

Kristoffer Toldnes Cumming

Effekten av to ulike styrketreningsmetoder på satellittceller, cellekjerner, muskelfiberareal og muskelstyrke i knestrekkerne hos eldre.

Sammendrag

Målet med denne studien var å undersøke ulike cellulære endringer hos eldre mennesker etter 12 uker med trening. 11 selvhjulpne eldre mennesker (70-88 år) trente enten tradisjonell ($n=5$) eller funksjonell styrketrening ($n=6$) tre ganger i uken. En deltager ble ekskludert på grunn av for få gjennomførte treninger. Før og etter treningsintervensjonen ble muskelstyrken målt i et kneekstensjonsapparat, muskeltykkelsen ble målt av m. vastus lateralis ved hjelp av ultralyd, og det ble tatt en muskelbiopsi av m. vastus lateralis for å undersøke satellittceller, cellekjerner og muskelfiberareal.

Begge treningsgruppene hadde en signifikant økning av maksimal styrke etter 12 uker med trening. De som trente tradisjonell styrketrening fikk den største økningen i muskelstyrken på $36\pm 8\%$, mens de som trente funksjonell styrketrening økte med $24\pm 5\%$. Selv om deltagerne som trente tradisjonell styrketrening økte styrken prosentvis mer, var det ikke signifikant mer enn de som trente tradisjonell styrketrening. Tradisjonell- og funksjonell styrketrening økte i tykkelsen av m. vastus lateralis med henholdsvis $21\pm 5\%$ og $15\pm 5\%$. Tradisjonell styrketrening viste en tendens til økning av det totale muskelfiberarealet ($21\pm 11\%$), hvor den største økningen fantes i type II muskelfibre ($34\pm 16\%$). Funksjonell styrketrening hadde ingen signifikant økning i det totale muskelfiberarealet ($4\pm 13\%$).

Tradisjonell styrketrening viste ingen signifikante endringer i antall cellekjerner per muskelfiber som følge av treningen. Funksjonell styrketrening økte signifikant antallet cellekjerner per muskelfiber ($19\pm 10\%$), hvor både type I og II muskelfibre hadde en økning. Når vi undersøkte satellittcellene viste ingen av treningsgruppene noen signifikant endring i antallet satellittceller per muskelfiber. Men den funksjonelle treningsgruppen hadde en signifikant nedgang på $-22\pm 8\%$ når vi så på antallet satellittceller per cellekjerne. Dette er et resultat av en nedgang i både type I og II muskelfibre.

Denne studien har få deltagere, noe som senker den statistiske styrken. En endelig konklusjon basert på disse resultatene blir derfor vanskelig. Våre resultater indikerer likevel at tradisjonell styrketrening kan være mer gunstig enn funksjonell styrketrening på de målte variabler, siden denne gruppen hadde de største økningene i styrke, muskeltykkelse og muskelfiberareal.

Nøkkelord: Eldre, trening, muskelfiberareal, satellittceller, cellekjerner, kjernedomene

Forord

Denne masteroppgaven er en del av prosjektet "Senior-løftet" som gjennomføres i perioden 2008-2009 ved Norges idrettshøgskole. Jeg vil benytte anledningen til å takke noen av de som har gjort det mulig å gjennomføre denne oppgaven.

Først en stor takk til Truls Raastad og Nils Helge Kvamme for all hjelp gjennom hele masteroppgaven. Jeg kunne aldri ha klart dette uten den fantastiske veiledningen og støtten dere har gitt meg.

Stor takk til Satu Koskinen for opplæring, veiledning og støtte gjennom hele masterperioden.

Tormod Skogstad Nilsen for god opplæring på laben.

Takk til alle klassekameratene mine for god støtte og mange morsomheter i masterperioden. Takk til alle jentene i klassen (+Vidar) for å ha bakt gode kaker som jeg har spist meg god og mett på.

En takk til forsøkspersonene som stilte opp med et smil!

Takk til alle ved seksjon for fysisk prestasjonsevne for å ha blitt tatt veldig godt imot som masterstudent.

Til slutt vil jeg takke Elisabeth for å ha ventet alle disse årene på at jeg skal bli ferdig!

Takk for at du har vist forståelse og tålmodighet for at jeg har vært distré de siste månedene.

Innholdsliste

1.0 INNLEDNING	6
1.1 PROBLEMSTILLING	7
2.0 TEORI	8
2.1 SARKOPENI	8
2.1.1 UTVIKLING AV MUSKELMASSEN	8
2.1.2 HVORDAN ENDRES MUSKELMASSEN?	10
2.2 MUSKELVEKST	12
2.2.1 MUSKELTVERRSNITT ETTER STYRKETRENING	12
2.2.2 MUSKELFIBERAREAL ETTER STYRKETRENING	13
2.3 SATELLITTCELLEN	13
2.3.1 AKTIVERING, PROLIFERERING OG DIFFERENSIERING AV SATELLITTCELLEN	15
2.3.2 ANTISTOFFER FOR IDENTIFISERING AV SATELLITTCELLEN	16
2.3.3 ENDRING I SATELLITTCELLER VED ALDRING	17
2.4 ALDERSRELATERTE FAKTORER SOM PÅVIRKER ANTALLET SATELLITTCELLER	19
2.4.1 TESTOSTERON	19
2.4.2 GH OG IGF-1	20
2.4.3 SATELLITTCELLENS DELINGSKAPASITET	20
2.4.4 HVA PÅVIRKER SATELLITTCELLENS DELINGSKAPASITET VED ALDRING?	21
2.5 EFFEKTER AV TRENING	22
2.6 OPPSUMMERING	23
3.0 METODE	25
3.1 UTVALG	25
3.2 INNDELING I GRUPPER	26
3.3 TRENINGSPROTOKOLL	26
3.3.1 TRADISJONELL STYRKETRENING	27
3.3.2 FUNKSJONELL STYRKETRENING	28
3.4 STYRKETEST	29
3.5 ULTRALYD	30
3.6 MUSKELBIOPSIER	30
3.6.1 SNITTING AV MUSKELBIOPSIER	31
3.6.2 IMMUNOHISTOKJEMI – METODE UTPRØVING	31
3.6.2.1 DAB (3,3'-DIAMINOBENZIDINE)	32
3.6.2.2 VECTOR VIP-KIT	32
3.6.2.3 IMMUNOFLUORESCENCE	33
3.6.2.4 KONKLUSJON	34
3.7 IMMUNOHISTOKJEMI	35
3.7.1 ANTISTOFFER	35
3.7.2 KVANTIFISERING AV SATELLITTCELLEN	36
3.7.3 KVANTIFISERING AV NCAM POSITIVE MUSKELFIBERE	38
3.7.4 KVANTIFISERING AV CELLEKJERNER	38
3.7.5 KVANTIFISERING AV MUSKELFIBERTYPER OG MUSKELFIBERAREAL	40
3.8 STATISTIKK	41

4.0 RESULTAT	42
4.1 KROPPSVEKT	42
4.2 TRENINGSPROGRESJON	42
4.2.1 TRENINGSMOTSTAND	42
4.2.2 TRENINGSVOLUM	44
4.3 MUSKELSTYRKE	45
4.4 MUSKELTYKKELSE OG MUSKELFIBERAREAL	46
4.4.1 TYKKELSE AV M. VASTUS LATERALIS	46
4.4.2 MUSKELFIBERAREAL	47
4.4.3 STØRRELFORDELING AV MUSKELFIBERE	49
4.5 SATELLITTCELLER	50
4.7 NCAM-POSITIVE MUSKELFIBERE	51
4.5 CELLEKJERNER	52
4.8 KORRELASJONER	53
5.0 DISKUSJON	56
5.1 MUSKELKARAKTERISTIKK	56
5.1.1 MUSKELTYKKELSE	56
5.1.2 MUSKELFIBERAREAL	58
5.2 SATELLITTCELLER	60
5.3 CELLEKJERNER	63
6.0 KONKLUSJON	66
7.0 REFERANSELISTE	67

1.0 Innledning

Tall fra Statistisk Sentralbyrå viser at andelen eldre over 66 år vil øke fra 13 % (2002) til 21 % av befolkningen i 2050 (SSB, 2003). Denne økningen skyldes både en økt levealder og lav fødselsrate. Dette betyr store kommende påkjenning på helsevesenet, og vil ha store økonomiske konsekvenser. Å ha et velfungerende muskelsystem er sentralt for å opprettholde et uavhengig og selvstendig liv. Ved aldring vil det skje ulike endringer i muskelsystemet. Den viktigste er en gradvis reduksjon av muskelstyrke og muskelmasse med alderen, men det er først etter 50-60 års alderen at reduksjonen blir markant (Hunter *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 1995). Dette er et resultat av nedgang i antall og atrofi av muskelfibrene, spesielt type II muskelfibrene. Årsakene til denne reduksjonen er noe usikker, men fysisk inaktivitet, i tillegg til naturlige aldringsprosesser er to viktige faktorer (Roubenoff & Hughes, 2000).

Det er viktig å forstå mekanismene som ligger bak den negative utviklingen hos eldre, men det er enda viktigere å forstå hvordan man kan forbedre muskelfunksjonen til eldre. Dette kan gjøres gjennom fysisk aktivitet, som ser ut til å bremse den aldersrelaterte nedgangen i muskelstyrke og muskelmasse (McCartney *et al.*, 1996). Dessverre er en stor andel eldre lite fysisk aktive (Loland, 2004). Endringer i muskelstyrke og muskelmasse skjer gjennom hypertrofi av muskelfibrene, og spesielt type II muskelfibrene ser ut til å kunne påvirkes i stor grad hos eldre mennesker (Kryger & Andersen, 2007). Det ser derfor ut til at opprettholdelse av et fysisk aktivt liv er svært viktig for et velfungerende muskelsystem hos eldre mennesker.

For at en muskelfiber skal kunne øke i størrelse kreves det at flere cellekjerener adderes slik at *kjernerdomenet*¹ opprettholdes. Paradoksalt observerer man sjelden en økning i antall cellekjerener selv om muskelfiberarealet øker etter en treningsperiode hos eldre (Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Siden muskelfibrene ikke har mulighet til å gjennomgå mitose, har en gruppe celler som befinner seg mellom cellemembranen og basalmembranen av muskelfiberen fått stor oppmerksomhet. Disse cellene kalles satellittceller og ser ut til å være viktig for vekst og vedlikehold av muskulatur (Hawke & Garry, 2001). Det er noe uenighet om hvordan satellittceller blir påvirket ved aldring, men man har sett at de kan påvirkes av trening (Kadi *et al.*, 2005). Hvordan satellittcellen blir påvirket ved ulike treningsmetoder og belastninger er mindre klart. Det finnes i dag flere studier der man har undersøkt de cellulære

¹ Det volumet cellekjernen kontrollerer av cellen (Hawke, 2005).

endingene i muskulatur hos eldre ved tradisjonell styrketrening (Hikida *et al.*, 2000; Mackey *et al.*, 2007). Det finnes imidlertid ingen studier der man har undersøkt hvordan trening som inkluderer hverdagslige aktiviteter i treningsprogrammet, og utføres på en slik måte at de ligner på tradisjonell styrketrening, påvirker de cellulære mekanismene. Dette er et område som er viktig å undersøke og tilegne seg mer kunnskap om. Gjennom denne studien har vi som mål om å undersøke satellittceller, cellekjerner og muskelfiberarealet hos selvhjulpne eldre mennesker som har trent tradisjonell- og funksjonell styrketrening med ulik belastning over 12 uker.

1.1 Problemstilling

- Hvilken effekt har tradisjonell styrketrening og funksjonell styrketrening på:
 - Muskelstyrken
 - Muskeltykkelsen
 - Muskelfiberareal
 - Satellittceller
 - Cellekjerner

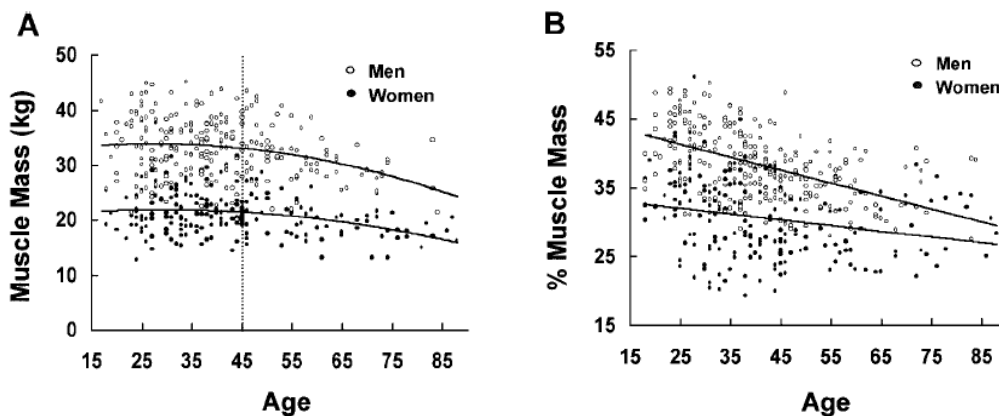
- Vil det forekomme noen fiberspesifikke endringer som følge av de to treningsformene på:
 - Muskelfiberareal
 - Satellittceller
 - Cellekjerner

