, Millipore Corporation (Billerica, MA, USA).

Millipore Multiscreen HTS™, Opaque non-sterile, hydrophobic plates with lid. High protein binding Immobilon-P Membrane, Millipore Corporation (Billerica, MA, USA).

Multiscreen<sub>HTS</sub> Vacuum Minifold, Millipore Corporation (Billerica, MA, USA).

Nanodrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific (Roskilde, Danmark).

NUNC 96-brønners brett med flat bunn, Thermo Scientific (Roskilde, Danmark).

NUNC celleflasker, 25 cm<sup>2</sup>, Thermo Scientific (Roskilde, Danmark).

Olympus CKX41 microscope med digitalkamera, Olympus (Tokyo, Japan).

PowerPac™ HC power supply, Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland).

StuartScientific Gyro-Rocker Modell 16R, VWR (Radnor, PA, USA).

Techne Dri-Block® DB-3D, Bibby Scientific Limited (Staffordshire, Storbritannia).

2720 Thermal Cycler, AB Applied Biosystems (Stockholm, Sverige).

Trappestativ, med metallskruer, metallplate og silikonplate inkludert. Laget av instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)

TopSeal®-A gjennomsiktig film, PerkinElmer™ (Waltham, MA, USA).

Unifilter®-96 GF/B, PerkinElmer™ (Waltham, MA, USA).

Wallac Victor™ X4, PerkinElmer™ (Waltham, MA, USA).

## 2.2 Donorkarakteristika

Det ble tatt biopsier fra *musculus vastus lateralis*. Det var totalt 14 donorer og alle donorene var menn i alderen 40-59 år. Deltakerne ble delt inn i to grupper. Den ene gruppa var prediabetikere (omtales som pasientgruppa etter dette), mens den andre gruppa var en kontrollgruppe, som bestod av friske personer. Kriteriene for å være med i pasientgruppa var mann i alderen 40-65 år, av nordisk etnisitet, KMI på 27-32 kg/m<sup>2</sup> og med en forstyrrelse i glukosestoffskiftet. Denne forstyrrelsen i glukosestoffskiftet var enten forhøyet fastende blodsukker (plasma glukose  $\geq 5,6$  mmol/l), nedsatt glukosetoleranse (2 timers plasma glukose  $\geq 7,8$  mmol/l) eller diabetes type-2 (ubehandlet med medisiner, HbA1c  $\leq 7,5\%$ ). Kriteriene for å være med i kontrollgruppa var mann i alderen 40-65 år, av nordisk etnisitet og en KMI på 19-25 kg/m<sup>2</sup>. Kontrollpersonen skulle også ha normalt glukosestoffskifte og ingen førstegradsslektning med diabetes type-2. Deltakerne i studien skulle også være inaktive, og dette ble definert som å trene mindre enn én time i uka. De skulle heller ikke ha en kronisk betennelsesykdom eller en annen sykdom som kunne påvirke studien, og de skulle ikke bruke noen systemiske kortikosteroider, kolesterolsenkende, blodfortynnende eller blodsukkersenkende medikamenter. De skulle ikke røyke eller bruke narkotiske stoffer, eller konsumere mer enn 2 alkoholenheter daglig. De skulle også være mentalt klare og i stand til å forstå studiens hensikt, og villige til å delta i alle undersøkelser og aktiviteter som var inkludert i studien. I tabell 2.1 er de viktigste donorkarakteristika for de donorene som er brukt i denne oppgaven presentert. Studien er registrert i ClinicalTrials.gov, og har identifikasjonsnummer NCT01803568.

**Tabell 2.1: Donorkarakteristika før og etter treningsintervensjonen.** KMI, kroppsmasseindeks; GIR, ”clamp” glukoseinfusjonshastighet; SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorgruppe	Donorkode	Alder (i år)	KMI før trening (kg/m <sup>2</sup> )	KMI etter trening (kg/m <sup>2</sup> )	ΔKMI (kg/m <sup>2</sup> )	GIR før trening (mg/kg/min)	GIR etter trening (mg/kg/min)	ΔGIR (%)
Kontroll	1	40	23,8	22,8	-1	6,6	9,5	2,9
	3	42	25,0	23,8	-1,2	9,6	9,7	0,1
	13	53	21,3	21,0	-0,3	5,3	8,8	3,5
	70	58	24,0	24,0	0	6,4	7	0,6
	71	47	26,6	26,4	-0,2	6	8,3	2,3
	81	53	24,1	23,7	-0,4	9,8	11,7	1,9
	88	55	20,8	21,0	0,2	7	6,2	-0,8
	Gjennomsnitt ± SEM	49,7 ± 2,6	23,7 ± 0,8	23,2 ± 0,7	-0,4 ± 0,2	7,2 ± 0,7	8,7 ± 0,7	1,5 ± 0,6
Pasient	2	47	31,4	29,7	-1,7	4,4	7	2,6
	4	59	29,4	28,0	-1,4	5,0	4,4	-0,6
	17	49	28,0	26,2	-1,8	4,4	4,9	0,5
	21	46	32,5	31,9	-0,6	1,5	4,7	3,2
	55	58	32,1	31,2	-0,9	4,3	4,9	0,6
	61	55	31,7	30,5	-1,2	4,2	4,3	0,1
	62	49	27,0	25,8	-1,2	5,9	7,8	1,9
	Gjennomsnitt ± SEM	51,9 ± 2,0	30,3 ± 0,8	29,0 ± 0,9	-1,3 ± 0,2	4,2 ± 0,5	5,4 ± 0,5	1,2 ± 0,5
Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)	50,8 ± 1,6	27,0 ± 1,1	26,1 ± 1,0	-0,8 ± 0,2	5,7 ± 0,6	7,1 ± 0,6	1,3 ± 0,4	

## 2.3 Treningsintervensjonen

Treningsintervensjonen varte i totalt 12 uker, og deltakerne i studien skulle trene fire ganger i uka. Her var to av øktene styrketrening, mens de andre to var utholdenhetstrening. Treningene ble nøye fulgt opp av en instruktør fra Norges Idrettshøyskole (NIH). Instruktøren passet på at det ble brukt riktig teknikk under styrkeøvelsene, og at deltakerne fikk god og riktig fremgang. To deltakere delte vanligvis på en instruktør, og alle fikk personlig opplæring og instruksjon av apparater og teknikk.

### 2.3.1 Styrketrening

Styrketreningen bestod av åtte øvelser. Øvelsene var benkpress, beinpress, ”sittende-roing”, skulderpress, ”leg-curls”, en ryggøvelse, ”crunches” og ”cable pull-down”. Styrketreningen ble innledet med 10 minutter aerob oppvarming. Oppvarminga bestod av enten å løpe på tredemølle, ro på romaskin eller å sykle på spinningssykel. Hver øvelse ble i de første tre ukene av treningsintervensjonen gjennomført med 3 sett á 12 repetisjoner. I den fjerde uka

ble det gjennomført 3 sett á 10 repetisjoner. Etter åtte uker med styrketrening, ble det gjennomført 3 sett med bare 8 repetisjoner.

For å måle deltakernes maksimale styrke ble det gjennomført tester på tre av styrkeøvelsene. Øvelsene som ble valgt ut var: brystpress, ”cable pull-down” og beinpress. Testene ble innledet med 10 minutters oppvarming, enten løping eller sykling. Testen ble i starten gjennomført med en vektbelastning på omtrent 50 % av forventet maksimal styrke. Vektbelastninga ble gradvis økt, til maksimal styrke ble nådd. Hver deltaker fikk to forsøk på maksimal styrke. I tabell 2.2 er resultatene fra disse testene vist.

**Tabell 2.2: Resultater av styrketreningen som følge av treningsintervensjonen. SEM, standardfeil til gjennomsnittet**

Donorgruppe	Donorkode	ΔBrystpress (kg)	ΔBrystpress (%)	Δ”Cable pull-down” (kg)	Δ”Cable pull-down” (%)	ΔBeinpress (kg)	ΔBeinpress (%)
Kontroll	1	20,0	38,1	25,0	45,5	20,0	11,8
	3	2,5	3,3	5,0	7,1	-5,0	-2,1
	13	5,0	11,8	10,0	16,0	30,0	23,1
	70					10,0	5,7
	71	15,0	16,7	12,5	16,7	15,0	6,1
	81	12,5	20,0	7,5	12,0	30,0	13,6
	88	5,0	9,1	7,5	10,7	2,5	1,3
	Gjennomsnitt ± SEM	10,0 ± 2,8	16,5 ± 4,9	11,3 ± 2,9	18,0 ± 5,7	14,6 ± 5,0	8,5 ± 3,2
Pasient	2	7,5	8,6	10,0	10,5	52,5	18,4
	4	5,0	6,3	5,0	6,3	27,5	9,9
	17	12,5	17,9	12,5	14,7	50	27,0
	21	10	11,1	2,5	2,4	40	14,0
	55	7,5	12,0	7,5	9,7	20,0	7,7
	61	5,0	8,3	15,0	23,1	15	5,5
	62	5,0	9,5	10,0	18,2	15	6,0
	Gjennomsnitt ± SEM	7,5 ± 1,1	10,5 ± 1,4	8,9 ± 1,6	12,1 ± 2,7	31,4 ± 6,1	12,4 ± 3,2
	Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)	8,7 ± 1,4	13,3 ± 2,4	10,0 ± 1,6	14,8 ± 3,0	23,0 ± 4,4	10,6 ± 2,1

Som vist i tabell 2.2, så var det en stor intraindividuell variasjon i både pasientgruppa og kontrollgruppa. Kontrollgruppa hadde en høyere gjennomsnittlig forbedring på to av øvelsene, bortsett fra beinpress hvor pasientgruppa hadde en gjennomsnittlig større forbedring. Kontroll 70 hadde ingen registrerte resultater på brystpress og ”cable pull-down” i testene etter treningsintervensjonen på grunn av en nakkeskade, og ble derfor ikke regnet med i gjennomsnittet for disse to øvelsene. Alle deltakerne hadde en økning i

treningsresultatene på alle øvelsene det ble testet for, bortsett fra kontroll 3, som hadde en reduksjon i øvelsen beinpress.

### **2.3.2 Utholdenhetstrening**

Utholdenhetstreninga bestod av intervaller på sykkel. Oppvarminga var på 12-15 minutter, og bestod av tre intervalldrag på 4-5 minutter. Intervalldragene skulle ligge på 60 %, 70 % og 75 % av maksimal hjertefrekvens ( $HF_{max}$ ). Den ene økta bestod av intervalldrag på 7 minutter på omtrent 85 % av  $HF_{max}$ , med 3 minutter pause med lavere intensitet mellom hvert intervalldrag. I pausen skulle  $HF_{max}$  ligge på omtrent 60 %. Den andre økta bestod av intervaller med en lengde på 2 minutter med  $HF_{max} > 90$  %. Her hadde deltakerne seks intervalldrag, med en pause på 2 minutter med lavere intensitet mellom hvert drag. I pausen skulle  $HF_{max}$  ligge på omtrent 60 %. Halveis inn i økta ble det lagt inn en seriepause på 5 minutter, på omtrent 60 % av  $HF_{max}$ . Begge øktene ble avsluttet med en nedtrapping som bestod av 5 minutter med sykling på en intensitet som deltakerne valgte selv.

For å få et mål på deltakernes aerobe kapasitet, ble det utført en test på  $VO_2max$ , før og etter treningsintervensjonen. Her skulle deltakerne gjennom en standardisert oppvarming, som bestod av 3-4 intervaller på 5 minutter, hvor intensiteten ble økt for hvert 5. minutt. Etter oppvarminga syklet deltakerne på lavere intensitet i 5 minutter, før selve testen begynte.  $VO_2max$  testen bestod av 45 minutter sykling med en intensitet på 70 % av estimert  $VO_2max$ . Resultatene fra testen er vist i tabell 2.3.

**Tabell 2.3: Resultater av utholdenhetstreningen som følge av treningsintervensjonen.** VO<sub>2</sub>max, maksimalt oksygenopptak; SEM, standardfeil til gjennomsnittet.

Donorgruppe	Donorkode	VO <sub>2</sub> max før trening (ml/kg/min)	VO <sub>2</sub> max etter trening (ml/kg/min)	ΔVO <sub>2</sub> max (ml/kg/min)
Kontroll	1	41,3	51,0	9,7
	3	44,8	45,4	0,6
	13	46,2	52,5	6,3
	70	40,4	35,8	-4,6
	71	42,3	49,3	7,0
	81	42,5	47,4	4,9
	88	39,1	45,2	6,1
	Gjennomsnitt ± SEM	42,4 ± 0,9	46,7 ± 2,1	4,3 ± 1,8
Pasient	2	35,6	42,2	6,6
	4	41,2	44,9	3,7
	17	39,0	40,5	1,6
	21	32,2	36,3	4,1
	55	29,1	31,4	2,3
	61	38,9	41,4	2,5
	62	38,5	48,8	10,3
	Gjennomsnitt ± SEM	36,4 ± 1,6	40,8 ± 2,1	4,4 ± 1,2
	Gjennomsnitt ± SEM (begge grupper)	39,4 ± 1,2	43,7 ± 1,6	4,4 ± 1,0

Som vist i tabell 2.3, så økte alle deltakerne sin maksimale aerobe kapasitet, bortsett fra kontroll 70. Kontroll 70 hadde som nevnt i avsnitt 2.3.1 en nakkeskade etter treningsintervensjonen, og det kan tenkes at dette påvirket resultatet i testen for VO<sub>2</sub>max. Før og etter treningsintervensjonen hadde pasientgruppa i gjennomsnitt en lavere VO<sub>2</sub>max enn kontrollgruppa. Differansen mellom før og etter treningsintervensjonen er nokså lik for både kontroll og pasientgruppa.

## 2.4 Celledyrking

### 2.4.1 Utsåing

Det ble først opprettet en cellebank, og celleampullene ble tatt ut fra denne cellebanken. Først ble utsåingsmediet overført til et 50 ml rør, og tint på et vannbad som holdt 37 °C. Så ble celleampuller tatt ut fra nitrogentanken og varmet opp på vannbad. Her var det viktig å skru opp korken av og til, for å utligne trykket inne i ampullen. Så ble innholdet i ampullen overført til et 50 ml rør ved hjelp av en 1 ml pipette. Ampullen ble skylt med ca. 0,5 ml med utsåingsmedium, og medium ble så tilsatt til totalt 5 ml. Dette ble gjort for å fortynde dimetylsulfoksid (DMSO) som er i nedfrysingsmediet. DMSO er toksisk for cellene, og er



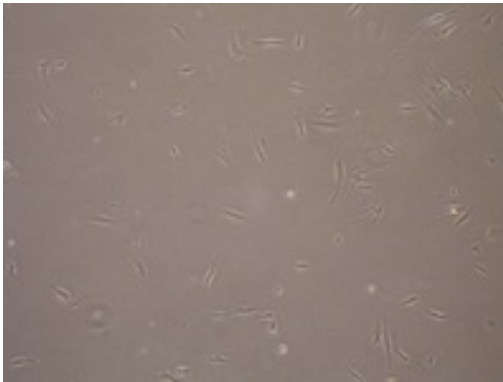
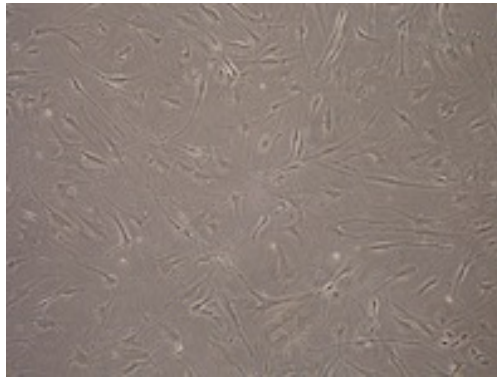
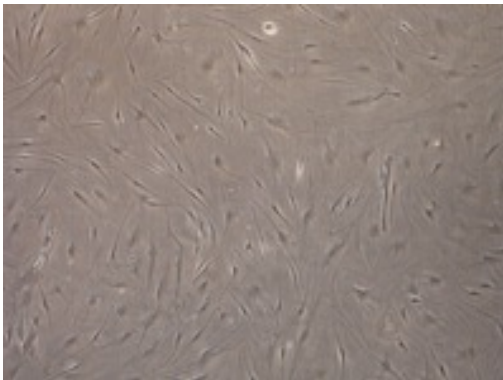
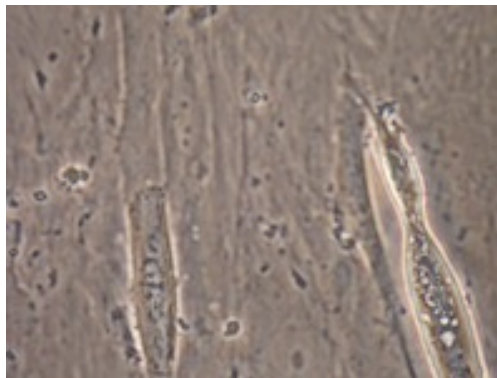
tilsatt nedfrysingsmediet for å unngå at det krystalliseres. DMSO er ikke skadelig når det er fryst eller fortynnet. Røret ble så sentrifugert på 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, slik at bare cellepelleten var igjen i bunnen av røret. Cellepelleten ble resuspendert i 3 ml utsåingsmedium. 20 µl av cellesuspensjonen ble overført til et eppendorfrør og 20 µl tryptanblått 0,4 % ble tilsatt, slik at det ble et 1:1 forhold. Tryptanblått farget de døde cellene blå. Løsningen ble så talt ved hjelp av celletelleren, og antall levende celler ble talt. Dette ble gjort for å beregne volum til utsåingen. Volumet ble så tatt ut til et 50 ml rør, og utsåingsmedium til totalt 10 ml ble tilsatt. Så ble det brukt reservoar og multikanalspipette for å overføre cellesuspensjonen til et Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup>-brett med 96 brønner. Det ble tilsatt 100 µl cellesuspensjon i hver brønn. Brettet ble inkubert i 24 timer i et varmeskap som holdt 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.4.2 Proliferasjon**

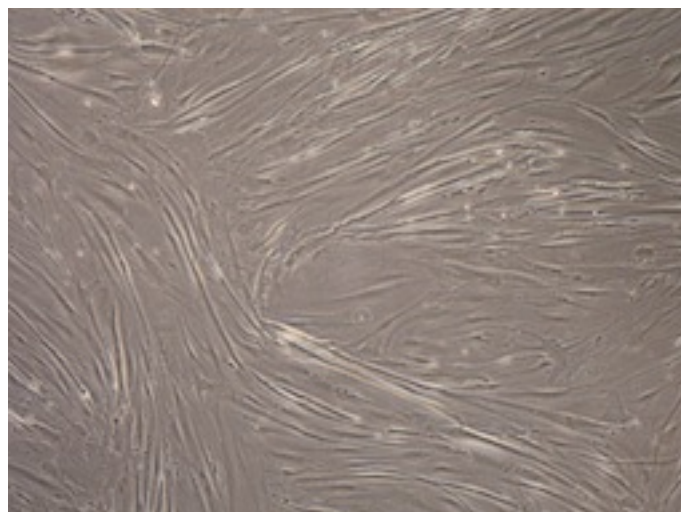
Etter 24 timer ble utsåingsmediet byttet ut med proliferasjonsmedium. Dette var fordi cellene skulle dele seg og bli flere. Proliferasjonsmediet ble byttet med jevne mellomrom, ca. annenhver dag, til cellene ble 80-90 % konfluente. Det ble tilsatt 100 µl proliferasjonsmedium til hver brønn.

### **2.4.3 Differensiering**

Når cellene ble 80-90 % konfluente ble proliferasjonsmediet byttet ut med differensieringsmedium. Siden differensieringsmediet inneholdt lite serum og i tillegg insulin, differensierte muskelcellene til myotuber. Cellene ble nå lange med flere kjerner, og det var mulig å se tverrstriping. Figur 2.1 og figur 2.2 viser utviklingen av muskelcellene fra utsåing til dannelse av myotuber. Innholdsstoffene i utsåingsmediet, proliferasjonsmediet og differensieringsmediet er listet opp i appendiks, avsnitt 1.1-3.