2.0 Teori

2.1 Sarkopeni

2.1.1 Utvikling av muskelmassen

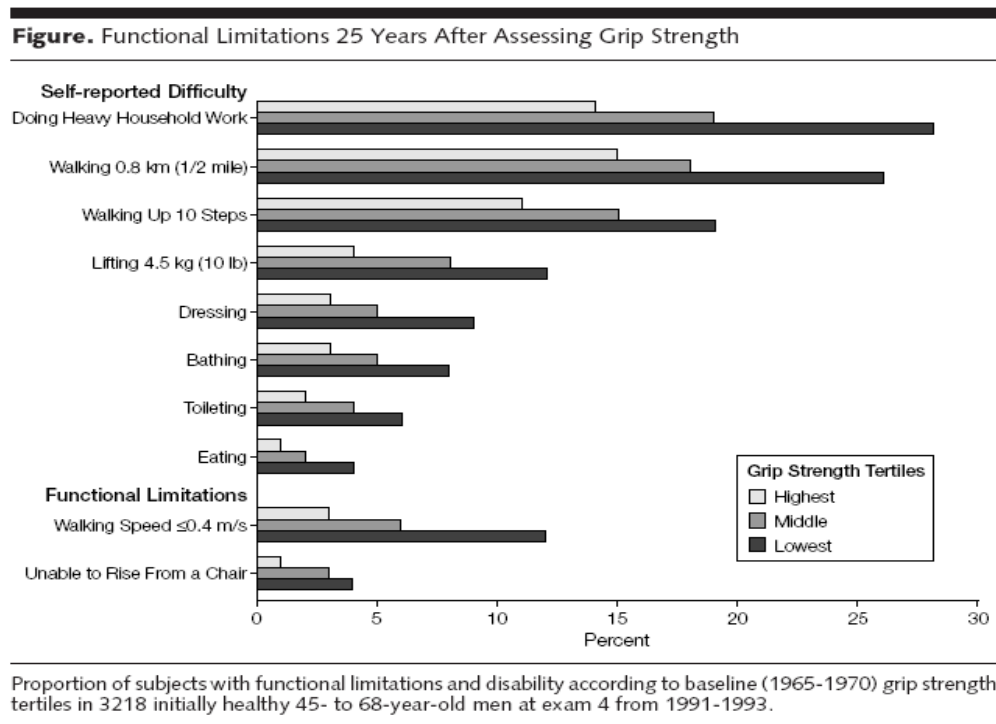
Muskelmassen reduseres gradvis ved aldring (figur 2.1), en prosess som kalles sarkopeni (aldersrelatert muskelatrofi). Muskeltapet starter relativt tidlig, men utgjør ikke mer enn 5 til 10 % tap fra alderen 20 til 50 år. Videre vil man se en reduksjon på hele 30 til 40 % (i tillegg til hva man allerede har mistet) fra 50 til 80 års alderen (Hunter *et al.*, 2004). Et slikt tap av muskelmasse kan resultere i at veien fra et selvstendig til et avhengig liv er kort. Redusert muskelmasse vil resultere i redusert muskelstyrke. Dette er en vanlig årsak til redusert livskvalitet hos eldre, siden redusert muskelstyrke/muskelfunksjon vil kunne påvirke den daglige funksjonsevnen og morbiditeten² hos eldre (Hunter *et al.*, 2004). Dette vil også ha store samfunnsøkonomiske kostnader.



Figur 2.1. A: Forholdet mellom muskelmasse og alder. B: Forholdet mellom relativ muskelmasse (muskelmasse/kroppsmasse) og alder. Menn (hvite prikker) og kvinner (sorte prikker). Hentet fra Jansen *et al.*, 2000.

² Sykeligheten

Reduksjonen i muskelmasse er forskjellig fra individ til individ, men man tror at muskelmassen man har som ung også kan være avgjørende for hvor stort fallet vil være senere i livet. Sannsynligvis skyldes dette at de med mer muskelmasse antageligvis er mer fysisk aktive, og dermed bremser fallet i muskelmassen ved aldring (Sayer et al., 2008). I en studie av Rantanen et al. (1999) ble det funnet en sammenheng mellom muskelstyrken i håndgrepet og ulike funksjonelle begrensninger som deltagerne fikk som eldre (25 år senere) (figur 2.2).



Figur 2.2. Forholdet mellom funksjonelle begrensninger og muskelstyrke i grepet. Hentet fra Rantanen et al., 1999.

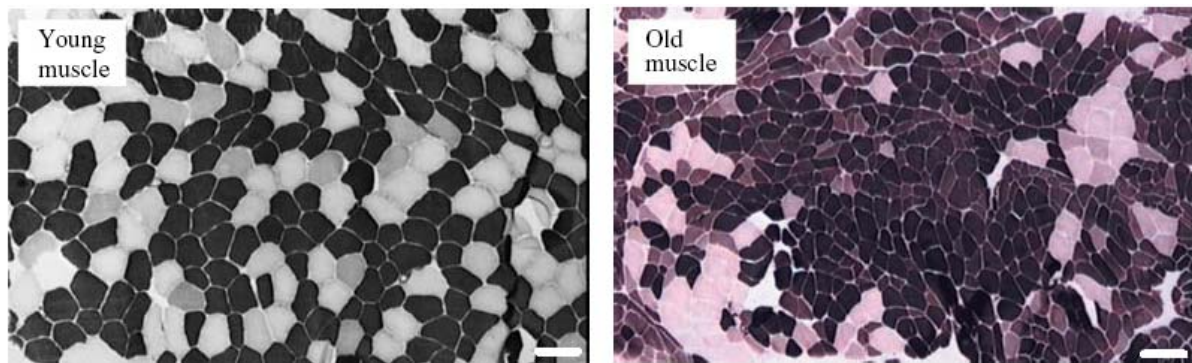
Selv om korrelasjonen er testet opp mot håndstyrken, blir det hevdet at håndgrepstyrken korrelerer med muskelstyrken i andre muskler (Rantanen et al., 1999). Det er videre funnet en sammenheng mellom muskelstyrken i håndgrepet og dødelighet hos middelaldrene og eldre mennesker (Sasaki et al., 2007). Videre kan det tenkes at muskelstyrken kan gjenspeile aktivitetsnivået til deltagerne i studien, som dermed gjenspeiler dødeligheten bedre. Dette blir det derimot tatt høyde for i en senere studie av Rantanen et al. (2000) ved å undersøke muskelstyrken i håndgrepet og BMI³. Det er sannsynlig at vi med andre styrketester, som inkluderer større muskelgrupper, vil finne en bedre sammenheng enn det som er gjort mellom

³ BMI = Kroppsmasseindeks, $BMI = \text{vekt (kg)} / \text{høyde}^2 \text{ (cm)}$

håndgrepstyrken og funksjonsnivå. Tester som gjenspeiler styrken i muskulatur som er viktig for funksjonsdyktigheten, som beinmuskulaturen, ser derfor ut til å gi bedre sammenheng mellom styrke og funksjonsdyktighet, sykelighet og dødelighet (Ruiz *et al.*, 2008).

2.1.2 Hvordan endres muskelmassen?

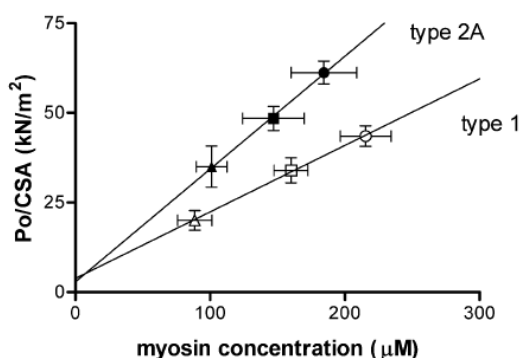
Flere faktorer bidrar til en nedgang i muskelmasse og muskelstyrke. En av dem er en reduksjon i antallet muskelfibere (Lexell *et al.*, 1988). Denne nedgangen ser ut til å være størst i under- enn i overekstremiteten (Brunner *et al.*, 2007). Dette tror man er et resultat av denervering og reinnervasjon av muskelfibre fordi motoriske enheter går tapt, som et resultat av at antallet motoneuroner i ryggmargen og antallet og størrelsen på motoraksoner blir redusert ved aldring (Porter *et al.*, 1995). Dette vil resultere i at enkelte muskelfibere ikke blir reinnervert, og dermed vil muskelfibere gå tapt (Lexell *et al.*, 1986). En effekt av dette er ofte en gruppering av muskelfibere, noe man ikke ser hos unge (Lexell *et al.*, 1986). Dette vil si at man ser at type I muskelfibere samler seg på ett område, mens type II muskelfibrene samler seg på et annet område. Hos unge individer vil man se en noe mer tilfeldig ”plassering” av fibre (figur, 2.4). En reinnervasjon vil også kunne endre muskelfibertype hvis en muskelfiber blir innervert av et annen type akson (Hunter *et al.*, 2004).



Figur 2.4. Fordeling av muskelfibrene i muskelen til en unge (22 år) og hos en eldre person (87 år). Hentet fra Andersen, 2003.

Det er uenighet om muskelfibersammensetningen blir påvirket ved aldring. Noen finner ingen endring (Lexell *et al.*, 1983; Aniansson *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 2003) og andre finner endringer (Lexell *et al.*, 1986; Fayet *et al.*, 2001). Det kan se ut som forskjellene blir mer synlige ved en høy alder (> 76 år) (Aniansson *et al.*, 1992).

En annen faktor som bidrar til nedgangen i muskelmassen er en atrofi av muskelfibrene. Ved å undersøke muskelfibrene, spesielt type II fibre, viser eldre et lavere muskelfiberareal enn unge (Andersen, 2003), og atrofien rammer både under- og overekstremiteten. Det kan se ut som atrofien ofte er størst i de muskelfibrene som i utgangspunktet hadde færrest cellekjerner (Bruusgaard *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2009). Det kan derfor også se ut til at enkelte muskler er mer utsatt for atrofi enn andre (Brooks *et al.*, 2009), spesielt i muskler som har en høy andel type II muskelfibere, siden disse ofte har et lavere antall cellekjerner enn i type I muskelfibrene (Verdijk *et al.*, 2007). Dette kan også være et resultat av at type II muskelfibrene sjelden eller aldri blir fullt aktivert hos eldre, og dermed atrofierer som følge av mangel på stimulering (Andersen, 2003). En av de største negative effektene av reduksjonen i muskelfiberarealet for type II muskelfibrene er at det vil forårsake en nedgang i *power*⁴ (Hunter *et al.*, 2004). Å opprettholde en god *power* er svært viktig hos eldre fordi det påvirker evnen til å utvikle kraft hurtig, f. eks hvis man skal sette foten raskt ut for å korrigere/unngå en ubalanse. I tillegg til en reduksjon i muskelfiberareal, ser man også en reduksjon i tettheten av myofibriller (målt som myosinkonsentrasjon) ved aldring. I en studie av D'Antona *et al.* (2003) ble det vist en redusert konsentrasjon av myosin hos eldre, spesielt hos eldre med lav funksjonsdyktighet, sammenlignet med unge personer. Dette gjelder både type I og type II fibre. Effekten av dette vil være at hver enkelt muskelfiber vil ha en lavere kraft per areal (figur 2.3). Dette vil, i tillegg til en reduksjon i fiberareal, ha en negativ effekt på muskelstyrken til eldre.



Figur 2.3. Myosinkonsentrasjon og spesifikk kraft for type I og II muskelfibere hos unge (sirkel), eldre (firkant) og immobiliserte eldre (trekant). Hentet fra D'Antona *et al.*, 2003.

⁴ Evnen til å utvikle stor effekt ($Power = kraft \times hastighet$)

2.2 Muskelvekst

I dette delkapittelet vil jeg ta for meg studier som omhandler styrketrening av eldre, og målinger gjort av m. quadriceps femoris.

2.2.1 Muskeltverrsnitt etter styrketrening

Det finnes i dag en rekke verktøy man kan bruke for å måle endringer i muskeltverrsnittareal (CSA) og muskeltykkelse, hvor MRI (magnetisk resonans tomografi) og CT (computer tomografi) er hyppigst benyttet.

Ved hjelp at CT er det funnet en økning fra 5,5 til 12 % i CSA etter styrketrening hos eldre (Frontera *et al.*, 1988;McCartney *et al.*, 1996;Ferri *et al.*, 2003;Frontera *et al.*, 2003;Suetta *et al.*, 2004;Verdijk *et al.*, 2009). Disse resultatene varierer siden treningsintervensjonen har ulik varighet (12 uker – 2 år), ulik fysisk form hos deltagerne (inaktive pasienter til normalt aktive eldre) og styrketreningen er av ulik kvalitet. F. eks i studien til Frontera *et al.* (2003) og Suetta *et al.* (2004) har deltagerne i begge studiene trent styrketrening over 12 uker, men de økte henholdsvis 5,5 og 12 % i CSA. Dette kan skyldes at Suetta *et al.* benyttet seg av postoperative hoftepasienter, noe som kan bety at de har vært inaktive i perioden før styrketreningen, og derfor har et stort potensial for å øke muskelstørrelsen.

I studiene hvor man benytter seg av MRI er det også en stor spredning med økning fra 1 til 9,8 % i CSA (Welle *et al.*, 1996;Hakkinen *et al.*, 1998b;Harridge *et al.*, 1999;Hakkinen *et al.*, 2001;Kryger & Andersen, 2007). I likhet med studiene som benyttet seg av CT er det ulikheter i lengden på treningsintervensjonen (10 – 21 uker), utgangspunktet til deltagerne og styrketreningen var ulik. Her kan det være verdt å trekke frem studien av Welle *et al.* (1996), denne ble gjennomført over 12 uker, likt som studiene presentert i avsnittet om CT målinger, men deltagerne viste kun en økning på 1 % i CSA. Denne økningen skyldes antageligvis at utregningen av CSA er gjort for hele muskelen, i motsetning til andre studier som utregnet CSA av den tykkeste delen av muskelen.

Det finnes i dag svært få studier der man har benyttet seg av ultralyd. Häkkinen et al. (1998a) benyttet ultralyd for å beregne CSA. Økningen i CSA etter 6 mnd med styrketrening var 5,8 % hos kvinner og 2,1 % hos menn. Suetta et al. (2008) målte derimot tykkelsen av m. vastus lateralis med ultralyd og fant at denne endret seg med 15 % etter 12 uker med styrketrening.

2.2.2 Muskelfiberareal etter styrketrening

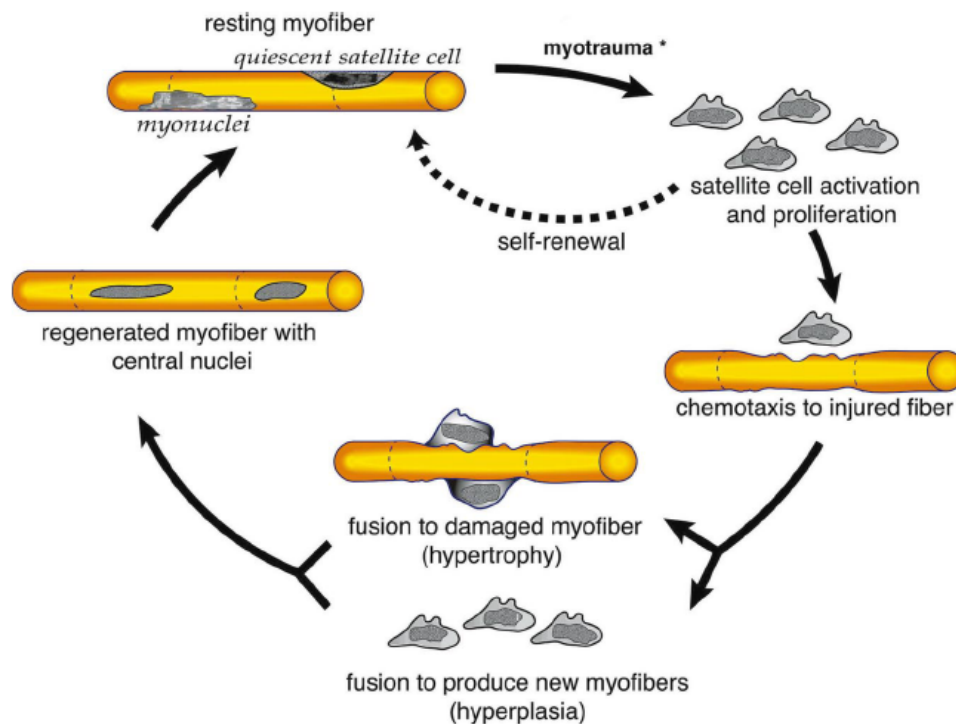
Ved hjelp av muskelbiopsier kan man undersøke endringer i muskelfiberarealet. Som tidligere nevnt ser man at eldre har en reduksjon i muskelfiberarealet sammenlignet med unge, spesielt i type II muskelfibrene. Studier viser at dette kan bremses, og muskelfiberarealet kan økes med trening av eldre (Petrella *et al.*, 2006; Suetta *et al.*, 2008), men ikke alle har ikke funnet endringer i muskelfiberarealet ved trening (Mackey *et al.*, 2007). Petrella et al. (2006) fant en økning av det totale muskelfiberarealet (samlet type I og II) på 17 % etter 16 uker med styrketrening. Ut ifra andre studier ser man at denne økningen i storgrad skyldes økning i type II muskelfibrene (Häkkinen *et al.*, 2001; Kryger & Andersen, 2007). Denne økningen er mest synlig i type IIX muskelfibere hvor man har sett en gjennomsnittlig økning på over 50 % (Hikida *et al.*, 2000; Suetta *et al.*, 2008). I studien til Mackey et al. (2007) fant man ingen endringer i muskelfiberarealet, men de fant en signifikant økning i muskeltverrsnittet av m. quadriceps femoris. Man kan derfor ikke utelukke at det kan ha oppstått hyperplasi hos deltagerne i denne studien, men det er også mulighet de områdene biopsiene ble tatt fra ikke er representative for de endringene som skjedde ved treningen.

2.3 Satellittcellen

Satellittcellen ble for første gang beskrevet av Alexander Mauro (1961) etter å ha undersøkt muskulaturen hos frosker ved hjelp av elektronmikroskopi. Satellittcellen fikk sitt navn etter den perifere beliggenheten i muskelfiberen mellom cellemembranen og basalmembranen i muskelfibrene. Satellittceller (i hvile) kjennetegnes ved dens høye tetthet av heterokromatin⁵, redusert mengde organeller, høyt forhold mellom cellekjerne og cytoplasmatisk volum (kjernedomene) og lav transkripsjonsaktivitet (Hawke & Garry, 2001; Shortreed *et al.*, 2008). Siden satellittcellen er en udifferensiert celle kan den, i motsetning til muskelfibere (som ikke kan gjennomgå mitose), tre inn i cellesyklus når muskelen blir utsatt for et stimulus, f. eks ved trening eller en skade. Dette gjør at en muskelfiber kun kan få flere cellekjerener ved at

⁵ Generelt ”inaktive” regioner av kromosomet

satellittceller ”smelter” sammen med muskelfiberen, noe som er nødvendig ved hypertrofi for å opprettholde et konstant kjernedomene. På denne måten spiller de en viktig rolle for vekst og vedlikehold av muskelfiberen. Satellittcellen har også mulighet til smelte sammen med andre satellittceller. Dette blir starten på dannelse av nye muskelfibere (hyperplasi) (Hawke & Garry, 2001). I tillegg til å påvirke muskelfibere, har satellittcellen også mulighet til å danne nye datterceller, slik at mengden satellittceller blir opprettholdt eller økt etter hvert som deres aktivitet endres (Mackey *et al.*, 2007).



Figur 2.5. Satellittcellen aktiveres etter et stimuli, f. eks styrketrening. I respons til dette vil satellittcellen aktiveres og prolifere. Noen satellittceller kan danne nye datterceller og dermed opprettholde eller øke mengden satellittceller. Andre kan ”smelte” sammen med muskelfibere for å føre nye cellekjerner ved hypertrofi, eller smelte sammen med andre satellittceller for å danne nye muskelfibere. Hentet fra Hawke og Garry, 2001.

2.3.1 Aktivering, proliferering og differensiering av satellittcellen

Aktiveringen av satellittcellen ser ut til å være et resultat av stimulering fra flere vekstfaktorer. IGF-1 er en av mange vekstfaktorer som har en viktig funksjon i aktiveringen og proliferering av satellittcellen, ettersom den oppregulerer både MAPK⁶ og PI3K⁷, som begge er viktige signalveier for cellevekst (Hawke & Garry, 2001; Machida & Booth, 2004; Wozniak *et al.*, 2005). En annen viktig reguleringsfaktor for satellittcellen er MRFene (se senere delkapittel). Spesielt ser det ut til at Myf5 og MyoD er viktige i den tidlige fasen av prolifereringen, mens myogenin og MRF4 er mer sentralt i den sene fasen av prolifereringen, hvor de gjør satellittcellen klar for å tre inn i differeringsfasen (Shortreed *et al.*, 2008). En akutt aktivering ser ut til å skje gjennom frigjøring av *nitrogenoksid* (NO), som fører til frigjøring av *hepatocyte growth factor* (HGF) (Tatsumi *et al.*, 2002). Denne frigjøringen skjer hurtig, i løpet av noen få minutter. Graden av frigjøring avhenger av hvor stort stimuli er. HGF binder seg til *c-met reseptoren* i satellittcellen (Anderson, 2000). Bindingen mellom HGF og *c-met reseptoren* fører til en kaskade av signaler som starter prolifereringen av satellittcellen. Gjennom å gi injeksjoner av HGF har man sett at satellittcellen kan aktiveres, selv uten et kjent stimuli. Dette viser at HGF har en meget viktig rolle i aktiveringen av satellittceller (Tatsumi *et al.*, 1998).

⁶ Mitogen-aktivert protein kinase

⁷ Phosphatidylinositol 3 kinase

2.3.2 Antistoffer for identifisering av satellittcellen

Selv om elektronmikroskopi blir sett på som gullstandarden for identifisering av satellittcellen, finnes i dag en rekke antistoffer for å identifisere den. I dette avsnittet vil jeg ta for meg de vanligste antistoffene som er benyttet for identifiseringen av satellittcellen hos eldre mennesker.

NCAM (neural cell adhesion molecule) er et glykoprotein som finnes i cellemembranen til satellittcellen. Bruken av antistoff mot NCAM for å identifisere satellittceller ble først beskrevet av Moore og Walsh (1985). De observerte at anti-NCAM fungerte godt i muskulatur både hos fostre og voksne. Bruken av antistoff mot NCAM er svært mye brukt i humane studier (Renault *et al.*, 2002b; Charifi *et al.*, 2003; Cramer *et al.*, 2004; Kadi *et al.*, 2004a; Dreyer *et al.*, 2006; Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009), og er antatt å merke satellittceller i en passiv, aktivert og prolifererende fase (Hawke & Garry, 2001). Et problem med merking mot NCAM er at det blir også benyttet for å identifisere nervesynapser i muskulaturen (Covault & Sanes, 1986). Det er derfor viktig å undersøke nøye slik at man ikke inkluderer synapsene under analysen.

PAX-7 (paired box transcription factor 7) er en gruppe transkripsjonsfaktorer som er en del av *paired box* familien. Man mener at disse faktorene spiller en viktig rolle i utviklingen av muskulatur, ettersom mus som mangler dette genet har underutviklet muskulatur (Kuang *et al.*, 2006). Ettersom satellittceller uttrykker PAX-7 vil antistoff mot dette genet merke satellittceller (Seale *et al.*, 2000), og det vil være et godt antistoff for å identifisere satellittcellen. PAX-7 ser imidlertid ut til å bli nedregulert ved slutten av differeringsfasen (Seale *et al.*, 2000). Det kan derfor se ut til at bruken av dette antistoffet kan underestimere antallet satellittceller. PAX-7 blir likevel benyttet for å merke satellittceller i en passiv, aktivert og prolifererende fase (Hawke & Garry, 2001). Det finnes per i dag kun én studie som benytter dette antistoffet på muskulatur fra eldre (Verdijk *et al.*, 2007).

M-Cadherin (Cadherin 15 (CDH15), *Calcium dependant adhesion molecules*) er en gruppe gener i cadherin familien som koder for *Calcium dependant adhesion glycoproteins* i muskulatur. M-Cadherin blir benyttet for å identifisere satellittceller i en passiv, aktivert og prolifererende fase (Hawke & Garry, 2001). Det er imidlertid observert at M-Cadherin merking kan underestimere antallet satellittceller (Cornelison & Wold, 1997). Det finnes per i dag kun én studie som har benyttet M-Cadherin for å identifisere satellittcellen (Sajko *et al.*,

2004). Det skal sies her at denne studien rapporterte det laveste gjennomsnittlige antall satellittceller i forhold til andre studier som er gjort på muskulatur fra eldre (tabell 2.1).

2.3.3 Endring i satellittceller ved aldring

Satellittcellene står for ca. 30 % av cellekjernene i muskler hos nyfødte. Andelen satellittceller ser ut til å minke til ca. 5 % ved voksen alder, enkelte hevder at antallet reduseres ytterligere ved økt alder. Snow (1977) var den første som undersøkte muskler til eldre og unge samtidig. Denne studien ble utført på mus og rotter, og viste at eldre dyr hadde mindre andel satellittceller (prosent av cellekjernene observert). Dette kommer av at de eldre dyrene hadde en større mengde cellekjerner, men uttrykt som antall satellittceller per muskelfiber hadde de det samme antallet satellittceller som de unge. Hikida et al. (1998) var de første som undersøkte forskjellene mellom unge og eldre mennesker. De fant ingen forskjell mellom eldre og unge verken mellom antallet cellekjerner eller satellittceller. Hikida et al. (1998) benyttet seg av elektronmikroskopi. Som er en meget nøyaktig metode, men er tidkrevende, og den tillater ikke analyse av så mange muskelfibere som ved en immunologisk metode. Renault et al. (2002b) var de første som benyttet seg av en immunologisk metode for å sammenligne satellittceller hos unge og eldre. De tok en muskelbiopsi fra ulike deler av muskelen postmortem. Studien viste klart flere satellittceller hos unge enn hos eldre mennesker, men tar ikke hensyn til aktivitetsnivået hos deltagerne, noe som kan påvirke satellittcelleandelen (se senere delkapittel). Disse resultatene blir også støttet opp av andre studier (Kadi *et al.*, 2004a; Sajko *et al.*, 2004), men ikke av alle (Hikida *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2000; Dreyer *et al.*, 2006; Petrella *et al.*, 2006).

Tabell 2.1. Humanstudier der man har sammenlignet unge og eldres satellittceller.

Referanse	Kjønn	Antall satellittceller per cellekjerne		Sig. Kjønn	Sig. Eldre vs. Unge	Merknad
		Eldre	Unge			
(Hikida <i>et al.</i> , 1998)	M	2,45 ± 0,87	1,61 ± 1,22			Intervensjonsgruppe
		2,30 ± 0,89	2,35 ± 0,11		IS	Kontroll Elektronmikroskopi
(Roth <i>et al.</i> , 2000)	K	2,5 ± 0,6	1,7 ± 0,6	IS		Elektronmikroskopi
	M	1,7 ± 0,5	2,8 ± 0,5	IS	IS	
(Renault <i>et al.</i> , 2002b)	M	1,44 ± 0,74	4,17 ± 0,52		<i>P</i> <0,001	m. Biceps brachii
		1,77 ± 0,7	5,89 ± 1,0		<i>P</i> <0,001	m. Masseter
(Kadi <i>et al.</i> , 2004a)	K	4,4 ± 1,3	7,1 ± 1,9	<i>P</i> <0,001	<i>P</i> <0,001	
	M	3,9 ± 0,9	6,9 ± 1,8			
(Sajko <i>et al.</i> , 2004)	M	1,09	2,02		<i>P</i> <0,05	
(Dreyer <i>et al.</i> , 2006)	M	2,81 ± 0,7	2,86 ± 0,6		IS	
(Petrella <i>et al.</i> , 2006)	K	4,6 ± 0,5	4,0 ± 0,4	IS	IS	
	M	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5			
(Verdijk <i>et al.</i> , 2007)	M	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,1		IS	Type 1 muskelfibere
		1,5 ± 0,2	2,9 ± 0,4		<i>P</i> <0,05	Type 2 muskelfibere

Tabell 2.1 summerer alle studier som sammenligner antall satellittceller hos unge og eldre mennesker. Det er stor variasjon mellom studiene, noe som kan skyldes ulike analysemetoder og muskler brukt i analysen. Forskjellen blir tydelig hvis man undersøker andelen satellittceller⁸ i de ulike muskelfibertypene. Det er vist at eldre har en lavere andel satellittceller i type II muskelfiberne i forhold til type I muskelfiberne (Verdijk *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Forskjellen blir mer synlig når man sammenligner eldre og unge, siden unge i utgangspunktet har tilnærmet likt forhold i andelen satellittceller i type I og II muskelfibere (Verdijk *et al.*, 2007). Det finnes derimot en annen måte å kvantifisere satellittceller på. Ved å telle antall satellittceller per muskelfiber vil man kunne ta høyde for eventuelle forskjeller i cellekjerne mellom unge og eldre deltagere. Det finnes et begrenset antall studier som kvantifiserer satellittceller på denne måten hos unge og eldre mennesker, og resultatene er sprikende. Noen finner en forskjell (Renault *et al.*, 2002b; Sajko *et al.*, 2004), mens andre finner ingen forskjell (Kadi *et al.*, 2004a; Petrella *et al.*, 2006). Det ser ut til at det er muskelfiberspesifikke forskjeller, hvor man finner en forskjell i type II muskelfibrene (Verdijk *et al.*, 2007). Som antydnet tidligere kan det se ut som det er

⁸ Andelen satellittceller utregnes som antall per cellekjerne

intramuskulære forskjeller i andelen satellittceller innad hos individer, hvor muskler som inneholder flere type II muskelfibere har færre satellittceller (Gibson & Schultz, 1983; Verney *et al.*, 2008). Disse forskjellene, både i muskelfibertypene og intramuskulært, kan skyldes ulike faktorer som redusert bruk av muskulaturen, redusert respons hos satellittcellene eller naturlige aldringsprosesser av muskulaturen.