**A****B****C****D**

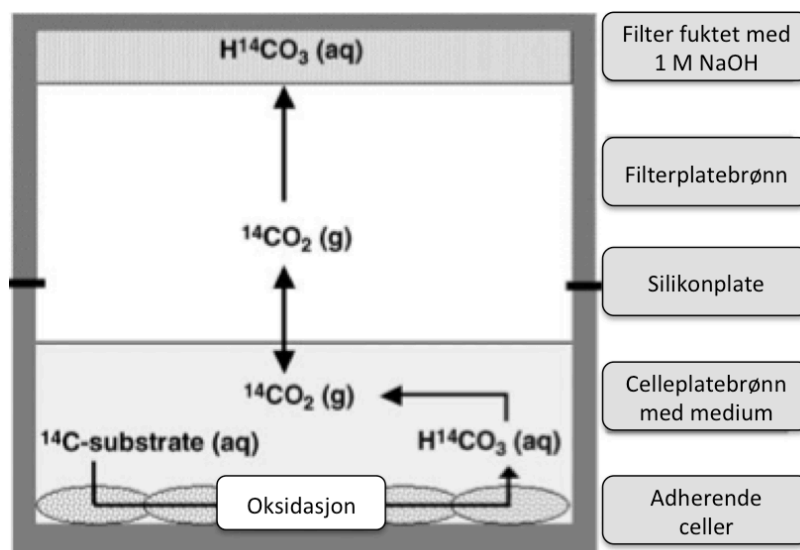
**Figur 2.1: Bilde av humane skjelettmuskelceller fra celledyrkingen.** A) Muskelcellene etter 24 timer i utsåingsmedium. Bildet er tatt med 4x forstørrelse. B) Muskelcellene etter 5 dager i proliferasjonsmedium. Bildet er tatt med 4x forstørrelse. C) Muskelcellene etter 7 dager i differensieringsmedium. Bildet er tatt med 4x forstørrelse. D) Flerkjernet myotube. Bildet er tatt etter 7 dager i differensieringsmedium, med 40x forstørrelse. Alle bildene er tatt av samme donor, dyrket opp i NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske.



**Figur 2.2: Eksempel på muskelfibre.** Bildet er tatt med 4x forstørrelse. Muskelcellene er dyrket opp i NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske.

## 2.5 Substratoksidasjonsforsøk

Substratoksidasjonsmetoden ble utviklet av Wensaas et al. i 2007 [88]. Her brukes et 96-brønnersbrett med dyrkede humane myotuber og et filterbrett fuktet med NaOH. Et  $^{14}\text{C}$ -merket substrat oksideres av de adhererte cellene på 96-brønnersbrettet, og det frigjøres  $\text{CO}_2$ . Denne  $\text{CO}_2$ -gassen vil bli fanget i det basiske filteret i filterbrettet. Mengden  $^{14}\text{CO}_2$  som er fanget i filteret måles. Figur 2.3 viser en illustrasjon av metoden [88].



**Figur 2.3: Teori bak substratoksidasjonsmetoden.** Det  $^{14}\text{C}$ -merkede substratet oksideres av de adhererte cellene, og  $\text{CO}_2$ -gassen som dannes i cellene fanges i det basiske filteret. Mengden  $^{14}\text{CO}_2$  som er fanget i filteret kan måles. Bildet er modifisert fra [88].

### 2.5.1 Substratoksidasjonsforsøket

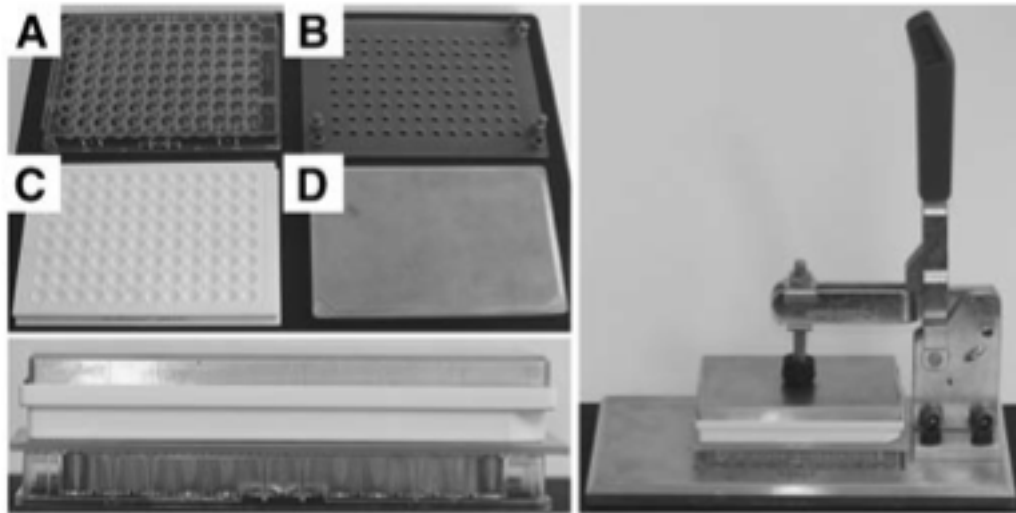
Cellene ble dyrket opp på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.4. Det ble brukt et celletall på 700 000 celler/ml. Etter at cellene hadde differensiert i 7 dager, ble det utført forsøk på cellene. Dagen før selve substratoksidasjonsforsøket ble det byttet differensieringsmedium på kolonne 3-8. Det ble da tilsatt 50  $\mu\text{l}$  differensieringsmedium i hver brønn. Det ble også tilsatt 50  $\mu\text{l}$  forbehandling og formerking i brønn 2, 9, 10 og 11. Ved formerking menes det at det ble tilsatt radioaktiv oljesyre 24 timer før forsøket. Ved forbehandling menes det at det ble tilsatt kald oljesyre 24 timer før forsøket. Kald oljesyre betyr at oljesyra ikke er radioaktiv. Tabell 2.4 viser oppsettet som ble brukt i dette substratoksidasjonsforsøket. Her ble ulike konsentrasjoner av oljesyre og effekt av tilsetninger av ”carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone” (FCCP) og glukose undersøkt. Det ble også undersøkt

effekten av ulike formerkinger og forbehandling med oljesyre. Se appendiks, avsnitt 2.1-2, for innholdsstoffene i alle mediene som er brukt i substratoksidasjonsforsøkene.

**Tabell 2.4: Oppsett substratoksidasjonsforsøk:** Kolonne 2 ble forbehandlet med kald oljesyre 24 timer før substratoksidasjonsforsøket, og ble tilsatt radioaktiv oljesyre akutt i 4 timer på selve forsøksdagen. Kolonne 3-8 ble tilsatt radioaktiv oljesyre med og uten ulike tilsetninger akutt i 4 timer på forsøksdagen. Kolonne 9-11 ble formerket med enten 100  $\mu\text{M}$  eller 400  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre 24 timer før substratoksidasjonsforsøket, og ble tilsatt kald oljesyre på forsøksdagen akutt i 4 timer. FCCP er lyssensitiv og ble tilsatt mediet rett før forsøket. r = radioaktiv oljesyre; Glu, glukose; FCCP, "carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone"; f = formerket med radioaktiv oljesyre.

		Akutt							Kronisk (f = formerket med radioaktiv oljesyre)			
Rad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-H		100r + 100 forbe h.	100r	100r + 5mM glu	100r + 1 $\mu\text{M}$ FCCP	20r	400r	400r + 1 $\mu\text{M}$ FCCP	0 + 100f	0 + 400f	100 + 100f	

Den dagen forsøket skulle utføres ble filterbrettet merket og et sealing-filter ble festet på undersiden av filterbrettet. Filterpapiret i de hjørnene hvor skruene skulle stå ble fjernet med en pinsett. 20  $\mu\text{l}$  1 M NaOH ble tilsatt hver brønn i kolonne 2-11 på filterbrettet. Overflødig NaOH ble fjernet. Mediene som var på cellene ble sugd av og 50  $\mu\text{l}$  trappemedium ble tilsatt hver brønn. Cellebrettet ble så plassert nederst i en trappholder. Silikonlappen ble plassert over cellebrettet og filterbrettet ble plassert øverst. Aluminiumsplaten ble plassert oppå og stativet ble låst sammen, slik at det ble dannet en "sandwich". Figur 2.4 viser et bilde av apparatet. Medier ble satt i en fryser som holdt  $-20^{\circ}\text{C}$  for senere telling. Etter 4 timer inkubasjon i et varmeskap som holdt  $37^{\circ}\text{C}$  med 5 %  $\text{CO}_2$ , ble stativet demontert, og cellebrettet vasket to ganger med 150  $\mu\text{l}$  med fosfatbufret saltvann (PBS), etter at trappemediet hadde blitt sugd av. Deretter ble det tilsatt 200  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH for å lysere cellene, og cellebrettet ble satt i en fryser som holdt  $-20^{\circ}\text{C}$ . Filterbrettet ble tilsatt 40  $\mu\text{l}$  Optiphase Supermix tellevæske. TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm ble satt på, og brettet ble satt til inkubasjon i romtemperatur i 2 dager, før det ble talt på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter.



**Figur 2.4:** Et bilde av utstyret som ble brukt i substratoksidasjonsforsøkene. A) Corning® CellBIND® 96-brønners Brett med adhererte celler. B) Silikonplate med tilhørende metallskruer. C) UniFilter® 96-brønners brett fuktet med 1M NaOH. D) Plate av aluminium. Alle disse delene settes sammen som en sandwich som vist på bildet til høyre. Denne sandwichen inkuberes så i 4 timer ved 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub>. Bildet er hentet fra [88].

### 2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet

Celleassosiert radioaktivitet (CA) er den mengden radioaktivitet som cellene akkumulerer og kan telles på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter. Det var mulig å få et estimat på oljesyreopptaket i cellene, ved å slå sammen resultatene fra CO<sub>2</sub>- og CA-tellingene.

Fryste cellebrett og medierester ble tatt opp av -20 °C fryser satt i et varmeskap som holdt 37°C med 5 % CO<sub>2</sub> for tining. 50 µl av lysatet ble tatt ut av hver brønn og overført til et eget brett som brukes til å måle CA. Dette er et 96-brønners Isoplate™ brett. De tomme kolonnene ble brukt til medietelling, 50 µl medium ble da tilsatt hver brønn. 100 µl Optiphase Supermix tellervæske ble tilsatt, og brettet ble forseglet med TopSeal®-A gjennomsiktig plastfilm. Brettet ble stående til inkubasjon i 2 timer, før det ble talt på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter.

### 2.5.3 Lipidfiltrering

Her undersøkes akkumuleringen av oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene. Cellebrett med fryste lyserte celler ble satt i varmeskap som holdt 37°C med 5 % CO<sub>2</sub> for tining. Ved lipidfiltrasjon brukes en hydrofob Millipore Multiscreen-plate. Først ble coveret på platen fjernet. Så ble det tilsatt 75 µl 70 % etanol i hver brønn. Dette ble gjort for å fukte filteret.

Filteret var opprinnelig hydrofobt, men for at det hydrofile lysatet kunne filtreres gjennom ble filteret fuktet med etanol. Etter 30 sekunder ble etanolen filtrert gjennom filteret ved hjelp av Millipore vakuumbastasjon. Filtrene måtte ikke tørke ut før prosedyren var ferdig. Deretter ble filtrene vasket to ganger med 200 µl destillert vann, for å fjerne etanolen. Overflødig vann ble fjernet før prøvene ble satt på. 50 µl av hver prøve ble satt på filtrene og ble filtrert gjennom. Her ble det brukt radioaktivt sug. Deretter ble det vasket seks ganger med 100 µl destillert vann, slik at det av prøvene som ikke hadde festet seg ble fjernet. Etter den første vaskingen, ble det byttet fra radioaktivt sug til vanlig sug. Platecoveret på undersiden av platen og overflødig vann ble fjernet, og det ble satt på TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm på undersiden. 100 µl Optiphase Supermix tellevæske ble tilsatt i hver brønn, og det ble satt på TopSeal<sup>®</sup>-A gjennomsiktig plastfilm på oversiden. Platen stod på benken til inkubasjon i én time før den ble talt ved hjelp av lysat/ASM-programmet på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter. Brettene ble tatt ut av telleren så fort de tellingen var ferdig, da det kunne bli lekkasje i filtrene.

## **2.6 Bradfords metode for proteinmåling**

Marion Bradford utviklet i 1976 en metode for kvantifisering av protein [89]. Metoden baserer seg på at Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter farge fra rødt til blått når det binder seg til protein. Det skjer også et skifte i absorpsjonsmaksimumet til fargestoffet, fra 365 til 595 nm, og det er dette absorpsjonsmaksimumet som måles [89].

Cellebrett med fryste, lyserte celler og ferdiglagde standarder med bovint serumalbumin (BSA) ble satt i varmeskap som holdt 37°C med 5 % CO<sub>2</sub> for tining. BSA-standardene hadde konsentrasjonene 0, 5, 10, 20, 40, 80 og 160 µg/ml. Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate ble fortynnet med destillert vann i fortynningsgraden 1:5. 50 µl av de lyserte cellene ble tilsatt i hver brønn i en 96-brønners mikrotiterplate. Her ble kolonne 3-12 brukt. I kolonne 1 og 2 ble det tilsatt 50 µl av de ulike BSA-standardene. Det ble tilsatt to paralleller av hver standard. 200 µl av Bio-Rad løsningen ble tilsatt hver brønn, og dette stod til inkubering i romtemperatur i 5 minutter før brettet ble talt på Victor<sup>™</sup> X4 fra PerkinElmer.

## **2.7 Test av ulike coatinger**

Her ble tre ulike coatinger i flasker sammenlignet for å se på hvordan muskelcellene vokste i ulike betingelser. Dette forsøket ble utført fordi det tidligere hadde vært tidvise problemer

med å få cellene til å vokse jevnt og konfluent nok. Det ble brukt to Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> 25cm<sup>2</sup>-flasker, to NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flasker og to NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flasker som var coatet med ekstracellulær matriks (ECM). Coatingen ble laget ved å tine opp ECM fortynnet i ”Dulbecco’s Modified Eagle medium” (DMEM) (i forholdet 5:75) i romtemperatur. Så ble 1 ml ECM blandet med 4 ml DMEM m/ GLUTAMAX. 2,5 ml av denne blandingen ble tilsatt hver av de to flaskene som skulle coats, og dette ble så sugd av etter at det hadde stått en liten stund i benken. Flaskene lufttørket i benken til de var helt tørre. Cellene ble her dyrket opp på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.4, slik at det tilslutt ble dannet flerkjernede myotuber. Her ble det istedenfor cellebrett brukt ulike flasker, og et celletall på 300 000 celler/ml. Det ble brukt et volum på 3 ml totalt i celleflaskene. Etter 24 timer ble utsåingsmediet byttet ut med proliferasjonsmedium, og etter ca 7 dager ble dette mediet byttet ut med differensieringsmedium. I dette forsøket ble det brukt én donor med celleprøver fra før og etter treningsintervensjonen. Det ble tatt bilder underveis for å dokumentere veksten av muskelcellene i de ulike flaskene. Denne evnen flaskene og coatingen hadde til å dyrke opp celler ble undersøkt med Olympus CKX41 mikroskop og bildene ble tatt med digitalkamera.

## 2.8 Test av ulike proliferasjonsmedier

For å undersøke hvordan cellene vokste i ulike proliferasjonsmedier ble cellene sådd ut på samme måte som i avsnitt 2.4. Her ble det brukt tre Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup>-brett med 96 brønner. Det ble brukt et celletall på 7000 celler/brønn. Etter 24 timer i utsåingsmedium, ble det byttet til proliferasjonsmedium. Det ene brettet fikk standard proliferasjonsmedium, det andre brettet et alternativt proliferasjonsmedium, mens det siste brettet fikk alternativt proliferasjonsmedium uten bFGF. Se appendiks, avsnitt 3.1-3, for innholdsstoffer i de ulike proliferasjonsmediene. Når cellene var 80-90 % konfluente ble proliferasjonsmediet byttet ut med differensieringsmedium. Alle brettene fikk samme differensieringsmedium. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble det utført forsøk på cellene. Det ble utført substratoksidasjonsforsøk, proteinmåling, CA og lipidfiltrering på brettene. Det ble fulgt samme prosedyrer som beskrevet i avsnitt 2.5 og 2.6. Tabell 2.5 viser oppsettet som ble brukt til dette forsøket. Cellene var dyrket opp i kolonne 4-9, og det ble brukt celler fra etter trening fra en donor i kontrollgruppen. Det ble brukt ”Dulbeccos” fosfatbufret saltvann (DPBS) i kolonnene som ikke hadde celler fordi det var ønskelig å undersøke om mediet fluktuerte. De

4 siste dagene før substratoksidasjonsforsøket ble cellene i kolonne 5 og 8 forbehandlet med 10 nM GW501516.

**Tabell 2.5: Oppsett for test av ulike proliferasjonsmedier.** Cellene ble dyrket opp i kolonne 4-9. Det ble tilsatt DPBS i kolonne 1-3 og 10-12 for å undersøke om mediet fluktuerte. 10 nM GW501516 ble tilsatt cellene 4 dager før substratoksidasjonsforsøket. 1  $\mu\text{M}$  FCCP ble tilsatt samme dag som forsøket ble utført, på grunn av at den er lyssensitiv. DPBS, Dulbecco's fosfatbufret saltvann; OA, oljesyre som her var radioaktiv; GW, GW501516; FCCP, "carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone".

Rad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A-H	DPBS	DPBS	DPBS	100 $\mu\text{M}$ OA	100 $\mu\text{M}$ OA + 10 nM GW	100 $\mu\text{M}$ OA + 1 $\mu\text{M}$ FCCP	100 $\mu\text{M}$ OA	100 $\mu\text{M}$ OA + 10 nM GW	100 $\mu\text{M}$ OA + 1 $\mu\text{M}$ FCCP	DPBS	DPBS	DPBS

## 2.9 Westernblotting

Metoden som brukes til å identifisere, kvantifisere og bestemme størrelsen av spesifikke proteiner kalles westernblotting. Metoden kalles også immunoblotting eller proteinblotting. Denaturerte proteiner separeres med gel elektroforese, og overføres til en membran. Proteinene kan så påvises ved å bruke spesifikke antistoffer [90]. Alle løsninger og blandinger brukt i denne metoden er listet opp i appendiks, avsnitt 4.1-4.

### 2.9.1 Utsåing til westernblot

Cellene ble dyrket opp på samme måte som beskrevet i avsnitt 2.4, bortsett fra at cellene ble dyrket opp i NUNC 25  $\text{cm}^2$ -flasker. Det ble brukt et celletall på 300 000 celler/ml og et totalvolum på 3 ml. Det ble det dyrket opp to flasker per donor, på grunn av at den ene flasken skulle forbehandles med 100 nM insulin. Etter 24 timer så ble det byttet til proliferasjonsmedium, og etter 7 dager ble det byttet til differensieringsmedium. Da hadde cellene blitt 80-90 % konfluente.



### **2.9.2 Høsting av celler**

Etter at cellene hadde stått i differensieringsmedium i 7 dager, ble cellene høstet. Differensieringsmediet ble så sugd av flaskene, og det ble tilsatt 3 ml med differensieringsmedium. Den ene av de to flaskene fikk differensieringsmedium hvor 100 nM insulin var tilsatt, mens den andre fikk differensieringsmedium uten insulin. Flaskene ble så satt i en inkubator som holdt 37 °C med 5 % CO<sub>2</sub> i nøyaktig 15 minutter før de ble hentet ut igjen og satt på is. Dette ble gjort for å stoppe insulinprosessen. Det ble så vasket to ganger med 2 ml iskald PBS. Etter siste vasking ble alle rester av PBS i flaskene sugd av nøye, det skulle ikke være igjen noen rester av PBS i flaskene som kunne reagere med høstebufferen. Så ble 150 µl høstebuffer tilsatt hver flaske, før flaskebunnen ble skrapet av og væsken pipettert over i et eppendorfrør. Høstebufferen inneholdt SDS, som denaturerte proteinene og gjorde dem negativt ladet. Høstebufferen inneholdt også fosfatasehemmere og en proteasehemmer, som hindret degradering av proteinene. Eppendorfrørene ble så kokt ved 100 °C i 5 minutter, og videre ble 2 µl av hvert eppendorfrør tatt ut til proteinmåling på NanoDrop™ Lite spektrofotometer. Her ble mg/ml programmet brukt, og høstebufferen ble brukt som blankprøve (1 µl). Etter at alle prøvene hadde blitt målt, ble sokkelen rengjort med deionisert vann. Her ble 3 µl deionisert vann applisert på sokkelen, spaken ble senket og slik stod det i 2-3 minutter før vannet ble fjernet med en tørr og lofri "lab-wipe". Eppendorfrørene ble så tilsatt 10 % β-merkaptøetanol (15 µl) og 5 % bromfenolblått (7,5 µl). β-merkaptøetanol ble brukt for å bryte opp disulfidbindingene i proteinene, mens bromfenolblått farget prøvene blå. Eppendorfrørene ble deretter kokt i 5 minutter ved 100 °C, før de ble satt i en fryser som holdt -20 °C.