2.4 Aldersrelaterte faktorer som påvirker antallet satellittceller

Man ser at mengden med fysisk aktivitet går ned når man blir eldre (Loland, 2004).

Endringene i antall satellittceller kan være et resultat av mange faktorer, som endringer i hormoner, vekstfaktorer, cytokiner og/eller endret fysisk aktivitet.

Hos mennesker har man sett en gradvis nedgang i hormonkonsentrasjonen. Spesielt anabole hormoner som testosteron, veksthormon (Growth hormone, GH) og IGF-1 (Insulin-like growth factor) har fått oppmerksomhet i forbindelse med sarkopeni. I tillegg vil den katabole faktoren myostatin (GDF-8, Growth and differentiation factor-8) og det katabole cytokinet TNF α (Tumor necrosis factor- α) være viktige i forbindelse med sarkopeni.

2.4.1 Testosteron

Ved aldring vil nivåene av fritt testosteron synke. Nivåene kan synke med så mye som 64 % fra 25 til 85 år hos menn, mens hos kvinner kan den synke 28 % (Morley *et al.*, 1997; Khosla *et al.*, 1998). I tillegg til dette vil forløperen til testosteron, DHEA, være ca. 5 ganger lavere ved 85 år enn ved 30 års alder (Herbert, 1995; Nair *et al.*, 2006). Gjennom å gi testosteron til eldre menn har man observert økning av muskelmassen, selv uten trening (Ferrando *et al.*, 2002). Den økte muskelmassen hadde også effekt på en rekke styrketester. Hos eldre menn har det blitt funnet en sammenheng mellom muskelstyrken og serum testosteron, mens hos kvinner har man ikke funnet det samme. Dette kan komme av kvinner ikke har en stor produksjon av testosteron (Iannuzzi-Sucich *et al.*, 2002). Grunnen til at testosteron er så effektiv for muskelmassen er fordi det har en positiv effekt på mengden satellittceller i muskulatur ved å påvirke prolifereringen og modningen av disse, og vil kunne påvirke ekspresjonen av androgene reseptorer (Ryall *et al.*, 2008). Testosteron har vist seg å påvirke muskelmassen i stor grad, og redusert nivå av testosteron vil derfor være sentralt i utviklingen av sarkopeni, spesielt hos menn.

2.4.2 GH og IGF-1

I likhet med testosteron vil blodkonsentrasjonen av GH synke fra 30 års alder, med gjennomsnittlig nedgang på ca. 1 % per år (Ryall *et al.*, 2008). Muligens er dette mer et resultat av inaktivitet enn aldringen *per se* fordi ved trening vil man se en økning i blodkonsentrasjonen av GH (Raastad, 2005). En av funksjonene til GH er å fungere som et anabolt hormon som fungerer gjennom å regulere IGF-1 transkripsjonen. I en randomisert kontrollert studie gjort på eldre menn (65 – 80 år) som hadde et naturlig lavt nivå av GH ble det vist at GH tilskudd ga økt muskelmasse, selv uten trening (Giannoulis *et al.*, 2006). Dette indikerer at GH er en viktig brikke i utviklingen av sarkopeni, spesielt hos eldre som har et lavt nivå av GH (Velloso, 2008).

Som følge av nedgangen i GH ved aldring vil man se en påfølgende nedgang i IGF-IEa/lever produsert IGF-1 (Benbassat *et al.*, 1997). Man kan derfor si at IGF-1 mer er et resultat av inaktivitet enn aldring i seg selv. IGF-1 har fått spesielt oppmerksomhet siden det kan påvirke både satellittceller, muskelmetabolisme, proteinsyntese, men også nerveceller, noe som kan forklare endringen på motoneuroner man ser hos eldre (Edstrom *et al.*, 2007). Siden IGF-1 også har en negativ effekt på overlevelsen av motoneuroner, kan denne nedgangen være en av årsakene til grupperingen av muskelfibere hos eldre (figur 2.4).

Siden IGF-1 har en viktig rolle i både oppbygningen (anabolt og anti-katabolt) og vedlikehold av muskulatur, samt har en viktig innvirkning på nerveceller, vil negative endringer i IGF-1 være en viktig brikke i utviklingen av sarkopeni.

2.4.3 Satellittcellens delingskapasitet

Gjennom forsøk *in vitro*⁹ har det blitt funnet at satellittcellenes evne til å proliferere og danne nye datterceller er svekket i vev fra eldre rotter (Schultz & Lipton, 1982). Man tror derfor at dette vil kunne påvirke muskelens evne til å regenerere seg siden eldre har færre satellittceller som følge av dette (Sadeh, 1988). I studien til Sadeh (1988) fant man ikke bare at regenereringen av sterkt skadet muskelvev gikk sakte, men at den også var kraftig svekket hos eldre rotter. Ved *in vitro* forsøk gjort med muskelvev fra mennesker har man også rapportert at satellittcellers evne til å proliferere er svekket i vev fra eldre (Renault *et al.*, 2000). Selv om

⁹ Forsøk gjort hvor vevet er tatt ut av en levende organisme og befinner seg i et kontrollert miljø i et rør eller en skål.

disse studiene er gjort *in vitro* er det grunn til å tro at dette også gjelder *in vivo*¹⁰, og man har dermed grunn til å tro at dette påvirker evnen til hypertrofi hos eldre.

2.4.4 Hva påvirker satellittcellens delingskapasitet ved aldring?

Det finnes mange potensielle faktorer som påvirker satellittcellen både negativt og positivt. Som nevnt tidligere så skjer det endringer i IGF-1 ved aldring, dette er en vekstfaktor som kan ha en direkte effekt på prolifereringen av satellittcellen (Grounds, 1998). Denne kan derimot økes med trening, og er dermed ikke svekket hvis man er fysisk aktiv.

MRF er en viktig gruppe regulatoriske faktorer som har spesiell betydning i utviklingen av muskelceller og består av MyoD, mrf4, myogenin og myf5. Disse påvirker både aktiveringen, prolifereringen og modningen av satellittceller, og er derfor svært sentral når man snakker om den regenerative kapasiteten til muskulatur. Gjennom dyreforsøk har man observert at eldre rotter hadde høy ekspresjon av MyoD og myogenin sammenlignet med unge dyr. Etter en overbelastning av plantaris muskulaturen i 14 dager viste kun de unge dyrene økt proteinmengde av MyoD og myogenin parallelt med hypertrofi, noe man ikke så hos de eldre dyrene når ekspresjonen var høy før overbelastningen (Alway *et al.*, 2002). Hos eldre mennesker har man funnet økt ekspresjon av samtlige MRFer i hvile, men etter en treningsøkt hadde de eldre et tilnærmet likt ekspresjonsnivå som unge (Raue *et al.*, 2006). I andre studier har man derimot ikke funnet noen forskjeller mellom eldre og unge, verken på ekspresjonen eller proteinmengden av MRF (Bamman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Det blir også hevdet at MRF responsen ved trening er svekket hos eldre (Hameed *et al.*, 2003; Petrella *et al.*, 2006). Det er derfor svært sprikende resultater når det gjelder MRF, både hos dyr og mennesker. Hvis det viser seg at det er forskjeller i MRF hos unge og eldre, vil sannsynligvis dette kunne være en av faktorene som påvirker utviklingen av sarkopeni.

TNF- α er et katabolt cytokin som nedregulerer proteinsyntese og øker proteinnedbrytningen, og er sentral i en rekke sykdommer som forårsaker muskelatrofi (Hunter *et al.*, 2004). TNF- α fungerer gjennom at det virker negativt på MyoD og dermed blokkerer for modningen av satellittceller. Det er funnet økte nivåer av TNF- α (målt ved blodprøve) ved økt alder (Paolisso *et al.*, 1998), noe som betyr at regenereringsevnen hos eldre vil være redusert. Ved styrketrening har nivåene av TNF- α blitt redusert, både på mRNA- og proteinnivå, noe som

¹⁰ Eksperiment som er foregått i levende vev til hele levende organismer.

førte til økt proteinsyntese i muskulaturen (Greiwe *et al.*, 2001). TNF- α ser derfor ut til å kunne påvirke muskelmassen negativt ved å hemme muskelens regenereringsevne.

Myostatin er en annen negativ regulator for muskulatur. Den fungerer ved å hemme prolifereringen av satellittceller og holde cellyklusen i en G₀-fase¹¹ (McCroskery *et al.*, 2003). Forsøk gjort på myostatin *knockout* mus viste at disse var større og hadde en kraftigere muskelvekst enn andre mus som hadde normal myostatinproduksjon (McPherron *et al.*, 1997). Hos eldre kvinner er det funnet en høyere ekspresjon av myostatin mRNA i forhold til unge kvinner (Raue *et al.*, 2006), mens det er ikke funnet noen forskjell mellom unge og eldre menn (Welle *et al.*, 2002). I tillegg kan det se ut som styrketrening kan senke nivåene av myostatin (Hulmi *et al.*, 2007; Dennis *et al.*, 2008).

2.5 Effekter av trening

Trening er et stimulus for å ”vekke” satellittcellen. Gjennom forsøk gjort på styrkeløftere, som har mange år med hard styrketrening, ble det vist at disse hadde 70 % høyere satellittcellemengde i m. trapezius enn kontrollgruppen (Kadi *et al.*, 2005). Gjennom treningsintervensjoner har man også sett en økning av satellittceller etter trening av i utgangspunktet utrente unge, både etter 9 uker (Roth *et al.*, 2001) og 16 uker (Petrella *et al.*, 2006). Dette viser at antallet satellittceller kan økes ved regelmessig trening. Effektene av en treningsøkt har også vist en respons på satellittcellene. Dreyer *et al.* (2006) fant at en treningsøkt med 6 serier eksentriske kontraksjoner var tilstrekkelig til å øke satellittcellene etter kun 24 timer. I motsetning til disse resultatene fant Cramer *et al.* (2004) ingen økning før 4 dager etter en treningsøkt bestående av 50 ett bens fallhopp og 8 serier eksentrisk belastning. Denne studien antyder også at responsen på antall satellittceller ser ut til å være størst etter 4 dager for så å bli redusert 8 dager etter treningsøkten. Dette ser man også gjennom lengre perioder med trening, hvor man antar at satellittcellene når en topp i celleprolifisering (Kadi *et al.*, 2005). Disse studiene viser at responsen på satellittceller etter et stort treningstimuli er relativt hurtig og kraftig. I etterkant av en periode med trening har man sett at antallet satellittceller opprettholdes i minst 60 dager etter avsluttet trening. Etter 90 dager derimot vil man se en signifikant reduksjon (Kadi *et al.*, 2004b).

¹¹ En fase av cellyklus hvor cellen er i dvale uten mitotisk aktivitet

Selv om disse studiene omhandler unge, kan man se de samme tendensene hos eldre etter en periode med trening. Både etter 12 (Verney *et al.*, 2008) og 14 uker (Mackey *et al.*, 2007) med styrketrening økte antall satellittceller hos både eldre kvinner og menn.

I en annen studie gjort over 9 uker med styrketrening ble det vist at eldre menn og kvinner fikk en økning i andelen satellittceller i forhold til kontrollgruppen (Roth *et al.*, 2001).

Økningen i denne studien var størst hos kvinner, som i utgangspunktet også hadde størst andel med satellittceller før treningsperioden startet. Dette støttes ytterligere opp gjennom studien til Petrella *et al.* (Petrella *et al.*, 2008), som gjennomførte en clusteranalyse. Etter 16 uker med styrketrening hadde de som i utgangspunktet hadde størst andel med satellittceller den største økningen av satellittceller etter treningsintervensjonen. Dette var også de som fikk størst økning i muskelfiberareal gjennom treningsperioden.

Som jeg har antydnet i et tidligere delkapittel vil eldre ha en reduksjon i antall satellittceller rundt type II muskelfibrene. Hvordan satellittceller rundt de ulike muskelfibertypene endrer seg ved styrketrening har blitt undersøkt nærmere gjennom to studier (Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Disse studiene viser at den største endringen i antallet satellittceller ser ut til å skje nettopp i type II muskelfibrene. Dette tyder på at styrketrening er svært effektiv for å redusere de negative endringene i type II muskelfibrene ved aldring.

2.6 Oppsummering

Ved aldring oppstår det tap av muskelmasse og styrke, dette kalles sarkopeni. Tapet av muskelmasse er et resultat av redusert antall og atrofi av muskelfibrene, spesielt er muskelfibertype II hardt rammet. Årsaken til reduksjonen i muskelmassen er noe usikker, men man regner med at det er en kombinasjon mellom naturlig aldringsprosesser og nedsatt fysisk aktivitet. Fysisk aktivitet kan bremse utviklingen av sarkopeni gjennom å øke muskelmassen og dermed muskelstyrken. Gjennom styrketrening observerer man en økning i muskelfiberarealet i type II muskelfibrene. Satellittcellen har fått stor oppmerksomhet ved muskelhypertrofi. Satellittceller fungerer slik at de kan smelte sammen og danne nye muskelfibere, eller de kan smelte sammen med eksisterende muskelfibere for å danne en ny cellekjerne. Dette er essensielt ved muskelhypertrofi, siden dette opprettholder et tilstrekkelig kjernedomene for cellekjernene å kontrollere. Hos eldre finnes det sprikende resultater hvordan antallet satellittceller er hos eldre mennesker sammenlignet med unge. Det kan imidlertid se ut til at antallet satellittceller er redusert i type II muskelfibrene hos eldre. Ved trening ser man at satellittcellene øker i antall hos eldre, spesielt type II muskelfibrene som

ofte rammes hardest av sarkopeni. Det er noe usikkerhet hvordan satellittcellene påvirkes hos eldre ved ulik trening. Men det kan se ut til at eldre mennesker vil få en positiv effekt av fysisk aktivitet, spesielt i type II muskelfibere som er mest rammet av den aldersrelaterte muskelatrofien. I denne oppgaven undersøker vi nærmere hvordan antallet satellittceller, antallet cellekjerner og muskelfiberarealet endres i type I og II muskelfibrene ved to forskjellige former for styrketrening.