### **2.9.3 Elektroforese**

Alle prøvene ble fortynnet med høstebuffer slik at de hadde en proteinkonsentrasjon på 1,2 mg/ml. I elektroforesen ble det brukt Criterion TGX 10 % separasjonsgeler. Disse gelene inneholder 10 % akrylamid, og brukes til proteiner med en molekylvekt på 30 til 80 kDa. Gelene ble pakket ut og tapen i bunnen ble fjernet. Gelene ble så satt i en Criterion™ Cell elektroforeseboks, og det lille kammeret ble fylt opp med 1x Runningbuffer. Kammen som danner prøvebrønnene i polyakrylamidgelene ble trukket forsiktig ut. Markøren som ble brukt het Precision Plus Standard Blu, og 10 µl av denne ble tilsatt brønn nummer en. Det ble tilsatt 12 µl av hver prøve til de andre brønnene. 1x Runningbuffer ble tilsatt på utsiden til et merke ble nådd. PowerPac™ HC power supply ble festet til elektroforeseboksen og

elektroforesen ble gjennomført på 200 volt i 50 minutter. Bunnen på elektroforeseboksen var positivt ladet. Proteinene, som var negativt ladet, vandret derfor gjennom gelen. Proteinene ble separert etter molekylvekt.

#### **2.9.4 Blotting**

De separerte proteinene ble overført til en membran etter at elektroforesen var ferdig. En polyvinylidendifluorid-(PVDF)-membran (Immobilon<sup>®</sup>-P Transfer Membrane, millipore 0,45 µM) ble først dyppet i metanol i 15 sekunder, i H<sub>2</sub>O i 5 minutter og i transferbuffer (25nM Tris/192mM Glycin/10% Metanol) i 10-15 minutter. Gelen ble så ekvilibrert med denne membranen i transferbuffer på et StuartScientific Gyro-Rocker Modell SSL3 vippebord, etter elektroforesen. En sandwichholder ble åpnet og plassert med den røde siden ned i et kar med kald transferbuffer. Membranen og gelen ble lagt mellom fiberpad og filterpapir på begge sider. Her var det viktig å unngå luftbobler, både under montering av sandwichholder og mellom de ulike lagene. Denne sandwichen ble så montert i en Criterion<sup>™</sup> Blotter sammen med magnet og isblokk. Transferbuffer ble fylt opp til merket, og blottingen foregikk ved 100 volt i 30 minutter. Proteinene ble her overført til membranene. Etter blotting ble membranene vasket med PBS 0,1 % Tween-20, pH 7,4 (PBS-T) i 3 x 10 minutter. Dette foregikk på vippebordet som også alt av videre vask og inkubering foregikk på etter dette.

#### **2.9.5 Blokking og påsetting av antistoff**

Membranene ble blokket i en løsning med 5 % skummet melk og PBS-T i 2 timer i romtemperatur, for å hindre uspesifikk binding mellom membranen og antistoffet. For å fjerne overskudd av melk, ble membranene vasket med PBS-T i 2 x 30 sekunder etter blokkinga. Membranene ble inkubert med primært antistoff over natten i kjøleskap på Orbital rotator, 50 sykluser/minutt. De primære antistoffene som ble brukt var fosfo-Akt (Ser473) og fosfo-glykogen-syntase (Ser641). Dagen etterpå ble membranene vasket med PBS-T i 6 x 10 minutter for å fjerne antistoff som ikke hadde bundet seg. Membranene ble så inkubert med sekundært antistoff i 60 minutter i romtemperatur. Det sekundære antistoffet var Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody i 1:20 000 fortyning. Membranene ble vasket i 6 x 10 minutter med PBS-T for å fjerne ubundet antistoff.

### **2.9.6 Fremkalling**

750 µl av reagens 1 og 750 µl av reagens 2 ble blandet sammen for hver membran som skulle fremkalles. Reagens 1 inneholdt SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Stable Peroxide Buffer, mens reagens 2 inneholdt SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Luminol/Enhancer Solution. Membranene ble inkubert med denne reagensblandingen i 5 minutter i mørke. Membranene ble så plassert i en ChemiDoc MP gel Imaging System og blotene ble kvantitert. Den ”chemilumineserende” agensen ble kløyyet av ”horseradish-peroxidase” (HRP) som var bundet til det sekundære antistoffet. Det ble frigjort luminesens som detekteres, og dette var relatert til mengden protein.

### **2.9.7 Stripping**

Det var også ønskelig å undersøke de primære antistoffene glykogen syntase (GS-total) i fortynning 1:10000 og total Akt i fortynning 1:1000. Da ble det brukt en metode som kalles ”stripping”. Her ble antistoffene som allerede var bundet til membranene først fjernet, slik at blottet kunne brukes på nytt. Etter at membranene hadde blitt fremkalt ble de vasket i 3 x 5 minutter med PBS-T. Membranene ble så inkubert i 30 sekunder med strippingbuffer i romtemperatur, og deretter 2 x 3 minutter i et varmeskap som holdt 37 °C. Karet med membranene ble ristet mellom inkuberingene. Membranene ble så vasket i 5 x 10 minutter i PBS-T og blokket i 5 % skummet melk i 30 minutter. Etter blokkingen ble membranene vasket i 2 x 30 sekunder i PBS-T. Sekundært antistoff ble så tilsatt membranene, og inkubert i 60 minutter. Her ble samme sekundære antistoff som i avsnitt 2.9.5 brukt. Membranene ble deretter vasket i 3 x 5 minutter med PBS-T. Membranene ble videre fremkalt for å se at ikke de primære antistoffene fortsatt var bundet til membranen. Det ble brukt samme fremkallingsprosedyre som i avsnitt 2.9.6. Deretter ble membranene vasket 6 x 10 minutter i PBS-T, før de nye primære antistoffene ble tilsatt. Så ble samme prosedyre som i avsnitt 2.9.5 til 2.9.6 fulgt på nytt. Blotene ble kvantitert ved hjelp av ChemiDoc MP gel Imaging System. For å komme frem til hvor stor andel av Akt som ble fosforylert, ble fosforylert Akt, delt på total Akt. Deretter ble verdiene for insulin delt på basal. Det samme ble gjort for glykogen syntase.

## 2.10 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon, qPCR, kalles også real-time revers-transkriptase-PCR. Dette er en kvantitativ PCR-metode for å måle endringer i ekspresjonen av mRNA. Reaksjonsblandinger og løsninger brukt i forbindelse med metoden er oppgitt i appendiks avsnitt 5.1-5.

### 2.10.1 Utsåing av celler til qPCR

Cellene ble her dyrket opp på samme måte som i avsnitt 2.4, bortsett fra at cellene ble dyrket opp i NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flasker. Det ble brukt et celletall på 300 000 celler/ml, og et totalvolum på 3 ml.

### 2.10.2 Høsting av celler til qPCR

Når cellene hadde vært i differensieringsmediet i ca. én uke og blitt differensiert til flerkjernede myotuber, ble de høstet. Flaskene ble vasket to ganger med 2 ml PBS uten Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup>. Det ble så tilsatt 500 µl lysisbuffer fra Agilent. Det ble brukt PBS uten Ca<sup>2+</sup> og Mg<sup>2+</sup> fordi det var ønskelig å unngå at lysisbufferen reagerte med saltene. Overflaten på flaskene ble så skrapt med en celleskrape, slik at cellene løsnet. Innholdet i flasken ble deretter overført til et merket eppendorfrør, og dette røret ble lagt i en fryser som holdt -80 °C. Celleskraperen ble vasket med PBS mellom hver gang den ble brukt på en ny donor.

### 2.10.3 RNA-isolering

Eppendorfrørene med cellehomogenat ble tatt opp av fryseren og satt på en varmeblokk som holdt 37 °C i 15-20 minutter. Cellehomogenatet ble så sentrifugert gjennom en mini-prefiltrasjonskolonne ved 16 000 x g i 3 minutter. Det ble tilsatt et tilsvarende volum (500 µl) av 70 % etanol til filtratet. Dette ble blandet godt og inkubert i romtemperatur i 5 minutter. Blandingen ble så overført til en mini-isolasjonskolonne og sentrifugert ved 16 000 x g i 30 sekunder. Dette ble gjort i to omganger, fordi kolonnen maksimalt kunne romme 700 µl. Filtratet ble kastet mellom hver sentrifugering. Kolonnen ble så vasket to ganger med vaskeløsning, her ble det også sentrifugert ved 16 000 x g i 30 sekunder, og filtratet ble kastet etter hver sentrifugering. Kolonnen ble så tørket ved å sentrifugere ved 16 000 x g i 2 minutter. Kolonnen ble videre overført til et samlingsrør og 20 µl nukleasefritt vann ble tilsatt. Kolonnen ble så inkubert i romtemperatur i 1 minutt, og deretter sentrifugert ved 16

000 x g i 1 minutt. Isolert RNA ble oppbevart i en fryser som holdt -80 °C før senere cDNA-syntetisering.

#### **2.10.4 Kvantifisering av RNA-konsentrasjon i prøven**

Før kvantifiseringen ble alle prøvene sonikert i ca 20 sekunder. Prøvene stod på is under sonikeringen, fordi det ble utviklet mye varme. For å kvantifisere RNA-konsentrasjonen i prøven ble det brukt NanoDrop™ Lite spektrofotometer, og det ble målt absorbans ved 260 nm. Først ble det etablert en blankprøve basert på nukleasefritt vann. 1 µl nukleasefritt vann ble da applisert på nedre sokkel av spektrofotometeret. Så ble 1 µl av prøvene applisert på sokkelen, og konsentrasjon og renhet ble notert. Etter at alle prøvene hadde blitt målt, ble sokkelen rengjort med deionisert vann. Her ble 3 µl deionisert vann applisert på sokkelen, spaken ble senket og slik stod det i 2-3 minutter før vannet ble fjernet med en tørr og lofri ”lab-wipe”.

#### **2.10.5 cDNA-syntetisering**

En komplementær DNA-kopi, cDNA, av RNA-prøven, kan lages ved å bruke enzymet revers transkriptase [91]. Et volum tilsvarende  $\leq 1$  µg RNA ble tatt ut av hver prøve, og overført til et MicroAmp® mini-ependorfrør. Nukleasefritt vann ble tilsatt, slik at totalvolumet ble 13,2 µl. Hver prøve ble tilsatt 6,8 µl reaksjonsblanding og satt i Thermal Cycler 2720 for cDNA-syntetisering. Ferdig syntetisert cDNA ble lagret ved -20 °C. Kittet som ble brukt var TaqMan Reverse Transcription Reagents, og betingelsene for syntesen var eksponering i 10 minutter ved 25 °C for heksamertemplat priming. Eksponering videre ved 37 °C for revers transkripsjon, og til slutt eksponering ved 80 °C for inaktivering av revers transkriptase.

#### **2.10.6 qPCR**

cDNA kan amplifiseres ved å bruke PCR [91], og i denne oppgaven ble qPCR brukt. For å lage cDNA-miks ble det tatt ut 2 µl av hver prøve. Denne ble fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann for å lage standard 1000, denne ble igjen fortynnet 1:2 for å lage standard 500. Standard 500 ble videre fortynnet 1:2 for å lage standard 250, som igjen ble fortynnet 1:2 for å lage standard 125. Disse standardene dannet grunnlaget for standardkurven som ble brukt til å beregne mengden amplifisert cDNA. Prøvene ble fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann. Nukleasefritt vann ble også brukt som en negativ kontroll. 2,5 µl av standardene, prøvene og

den negative kontrollen ble overført til en MicroAmp<sup>®</sup> Optical Reaction Plate. Det ble laget en reaksjonsblanding med primere (SYBR green PCR mix) og 22,5 µl av denne blandingen ble tilsatt brønnene. SYBR Green binder seg uspesifikt til dobbeltrådig DNA og det dannes fluoresens som kan måles [91]. Brettet ble videre satt inn i ABI PRISM 7000. Genene som det ble testet for i dette forsøket er oppgitt i tabell 2.6. De endogene kontrollene 36B4 og GAPDH ble brukt som referansegener. Disse ble brukt til å korrigere for variable totale mengder RNA for hver prøve.

**Tabell 2.6: Oversikt over primere som ble benyttet i qPCR-forsøket.** PDK4, pyruvat dehydrogenasekinase isoenzym 4; Angptl4, angiopoietinlignende protein 4; PLIN2, perlipin 2; CD36, "cluster of differentiation" 36; PGC1 $\alpha$ , peroksisomproliferator-aktivert reseptor  $\gamma$  koaktivator-1 $\alpha$ ; Cyc1, cytokrom c-1; PPAR $\delta$ , peroksisomproliferator-aktivert reseptor  $\delta$ ; IL-6, interleukin 6; 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; GAPDH, glyserylaldehyd-3-fosfat-dehydrogenase; F, forward; R, reverse.

Gener	Genbanknummer	Primere
PDK4	BC040239	F: 5'-TTTCCAGAACCAACCAATTCACA-3' R: 5'-TGCCCGCATTGCATTCTTA-3'
Angptl4	NM139314	F: 5'-CCTCCGCAGGGACAAGAA-3' R: 5'-GTGGGATGGAGCGGAAGTACT-3'
PLIN2	NM001122	F: 5'-GGTGATGGCAGGCGACAT-3' R: 5'-TAGAAGTGAGGAGGCTGTCAGACA-3'
CD36	L06850	F: 5'-AGTCACTGCGACATGATTAATGGT-3' R: 5'-CTGCAATACCTGCCTTTTCTCAA-3'
PGC1 $\alpha$	NM013261.3	F: 5'-AAAGGATGCGCTCTCGTTCA-3' R: 5'-TCTACTGCCTGGAGACCTTGATC-3'
Cyc1	NM001916	F: 5'-CTGCCAACAACGGAGCATT-3' R: 5'-CGTGAGCA36AGGGAGAAGACGTA-3'
PPAR $\delta$	BC002715	F: 5'-AGCATCCTCACCGGCAA-3' R: 5'-ATGTCTCGATGTTCGATGTCGTGGATAC-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'-TGCACCACCCTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

## 2.11 Statistikk

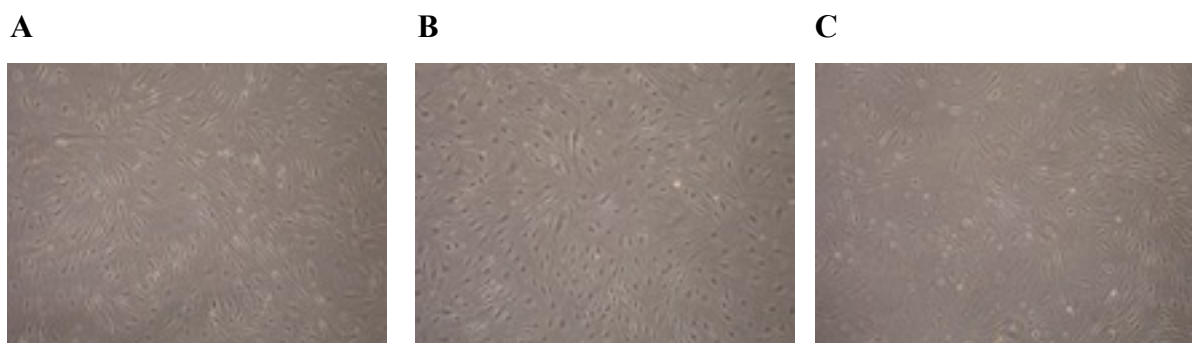
I denne oppgaven ble dataprogrammet GraphPad Prism 6 for Mac benyttet til alle statistiske analyser. Det ble benyttet en paret parametriske  $t$ -test og en paret ikke-parametriske  $t$ -test ("Wilcoxon matched-pairs signed rank" test). I substratoksidasjonsforsøkene ble det brukt 8-16 paralleller, og gjennomsnittsverdien ble beregnet ut i fra disse. Gjennomsnittet  $\pm$  SEM (standardfeil til gjennomsnittet) er presentert for samtlige data i denne oppgaven. Det ble benyttet et signifikansnivå på 5 % ( $\alpha=0,05$ ).

GraphPad Prism 6 for Mac ble også benyttet i korrelasjonsanalysene. Her ble Pearsons test for korrelasjon og Spearmans test for korrelasjon benyttet. Pearsons test for korrelasjon tar utgangspunkt i at dataene er normalfordelte, mens i Spearmans test for korrelasjon antas det at dataene ikke er normalfordelte. Korrelasjonsanalysene er basert på resultater fra 6 donorer. I korrelasjonsanalysene ble det også benyttet et signifikansnivå på 5 % ( $\alpha=0,05$ ).

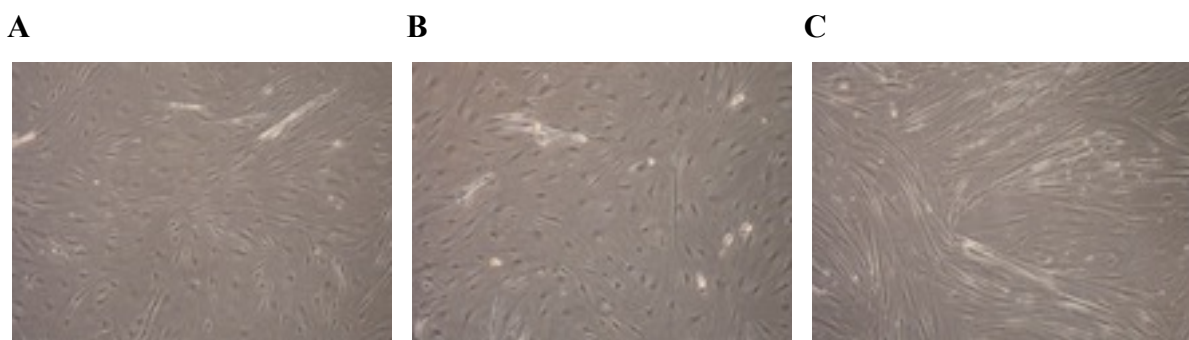
# 3 Resultater

## 3.1 Test av ulike coatinger

Det var ønskelig å undersøke ulike celleflasker med coatinger, for å se på om disse faktorene hadde betydning for oppdyrking av muskelceller. Det ble brukt dyrkede humane myotuber fra biopsier fra *musculus vastus lateralis* fra 6 av deltakerne i studien. Figur 3.1 og 3.2 viser muskelcellene etter 7 dager i differensieringsmedium, der figur 3.1 er celler fra en donor tatt før trening, mens figur 3.2 er celler fra en donor tatt etter trening.



**Figur 3.1: Bilder av muskelcellene etter 7 dager i differensieringsmedium.** A) Corning® CellBIND® 25cm<sup>2</sup>-flaske. B) NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske. C) NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske coatet med ECM. Alle bildene er tatt med 4x forstørring. Alle cellene er fra biopsier tatt før trening.



**Figur 3.2: Bilder av muskelcellene etter 7 dager i differensieringsmedium.** A) Corning® CellBIND® 25cm<sup>2</sup>-flaske. B) NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske. C) NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske coatet med ECM. Alle bildene er tatt med 4x forstørring. Alle cellene er fra biopsier tatt etter trening.

Observasjoner med lysmikroskopi viste at det var store variasjoner mellom hvor jevnt og konfluent muskelcellene vokste i de ulike flaskene med coatingene. Det så ut som celler isolert fra biopsier tatt før trening vokste best i NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske (figur 3.1), mens celler isolert fra biopsier tatt etter trening vokste best i NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flaske som var coatet med

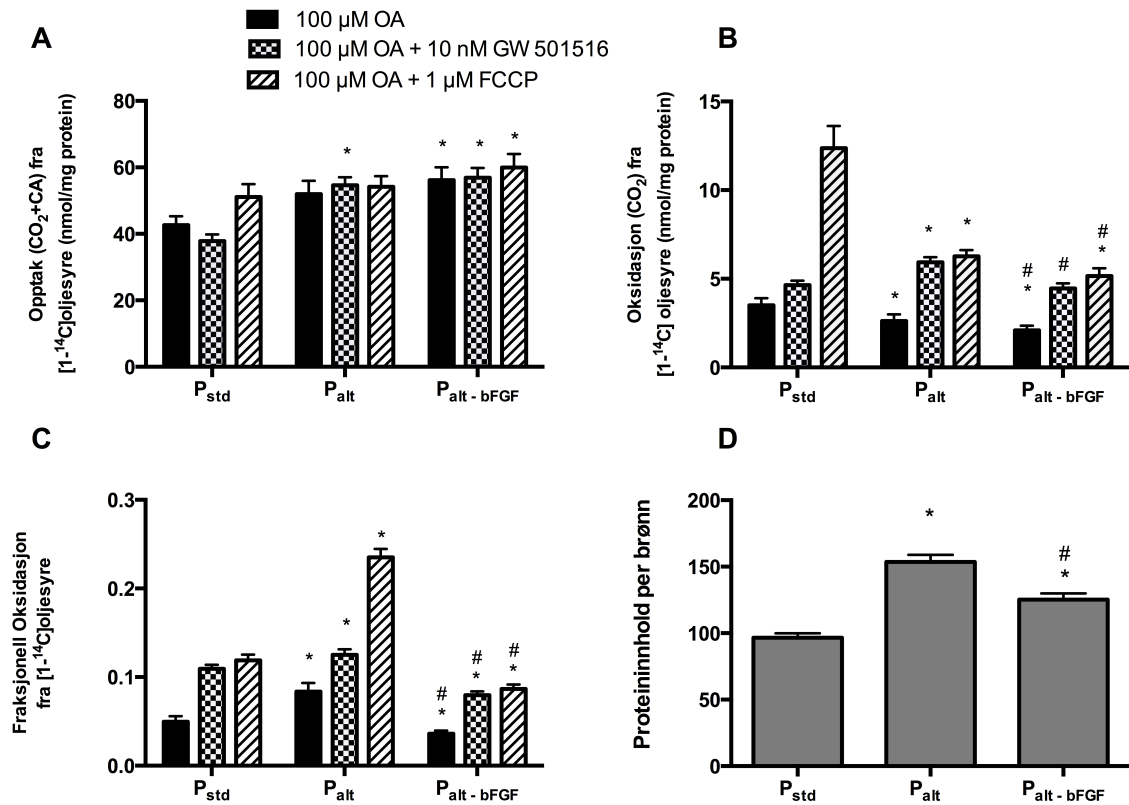


ECM (figur 3.2). Her ble det dannet lange og fine muskelfibre. I Corning<sup>®</sup> CellBIND<sup>®</sup> 25cm<sup>2</sup>-flaske var det flere fibroblaster tilstede. Det kan konkluderes med at det var ingen betydelige forskjeller mellom de tre flaskene. I qPCR- og westernblottingen i denne oppgaven ble det brukt NUNC 25 cm<sup>2</sup>-flasker coatet med ECM for noen av donorene. Det gjenstår å undersøke hvordan de ulike flaskene med coating spiller inn på resultater i substratoksidasjonsforsøk.

## 3.2 Test av ulike proliferasjonsmedier

Ulike proliferasjonsmedier ble utprøvd for å undersøke hvordan cellene vokste i de ulike mediene. De ulike proliferasjonsmediene var standard proliferasjonsmedium, alternativt proliferasjonsmedium og alternativt proliferasjonsmedium uten bFGF. Se appendiks, avsnitt 3.1-3 for innholdstoffene i de ulike proliferasjonsmediene. Ved hjelp av lysmikroskopi ble det konstatert at cellene i brettet med alternativt proliferasjonsmedium vokste raskest. Alle brettene fikk likevel differensieringsmedium samme dag, på grunn av praktiske årsaker.

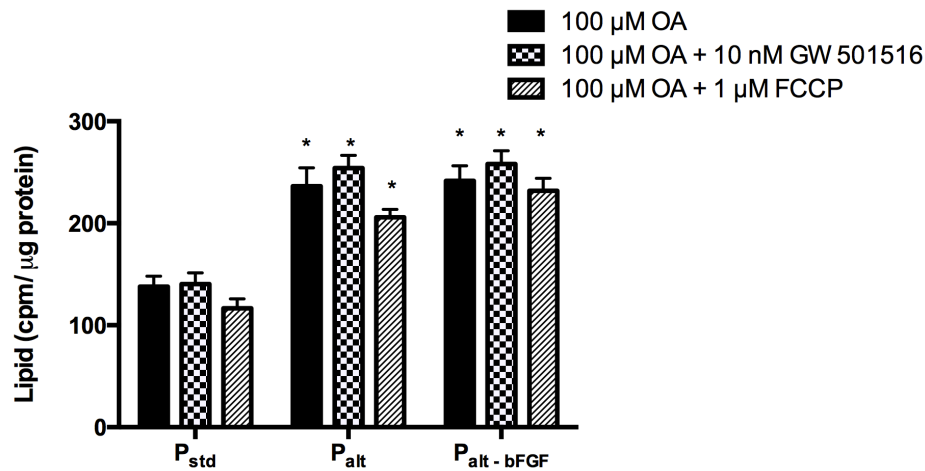
Opptak (CO<sub>2</sub>+CA), oksidasjon (CO<sub>2</sub>) og fraksjonell oksidasjon (CO<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>+CA) av radiomerket oljesyre ([1-<sup>14</sup>C]oljesyre) ble målt for alle brettene, og resultatene er fremstilt i figur 3.3. GW501516 er en selektiv PPAR $\delta$ -agonist, som har vist seg å øke oljesyreoksidasjonen hos mennesker [55]. FCCP er en mitokondriell frikobler. Mitokondrielle frikoblere transporterer protoner inn til mitokondrienes matrix, uavhengig av ATP-syntase, og det oppnås en redusert dannelse av reaktive oksygenspesier og en økt mitokondriell respirasjon. Mitokondrielle frikoblere er svake syrer. En depolarisering av plasmamembranen, cytotoxicitet og mitokondriell hemming er uønskede effekter av FCCP [92].



**Figur 3.3: Effekt av ulike proliferasjonsmedier på opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av oljesyre, samt på proteininnhold per brønn.** På forsøksdagen ble myotubene inkubert med 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt i 4 timer. 10 nM GW501516 ble tilsatt noen av myotubene 4 dager før selve forsøket. På forsøksdagen ble 1  $\mu\text{M}$  FCCP tilsatt noen av myotubene akutt i 4 timer. OA, oljesyre; FCCP, carbonylcyanid p-trifluormethoxyphenylhydrazone; P<sub>std</sub>, standard proliferasjonsmedium; P<sub>alt</sub>, alternativt proliferasjonsmedium; P<sub>alt-bFGF</sub>, alternativt proliferasjonsmedium uten bFGF. A) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2 + \text{CA}$ ) for alle brettene. B) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) for alle brettene. C) Fraksjonell oksidasjon av oljesyre ( $\text{CO}_2 / \text{CO}_2 + \text{CA}$ ) for alle brettene. D) Proteininnhold per brønn for alle brettene. \* =  $p < 0,05$  i forhold til samme behandling med standard proliferasjonsmedium. # =  $p < 0,05$  i forhold til samme behandling med alternativt proliferasjonsmedium. Her er det brukt en paret parametrisk  $t$ -test. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM. Her er det brukt 16 paralleller av hver behandling.

Det var ingen betydelige forskjeller mellom de tre brettene. Man ser i figur 3.3 at det var et høyere proteininnhold i brettet med alternativt proliferasjonsmedium. Dette gjenspeiler seg også i at de vokste raskere. Det ble observert en signifikant økt oljesyreoksidasjon hos de cellene som ble inkubert med 10 nM GW501516 i 4 dager eller ble tilsatt 1  $\mu\text{M}$  FCCP på forsøksdagen. Denne effekten av GW501516 og FCCP ble vist i alle behandlingene. Statistikk for dette er ikke angitt i figuren. Det ble benyttet paret parametrisk  $t$ -test.

Det ble også utført lipidfiltrasjon på cellelysatenes for å undersøke akkumuleringen av oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene. Lipidene binder seg til den hydrofobe membranen i filterbrettet, og deretter kan radioaktivitetsmengden til de akkumulerte lipidene måles. Figur 3.4 viser resultatene fra lipidfiltrasjonsforsøkene.



**Figur 3.4: Effekt av ulike proliferasjonsmedier på akkumulering av oljesyre i lipider i cellelysatenes.** Mengden akkumulert oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene ble målt ved å gjøre lipidfiltrasjon på cellelysatenes etter substratoksidasjonsforsøkene. OA, oljesyre; FCCP, carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazon; P<sub>std</sub>, standard proliferasjonsmedium; P<sub>alt</sub>, alternativt proliferasjonsmedium; P<sub>alt-bFGF</sub>, alternativt proliferasjonsmedium uten bFGF. \* =  $p < 0,05$  i forhold til samme behandling med standard proliferasjonsmedium. Her er det brukt en paret parametriske *t*-test. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM. Her er det brukt 16 paralleller av hver behandling.

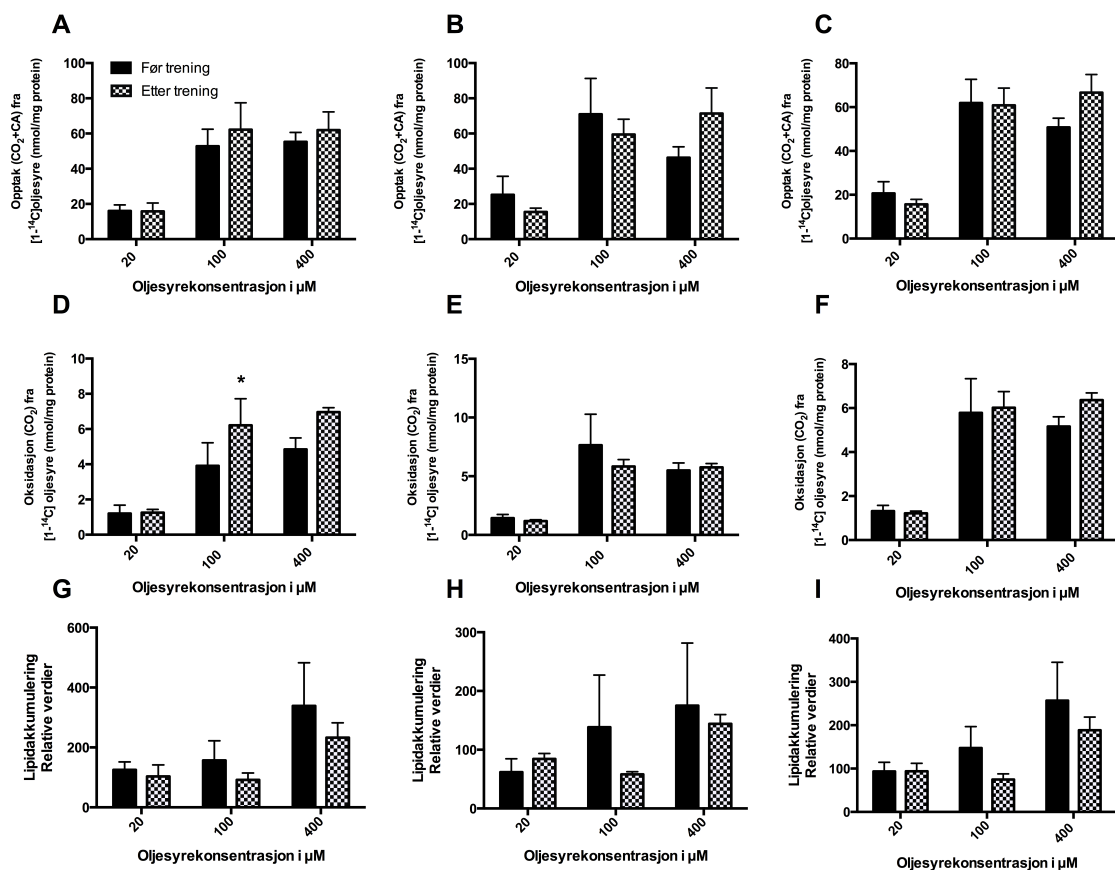
Dette forsøket viste at det egentlig ikke spiller noen stor rolle hvilket proliferasjonsmedium som brukes. Utover en litt raskere vekst av cellene i det alternative proliferasjonsmediet, var det ingen tydelige forskjeller mellom de ulike proliferasjonsmediene. Derfor brukes standard proliferasjonsmedium videre.

### 3.3 Substratoksidasjonsforsøk

Det er vist at opptaket og oksidasjonen av fettsyrer i skjelettmuskelceller øker ved trening [62], og det var ønskelig å undersøke om dette også gjelder celler dyrket etter trening, sammenlignet med celler dyrket før trening.

### 3.3.1 Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* når oljesyre tilsettes akutt

Det ble målt CO<sub>2</sub> og celleassosiert radioaktivitet (CA) fra radiomerket oljesyre ([1-<sup>14</sup>C]oljesyre) for å undersøke hvordan treningsintervensjonen hadde påvirket oljesyremetabolismen i skjelettmuskelcellene. Akkumuleringen av oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene ble også undersøkt. Figur 3.5 viser resultatene når det er tilsatt [1-<sup>14</sup>C]oljesyre akutt i konsentrasjonene 20 μM, 100 μM og 400 μM.

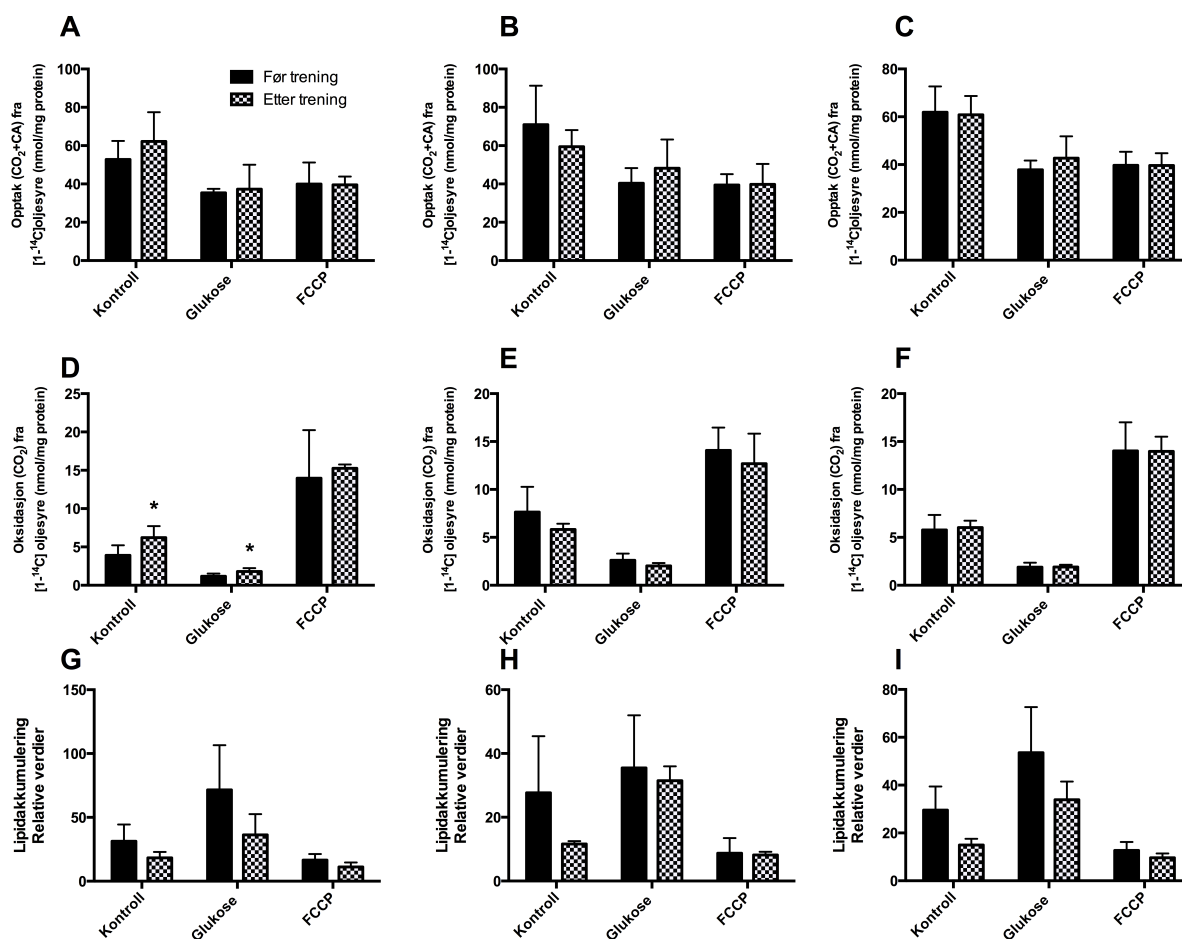


**Figur 3.5:** Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* når oljesyre tilsettes akutt. På forsøksdagen ble myotubene inkubert med enten 20 μM, 100 μM eller 400 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre akutt i 4 timer. A) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) i kontrollgruppa. B) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) i pasientgruppa. C) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. D) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) i kontrollgruppa. E) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) i pasientgruppa. F) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. G) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa. H) Akkumulering av oljesyre i lipider i pasientgruppa. I) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM for n = 6. \* = p < 0,05 i forhold til før trening. Her er det brukt paret parametriske *t*-test.

Som vist i figur 3.5 ble det observert et høyere opptak og oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre ved økende oljesyrekonentrasjon. Opptaket og oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre var høyere for konsentrasjonen på 100 μM, enn konsentrasjonen på 20 μM, men det var ikke store forskjeller på konsentrasjonene på 100 μM og 400 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre. Det ble observert en tendens til et høyere opptak og oksidasjon av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre etter treningsintervensjonen, men disse økningene var ikke statistisk signifikante, bortsett fra ved akutt behandling med 100 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i fire timer. Her ble det observert en statistisk signifikant økning i oljesyreoksidasjonen i kontrollgruppa etter trening. Akkumuleringen av oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene tenderte til å være lavere etter treningsintervensjonen, men denne reduksjonen var ikke statistisk signifikant.

### **3.3.2 Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* når oljesyre, glukose og FCCP tilsettes akutt**

Det var også ønskelig å undersøke hvordan tilsetninger av 5 mM glukose og 1 μM FCCP påvirket opptaket og oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre-, og akkumuleringen av oljesyre i lipider. Figur 3.6 viser effekten av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* når oljesyre, glukose og FCCP tilsettes akutt.



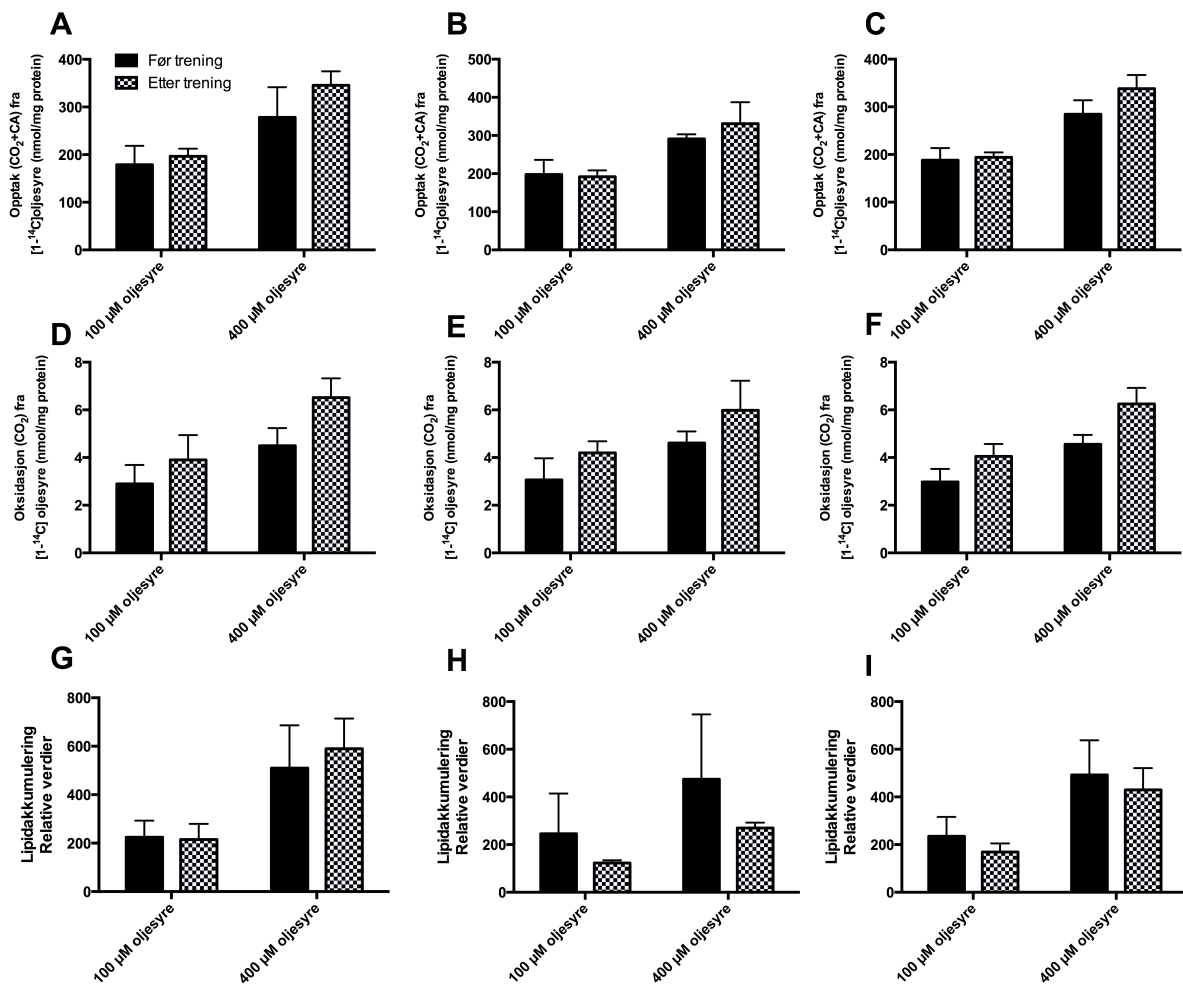
**Figur 3.6: Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* når oljesyre, glukose og FCCP tilsettes akutt.** På forsøksdagen ble myotubene inkubert med enten 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt (kontroll), 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt med 5 mM glukose (glukose) eller 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt og 1  $\mu\text{M}$  FCCP (FCCP). FCCP, carbonylcyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazine. A) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) i kontrollgruppa. B) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) i pasientgruppa. C) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. D) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) i kontrollgruppa. E) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) i pasientgruppa. F) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. G) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa. H) Akkumulering av oljesyre i lipider i pasientgruppa. I) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for  $n = 6$ . \* =  $p < 0,05$  i forhold til før trening. Her er det brukt paret parametriske *t*-test.