3.0 Metode

Denne masteroppgaven er en del av et større prosjekt, *Senior-løftet*, som gjennomføres på Norges idrettshøgskole i perioden 2008-2009.

3.1 Utvalg

Gjennom annonser i lokalaviser og oppslag i flere bydeler i Oslo viste 73 deltagere sin interesse for studien. Alle deltagere mottok skriftlig informasjon før studien og deltok på et informasjonsmøte i forkant av studien. Alle deltagere gjennomgikk en legesjekk, hvor 62 personer fikk godkjenning til å delta videre på studien (se tabell 3.1 for inklusjons- og eksklusjonskriterier). Deltagerne ble randomisert inn i fire grupper; tradisjonell styrketrening (TS), funksjonell styrketrening (FS), utholdenhetstrening eller kontrollgruppe.

Randomiseringen ble gjennomført etter styrketestene, ved å stratifisere utvelgelsen slik at gruppene ble mest mulig like. Etter randomiseringen sa 11 deltagere (8 kvinner, 3 menn) seg villig til å gjennomføre en muskelbiopsi før og etter treningsintervensjonen. Deltagerne som meldte seg til muskelbiopsi ga skriftlig samtykke og deltok frivillig. Studien var godkjent av Regional Komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Sør-Øst-Norge.

En person ble ekskludert fra posttestene grunnet ikke tilstrekkelig med gjennomførte treninger.

Tabell 3.1. Inklusjons- og eksklusjonskriterier for studien.

Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
Menn og kvinner over 70 år	Nedsatt kognitiv kapasitet (≤ 23 på MMSE)
Sedate (< to timer moderat trening per uke siste 6 mnd)	Langvarig bruk av corticosteroider siste 6 mnd (5-10 mg prednisolon)
Selvhjulpne	Undertrykk blod >100 mmHg
	Ikke forstå norsk
	Ikke godkjenning fra lege
	Beintetthet L2-L4 under 0.84g/cm ²
	Bruk av antidepressive medisiner
	Ikke gjennomført tilstrekkelig trening (30 av 36 treninger)

3.2 Inndeling i grupper

Deltagerne ble randomisert inn i fire treningsgrupper:

- Tradisjonell styrketrening
- Funksjonell styrketrening
- Utholdenhetstrening
- Kontrollgruppe

I denne studien har jeg kun tatt for meg deltagerne som sa seg villig til å ta en muskelbiopsi fra treningsgruppene tradisjonell- og funksjonell styrketrening.

Tabell 3.2. Antropometriske data av deltagerne fordelt på. Dataene er presentert i gjennomsnitt og variasjonsbredden i parentes.

	TS	FT
Alder (år)	75 (70-87)	71 (70-73)
Høyde (cm)	167 (156-178)	170 (167-174)
Vekt (kg)	72,1 (64,6-82,6)	73,7 (60,5-88,7)
Kjønnsfordeling	♀=3 ♂=2	♀=4 ♂=1

3.3 Treningsprotokoll

Treningen gikk over 12 uker og bestod av 36 treninger. Treningene ble gjennomført på Norges idrettshøgskole på dagtid, tre ganger per uke. Som en introduksjon til treningene ble det gitt en uke med treningstilvenning (2 økter). Målet med tilvenningsperioden var å bli kjent med øvelsene, samt finne en korrekt treningsmotstand til å starte treningsperioden med. Treningsuken bestod av en hard treningsøkt (1. dag), en lettere treningsøkt (2. dag) og en hard treningsøkt (3. dag). Alle treningene ble overvåket av en trener.

3.3.1 Tradisjonell styrketrening

Denne gruppen benyttet seg av styrketreningsapparater og frivekter. Treningsmotstanden ble justert slik at den tilsvarte 4 – 12RM (se tabell 3.3).

Tabell 3.3. Treningsmotstanden som ble benyttet gjennom treningsintervensjonen.

	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Uke 1-4	12RM	10 repetisjoner*	8RM
Uke 5-8	10RM	10 repetisjoner**	6RM
Uke 9-12	8RM	10 repetisjoner***	4RM

* gjennomføres med en den samme motstanden som fra dag 1.

** gjennomføres med en motstand som tilsvarer 90 % av vekten som fra dag 1.

*** gjennomføres med en motstand som tilsvarer 85 % av vekten som fra dag 1.

Treningen bestod av en serie på overkroppen, og to serier på underkroppen de første 6 ukene. Etter seks uker vil antall serier øke til to serier på overkroppen og tre serier på underkroppen. Alle treningene ble startet med en generell oppvarming på 10 minutter. Treningen tok ca. 60 minutter, eks. oppvarming, pauser og evt. uttøyning.

Øvelsesutvalget bestod av;

- Knebøy/V-squat
- Kneekstensjon
- Tåhev
- Brystpress
- Sittende roing
- Skulderpress
- Øvelse for mage (sit-ups på treningsmatte og magetreningsapparat)
- Øvelse dyp/nedre ryggmuskulatur (rygghev og diagonalløft)

På dag 2 ble det benyttet øvelser som utfordret stabilisering i større grad ved å bytte ut skulderpress med skulderpress med hantler, brystpress med brystpress med hantler og sittende roing med sittende roing i kabelapparat. For en detaljert beskrivelse av øvelsene se Andersen (2009).

3.3.2 Funksjonell styrketrening

Deltagerne i denne gruppen trente øvelser som hadde mål om å ligne på dagligdags aktivitet som f. eks å gå i trapper og løfte gjenstander opp/ ned fra en hylle. Belastningen ble justert slik at den tilsvarte 12 – 15RM (se tabell 3.4).

Tabell 3.4. Treningsmotstanden som ble benyttet gjennom treningsintervensjonen.

	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Uke 1-6	15RM**	10 repetisjoner*	15RM**
Uke 7-12	12RM	10 repetisjoner*	15RM

* gjennomføres med den samme vekten som fra dag 1.

** første serie ble gjennomført med 15 repetisjoner.

Treningene bestod av to serier, uke 1 - 6 ble første serie gjennomført noe lettere mens andre serie ble gjennomført med en belastning slik at 15RM ble oppnådd. Uke 7 - 12 ble gjennomført med to tunge serier (12RM på begge seriene), det ble i samme periode lagt til en ekstra øvelse for beinmuskulaturen (se oversikt lenger ned).

Alle treningene ble innledet med en generell oppvarming med lett sal aktivitet. Treningen tok ca. 60 minutter, eks. oppvarming, pause og lett uttøyning.

Øvelsesutvalget bestod av åtte øvelser;

- Trappetrinn m/venstre ben (m/ ytre belastning)
- Trappetrinn m/høyre ben (m/ ytre belastning)
- Mageøvelse (sit-ups) (m/ ytre belastning om nødvendig)
- Reis opp fra stol (m/ ytre belastning)
- Armhevninger (push-ups) (m/ytre belastning om nødvendig)
- Markløft (m/ ytre belastning)
- Øvelse dyp/nedre ryggmuskulatur (rygghev og diagonalløft) (m/ytre belastning om mulig og nødvendig)
- Løft opp på kasse
- Trappegang med ytrebelastning (f.o.m. uke 7)

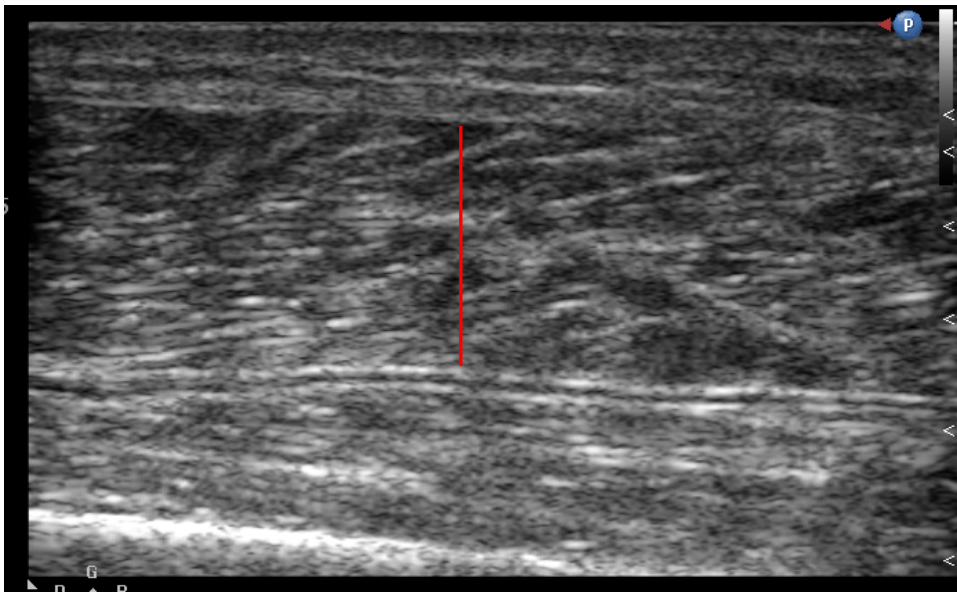
Som ytre belastning ble det benyttet vektvester á 10kg, sandsekker á 5-10-15-20kg og vekthantler (1-15kg). For en detaljert beskrivelse av øvelsene se Andersen (2009).

3.4 Styrketest

Styrketesten ble gjennomført på Norges idrettshøgskole. Før testen fikk alle deltagerne to tilvenninger til styrketesten for å unngå eventuelle læringseffekter fra styrketesten. Disse ble gjennomført uken før testdagen, med ca. 48 timer mellom hver tilvenningøkt. Individuelle innstillinger av styrkeapparatet ble registrert i denne perioden og ble brukt på pre- og post testen. Dette inkluderer innstillinger som å tilpasse setet slik at kneet er ved vektarmens omdreiningsakse, og fotputen ble innstilt slik at den kom rett over ankelleddet. Styrketesten ble gjennomført i et kneekstensjonsapparat (Technogym, Italia). Styrketesten ble innledet med 5 minutter generell oppvarming etterfulgt av 3 serier med lettere motstand i kneekstensjonsapparatet, som ble valgt ut ifra erfaringen testpersonellet fikk under tilvenningsperioden. For at et forsøk skulle bli godkjent måtte kneleddet være fullt ekstendert. For å kontrollere for dette ble høyden vektene forflyttet seg målt før og kontrollert under testen, disse innstillingene ble også benyttet på post testen. Den høyeste vekten deltagerne kunne løfte én gang ble registrert som deres maksimalstyrke (1RM).

3.5 Ultralyd

Muskeltykkelsen ble målt med ultralyd (Philips, HD11XE, USA). Pre verdiene ble tatt av midtre del av m. vastus lateralis, like under snittet for pre biopsien. Muskeltykkelsen ble tatt 2 cm under området for pre analysen etter treningsintervensjonen. Dette området ble gjenkjent ved at man kunne lett lokalisere arret etter snittet fra pre biopsien. Muskeltykkelsen ble målt ved å regne ut gjennomsnittsverdiene fra 5 målinger av muskelen.



Figur 3.1. Ultralyd ble benyttet for å estimere muskeltykkelsen av m. vastus lateralis. Rød linje indikerer tykkelsen av m. vastus lateralis på det aktuelle bildet.

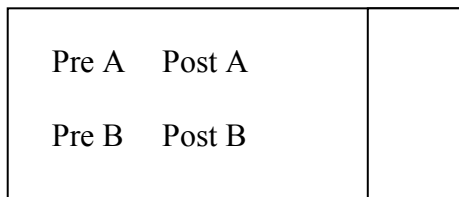
3.6 Muskelbiopsier

Muskelbiopsier ble tatt før (i løpet av uke -2 eller -1) og etter (14 uker) treningsperioden. Muskelbiopsiene ble tatt av m. vastus lateralis (midtre del) ved begge tidspunkt. Post biopsien ble tatt 3 cm distalt fra pre biopsien. M. vastus lateralis ble lokalisert ved hjelp av palpering, og ultralyd (Philips, HD11XE, USA) for å undersøke hvor dypt muskelen ligger. Før inngrepet ble huden rundt inngrepsområdet vasket med desinfiserende væske. Under lokal anestesi (xylocain adrenalin, 10mg/ml+5mikrog/ml) ble det snittet et 10-15mm snitt gjennom huden og muskelfascien. Biopsitakingen ble tatt etter en modifisert Bergström metode; en steril 6mm biopsinål ble ført inn gjennom det åpne snittet og inn til muskelen hvor to til tre 50-100mg muskelbiopsier ble tatt ut. Muskelbiopsiene ble tatt i to retninger; 1) distalt av fiberretningen, 2) proximalt av fiberretningen. Muskelbiopsiene ble rensset for eventuelt blod,

bindevev og fett før de ble lagt i en form med tissue-tek O.C.T compound (Sakura, Nederland). Muskelbitene ble lagt slik at fiberretningen lå likt hos alle muskelbitene. Formen ble så hurtig fyst ned i isopentan nedkjølt i flytende nitrogen (~ -160 °C). Muskelbiopsiene ble så lagret i en ultrafryser ved ~ -80 °C for senere analyse.

3.6.1 Snitting av muskelbiopsier

Muskelbiopsiene ble tatt ut av ultrafryseren (~ -80 °C) og montert i et kryostat (CM 3050, Leica Microsystems, Nussloch, Tyskland) som hadde en temperatur på ~ -22 °C. Snittene ble kuttet med en tykkelse på $8 \mu\text{m}$, og plassert på et objektivglass. For hver forsøksperson ble det plassert to snitt fra pre biopsien og to snitt fra post biopsien på hvert objektivglass (som vist på figur 3.2). Når snittingen var ferdig ble glassene tørket i romtemperatur over natt for så å bli fryst ned i ultrafryseren ved ~ -80 °C for senere analyse.