Som figur 3.6 viser, så observerte man ingen store endringer i opptaket av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter treningsintervensjonen. Det ble observert en økt oksidasjon av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre etter trening i kontrollgruppa. Denne økningen var statistisk signifikant ved kun 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og når 5 mM glukose ble tilsatt akutt. Oksidasjonen av  $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre var signifikant lavere når 5 mM glukose ble tilsatt, i forhold til kontrollen på 100  $\mu\text{M}$

[1-<sup>14</sup>C]oljesyre. Statistikk for dette er ikke angitt i figuren, men det gjelder når kontrollgruppa og pasientgruppa er slått sammen og for paret parametrisk *t*-test. FCCP økte, som forventet, signifikant oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre i forhold til kontrollen på 100 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre, men forskjellen mellom før og etter trening økte ikke. Statistikk for dette er ikke vist, men det gjelder når kontrollgruppa og pasientgruppa er slått sammen og for paret parametrisk *t*-test. Akkumuleringen av oljesyre i lipider tenderte til å reduseres etter treningsintervensjonen, men denne reduksjonen var ikke statistisk signifikant.

### **3.3.3 Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* ved formerking med oljesyre**

Opptaket, oksidasjonen og lipidakkumuleringen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre ble undersøkt når 100 μM og 400 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre var tilsatt 24 timer før selve forsøket skulle skje (formerking). Akkumuleringen av oljesyre i lipider ble også undersøkt. I figur 3.7 er effekten av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* ved formerking med oljesyre vist.



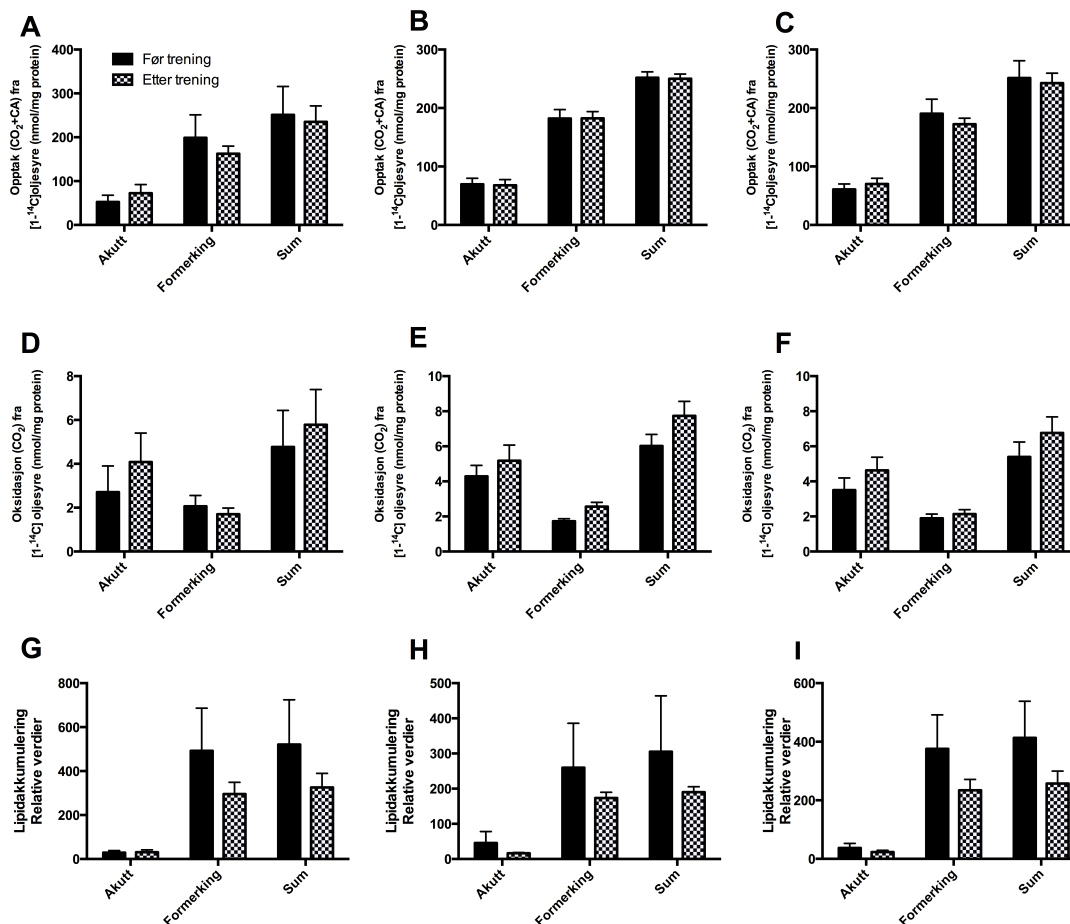
**Figur 3.7: Effekt av trening *in vivo* på oljesyremetabolismen *in vitro* ved formerking med oljesyre.** 24 timer før substratoksidasjonsforsøket ble myotubene inkubert med enten 100 μM eller 400 μM [1-<sup>14</sup>C]oljesyre. På selve forsøksdagen ble cellene inkubert i 4 timer med ikke-radioaktiv oljesyre. A) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) i kontrollgruppa. B) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) i pasientgruppa. C) Opptaket av oljesyre (CO<sub>2</sub>+CA) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. D) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) i kontrollgruppa. E) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) i pasientgruppa. F) Oksidasjonen av oljesyre (CO<sub>2</sub>) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. G) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa. H) Akkumulering av oljesyre i lipider i pasientgruppa. I) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM for n = 6.

Som vist i figur 3.7 tenderte både opptaket og oksidasjonen av begge konsentrasjonene av formerking med [1-<sup>14</sup>C]oljesyre til å øke etter treningsintervensjonen, men denne endringen var ikke statistisk signifikant. Man observerte også en tendens til at akkumuleringen av oljesyre i lipider ble redusert etter trening, men denne reduksjonen var ikke statistisk signifikant.



### 3.3.4 Effekt av trening *in vivo* på total oljesyremetabolisme *in vitro*

Den totale oljesyremetabolismen ble undersøkt ved å slå sammen tall fra substratoksidasjonsforsøkene som ble gjort ved å tilsette 1) 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre 24 timer før forsøket, og 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt på selve forsøksdagen, og 2) 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre 24 timer før forsøket, og 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre akutt på selve forsøksdagen. Akkumuleringen av oljesyre i lipider ble også undersøkt. I figur 3.8 er effekten av trening *in vivo* på total oljesyremetabolisme *in vitro* vist.

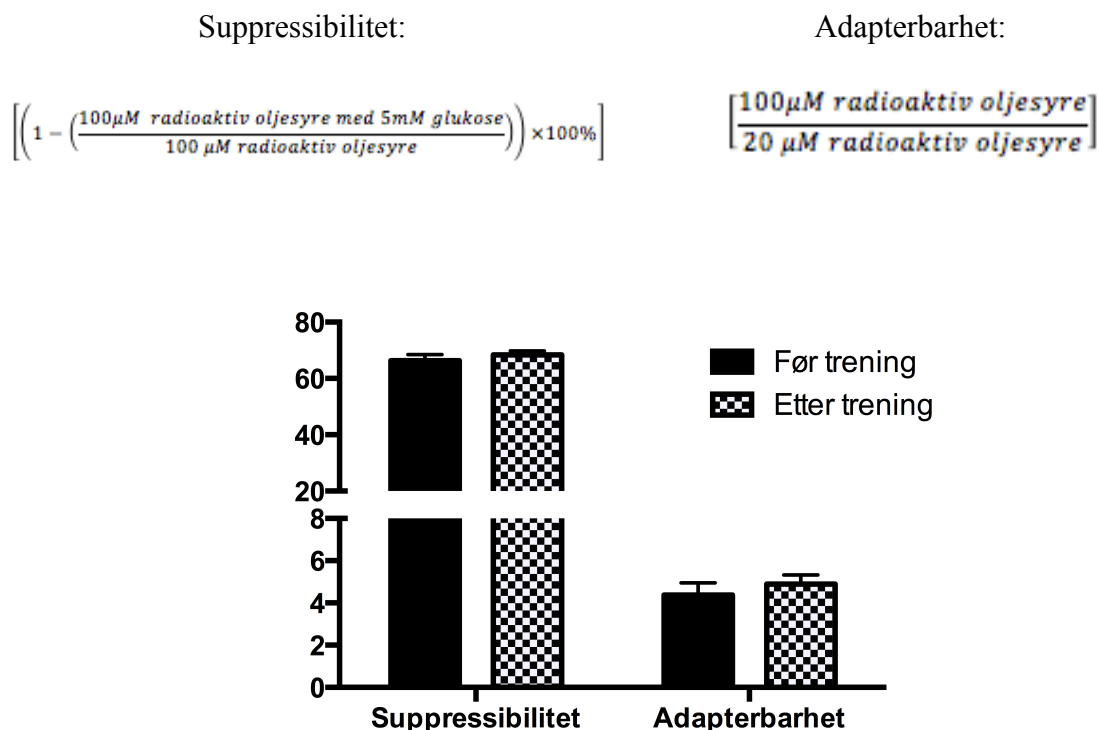


**Figur 3.8:** Effekt av trening *in vivo* på total oljesyremetabolisme *in vitro*. 24 timer før substratoksidasjonsforsøket ble myotubene inkubert med enten 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre (merket med akutt i figuren) eller 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (merket med formerking i figuren). På selve forsøksdagen ble de inkubert i 4 timer med enten 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre akutt (merket med akutt i figuren) eller 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre akutt (merket med formerking i figuren). Disse to behandlingene ble så summert. A) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) i kontrollgruppa. B) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) i pasientgruppa. C) Opptaket av oljesyre ( $\text{CO}_2+\text{CA}$ ) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. D) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) i kontrollgruppa. E) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) i pasientgruppa. F) Oksidasjonen av oljesyre ( $\text{CO}_2$ ) hos kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. G) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa. H) Akkumulering av oljesyre i lipider i pasientgruppa. I) Akkumulering av oljesyre i lipider i kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for  $n = 6$ .

Som vist i figur 3.8 er var det en tendens til at oksidasjonen av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre økte etter treningsintervensjonen, men denne økningen var ikke statistisk signifikant. Opptaket av [1-<sup>14</sup>C]oljesyre hadde en liten tendens til å gå ned etter trening, og denne reduksjonen var heller ikke statistisk signifikant. Akkumuleringen av oljesyre i lipider tenderte til å gå ned etter trening. Denne reduksjonen var ikke statistisk signifikant.

### 3.3.5 Effekt av trening *in vivo* på metabolsk fleksibilitet

For å undersøke om treningsintervensjonen hadde noen effekt på metabolsk fleksibilitet, ble parametrene suppressibilitet og adapterbarhet undersøkt. Suppressibilitet er evnen cellene har til å undertrykke fetttsyreoksidasjon når glukose tilsettes akutt. Mens cellenes evne til å øke fetttsyreoksidasjonen når det er økt tilgang på fettstyrer i kroppen kalles adapterbarhet [78]. Figur 3.9 viser effekten av trening på metabolsk fleksibilitet, ved disse to parametrene. Formler for utregning av suppressibilitet og adapterbarhet er vist under.



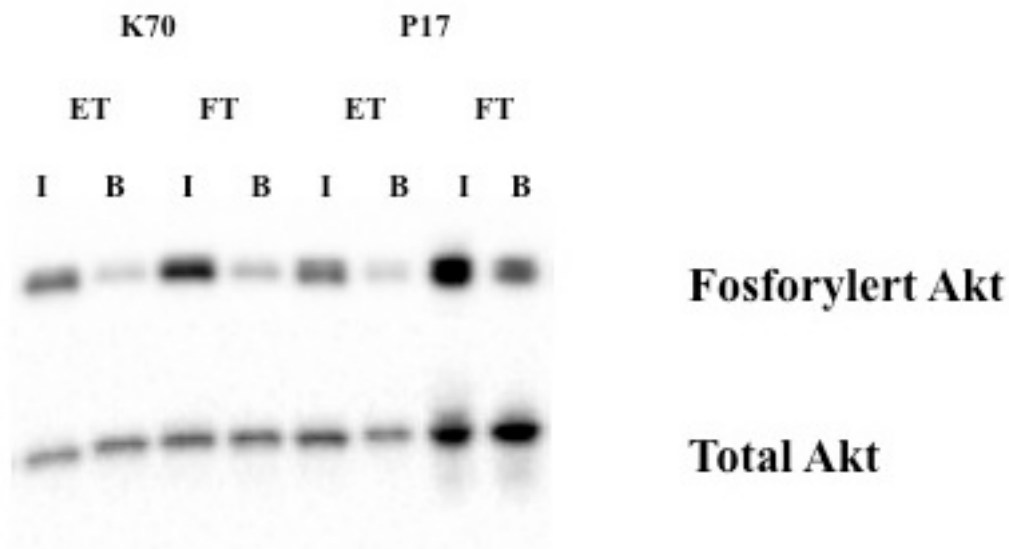
**Figur 3.9.** Effekten av trening på metabolsk fleksibilitet, ved parametrene suppressibilitet og adapterbarhet. Her er kontrollgruppa og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM for n=6.

Som vist i figur 3.9 hadde trening *in vivo* ingen effekt på de to parametrene suppressibilitet og adapterbarhet. Trening hadde dermed ingen målbar effekt på metabolsk fleksibilitet *in vitro*. Her er data presentert for kontrollgruppen og pasientgruppen samlet.

### 3.4 Effekt av trening og insulin på fosforylering av ulike proteiner involvert i glukose- og fettsyremetabolismen

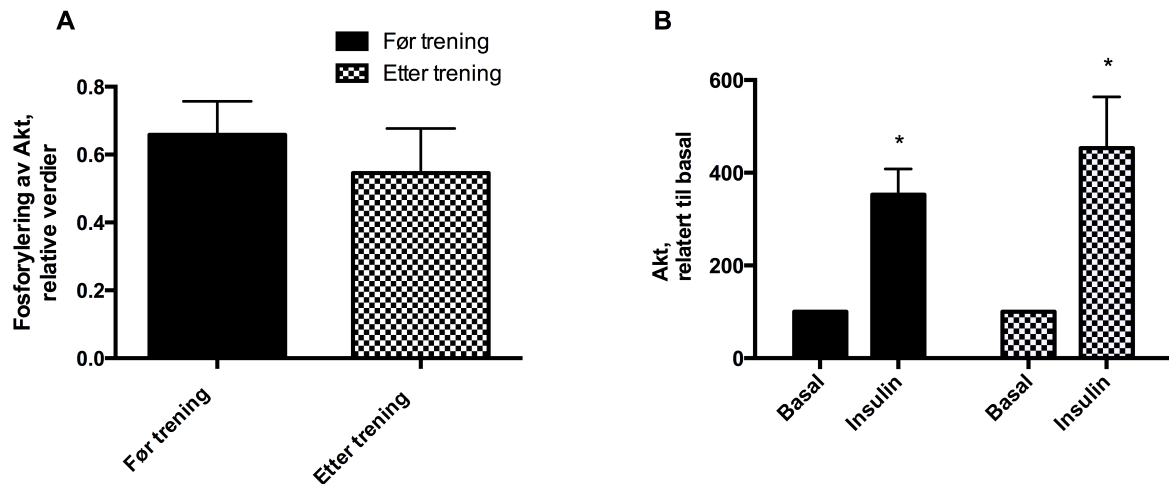
#### 3.4.1 Effekt av trening og insulin på fosforylering av Akt

For å undersøke om treningsintervensjonen endret insulinfølsomheten i cellene, ble det undersøkt om trening påvirket insulin-indusert fosforylering av Akt på serin 473 (Ser<sup>473</sup>), som er viktig for regulering av glukosetransport [48]. Det ble også undersøkt effekt av trening på ustimulert (basal) Akt-fosforylering. I figur 3.10 er det gitt et eksempel på hvordan westernblottet så ut for to av donorene. Den ene donoren var i pasientgruppa, og den andre donoren var i kontrollgruppa.



**Figur 3.10. Eksempel på westernblot for to donorer (70 og 17), før og etter treningsintervensjonen. Blottet viser effekt av trening på fosforylert og total Akt.** Etter 7 dager i differensieringsmedium ble 100 nM insulin tilsatt cellene i 15 minutter, hos de flaskene som ble behandlet med insulin. Dette ble gjort den dagen cellene ble høstet. Flaskene med basal ble kun tilsatt differensieringsmedium uten insulin. K70, donor 70 fra kontrollgruppa; P17, donor 17 fra pasientgruppa; ET, etter treningsintervensjonen; FT, før treningsintervensjonen; I, insulin; B, basal.

I figur 3.11 vises effekten av treningsintervensjonen og insulin på fosforyleringen av Akt, når flere blot tilsvarende det som vises i figur 3.10 er kvantitert.

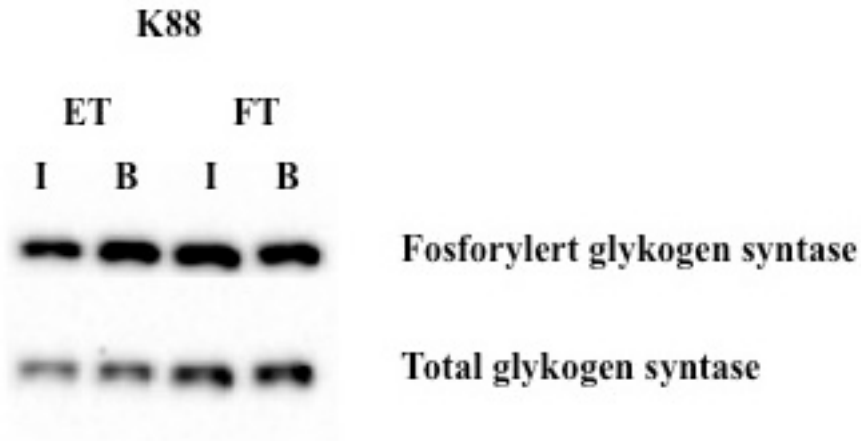


**Figur 3.11. Effekten av treningsintervensjonen og insulin på fosforyleringen av Akt.** A) Effekt av trening på fosforyleringen av Akt. For å komme frem til hvor stor andel av Akt som ble fosforylert, ble fosforylert Akt delt på total Akt. Her er bare verdiene for basal fremstilt. B) Effekt av insulin på fosforyleringen av Akt. For å komme frem til hvor stor andel av Akt som ble fosforylert, ble fosforylert Akt delt på total Akt, og deretter ble verdiene for insulin delt på basal. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for  $n=5$ . \* =  $p < 0,05$  i forhold til basal. Her er det brukt en paret parametriske  $t$ -test.

Treningsintervensjonen alene hadde som vist i figur 3.11A ingen effekt på fosforyleringen av Akt. Figur 3.11B viser som forventet den økte fosforyleringen av Akt når insulin ble tilsatt. Det var en insulinindusert fosforylering både før og etter treningsintervensjonen. Denne effekten var statistisk signifikant både før og etter treningsintervensjonen, med en tendens til økt effekt etter trening. På grunn av få donorer i dette forsøket, er pasientgruppa og kontrollgruppa slått sammen.

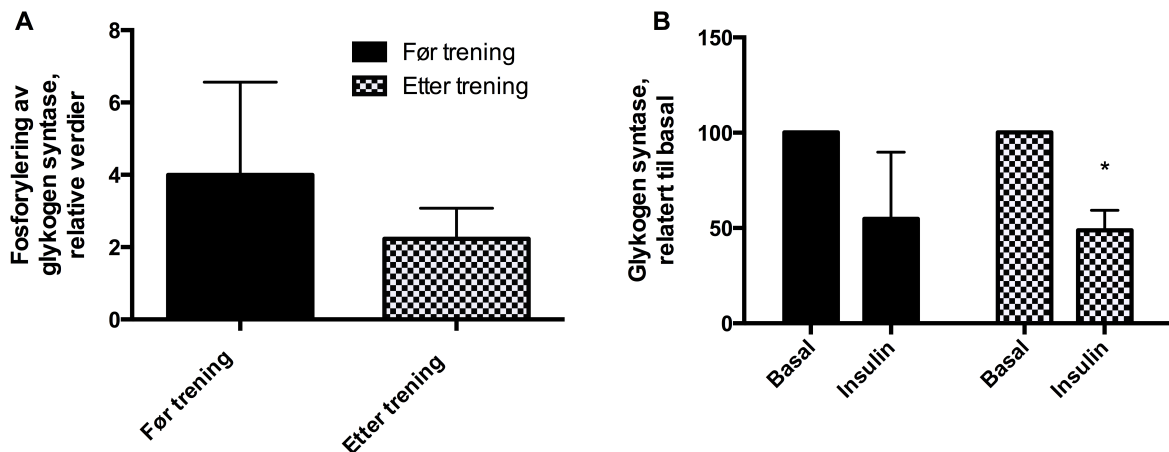
### 3.4.2 Effekt av trening og insulin på fosforylering av glykogen syntase

Det ble også undersøkt om treningsintervensjonen påvirket insulin-indusert defosforylering av glykogen syntase på serin 641 (Ser<sup>641</sup>) i de dyrkede humane skjelettmuskelcellene. Glykogen syntase er viktig for dannelsen av glykogen [39]. I figur 3.12 er det gitt et eksempel på hvordan westernblottet så ut for en av donorene. Denne donoren var i kontrollgruppa.



**Figur 3.12:** Eksempel på westernblot for donor 88, før og etter treningsintervensjonen. Blottet viser effekt av trening og insulin på fosforylert og total glykogen syntase. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble 100 nM insulin tilsatt cellene i 15 minutter, hos de flaskene som ble behandlet med insulin. Dette ble gjort den dagen cellene ble høstet. Flaskene med basal ble kun tilsatt differensieringsmedium uten insulin. K88, donor 88 fra kontrollgruppa; ET, etter treningintervensjonen; FT, før treningintervensjonen; I, insulin; B, basal.

I figur 3.13 vises effekten av treningsintervensjonen og insulin på defosforyleringen av glykogen syntase, når flere blot tilsvarende det som vises i figur 3.12 er kvantitert.

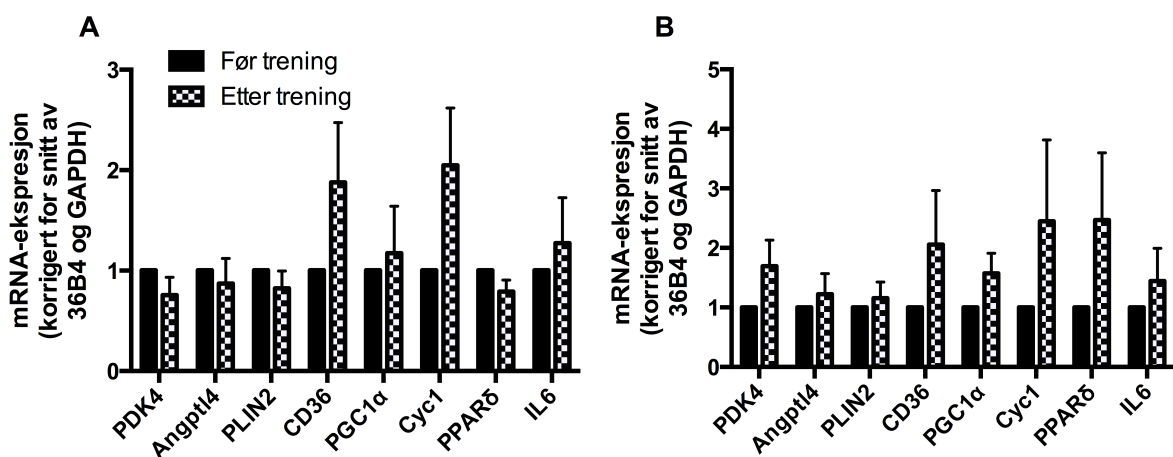


**Figur 3.13:** Effekten av treningsintervensjonen og insulin på fosforyleringen av glykogen syntase. A) Effekt av trening på fosforyleringen av glykogen syntase. For å komme frem til hvor stor andel av glykogen syntase som ble fosforylert, ble fosforylert glykogen syntase delt på total glykogen syntase. Her er bare verdiene for basal fremstilt. B) Effekt av insulin på fosforyleringen av glykogen syntase. For å komme frem til hvor stor andel av glykogen syntase som ble fosforylert, ble fosforylert glykogen syntase delt på total glykogen syntase, og deretter ble verdiene for insulin delt på basal. Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM for  $n=3$ . \* =  $p < 0,05$  i forhold til basal. Her er det brukt en paret parametriske *t*-test.

Som vist i figur 3.13A hadde treningsintervensjonen ingen effekt på fosforyleringsnivået av glykogen syntase. Det var forventet en redusert insulin-indusert stimulering av glykogen syntase og glykogen syntase er aktiv i defosforylert tilstand [53]. Som vist i figur 3.13B ble det observert en signifikant redusert fosforylering av glykogen syntase når insulin ble tilsatt de dyrkede cellene etter treningsintervensjonen. Før treningsintervensjonen var det en tendens, ikke statistisk signifikant, til redusert fosforylering etter insulinbehandling. Her er data fra bare kontrollgruppa fremstilt, da det var tilgjengelige data kun fra denne gruppa.

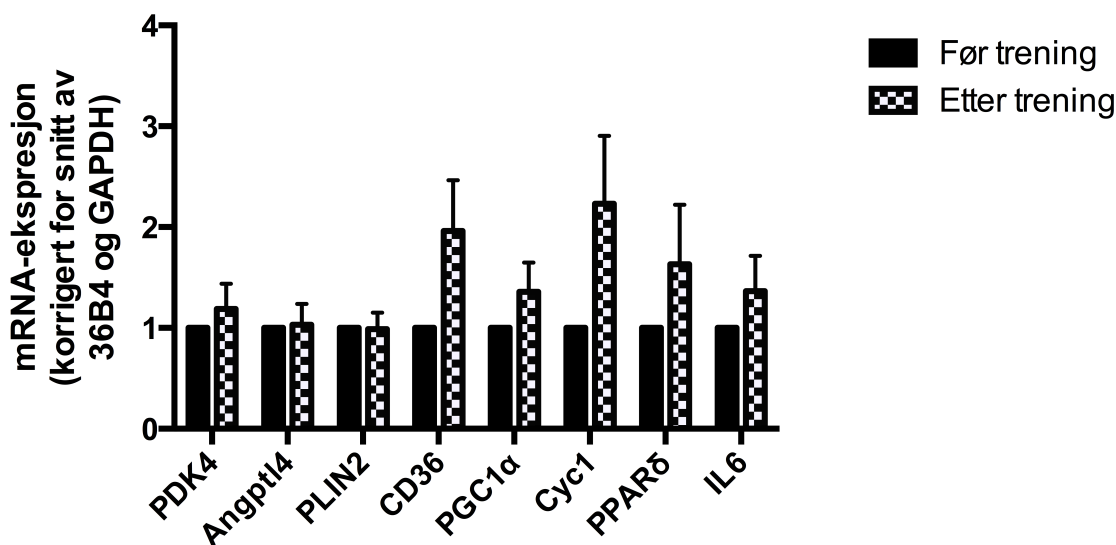
### 3.5 Effekt av trening på ulike gener som er viktige i fetttsyre- og glukosemetabolismen

Det var ønskelig å undersøke hvordan treningsintervensjonen påvirket ekspresjonen av gener som er involvert i fetttsyre- og glukosemetabolismen. De genene som ble analysert her var: PDK4, Angptl4, PLIN2, CD36, PGC1 $\alpha$ , Cyc1, PPAR $\delta$  og IL-6. 36B4 og GAPDH er benyttet som endogene kontrollere. Analysene ble gjort med qPCR. Figur 3.14 viser mRNA-ekspresjonen når pasientgruppa og kontrollgruppa er splittet.



**Figur 3.14: Resultat fra qPCR-forsøket.** mRNA-ekspresjonen når det er korrigeret for et gjennomsnitt av 36B4 og GAPDH, som er de endogene kontrollene. Ekspresjonen av genet før treningsintervensjonen er satt til 1. Cellene ble høstet etter ca. en uke i differensieringsmedium. A) mRNA-ekspresjonen for kontrollgruppa. n=7 for PDK4, Angptl4, PLIN2, CD36, PGC1 $\alpha$ , Cyc1 og PPAR $\delta$ . n=6 for IL-6. B) mRNA-ekspresjonen for pasientgruppa. n=7 for PPAR $\delta$ , IL-6, og PLIN2. n=6 for PDK4, Angptl4, CD36, Cyc1 og PGC1 $\alpha$ . Resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.

Figur 3.15 viser mRNA-ekspresjonen når pasientgruppen og kontrollgruppen er slått sammen.



**Figur 3.15: Resultatene for qPCR-forsøket.** mRNA-ekspresjonen når det er korrigert for et gjennomsnitt av 36B4 og GAPDH, som er endogene kontrollere. Ekspresjonen av genene før treningsintervensjonen er satt til 1. Cellene ble høstet etter ca. en uke i differensieringsmedium. Her er både kontrollgruppa, og pasientgruppa slått sammen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SEM. n=13 for PDK4, Angptl4, CD36, PGC1α, Cyc1 og IL-6. n=14 for PLIN2 og PPARδ.

Som vist i figur 3.14 og 3.15 observerte man ingen signifikant treningsindusert endring i mRNA-ekspresjonen av genene det er testet for i dette forsøket. Dette gjaldt uansett om gruppene var samlet eller splittet. Det var en tendens til en økning av mRNA-ekspresjonen av Cyc1 ( $p = 0,092$ ) og CD36 ( $p = 0,082$ ) etter trening, når gruppene ble slått sammen. Her ble paretparmetrisk  $t$ -test benyttet i statistikkutregningene.

### 3.6 *In vivo-in vitro*-korrelasjonsanalyser

Det var ønskelig å gjøre korrelasjonsanalyser mellom treningsresultatene fra intervensjonsstudien og celledata, for å se om det var noen sammenheng mellom disse resultatene. Alle korrelasjonsanalysene er gjort med Pearsons korrelasjonskoeffisient og ikke-parametriske Spearman test for korrelasjon. Korrelasjonsanalysene er basert på resultater fra 6 donorer, og celledataene er hentet fra substratoksidasjonsforsøkene i avsnitt 3.3. I alle korrelasjonene er det brukt et signifikansnivå på 5 % ( $\alpha=0,05$ ). I alle korrelasjonene er det brukt  $\Delta$ -verdier, det vil si endring i parametre fra før til etter treningsintervensjonen. I tabell

3.1-3.3 er resultatene fra korrelasjonsanalysene mellom opptak, oksidasjon og fraksjonell oksidasjon av 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og resultatene fra utholdenhets- og styrketestene fremstilt. Her er pasientgruppa og kontrollgruppa slått sammen.

**Tabell 3.1: Korrelasjon mellom opptak av 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og resultater fra utholdenhets- og styrketestene.**  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , maksimalt oksygenopptak. Her er pasientgruppa og kontrollgruppa slått sammen, og det er brukt  $\Delta$ -verdier for  $n=6$ .

Korrelasjoner	Pearsons korrelasjonskoeffesient		Ikke-parametrisk Spearman korrelasjon	
	p-verdi	r	p-verdi	r
Opptak 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og $\text{VO}_{2\text{max}}$	0,29	-0,52	0,10	-0,77
Opptak 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og brystpress	0,78	-0,18	0,30	-0,45
Opptak 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og ”cable pull-down”	0,31	-0,58	0,30	-0,45
Opptak 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og beinpress	0,40	-0,42	0,47	-0,35

**Tabell 3.2: Korrelasjon mellom oksidasjon av 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og resultater fra utholdenhets- og styrketestene.**  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , maksimalt oksygenopptak. Her er pasientgruppa og kontrollgruppa slått sammen, og det er brukt  $\Delta$ -verdier for  $n=6$ .

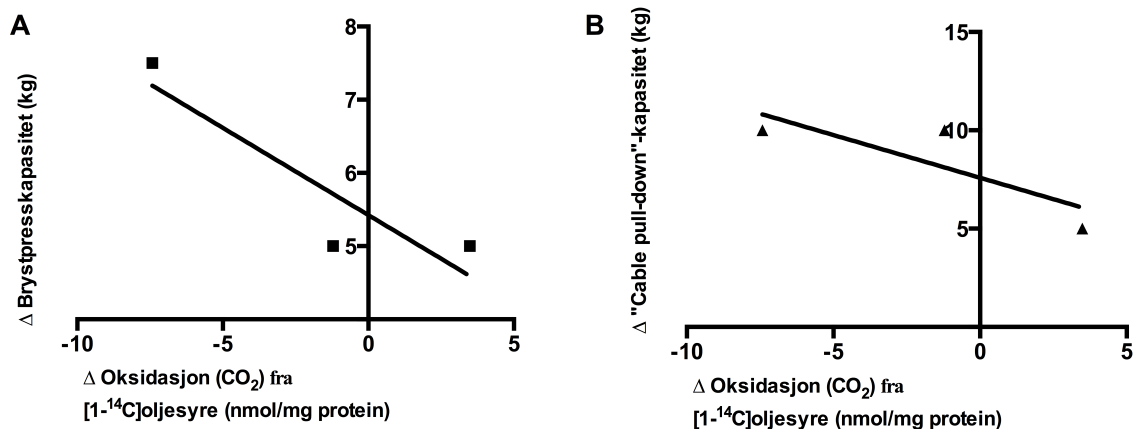
Korrelasjoner	Pearsons korrelasjonskoeffesient		Ikke-parametrisk Spearman korrelasjon	
	p-verdi	r	p-verdi	r
Oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og $\text{VO}_{2\text{max}}$	0,53	-0,32	0,18	-0,66
Oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og brystpress	0,99	-0,003	0,30	-0,45
Oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og ”cable pull-down”	0,67	-0,27	0,30	-0,45
Oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og beinpress	0,15	-0,67	0,78	-0,12

**Tabell 3.3: Korrelasjon mellom fraksjonell oksidasjon av 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og resultater fra utholdenhets- og styrketestene.**  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , maksimalt oksygenopptak. Her er pasientgruppa og kontrollgruppa slått sammen, og det er brukt  $\Delta$ -verdier for  $n=6$ .

Korrelasjoner	Pearsons korrelasjonskoeffesient		Ikke-parametrisk Spearman korrelasjon	
	p-verdi	r	p-verdi	r
Fraksjonell oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og $\text{VO}_{2\text{max}}$	0,61	0,27	0,66	0,26
Fraksjonell oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og brystpress	0,65	0,28	0,80	-0,11
Fraksjonell oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og ”cable pull-down”	0,38	0,51	0,60	0,45
Fraksjonell oksidasjon 100 $\mu\text{M}$ [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre og beinpress	0,26	-0,54	0,62	-0,23



Som vist i tabell 3.1-3, så ble det ikke funnet noen statistisk signifikante korrelasjoner mellom celledata og treningsresultatene fra intervensjonsstudien, når kontrollgruppa og pasientgruppa ble slått sammen. Det ser ut som om p-verdien for celledata og  $VO_{2max}$  er lavere enn for styrketreningsresultatene. Dette gjelder først og fremst for ikke-parametriske Spearman korrelasjon. Selv om det ikke var noen statistisk signifikante sammenhenger mellom oksidasjon av oljesyre og treningsresultater når gruppene ble sett på samlet (tabell 3.2) var det to signifikante sammenhenger når pasientgruppen ble studert alene. Det ble funnet en signifikant negativ korrelasjon mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ brystpresskapasitet, og mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ "cable pull-down"-kapasitet etter trening. Figur 3.16 viser korrelasjonen mellom  $\Delta$ oksidasjon av  $100 \mu M$   $[1-^{14}C]$ oljesyre og  $\Delta$ brystpresskapasitet og  $\Delta$ "cable pull-down"-kapasitet hos pasientgruppa.



**Figur 3.16: Korrelasjon mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon av  $100 \mu M$   $[1-^{14}C]$ oljesyre og  $\Delta$ treningsresultater hos pasientgruppa.** A) Korrelasjon mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ brystpresskapasitet hos pasientgruppa. B) Korrelasjon mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ "cable pull-down"-kapasitet hos pasientgruppa.  $p = <0,001$  og  $r = -0,8660$  for både A og B ved Spearmans test for korrelasjon. Resultatene er presentert for  $n=3$ .

Som vist i figur 3.16, hadde alle deltakerne i pasientgruppa en forbedring i brystpresskapasitet og "cable pull-down"-kapasitet, mens to av deltakerne hadde en lavere oljesyreoksidasjon etter trening. Den siste deltakeren hadde en forbedring i oljesyreoksidasjonen etter trening.

## **4. Diskusjon**

### **4.1 Vurdering av treningsintervensjonsstudien**

Før oppstart av denne treningsintervensjonsstudien ble den godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Deltakerne måtte også skrive under på at de samtykket i å delta i studien, og det var selvfølgelig frivillig å delta. Treningsintervensjonen var avsluttet da denne masteroppgaven ble påbegynt.

I forhold til testen for maksimalt oksygenopptak,  $VO_2\text{max}$ , er det flere ting som kan innvirke på resultatet. Det kan være uvant å sykle med en maske foran ansiktet, og dette kan føre til at deltakerne gir seg for tidlig. I denne treningsintervensjonen fikk deltakerne teste masken før selve testen, slik at de ble vant til å bruke den. Manglende oppvarming kan også føre til at deltakerne ikke kommer opp i sitt maksimale oksygenopptak. I denne treningsintervensjonen fikk deltakerne god tid til oppvarming, med en gradvis økning av tempoet. Det kan også skje kalibreringsfeil, for eksempel feil inntasting av vekt, høyde, og data fra omgivelser ved oppstart av testen. Det kan også være direkte feil ved utstyret. I denne studien hadde alle deltakerne økt sin  $VO_2\text{max}$  etter treningsintervensjonen, bortsett fra en deltaker (kontroll 70), som hadde lavere  $VO_2\text{max}$  etter treningsintervensjonen. Kontroll 70 hadde en nakkeskade etter treningsintervensjonen, og det kan godt tenkes at dette hadde innvirkning på resultatet på testen for maksimalt oksygenopptak.

I forhold til styrketreningstesten er det viktig å påpeke at deltakerens dagsform og psyke kan innvirke på resultatet. Dette gjelder også testen for maksimalt oksygenopptak. Før styrketreninga påbegynte fikk deltakerne en time med en personlig instruktør, slik at utstyr ble brukt riktig, og at deltakerne hadde riktig teknikk. Under hver styrkeøkt delte to av deltakerne vanligvis på en instruktør.

### **4.2 Vurdering av metodene brukt i denne oppgaven**

#### **4.2.1 Celledyrking**

Fra skjelettmuskel-biopsier kan satelittceller isoleres [27]. Disse satelittcellene kan proliferere og differensiere til flerkjernede myotuber [29], som fungerer som en modell for humane skjelettmuskelceller [27]. For å unngå at cellene mister sine egenskaper for proliferasjon og

differensiering kan cellene lagres i flytende nitrogen [93]. Det er flere studier som har undersøkt om egenskaper hos individer med diabetes type-2 er bevart i dyrkede satelittceller. Gaster et al. fant ut at kulturer med satelittceller dyrket opp fra pasienter med diabetes type-2 hadde et redusert glukoseopptak og insulin-stimulert glykogen syntase-aktivitet, i forhold til celler fra tynne kontrollere [94]. Dyrkede humane satelittceller fra pasienter med diabetes type-2 har dermed vist seg å beholde den diabetiske fenotypen [94]. I en annen studie, også utført av Gaster et al., er det beskrevet at dyrkede satelittceller fra individer med diabetes type-2 og fedme viste en redusert palmitatoksidasjon, i forhold til dyrkede satelittceller fra individer med fedme/overvekt [95]. I denne oppgaven ble det ikke påvist noen store forskjeller på oljesyreoksidasjonen mellom kontrollgruppa og pasientgruppa, så flere forsøk trengs for å si noe helt sikkert om den prediabetiske fenotypen er bevart i de dyrkede humane myotubene i dette forsøket. Individene i pasientgruppa i denne oppgaven var ikke egentlig type 2-diabetikere siden de kun hadde nedsatt glukosetoleranse. Individene som ble undersøkt i begge studiene til Gaster et al. nevnt ovenfor, hadde diabetes type-2 og fedme, og kontrollene var enten tynne eller hadde fedme/overvekt uten diabetes type-2 [94, 95].

Det ble brukt samme celledyrkningsprosedyre for alle skjelettmuskelcellene i denne oppgaven. Det viste seg at skjelettmuskelcellene fra de ulike donorene vokste svært ulikt. Dette kan for eksempel være på grunn av donorvariasjoner og/eller at det var ulike mengder med celler i celleampullene som ble tatt opp av nitrogentanken. Cellene vokste i ulikt tempo, men alle ble godt differensierte til slutt, der det ble observert flerkjernede myotuber. Det var også fibroblaster tilstede i mange av cellekulturene. Et annet viktig moment er valg av passasje. I denne oppgaven ble det tatt opp ampuller med celleprøver fra passasje 2 og 3. Replikasjonspotensialet til myoblaster er begrenset. Ved økende passasje reduseres også det proliferative potentialet og kapasiteten myoblastene har til å differensiere til myotuber. Det skjer en reduksjon i metabolske prosesser, og antallet kjerner reduseres [96]. I dette forsøket antas det at valg av passasje 2 og 3 ikke spiller inn på resultatet, da begge passasjene er nokså lave. I denne oppgaven er det brukt dyrkede humane myotuber. Det er vist at biopsier har et høyere uttrykk av gener, til forskjell fra dyrkede celler [97]. Årsaker til denne forskjellen kan blant annet være at cellene er i en slags hviletilstand eller at de dyrkede cellene ikke har modnet godt nok til muskelfibre [27]. Nikolić et al. har utviklet en metode for å studere effekten av trening *in vitro* på dyrkede humane myotuber med elektrisk pulsstimulering [98]. Cellene som er dyrket opp i denne oppgaven har aldri kontrahert selv, da de er dyrket opp fra

hvilende satelittceller, men det kan likevel se ut som om effekten av treningen *in vivo* i noen grad har blitt bevart i de dyrkede humane myotubene *in vitro*.