Figur 3.2. Muskelsnittene ble plassert på objektivglasset med to snitt av samme tidspunkt plassert ved siden av hverandre.

3.6.2 Immunohistokjemi – metode utprøving

Selv om man har meget gode rutiner for å analysere muskelvev hos unge, byr muskelvev hos eldre på andre utfordringer. Vår erfaring er at muskelvev fra eldre gir noe mer støy. Det ble derfor nødvendig å gjennomføre en metodetest for å finne den beste metoden for å gjøre de immunohistokjemiske analysene, med vekt på satellittcellene. Det ble benyttet antistoff mot NCAM (neural cell adhesion molecule, se senere kapittel for med detaljer) på alle metodene.

3.6.2.1 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)

DAB merking ble benyttet sammen med hematoxylin for å identifisere cellekjerner. Satellittcellene ble merket med et antistoff mot NCAM. Denne merkingen fikk satellittcellene til å merkes med en brunfarge og cellekjernene blå etter hematoxylinet (figur 3.3 A).

Fordelen med denne metoden er at den var enkel å gjennomføre og krever kun et lysmikroskop for å gjøre analysen. Hele strukturer på snittet er observerbart og merkingen er permanent slik at man kan benytte den til senere analyse. Ulempen med denne metoden var at fargestoffene kunne ha en tendens til å "klumpe" seg sammen, dette gjorde at man ikke kunne få tydelige skiller på hvor merkingen faktisk er og ikke er, og dermed mindre følsom for identifisering av satellittceller. Merkingen for cellekjerner (hematoxylin) viste seg også å være uegnet for en god identifisering av cellekjernene. En av de største ulempene med denne metoden var at den også fremhevet granolytter, siden dette fremstod som "støy" kunne det være vanskelig å identifisere satellittcellen. (For komplett prosedyre se vedlegg 1).

3.6.2.2 Vector VIP-kit

VIP ble benyttet sammen med ABC-kit og methyl green for å identifisere cellekjerner. Identifiseringen av satellittcellene ble det benyttet et antistoff mot NCAM. Denne metoden gjorde at satellittcellene ble merket med en mørk sort/grønnfarge mens cellekjernene med en lys grønnfarge (figur 3.3 B).

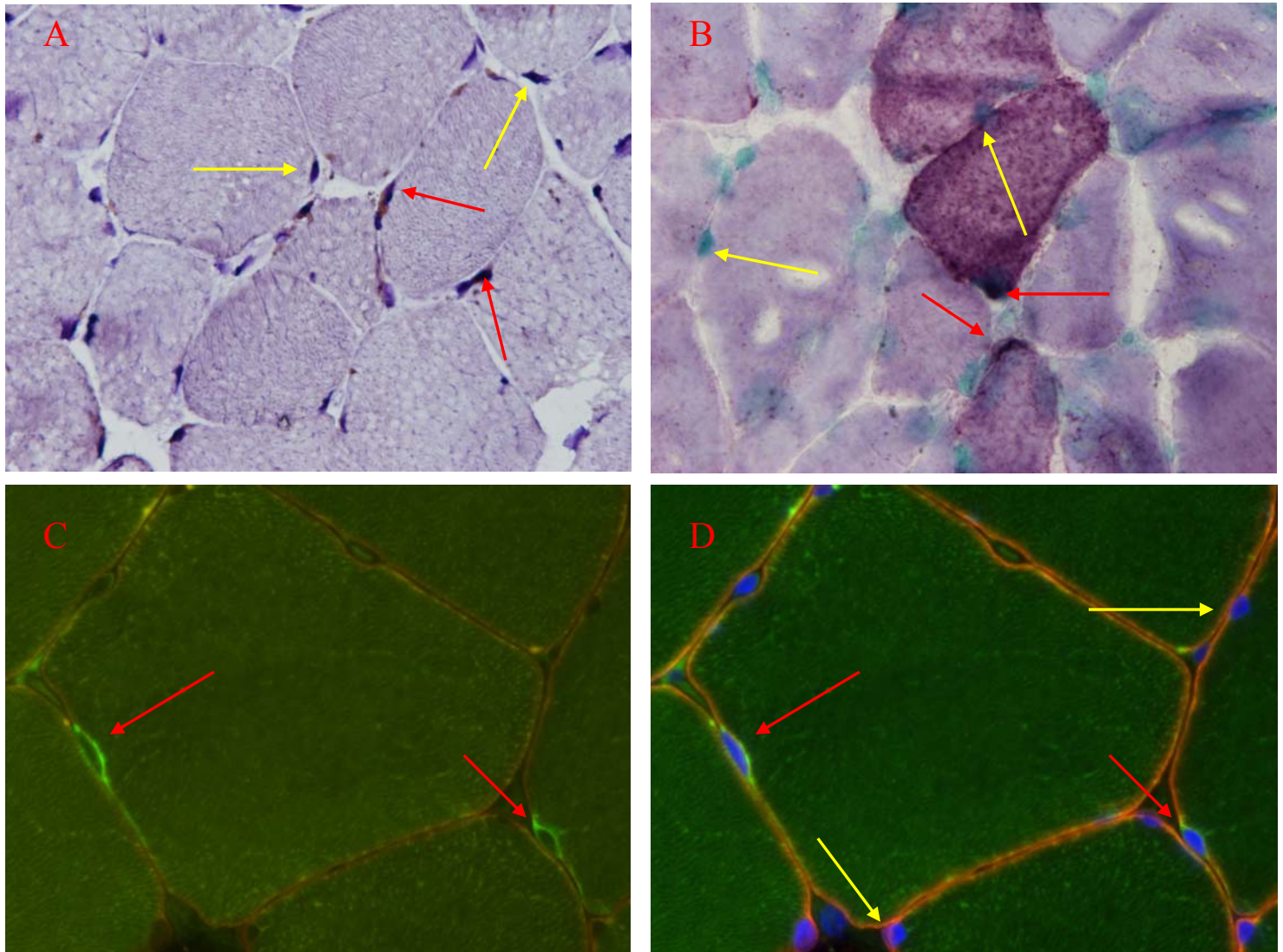
Fordelen med denne metoden er at den krever kun lysmikroskop. Hele strukturer på snittet er observerbart og merkingen er permanent slik at man kan benytte den til senere analyse. Ulempen er at den, i likhet med DAB, hadde en tendens til å merke av et større område enn ønskelig ettersom fargestoffene kunne "klumpe" seg. Metoden var derfor mindre følsom, og kanskje mindre følsom enn DAB, for identifisering av satellittceller. Denne viste seg også å være en uegnet metode for å få en god cellekjernemerking. (For komplett prosedyre se vedlegg 1).

3.6.2.3 Immunofluorescence

Ved denne metoden benyttet vi oss av et antistoff mot NCAM og et sekundært antistoff, med et fluorokrom. DAPI ble benyttet for å identifisere cellekjerner. Denne merkingen ble satellittcellene identifisert med en grønnfarge som fremstod som en ring, DAPI-merkingen fikk cellekjerner til å merkes med en blåfarge. I tillegg ble det benyttet en merking mot dystrofin, som merker cellemembranen. Dette gjorde identifiseringen noe lettere ettersom satellittcellen ligger utenfor, men tilknyttet til denne merkingen (figur 3.3 C og D).

Ulempen med denne metoden var at denne metoden krever noe lengre tid å gjennomføre enn de andre metodene. Den krevde et mikroskop med objektiver av god kvalitet, en fluoriserende lyskilde og fargefiltre. For å kunne ta gode bilder kreves det også et godt og sensitivt kamera. Den er heller ikke permanent ettersom den er følsom for lys, så snittene kan ikke brukes over veldig lang tid. Fordelen er at den er meget følsom ovenfor satellittcellemerkingen, den viser klare skiller og man kunne derfor lett identifisere satellittcellen. Metoden kan lett kombineres med andre merkinger (dobbelmerking), og derfor utmerket hvis man ønsker å identifisere ulike ting på samme snitt. Cellekjernemerkingen viste seg å være utmerket. (For komplett prosedyre se vedlegg 2). Denne metoden fremhevet også granolyttene, men siden mikroskopet hadde et fargefilter som kunne skille ut disse, og vise dem med en gul farge ble dette ikke et problem under analysen. I figur 3.4 A og 3.5 kan man tydelig se granolyttene som noen gule prikker.

3.6.2.4 Konklusjon



Figur 3.3. Rød pil viser identifisert satellittcelle, gul pil viser en cellekjerne. **A:** Identifisering av satellittcellen ved hjelp av DAB og hematoxylin-merking med hjelp av antistoff mot NCAM. Satellittcellen vises med en brunfarge rundt cellekjernene som er merket med blåfarge. **B:** Identifisering av satellittcellen ved hjelp av Vector VIP-kit og methyl green-merking med hjelp av antistoff mot NCAM. Satellittcellen merkes med en mørk blå/sort farge, ofte rundt cellekjernen som blir merket grønn. **C:** Immunofluorescence merking mot NCAM danner en grønn ring rundt satellittcellen. **D:** Ved å benytte seg av DAPI-merking kan man identifisere cellekjerener, samt være til hjelp for å identifisere satellittcellen.

Etter å ha gjennomført og studert metodene ble det avgjort at immunofluorescence var den beste metoden for å identifisere satellittceller hos eldre. Denne metoden var meget følsom og utstyr for å gjennomføre denne metoden var tilgjengelig.

Videre ble det også testet ulike bufferløsninger. Konklusjonen av denne testen viste seg at snitt hvor PBS-t (Phosphate buffered saline + 0,05 % Tween 20) hadde blitt benyttet kunne fremstå som noe mer støyfri og klar enn ved bruk av TBS-t (Tris buffered saline + 0,05 % Tween 20).

3.7 Immunohistokjemi

3.7.1 Antistoffer

For å kunne identifisere strukturer og proteiner i muskelvevet ble det benyttet en rekke ulike primær- og sekundær antistoff. Antistoffene benyttet i denne studien er listet opp i tabell 3.5.

Tabell 3.5. Primær- og sekundære antistoff som ble benyttet i denne studien

Antistoff	Binder seg til	Produsent	Vert/opprinnelse	Fortynning
NCAM	Neural cell adhesion molecule	ABCam	Mus, monoclonal	1:200
Dystrofin	Dystrofin	ABCam	Kanin, polyclonal	1:500
DAPI	DNA i alle cellekjerner	Invitrogen		Finnes i monteringsmedium
SC-71	Myosin heavychain II ¹²	Ikke-kommersiell. Stefano Schiaffino	Mus, monoclonal	1:1000
Alexa 488 α -mus*	Monoclonal antistoff av mus	Invitrogen	Geit	1:200
Alexa 594 α -kanin*	Polyclonal antistoff av kanin	Invitrogen	Geit	1:200

* sekundær antistoff

¹² (Smerdu & Soukup, 2008)

3.7.2 Kvantifisering av satellittcellen

Snittene ble tatt ut av fryseren og tint/tørket i romtemperatur i 30 minutter etterfulgt av innkubering med BSA (kveg) i 30 minutter. Primær antistoffet (NCAM) ble så tilført over natt (~14 timer) ved 4°C. Dagen etter ble snittene vasket før de ble tilført sekundær antistoff mot NCAM (alexa 488 α -mus) i 30 minutter. Snittene ble vasket før de ble tilført et primær antistoff mot dystrofin i 2 timer ved romtemperatur (~20°C). Sekundær antistoffet (alexa 594 α -kanin) ble tilført i 30 minutter før snittene ble montert med et dekkglass og med et monteringsmedia (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen) som inneholder DAPI. Snittene ble plassert lysfritt slik at monteringsmediumet fikk tørke og få den beskyttende egenskapen den har. (For komplett prosedyre se vedlegg 2).