#### **4.2.2 Substratoksidasjonsforsøkene, qPCR og westernblotting**

De fleste av metodene som er brukt i forsøkene i denne oppgaven er godt kjent fra før. Substratoksidasjonsmetoden er utviklet av Wensaas et al. i 2007 [88], mens Bradfords metode for proteinmåling ble utviklet av Marion Bradford i 1976 [89]. Lipidfiltreringsmetoden ble utviklet av Stefan Hallén ved AstraZeneca. For qPCR ble metodene utarbeidet av produsentene brukt. Westernblottingen ble utført i samarbeid med NIH, og deres prosedyrer ble fulgt.

### **4.3 Statistikk**

Paret parametriske *t*-test er den hypotesetesten som ble benyttet mest i denne oppgaven. Her antas det en normalfordeling av dataene. Det er grunn til å anta normalfordeling når kontrollgruppa og pasientgruppa er splittet. Før og etter trening hos hver donor er regnet som et par. Det er paret parametriske *t*-test som ligger til grunn, når noe er merket som signifikant i figurene i denne oppgaven. Det ble også brukt ”Wilcoxon matched-pairs signed rank” test, men det er ikke markert for denne testen i figurene. I korrelasjonsanalysene ble det brukt både Pearsons og Spearmans test for korrelasjon. Spearmans test for korrelasjon er en ikke-parametriske test for korrelasjon, mens Pearsons test for korrelasjon er en parametriske test. I denne oppgaven presenteres data fra begge testene. Korrelasjon, *r*, er et mål på sammenheng, og *r* er et tall mellom -1 og 1. En positiv *r* (0-1) betyr at det er en positiv sammenheng mellom variablene, men en negativ *r* (-1-0) betyr at det er en negativ sammenheng mellom variablene. I denne oppgaven er variablene ulike celledata og treningsresultater.

### **4.4 Effekten av trening på oljesyremetabolismen**

Resultatene fra denne oppgaven viste at det var en signifikant økning av oljesyreoksidasjonen etter trening i kontrollgruppa når 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble tilsatt akutt, eller når 100  $\mu\text{M}$   $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre og 5 mM glukose ble tilsatt akutt. Ellers var det ingen statistisk signifikante endringer i opptak eller oksidasjon av oljesyre. Trening har, som nevnt tidligere, vist seg å øke både opptaket og oksidasjonen av fettsyrer i *in vivo* studier [62]. Bourlier et al. har på samme måte som i denne oppgaven undersøkt effekter av trening *in vivo* på celler i kultur (*in*

*vitro*) på fettsyremetabolismen [87]. De fant en konsentrasjonsavhengig økning av palmitatoksidasjonen både før og etter trening, men ingen effekt av treningsintervensjonen på palmitatoksidasjonen [87]. Dette er i motsetning til denne oppgaven, der det ble funnet en effekt av treningsintervensjonen på oljesyreoksidasjonen. Studien til Bourlier et al. er ganske lik vår studie med tanke på at begge studiene har brukt dyrkede humane myotuber, og forskjeller mellom studiene er videre diskutert i avsnitt 4.5. Det ble brukt et lavt antall donorer i forsøket i denne oppgaven ( $n=6$ , når begge gruppene var slått sammen). Det er mulig at ved et større antall donorer, så blir økningen av opptaket og oksidasjonen av oljesyre statistisk signifikant etter trening. Fettsyreoksidasjonen reduseres ved en større tilgjengelighet av glukose og/eller insulin [26]. En mekanisme som er foreslått for dette, er som nevnt tidligere, at opptaket av fettsyrer inn til mitokondriene kontrolleres av glukose og/eller insulin [40]. Det ble observert en statistisk signifikant økning i oljesyreoksidasjonen etter trening, når 5 mM glukose ble tilsatt 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre akutt i kontrollgruppa. Det kan tenkes at denne økningen kommer av selve treningens effekt på fettsyreoksidasjonen, ikke påvirkningen av glukose, da glukose var tilsatt celler dyrket både før og etter trening. I forhold til kontrollen med 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre alene, ble oljesyreoksidasjonen derimot statistisk signifikant redusert når 5 mM glukose ble tilsatt 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre. Dette var tilfelle både før og etter trening. Denne signifikante reduksjonen gjelder når kontrollgruppa og pasientgruppa er slått sammen, og for parett parametrisk *t*-test, med et signifikansnivå på 5 % ( $\alpha=0,05$ ). Statistikk for dette er ikke angitt i denne oppgaven. Dette stemmer godt overens med glukoses effekt på fettsyreoksidasjonen som er nevnt ovenfor. Det stemmer også godt overens med en studie, der det ble observert en reduksjon i oljesyreoksidasjonen, når 5 mM glukose ble tilsatt dyrkede humane myotuber akutt i 4 timer [99]. I denne studien ble det brukt muskelbiopsier fra friske individer, og disse individene skulle ikke gjennom en treningsintervensjon [99]. Dette er til forskjell fra studien i denne oppgaven.

I denne oppgaven ble det også observert at økende konsentrasjon av oljesyre gav økt oljesyreoksidasjon. Dette stemmer godt overens med definisjonen på adapterbarhet, som er evnen cellene har til øke fettsyreoksidasjonen når det er økt tilgang på fettsyrer [78]. Det er ingen økning i oljesyreoksidasjonen fra konsentrasjonene på 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre til 400  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre, og det kan virke som oljesyreoksidasjonen flater ut ved 100  $\mu\text{M}$  [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]oljesyre.

Det var for øvrig heller ingen endring i akkumuleringen av oljesyre i lipider i skjelettmuskelcellene, men en tendens til en reduksjon i akkumuleringen ble observert etter trening. Denne reduksjonen stemmer godt overens med tidligere *in vivo*-studier. En studie, gjort på friske individer viste at IMCL i skjelettmuskel ble redusert etter 2 timer aerob trening (VO<sub>2</sub>max på 50-60 %) [100]. En annen studie viste at IMCL ble redusert hos individer med diabetes type-2, etter 2 uker med både trening og diett [101].

I forsøket der det var ønskelig å undersøke ulike proliferasjonsmediers evne til å dyrke opp muskelceller, ble PPAR $\delta$ -agonisten GW501516 tilsatt cellebrettene 4 dager før substratoksidasjonsforsøket. GW501516 er vist å øke fettsyreoksidasjonen hos mennesker [55]. I dette forsøket ble det, som forventet, observert en statistisk signifikant økt oksidasjon av oljesyre ved bruk av GW501516 i forhold til bare 100  $\mu$ M [<sup>14</sup>C]oljesyre akutt, ved bruk av paret parametrisk *t*-test og et signifikansnivå på 5 % ( $\alpha=0,05$ ). I dette forsøket ble det også observert en statistisk signifikant økt oksidasjon av oljesyre ved tilsetting av 1  $\mu$ M FCCP akutt, i forhold til bare 100  $\mu$ M [1-<sup>14</sup>C]oljesyre akutt. Dette stemmer godt, siden mitokondriell respirasjon øker ved bruk av mitokondrielle avkoblere, slik som FCCP. Mitokondrielle avkoblere gir et økt forbruk av O<sub>2</sub> [92]. Verken GW501516- eller FCCP-effekten ble undersøkt i celler både før og etter trening, men det kan det være aktuelt å gjøre i videre studier av disse cellene.

## 4.5 Effekten av trening på metabolsk fleksibilitet

Tidligere studier på metabolsk fleksibilitet gjort av Bourlier et al. viste at fettsyreoksidasjonen ble redusert ved økende konsentrasjon av glukose (suppressibilitet), og at suppressibiliteten ved 5 mM glukose økte signifikant etter trening [87]. De viste også en økt fettsyreoksidasjon (adapterbarhet) ved økende konsentrasjon av fettsyre før trening. Denne økningen var uendret etter trening. Trening hadde dermed ingen effekt på adapterbarhet. I disse studiene ble fettsyren palmitinsyre brukt [87]. I denne oppgaven ble det ikke funnet en statistisk signifikant forskjell på suppressibilitet før og etter trening, og det er ulikt studien til Bourlier et al. [87]. Bourlier et al. fant heller ingen effekt av trening på adapterbarhet [87], og det er i samsvar med det som ble funnet i denne oppgaven. I Bourlier et al. sine studier brukte de 5 donorer, og donorene var middelaldrende og hadde fedme. I Bourlier et al. sine studier trente forsøkspersonene kun utholdenhetstrening, og treningsintervensjonen varte i 8 uker [87]. Dette er ulikt denne treningsintervensjonen, der

forsøkspersonene trente i 12 uker, og trente både utholdenhetstrening og styrketrening. Donorene brukt i denne oppgaven var heller ikke like overvektige, som i studien nevnt ovenfor. Dette kan tenkes å ha virket inn på at resultatet på treningsintervensjonens effekt på suppressibilitet ble ulikt i disse to studiene. Det ble også brukt forskjellige fettsyrer. Forskjeller i metabolismen til palmitat og oljesyre har tidligere blitt undersøkt i humane myotuber, og det ble blant annet funnet ut at palmitat hadde større fettsyreoksidasjon ved akutt behandling i 4 timer med 100  $\mu\text{M}$  radioaktiv palmitat, i forhold til 100  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre [102]. Videre ønskes det å undersøke metabolsk fleksibilitet på totalt 18 donorer, for å se om et større antall donorer vil påvirke resultatet.

## 4.6 Effekten av trening og insulin på fosforylering av proteiner

### 4.6.1 Effekten av trening og insulin på fosforylering av Akt

Ingen har tidligere studert effekten av trening *in vivo* på fosforylering av Akt i celler i kultur. Men en *in vivo*-studie, publisert av Deldicque i 2008, undersøkte effekten av styrketrening på fosforyleringen av Akt i biopsimateriale [103]. Ni friske unge menn deltok i studien. Styrketreninga bestod av 10 sett med 10 repetisjoner med styrkeøvelser for knestrekkeren. Øvelsene ble gjort på kun én fot, og 30 sekunder og 24 timer etter treninga ble det tatt biopsier fra *musculus vastus lateralis*. Det ble observert en lavere fosforyleringstilstand av Akt på Thr<sup>308</sup> og Ser<sup>473</sup> rett etter trening. Fosforyleringsstatusen på Thr<sup>308</sup> var fortsatt redusert 24 timer etter treninga mens Ser<sup>473</sup> hadde returnert tilbake til basalnivå [103]. En annen *in vivo*-studie ble utført på 8 syklister [104]. Disse syklistene skulle gå på både en diett med lite karbohydrater og en diett med mye karbohydrater med en ukes mellomrom mellom diettene. Syklistene utførte 30 repetisjoner på en øvelse for knestrekkeren (på 70 % av maksimal styrke), og biopsier ble tatt fra *musculus vastus lateralis*, 20 sekunder og 10 minutter etter at treninga var avslutta. Før og rett etter trening var fosforyleringen av Akt på Ser<sup>473</sup> lik i begge gruppene. Fosforyleringen av Akt på Ser<sup>473</sup> var økt (1,5 ganger) etter 10 minutter i diettintervensjonen med mye karbohydrater. I diettintervensjonen med lavt innhold av karbohydrater, var fosforyleringen av Akt på Ser<sup>473</sup> uforandret. I diettintervensjonen med høyt karbohydratinnhold, hadde musklene et høyt glykogeninnhold. Dette kan ha påvirket resultatet [104]. I en *in vivo*-studie publisert av Ryan et al. i 2013 gjennomgikk mennene som deltok i en 6 måneder lang treningsintervensjon, som bestod av utholdenhetstrening med

moderat til høy intensitet, i tillegg til en diettindusert vektnedgang. Her observerte de ingen endringer i basal Akt fosforylering. Hyperinsulinemi økte fosforyleringen av Akt på Ser<sup>473</sup> før og etter treningsintervensjonen, men denne økningen var lik før og etter trening [105]. I en annen studie, publisert av Vind et al. observerte de at insulin økte fosforyleringen av Akt ved Thr<sup>308</sup> og Ser<sup>473</sup> før og etter en treningsintervensjon på 10 uker [50]. I denne oppgaven hadde ikke treningsintervensjonen noen effekt på fosforyleringen av Akt. Studier på effekten av trening på fosforylering av Akt viser ulike resultater, og disse variasjonene kan være på grunn av bruk av forskjellige treningsmetoder og treningsintensiteter. Det kan også være forskjell på hvilke forsøkspersoner som er inkludert i studiene. Deltakerne i denne oppgaven skulle ikke endre kostholdet, slik det ble gjort i for eksempel studien på syklistene [104], og Ryan et al. sin studie [105]. I denne oppgaven ble det funnet at insulin økte fosforyleringen av Akt på Ser<sup>473</sup>, og dette er i samsvar med tidligere studier som er gjort [50, 105], og det var en tendens til at insulin-indusert fosforylering var mer uttalt etter trening sammenlignet med før trening, noe som kan tyde på at trening kunne øke insulinfølsomheten. Her er det også ønskelig å gjøre forsøk på flere donorer, for å se om dette har noen innvirkning på resultatet. Det er viktig å påpeke at det kun er de oppdyrkede humane myotubene som ble stimulert med insulin, og ikke selve deltakerne i studien.

#### **4.6.2 Effekten av trening og insulin på fosforylering av glykogen syntase**

Ingen har tidligere studert effekten av trening *in vivo* på fosforylering av glykogen syntase i celler i kultur. Hos friske individer, individer med fedme og individer med diabetes type-2 har tidligere *in vivo*-studier vist at trening på sykkel øker aktiviteten av glykogen syntase [62]. Aktiviteten av glykogen syntase stimuleres av trening og insulin, ved defosforylering av flere seter [53]. Resultatene fra denne oppgaven gav ingen effekt av trening på fosforyleringen av glykogen syntase, men en insulin-indusert redusert fosforylering av glykogen syntase ble observert både før og etter treningsintervensjonen, noe som var forventet. Denne reduksjonen var kun statistisk signifikant etter treningsintervensjonen, og det kan også for glykogen syntase virke som om insulin gir en økt insulinfølsomhet etter trening. Treningsintervensjonsstudien i denne oppgaven varte i 12 uker og bestod av både styrke- og utholdenhetstrening, i motsetning til en *in vivo*-studie utført av Vind et al. [50], som bestod av 10 uker med kun utholdenhetstrening. I studien til Vind et al. beskrives at insulin reduserte fosforyleringen av glykogen syntase [50], og det var forventet og samsvarer med det som ble funnet i denne oppgaven. De fant også ut at trening ikke hadde noen effekt



på fosforyleringen av glykogen syntase [50], som også stemmer overens med det som ble observert i denne oppgaven. Det er også her viktig å påpeke at det kun er de oppdyrkede humane myotubene som ble stimulert med insulin, og ikke deltakerne i studien. I denne studien var det for få fosøk til å kunne undersøke om det var forskjell på de to gruppene forsøkspersoner med hensyn på insulineffekt på glykogen syntase. Henry et al. studerte effekten av insulin på glykogen syntase i dyrkede humane myotuber fra individer med og uten diabetes type-2 [106], og fant at aktiviteten av glykogen syntase økte hos ikke-diabetiske individer ved akutt stimulering med insulin. Glykogen syntase-aktiviteten hos individer med diabetes type-2 økte også, men ikke like mye [106].

## 4.7 Effekten av trening på uttrykket av gener

Resultatene fra qPCR-forsøket viste at det ikke var noen statistisk signifikante økninger i mRNA-ekspressjonen av de genene det var testet for. Resultatene viste en tendens til økt ekspresjon av *Cyc1* ( $p = 0,092$ ) og *CD36* ( $p = 0,082$ ) etter treningsintervensjonen. Det er flere studier som er gjort på trening og genekspressjon. Tunstall sin studie fra 2002 viste at ekspressjonen av *FAT/CD36* og *CPT-1-mRNA* ble økt etter 9 dager med utholdenhetstrening [66]. Man observerte derimot ingen økning av disse genene etter en akutt treningsøkt. Dette var en *in vivo*-studie, og ble gjort på utrente individer [66]. Ved trening vil *FAT/CD36* translokeres til plasmamembranen. Dette skjer etter 2 timer med moderat trening, og kan være med på å forklare hvordan trening påvirker opptaket og oksidasjonen av fettsyrer [107]. Det var i denne oppgaven en tendens til en økt ekspresjon av *Cyc1* etter treningsintervensjonen. *Cyc* er en komponent i elektrontransportkjeden [51], og funksjonen er beskrevet i avsnitt 1.7. I rottestudier er det vist at det mitokondrielle innholdet i skjelettmuskel øker ved utholdenhetstrening [108], og det er observert en økning i konsentrasjonen av *Cyc* etter hard trening hos rotter [109]. Konsentrasjonen av *Cyc* reduseres igjen, etter at treningen opphører. Dette gjelder hos både mennesker og rotter, men denne reduksjonen skjer langsommere hos mennesker [108].

## 4.8 Vurdering av korrelasjonsanalyser

Når pasientgruppa og kontrollgruppa ble slått sammen var det ingen statistisk signifikante korrelasjoner mellom celledata og treningsresultatene, og en kan dermed ikke si noe om sammenhengen mellom disse variablene. Når gruppene ble splittet var det ingen signifikante korrelasjoner i kontrollgruppa, og få for pasientgruppa. I denne oppgaven ble det observert en

statistisk signifikant negativ korrelasjon mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ brystpresskapasitet, og mellom  $\Delta$ oljesyreoksidasjon og  $\Delta$ ”cable pull-down”-kapasitet etter treningsintervensjonen i pasientgruppa. Dette betyr at jo større deltakerens forbedring i brystpresskapasitet og ”cable pull-down”-kapasitet var etter treningsintervensjonen, jo lavere var økningen i oljesyreoksidasjonen etter treningsintervensjonen, noe som ikke var forventet. Pasientgruppa hadde, som vist i tabell 2.2, en lavere forbedring i brystpresskapasitet og ”cable pull-down”-kapasitet i forhold til kontrollgruppa. Forbedringene på  $VO_2$ max var ganske like for både pasientgruppa og kontrollgruppa (tabell 2.3). Tre individer er et veldig lavt antall, så her der det vanskelig å konkludere. En *in vivo*-studie med utholdenhetstrening på sykkel er vist å øke fettsyreoksidasjonen hos friske menn, og denne økningen i fettsyreoksidasjonen er størst ved 55 % av  $VO_2$ max [110]. Deltakerne i denne oppgaven har utført både utholdenhetstrening og styrketrening, så man kan spekulere i om det er utholdenhetstreninga som har størst effekt på fettsyreoksidasjonen. En *in vivo*-studie, publisert i 2013, fant derimot ut at styrketrening og utholdenhetstrening var likeverdige med tanke på en økning i fettsyreoksidasjonen etter trening. Testpersonene, som her var kvinner med fedme, måtte konsumere et fettriikt måltid etter treningsøkta. Indirekte kalorimetri og en ”tracer-metode” ble brukt for å måle fettsyreoksidasjonen [111].

## 4.9 Veien videre

I denne masteroppgaven har det blitt utført substratoksidasjonsforsøk, proteinmåling, lipidfiltrasjon, westerblotting og qPCR på 14 utvalgte donorer i MyoGlu-studien. I fremtiden er det ønskelig å utføre disse forsøkene på alle tilgjengelige donorer (n=18) for å se om inkludering av flere donorer innvirker på resultatene. I tillegg har det blitt utført to metodeutviklingsforsøk som undersøkte valg av ulike proliferasjonsmedium og coating i celleflasker. Det ble ikke observert noen store forskjeller på hvilke proliferasjonsmedier eller coatinger i celleflasker som ble brukt, men det kan tenkes at flere slike undersøkelser kan være med på å bedre celledyrkningsbetingelsene i fremtiden.

## 5 Konklusjon

En 12 uker lang treningsintervensjon bestående av både styrke- og utholdenhetstrening *in vivo* hadde effekter på oljesyreoksidasjonen og insulinfølsomheten i dyrkede humane myotuber *in vitro*. Oljesyreoksidasjonen i myotuber fra gruppa med normal glukosemetabolisme ble økt etter treningsintervensjonen. Når glukose ble tilsatt samtidig med den radioaktive oljesyra, ble oljesyreoksidasjonen økt i celler etter treningsintervensjonen i gruppa med normal glukosetoleranse. Oljesyreoksidasjonen i de dyrkede humane myotubene ble økt når FCCP og GW501516 ble tilsatt. GW501516 er en PPAR $\delta$ -agonist, og ble tilsatt fire dager før substratoksidasjonsforsøket, mens FCCP er en mitokondriell frikobler og ble tilsatt samtidig som forsøket ble utført. Insulinfølsomheten ble målt som insulinstimulert fosforylering av Akt og defosforylering av glykogen syntase. Det var tendenser til at insulin økte fosforyleringa av Akt og reduserte fosforyleringa av glykogen syntase etter treningsintervensjonen, det vil si at treningsintervensjonen kan ha hatt en innvirkning på insulinfølsomheten i de dyrkede humane myotubene. Det var også en tendens til en økt mRNA-ekspressjon av Cyc1 og CD36 etter treningsintervensjonen.

Det kan virke som om effekten av treningen *in vivo* har blitt bevart i de dyrkede humane myotubene *in vitro*.

# Litteraturliste

1. World Health Organization. *Diabetes*. 2013 [Cited 2014 09. January]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>.
2. Walker, R. and C. Whittlesea, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 4th ed. 2007, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone Elsevier.
3. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok, *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. 2007: Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhandbok.
4. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglige retningslinjer: Diabetes - Forebygging, diagnostikk og behandling*. 2009.
5. Vikøren, T.B., J.P. Berg, and T.J. Berg, *Feilkilder ved bruk av hemoglobin A1c*. Tidsskrift for Den norske legeförening, 2014. **4**(134): p. 417-21.
6. Nathan, D.M., et al., *Translating the A1C Assay Into Estimated Average Glucose Values*. *Diabetes Care*, 2008. **31**(8): p. 1473-8.
7. The InterAct Consortium, *The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPIC-InterAct study*. *Diabetologia*, 2013. **56**(1): p. 60-9.
8. Shai, I., et al., *Ethnicity, obesity, and risk of type 2 diabetes in women: a 20-year follow-up study*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(7): p. 1585-90.
9. Reis, J.P., et al., *Lifestyle factors and risk for new-onset diabetes: a population-based cohort study*. *Ann Intern Med*, 2011. **155**(5): p. 292-9.
10. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok. *T3.1.2 Komplikasjoner*. 2013 [Cited 2014 01. May]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/318564?expand=1>.
11. Kase, E.T. and K.I. Birkeland, *[Antidiabetics which affect the incretin system]*. Tidsskrift for Den norske legeförening, 2008. **128**(4): p. 440-2.
12. Lehrke, M. and N. Marx, *New antidiabetic therapies: innovative strategies for an old problem*. *Curr Opin Lipidol*, 2012. **23**(6): p. 569-75.
13. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok. *L3.2.6.1 Dapagliflozin*. 2013 [Cited 2014 05. May]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/s%C3%B8ker/+%2Bforxiga/374532#i374571>.
14. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2013 [Cited 2014 15. April]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
15. Foreningen for utgivelse av norsk legemiddelhåndbok. *L23.4.1 Orlistat*. 2013 [Cited 2014 01. May]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/82368/?ids=82369#i82369>.
16. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 1st ed. 2001, Oslo, Norway: Gyldendal Norsk Forlag AS.
17. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, *The endocrine function of adipose tissue: an update*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006. **64**(4): p. 355-65.
18. van Hall, G., et al., *Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(7): p. 3005-10.
19. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. *Lancet*, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
20. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(4): p. 295-309.

21. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2006 [Cited 2014 24. April]; Available from: [http://www.idf.org/webdata/docs/MetS\\_def\\_update2006.pdf](http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf).
22. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
23. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2735-52.
24. Rasmussen, B.B. and R.R. Wolfe, *Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 463-84.
25. Roden, M., et al., *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2859-65.
26. Sidossis, L.S. and R.R. Wolfe, *Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. E733-8.
27. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* Cell Tissue Res, 2013. **354**(3): p. 671-682.
28. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
29. Bonavaud, S., et al., *Preparation of isolated human muscle fibers: a technical report*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002. **38**(2): p. 66-72.
30. Turner, N., et al., *Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle*. J Endocrinol, 2014. **220**(2): p. T61-79.
31. Daugaard, J.R., et al., *Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training*. Diabetes, 2000. **49**(7): p. 1092-5.
32. Tanner, C.J., et al., *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(6): p. E1191-6.
33. Coen, P.M. and B.H. Goodpaster, *Role of intramyocellular lipids in human health*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 391-8.
34. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-90.
35. Goodpaster, B.H., et al., *Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss*. Metabolism, 2000. **49**(4): p. 467-72.
36. Roden, M., *Does endurance training protect from lipotoxicity?* Diabetes, 2012. **61**(10): p. 2397-9.
37. Watt, M.J. and A.J. Hoy, *Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(11): p. E1315-28.
38. Luiken, J.J., et al., *Long-chain fatty acid uptake by skeletal muscle is impaired in homozygous, but not heterozygous, heart-type-FABP null mice*. Lipids, 2003. **38**(4): p. 491-6.
39. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 3rd ed. 2010, New York, New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.
40. Sidossis, L.S., et al., *Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria*. J Clin Invest, 1996. **98**(10): p. 2244-50.

41. Thyfault, J.P., et al., *Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(6): p. E1076-81.
42. Blaak, E.E., et al., *Impaired oxidation of plasma-derived fatty acids in type 2 diabetic subjects during moderate-intensity exercise*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2102-7.
43. Stuart, C.A., et al., *Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(5): p. E1067-73.
44. Santos, J.M., et al., *Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake*. Int J Sports Med, 2008. **29**(10): p. 785-94.
45. Rosa, G., et al., *Reduced PDK4 expression associates with increased insulin sensitivity in postobese patients*. Obes Res, 2003. **11**(2): p. 176-82.
46. Zhang, S., et al., *The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility*. Nutr Metab (Lond), 2014. **11**(1): p. 10.
47. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(3): p. 373-93.
48. Henriksen, E.J., *Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(2): p. 788-96.
49. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
50. Vind, B.F., et al., *Impaired insulin-induced site-specific phosphorylation of TBC1 domain family, member 4 (TBC1D4) in skeletal muscle of type 2 diabetes patients is restored by endurance exercise-training*. Diabetologia, 2011. **54**(1): p. 157-67.
51. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the Cell*. 3rd ed. 1994, New York, New York: Garland Publishing, Inc. .
52. Beck-Nielsen, H., *The role of glycogen synthase in the development of hyperglycemia in type 2 diabetes: 'To store or not to store glucose, that's the question'*. Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28**(8): p. 635-44.
53. Jensen, T.E. and E.A. Richter, *Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 5): p. 1069-76.
54. Damsbo, P., et al., *Reduced glycogen synthase activity in skeletal muscle from obese patients with and without type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1991. **34**(4): p. 239-45.
55. Feng, Y.Z., et al., *PPARdelta activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference*. Arch Physiol Biochem, 2014. **120**(1): p. 12-21.
56. Dimopoulos, N., et al., *The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(24): p. 4743-8.
57. Lancaster, G.I. and M.A. Febbraio, *The immunomodulating role of exercise in metabolic disease*. Trends Immunol, 2014(pii: S1471-4906(14)00034-9 [Epub ahead of print]): p. 1-8.
58. O'Gorman, D.J. and A. Krook, *Exercise and the treatment of diabetes and obesity*. Med Clin North Am, 2011. **95**(5): p. 953-69.
59. Helmrich, S.P., et al., *Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1991. **325**(3): p. 147-52.

60. Schellenberg, E.S., et al., *Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Ann Intern Med, 2013. **159**(8): p. 543-51.
61. Fedewa, M.V., et al., *Exercise and insulin resistance in youth: a meta-analysis*. Pediatrics, 2014. **133**(1): p. e163-74.
62. Turcotte, L.P. and J.S. Fisher, *Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise*. Phys Ther, 2008. **88**(11): p. 1279-96.
63. Jeppesen, J. and B. Kiens, *Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise*. J Physiol, 2012. **590**(Pt 5): p. 1059-68.
64. Helge, J.W., et al., *Muscle metabolism during graded quadriceps exercise in man*. J Physiol, 2007. **581**(Pt 3): p. 1247-58.
65. Kuhl, J.E., et al., *Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(6): p. E1296-303.
66. Tunstall, R.J., et al., *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(1): p. E66-72.
67. Russell, A.P., et al., *Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2874-81.
68. Liu, C. and J.D. Lin, *PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(4): p. 248-57.
69. Patti, M.E., et al., *Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8466-71.
70. Pilegaard, H., B. Saltin, and P.D. Neufer, *Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle*. J Physiol, 2003. **546**(Pt 3): p. 851-8.
71. Zhang, B.B., G. Zhou, and C. Li, *AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome*. Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 407-16.
72. 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. 2688-97.
73. Jessen, N. and L.J. Goodyear, *Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2005. **99**(1): p. 330-7.
74. Andersen, P. and J. Henriksson, *Training induced changes in the subgroups of human type II skeletal muscle fibres*. Acta Physiol Scand, 1977. **99**(1): p. 123-5.
75. Saltin, B., et al., *Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners*. Ann N Y Acad Sci, 1977. **301**: p. 3-29.
76. Fink, L.N., et al., *Expression of anti-inflammatory macrophage genes within skeletal muscle correlates with insulin sensitivity in human obesity and type 2 diabetes*. Diabetologia, 2013. **56**(7): p. 1623-8.
77. Parham, P., *The immune system*. 3rd ed. 2009, New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
78. Thoresen, G.H., et al., *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. **85**(5): p. 227-34.
79. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1934-41.

80. Houmard, J.A., *Intramuscular lipid oxidation and obesity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **294**(4): p. R1111-6.
81. Ling, C. and T. Ronn, *Epigenetic adaptation to regular exercise in humans*. Drug Discov Today, 2014(pii: S1359-6446(14)00083-X [Epub ahead of print]): p. 1-4.
82. Ling, C. and L. Groop, *Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2718-25.
83. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
84. Chuang, J.C. and P.A. Jones, *Epigenetics and microRNAs*. Pediatr Res, 2007. **61**(5 Pt 2): p. 24R-29R.
85. Zhu, P., et al., *Angiopoietin-like 4: a decade of research*. Biosci Rep, 2012. **32**(3): p. 211-9.
86. Dijk, W. and S. Kersten, *Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4*. Trends Endocrinol Metab, 2014. **25**(3): p. 146-155.
87. Bourlier, V., et al., *Enhanced glucose metabolism is preserved in cultured primary myotubes from obese donors in response to exercise training*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(9): p. 3739-47.
88. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
89. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
90. Jensen, E.C., *The basics of western blotting*. Anat Rec (Hoboken), 2012. **295**(3): p. 369-71.
91. Madgian, M.T., et al., *Brock Biology og microorganisms*. 12th ed. 2009, San Fransisco, CA, USA: Pearson Benjamin Cummings.
92. Kenwood, B.M., et al., *Identification of a novel mitochondrial uncoupler that does not depolarize the plasma membrane*. Mol Metab, 2014. **3**(2): p. 114-23.
93. Blau, H.M. and C. Webster, *Isolation and characterization of human muscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(9): p. 5623-7.
94. 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. 921-7.
95. Gaster, M., et al., *Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 542-8.
96. Nehlin, J.O., et al., *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. Biogerontology, 2011. **12**(4): p. 349-65.
97. Nikolic, N., et al., *Overexpression of PGC-1alpha increases fatty acid oxidative capacity of human skeletal muscle cells*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 714074.
98. Nikolic, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33203.
99. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(1): p. 94-105.
100. Egger, A., et al., *The effect of aerobic exercise on intrahepatocellular and intramyocellular lipids in healthy subjects*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70865.



101. Tamura, Y., et al., *Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3191-6.
102. Bakke, S.S., et al., *Palmitic acid follows a different metabolic pathway than oleic acid in human skeletal muscle cells; lower lipolysis rate despite an increased level of adipose triglyceride lipase*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(10): p. 1323-33.
103. Deldicque, L., et al., *Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise*. Eur J Appl Physiol, 2008. **104**(1): p. 57-65.
104. Creer, A., et al., *Influence of muscle glycogen availability on ERK1/2 and Akt signaling after resistance exercise in human skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 2005. **99**(3): p. 950-6.
105. Ryan, A.S., et al., *Aerobic Exercise Plus Weight Loss Improves Insulin Sensitivity and Increases Skeletal Muscle Glycogen Synthase Activity in Older Men*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2013([Epub ahead of print]): p. 1-9.
106. Henry, R.R., et al., *Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. Biochemical and molecular mechanisms*. J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1231-6.
107. Bradley, N.S., et al., *Acute endurance exercise increases plasma membrane fatty acid transport proteins in rat and human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(2): p. E183-9.
108. Holloszy, J.O. and E.F. Coyle, *Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984. **56**(4): p. 831-8.
109. Holloszy, J.O., *Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle*. J Biol Chem, 1967. **242**(9): p. 2278-82.
110. van Loon, L.J., et al., *The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans*. J Physiol, 2001. **536**(Pt 1): p. 295-304.
111. Davitt, P.M., et al., *Postprandial triglyceride and free fatty acid metabolism in obese women after either endurance or resistance exercise*. J Appl Physiol (1985), 2013. **114**(12): p. 1743-54.

# Appendiks

## 1. Medier til celledyrking

### 1.2 Utsåingsmedium

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

50 ml FCS (Føtalt kalveserum)

2,5 ml Penicillin-streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µml Amphotericin)

### 1.2 Proliferasjonsmedium

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

50 ml FCS (Føtalt kalveserum)

10 ml Ultrosor G

2,5 ml Penicillin-streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µml Amphotericin)

### 1.3 Differensieringsmedium

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

50 ml FCS (Føtalt kalveserum)

2,5 ml Penicillin-streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µml Amphotericin)

25 pmol insulin

## **2. Medier til substratoksidasjonsforsøket**

### **2.1 Forbehandling og formerkinger i 24 timer**

Kolonne 2: Forbehandling med 100  $\mu\text{M}$  ikke-radioaktiv oljesyre

Kald oljesyre 116,67  $\mu\text{l}$

Differensieringsmedium 6883,33  $\mu\text{l}$  = 6,883 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 9: Formerking med 100  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu\text{l}$

Kald oljesyre 105,93  $\mu\text{l}$

Differensieringsmedium 6859,04  $\mu\text{l}$  = 6,859 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 10: Formerking med 400  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu\text{l}$

Kald oljesyre 455,93  $\mu\text{l}$

Differensieringsmedium 6509,04  $\mu\text{l}$  = 6,509 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 11: Formerking med 100  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu\text{l}$

Kald oljesyre 105,93  $\mu\text{l}$

Differensieringsmedium 6859,04  $\mu\text{l}$  = 6,859 ml

Totalt 7 ml

### **2.2 Akutte trappemedier i 4 timer**

Kolonne 2: Akutt 100  $\mu\text{M}$  radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu\text{l}$

Kald oljesyre 105,93  $\mu\text{l}$

Karnitin 7  $\mu\text{l}$

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu\text{l}$

DPBS m/HEPES 6822,87  $\mu\text{l}$  = 6,823 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 3: Akutt 100  $\mu$ M radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 105,93  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6822,87  $\mu$ l = 6,823 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 4: Akutt 100  $\mu$ M radioaktiv oljesyre + 5mM Glu

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 105,93  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

Glu (1M stock) 35  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6787,87  $\mu$ l = 6,788 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 5: Akutt 100  $\mu$ M radioaktiv oljesyre + 1 $\mu$ M FCCP

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 105,93  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6815,87 $\mu$ l = 6,81587 ml

Totalt 6,993ml

Dette fordeles i 12 rør, med 582,75  $\mu$ l i hvert rør. Rett før substratoksidasjonsforsøket tilsettes røret 0,583  $\mu$ l FCCP (fra mellomstock 1mM)

Kolonne 6: Akutt 20  $\mu$ M radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 12,6  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6916,2  $\mu$ l = 6,916 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 7: Akutt 400  $\mu$ M radioaktiv oljesyre

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 455,93  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6472,87  $\mu$ l = 6,473 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 8: Akutt 400  $\mu$ M radioaktiv oljesyre + 1  $\mu$ M FCCP

Radioaktiv oljesyre 35,03  $\mu$ l

Kald oljesyre 455,93  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6465,87  $\mu$ l = 6,46587 ml

Totalt 6,993ml

Dette fordeles i 12 rør, med 582,75  $\mu$ l i hvert rør. Rett før substratoksidasjonsforsøket tilsettes røret 0,583  $\mu$ l FCCP (fra mellomstock 1mM)

Kolonne 9: Kronisk 0  $\mu$ M radioaktiv oljesyre

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6963,83  $\mu$ l = 6,964 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 10: Kronisk 0  $\mu$ M radioaktiv oljesyre

Karnitin 7  $\mu$ l

BSA (Bovint serumalbumin) 29,17  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6963,83  $\mu$ l = 6,964 ml

Totalt 7 ml

Kolonne 11: Kronisk 100  $\mu$ M ikke-radioaktiv oljesyre

Kald oljesyre 116,67  $\mu$ l

Karnitin 7  $\mu$ l

DPBS m/HEPES 6876,33  $\mu$ l = 6,876 ml

Totalt 7 ml

### **3. Test av ulike proliferasjonsmedier**

#### **3.1 Standard proliferasjonsmedium**

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

10 ml FCS (Føtalt kalveserum)

10 ml Ultrosor G

2,5 ml Penicillin-streptomycin 10.000 enheter/ml

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

#### **3.2 Alternativt proliferasjonsmedium**

DMEM uten glukose/F12

10% FBS (Føtalt bovint serum)

70 pM insulin

2 ng/ml bFGF ("Basic fibroblast growth factor")

10 ng/ml EGF ("Epidermal growth factor")

0,4 µg/ml Dexametason

50 U/ml Penicillin

50 µg/ml Streptomycin

Glutamax tilsettes

#### **3.3 Alternativt proliferasjonemedium uten bFGF**

89,8 ml DMEM m/Glutamax

100 µl Dexametason (0,4 µg/ml)

11,66 µl Insulin (70 pM)

10 ml FBS (Føtalt bovint serum)

100 µl EGF (10ng/ml)

Totalt 100 ml

## **4. Medier til Western**

### **4.1 Høstebuffer:**

2x samplebuffer

10 µl/ml proteasehemmer

10 µl/ml fosfatasehemmercocktail 1

10 µl/ml fosfatasehemmercocktail 2

### **4.2 2x SDS samplebuffer**

2,5 ml 0.5 M Tris-HCl med pH 6.8

2 ml glycerol

4 ml 10% (w/v) SDS

0,5 ml 0.1% i 10 % etanol (w/v) bromfenolblått

Opp til 10 ml med "Ultra pure water"

Tilsett 5 % β-merkaptoetanol

### **4.3 1x Runningbuffer:**

25nM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS

### **4.4 Transferbuffer:**

25 nM Tris

192 nM Glycin

10 % Metanol



## **5. Medier til qPCR**

### **5.1 Reaksjonsblanding**

Per prøve, totalt 20  $\mu\text{l}$  i hvert rør:

13,2  $\mu\text{l}$  DEPC-dH<sub>2</sub>O + prøve

2,0  $\mu\text{l}$  10 x TaqMan RT Buffer

0,8  $\mu\text{l}$  25 x dNTP mix

2,0  $\mu\text{l}$  10 x RT Random hexamers

1,0  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ )

1,0  $\mu\text{l}$  Mulitscribe Reverse Transcriptase (50 U/ $\mu\text{l}$ )

### **5.2 Standarder**

cDNA-mix: 2  $\mu\text{l}$  fra hver prøve (2  $\mu\text{l}$  x 14 prøver = 28  $\mu\text{l}$ )

Standard 1000: 24  $\mu\text{l}$  cDNA mix + 96  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

Standard 500: 60  $\mu\text{l}$  standard 1000 + 60  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

Standard 250: 60  $\mu\text{l}$  standard 500 + 60  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

Standard 125: 60  $\mu\text{l}$  standard 250 + 60  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

### **5.3 Primere**

Primer skal ha en konsentrasjon på 30  $\mu\text{M}$ . Stock med primer har en konsentrasjon på 300  $\mu\text{M}$ . Lager 1:10 fortykning.

10  $\mu\text{l}$  primer + 90  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

### **5.4 cDNA fortykning**

2,5  $\mu\text{l}$  x 2 paralleller x 7 gener = 35  $\mu\text{l}$ .

Lager 40  $\mu\text{l}$  av hver prøve. Lager 1:5 fortykning.

8  $\mu\text{l}$  prøve + 32  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

### **5.5 SYBR green PCR mix**

Per prøve, totalt 22,5 µl:

12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix

0,25 µl Primer F (Forward primer)

0,25 µl Primer R (Reverse primer)

9,5 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O

Denne løsningen lages per gen.