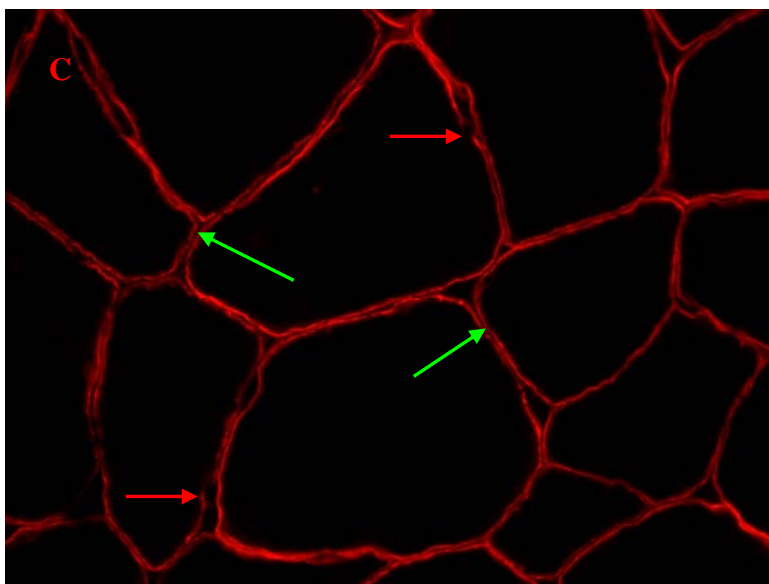
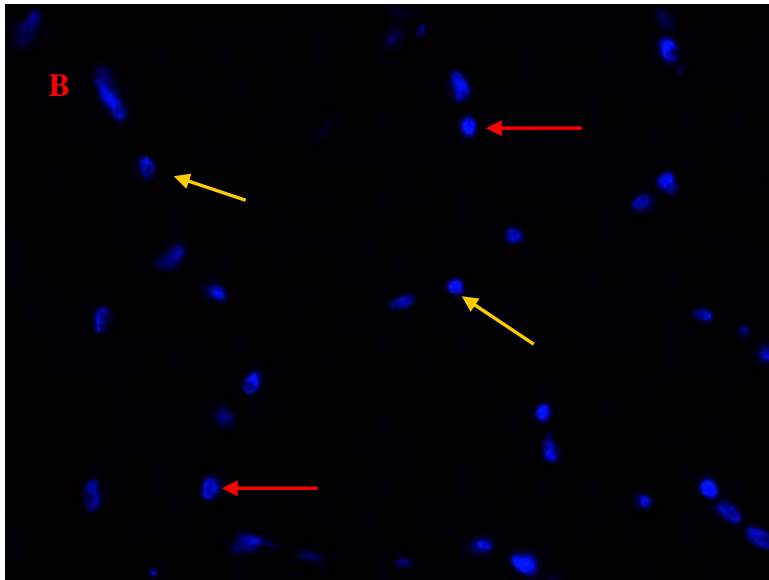
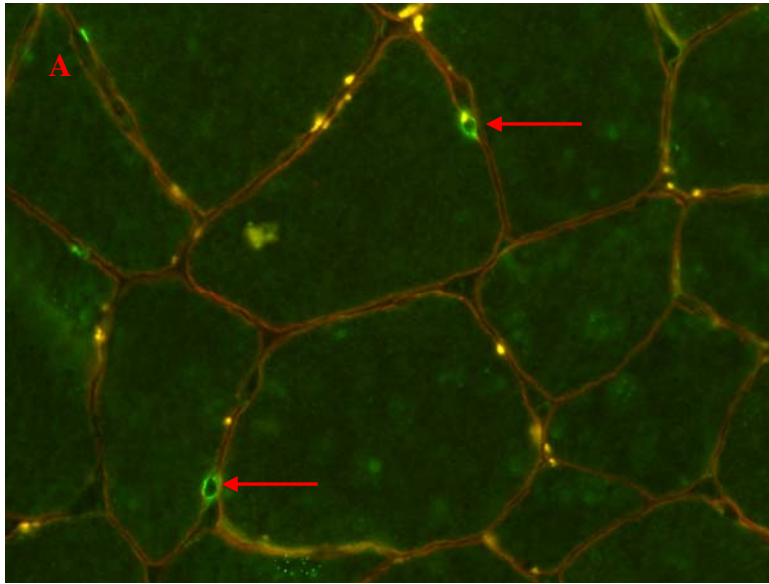
Et tilfredsstillende snitt fra pre og ett fra post ble valgt ut for analysen. Tellingen ble gjort ved hjelp av et mikroskop (Olympus BX61, Japan) med en fluoriserende lyskilde (EXFO XI120PC-Q, Canada). Snittene ble undersøkt under 60x forstørrelse. Tellekriteriene for satellittcellen var at de skulle ha minst 75 % av en synlig ring (figur 3.4 A, rød pil) man ser ved merking mot NCAM. NCAM merkingen skulle omringe en cellekjerne, som var identifisert ved hjelp av DAPI merkingen (figur 3.4 B, gul pil) og de skal ligge utenfor dystrofin merkingen (figur 3.4 C, grønn pil).

I enkelte tilfeller ble det observert en klar og tydelig ring som viste alle kriterier for en satellittcelle, men ingen DAPI merking mot cellekjernen. Disse ble tatt med i tellingen, og kvantifiseres som en satellittcelle. Satellittcellene blir presentert som antall per 100 muskelfiber og andelen av cellekjerne (% av antall cellekjerne).

For å kunne identifisere hvilken muskelfibertype satellittcellen tilhører ble det tatt et bilde med et påmontert kamera (Olympus DP72, Japan) til mikroskopet, av det aktuelle snittet med 10x forstørrelse. Bildet ble ytterligere forstørret og skrevet ut i A3 størrelse. Når en satellittcelle ble identifisert ble lokaliseringen merket av på utskriften, slik at man senere kunne undersøke muskelfibertypen satellittcellen tilhører.

Antall fibre som ble analysert for satellittceller ble telt ved hjelp av dataprogramvaren TEMA (Scan Beam, Danmark).

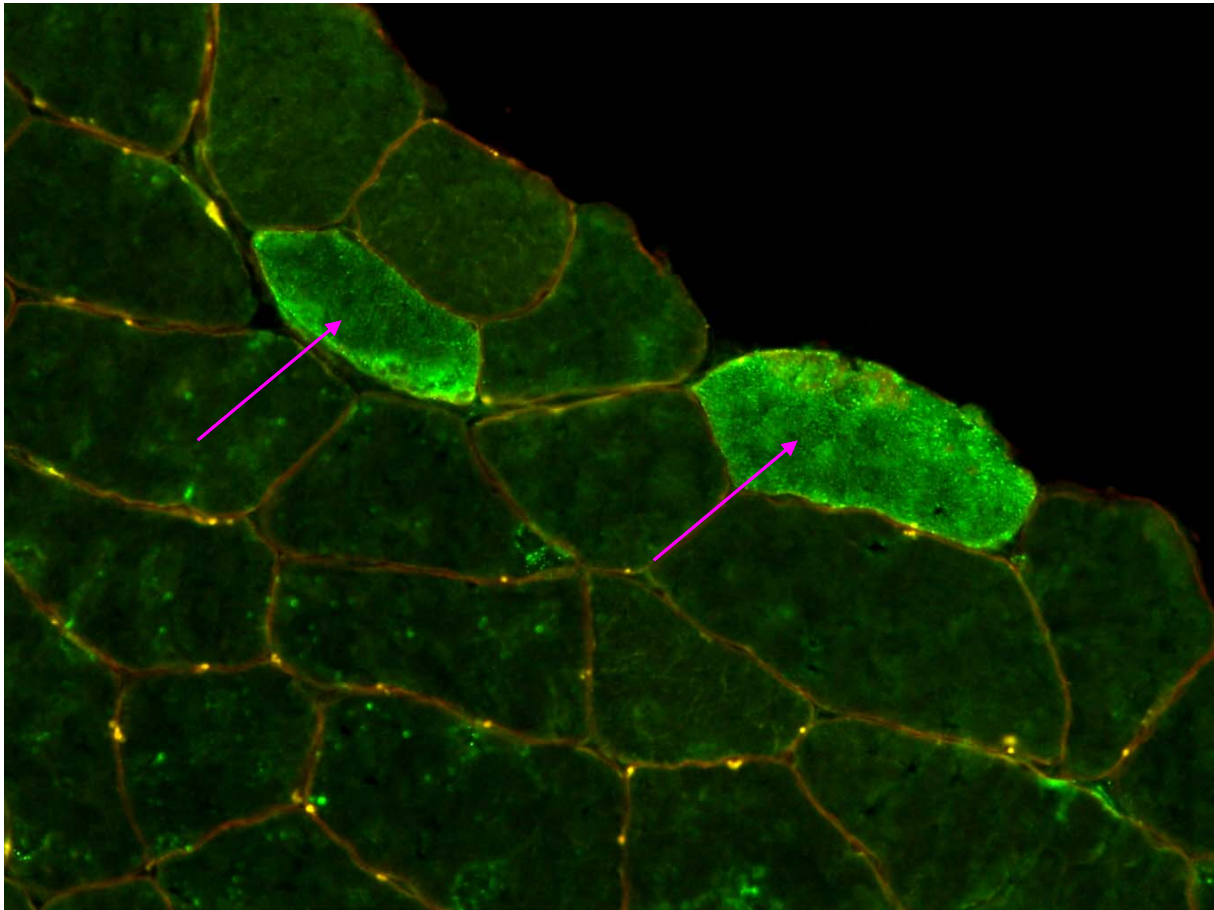
For å minimere eventuelle feilberegninger gjort av TEMA ble snittet gjennomgått for å eventuell legge til muskelfibre som ikke ble registrert, eller fjernet muskelfibre som ikke skulle tas med i analysen.



Figur 3.4. A: Merking mot NCAM som vises med en tydelig grønn ring. Rød pil indikerer lokaliseringen av satellittcellen. **B:** Cellekjernemerking med DAPI vises som en blå prikk. Rød pil indikerer hvor den identifiserte satellittcellen fra bilde A, gul pil indikerer en av cellekjernene synlig på bildet. **C:** Merking mot dystrofin (protein i cellemembranen) vises med en rød farge og kjennetegnes med den røde ringen den danner rundt cellemembranen. Rød pil indikerer hvor satellittcellen fra de andre bildene er lokalisert i forhold til cellemembranen, merk at cellemembranen ofte omslutter satellittcellen og dermed ofte lager en ”grop” inn i muskelfiberen. Grønn pil indikerer dystrofin merkingen.

3.7.3 Kvantifisering av NCAM positive muskelfibere

NCAM positive muskelfibere ble identifisert ved at muskelfiberen har blitt merket mot NCAM og vises med en intens grønn farge (figur 3.5). Disse muskelfibrene ble kvantifisert som NCAM positive muskelfibere. NCAM positive muskelfibere blir presentert som antall per 100 muskelfiber.



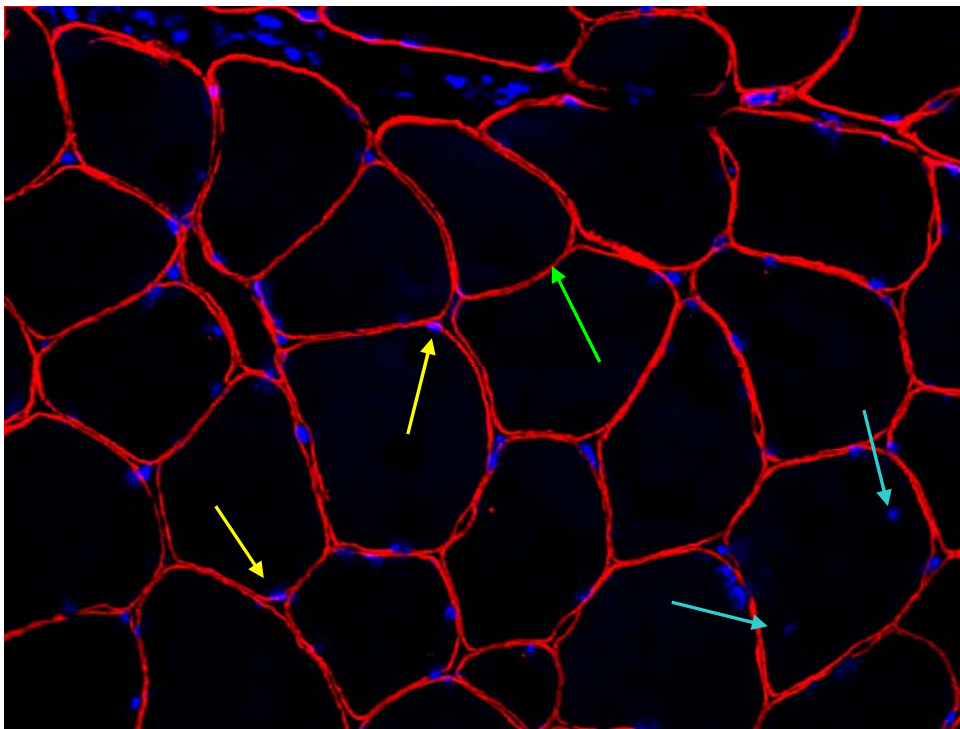
Figur 3.5. NCAM positive celler kunne gjenkjennes ved at de var merket med en intens grønnfarge. Rosa pil indikerer NCAM positive muskelfibere.

3.7.4 Kvantifisering av cellekjerner

Snittene ble tatt ut av fryseren og tint/tørket i romtemperatur i 30 minutter etterfulgt av innkubering med BSA (kveg) i 30 minutter. Primær antistoffene mot MHC type II (SC71) og mot dystrofin ble tilført og inkubert i fire timer ved romtemperatur (~20°C). Snittene ble vasket før de ble tilført sekundær antistoff mot SC71 (Alexa 488 α -mouse) og dystrofin (Alexa 594 α -kanin) i 30 minutter. Snittene ble så montert med et dekkglass og et monteringsmedia (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen) som inneholder

DAPI. Snittene ble plassert lysfritt for at monteringsmediumet fikk tørke og få den beskyttende egenskapen den har. (For komplett prosedyre se vedlegg 2).

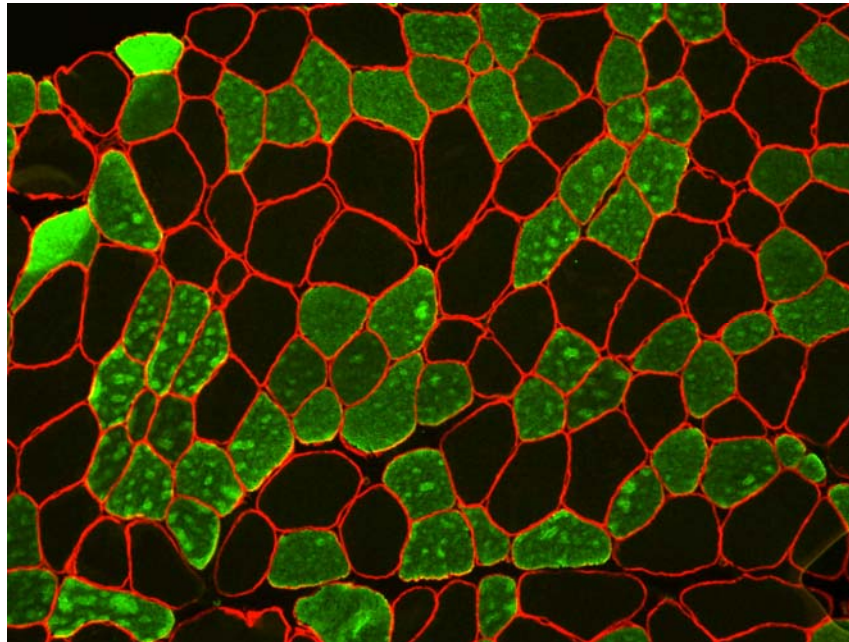
For videre analyse av cellekjerner ble det funnet minst 50 muskelfibere av både type I og II fra tilfeldige områder, disse ble tatt bilde av med det påmonterte kameraet på mikroskopet. Bildene ble lagret på en server og undersøkt nærmere i Cell[^]f (Olympus Life Sciences Europe, Tyskland). Cellekjerne måtte befinne seg innenfor dystrofin merkingen for at de skulle bli kvantifisert som cellekjerner. I enkelte tilfeller ble det funnet cellekjerner som ikke var lokalisert i nærheten av, men innenfor cellemembranen/dystrofin merkingen (figur 3.6), disse ble kvantifisert som sentrale cellekjerner og vil bli presentert under en egen kategori i resultat kapittelet. Cellekjernene presenteres som antall cellekjerner per muskelfiber, mens antall sentrale cellekjerner blir presentert som antall per 100 muskelfiber.



Figur 3.6. Cellekjernene ble identifisert ved hjelp av DAPI for å merke cellekjernene med en blåfarge. Cellemembranen ble merket mot dystrofin. Figuren viser cellekjerner merket med DAPI (gul pil), sentrale cellekjerner er illustrert med turkis pil og cellemembranen merket med antistoff mot dystrofin (grønn pil). Muskelfibertypen ble funnet ved at samme snitt ble merket med SC-71 (ikke illustrert på dette bildet), man kunne derfor identifisere de ulike muskelfibertypene tilhørte.

3.7.5 Kvantifisering av muskelfibertyper og muskelfiberareal

For kvantifisering av muskelfibertyper og muskelfiberarealet ble det benyttet samme snittet som beskrevet under avsnittet ”3.7.5 Kvantifisering av cellekjerner”, jeg vil derfor ikke gå inn på den immunohistokjemiske metoden som ble benyttet. Illustrasjon av muskelfibermerkingen se figur 3.7.



Figur 3.7. Muskelfibertype II ble identifisert ved hjelp av antistoffet SC71 og vises med en grønnfarge. Muskelfibertype I ble ikke merket med dette antistoffet og kunne derfor lett identifiseres ettersom det forble umerket (sort/fargeløs).

For å finne ut hvilke muskelfibertyper satellittcellene tilhører ble området hvor analysen for satellittceller ble gjennomført funnet. Fra utskriften som ble tatt tidligere var det da mulig å identifisere muskelfiberen hvor satellittcellen ble funnet og dermed mulig å finne ut om muskelfiberen enten var av type I eller type II.

For å finne muskelfibersammensetningen ble det tatt fire bilder med 10x forstørrelse av tilfeldige områder innenfor snittet som ble benyttet under satellittcelletellingen. Bildene ble tatt inn i dataprogrammet TEMA. Muskelfibere som lå i ytterkanten av snittet og/eller hadde en unormal form ble ekskludert fra beregningene. TEMA utregnet så muskelfibersammensetningen og muskelfiberarealet i samme analyse. Resultatet blir presentert som prosent (%) av antall muskelfibere analysert og prosent (%) av arealet analysert.

3.8 Statistikk

Microsoft Excel (Microsoft Excel, 2002 SP3, USA) ble benyttet for de statistiske analysene, med unntak av korrelasjonsanalysene hvor SPSS (versjon. 15.0) ble brukt. For å finne signifikante forskjeller innenfor gruppene ble det benyttet *paret t-test*, mens det ble brukt en *uparet t-test* for å finne signifikante forskjeller mellom gruppene. For dataene som ikke var normalfordelt ble det benyttet *Wilcoxon signed-rank test* for å finne signifikante forskjeller. For korrelasjonsanalysene ble det brukt *Pearson product-moment correlation coefficient*. Signifikansnivået ble satt til $P \leq 0,05$, hvis ikke annet er nevnt. Alle tallene blir presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM).

4.0 Resultat

4.1 Kroppsvekt

Det var ingen signifikant forskjell i kroppsvekt mellom treningsgruppene før treningsperioden startet. Kun deltagerne i funksjonell styrketrening økte kroppsvekten i løpet av treningsperioden med 1,3 % økning ($P \leq 0,05$) (tabell 4.1).

Tabell 4.1. Kroppsvekten før og etter treningsperioden (gjennomsnitt \pm SEM).

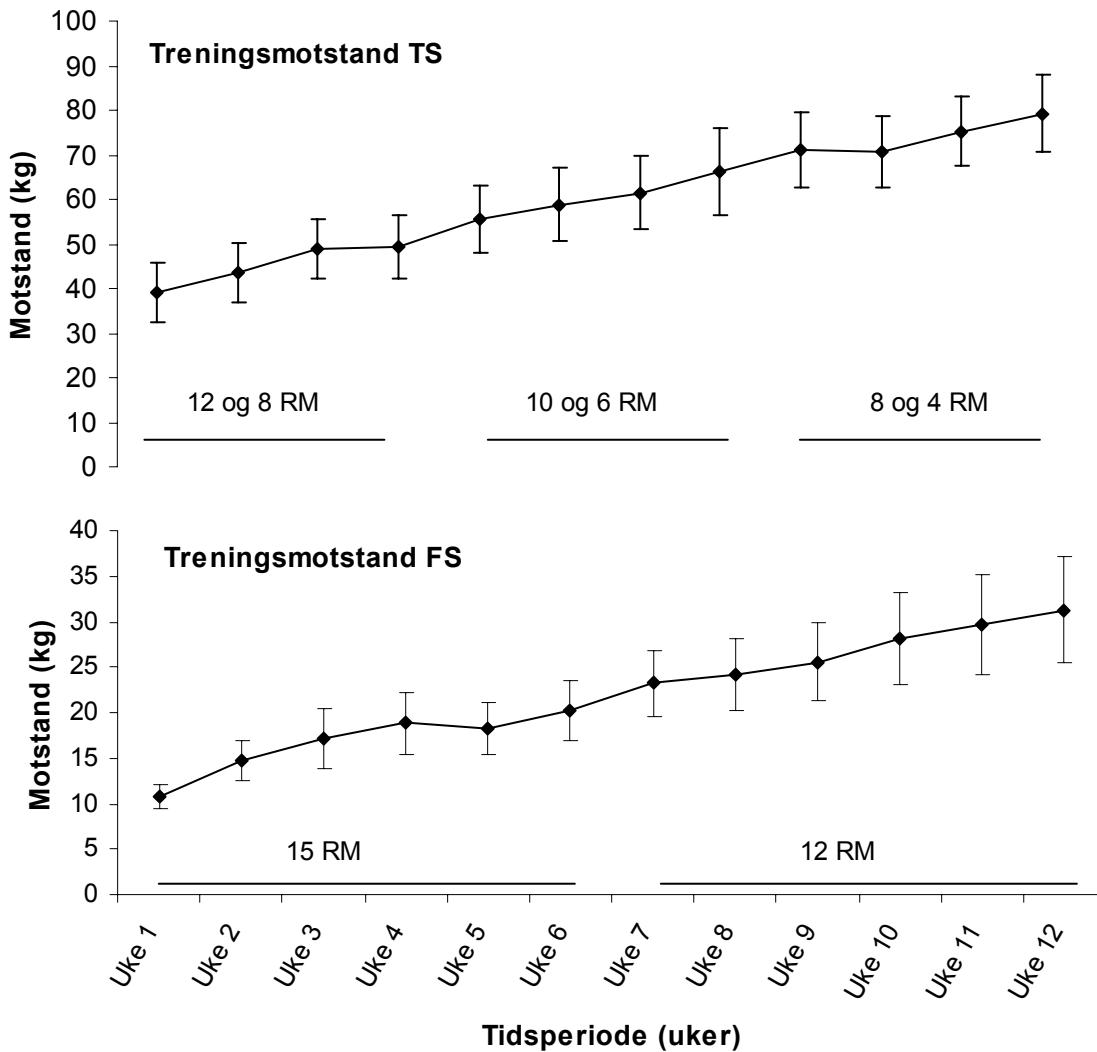
	Før	Etter	Prosent (%) endring
TS	72 \pm 3 kg	73 \pm 4 kg	0,6 \pm 0,9 %
FS	74 \pm 5 kg	75 \pm 5 kg*	1,3 \pm 0,3 %

* signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,05$)

4.2 Treningsprogresjon

4.2.1 Treningsmotstand

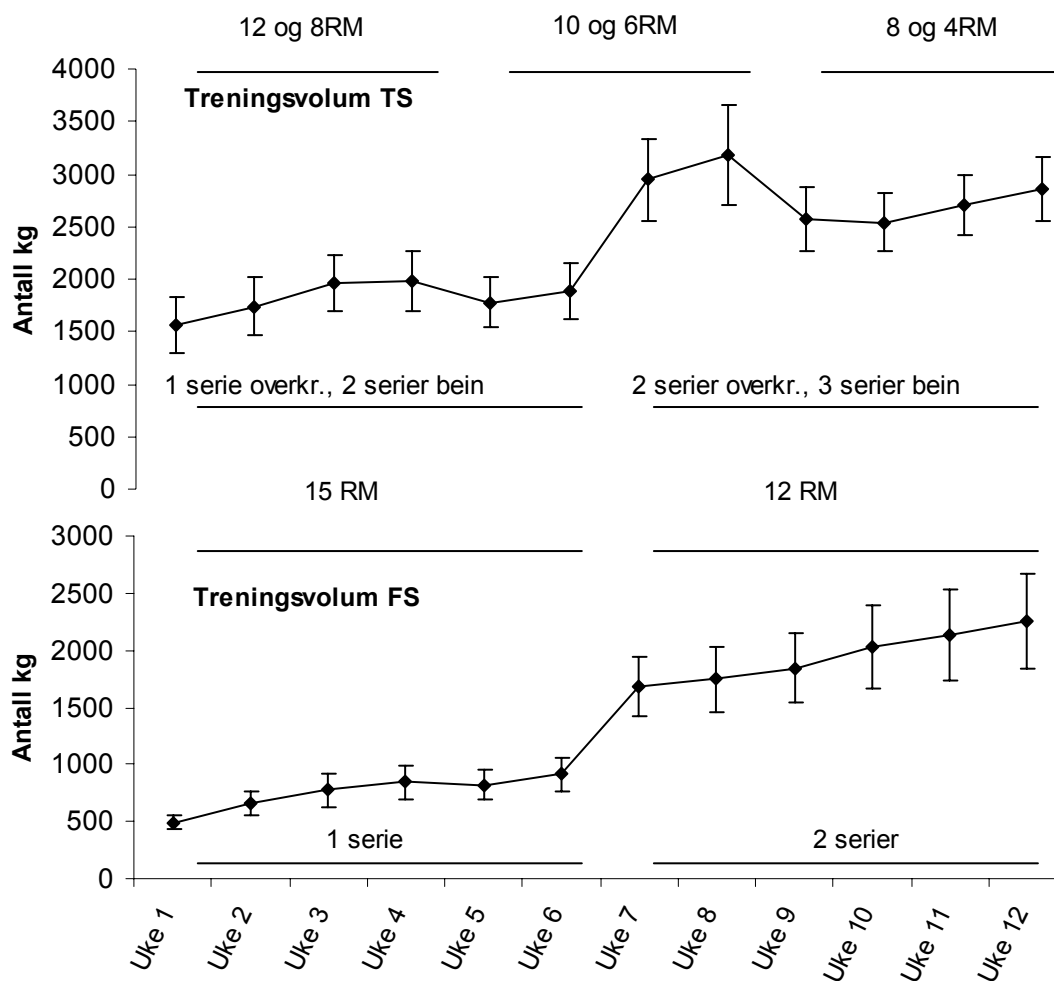
Både tradisjonell styrketrening og funksjonell styrketrening økte signifikant ($P \leq 0,05$) treningsmotstand gjennom intervensjonen (figur 4.1). For funksjonell styrketrening ble det tatt med en ekstra øvelse for beinmuskulaturen (trappegang) f.o.m. uke 6, noe som økte den totale belastningen ytterligere for funksjonell styrketrening.



Figur 4.1. Treningsmotstand over treningsperioden for tradisjonell styrketrening (TS) og funksjonell styrketrening (FS) (gjennomsnitt±SEM). Verdiene er utregnet fra øvelsene som belaster m. quadriceps femoris; TS, to øvelser. FS, tre øvelser.

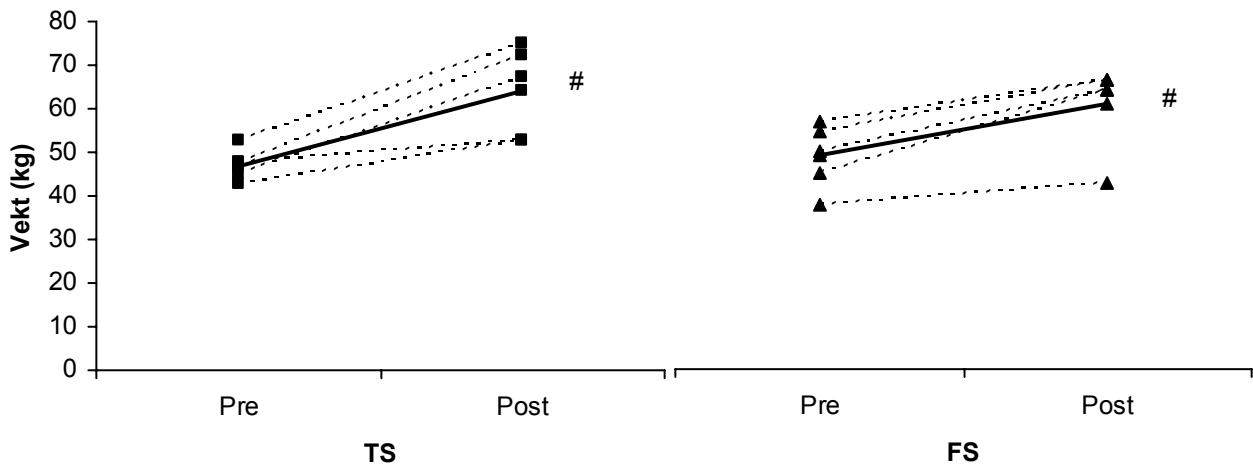
4.2.2 Treningsvolum

Både tradisjonell styrketrening og funksjonell styrketrening økte signifikant ($P \leq 0,05$) treningsvolumet gjennom intervensjonen (figur 4.2). Den store økningen i treningsvolum mellom uke 6 og 7 skyldes økning i antall serier, samt at deltagerne løftet mer gjennom hele perioden.



Figur 4.2. Treningsvolum over treningsperioden for tradisjonell styrketrening (TS) og funksjonell styrketrening (FS) (gjennomsnitt±SEM). Verdiene er utregnet fra øvelsene som belaster m. quadriceps femoris; TS, to øvelser. FS, tre øvelser.

4.3 Muskelstyrke

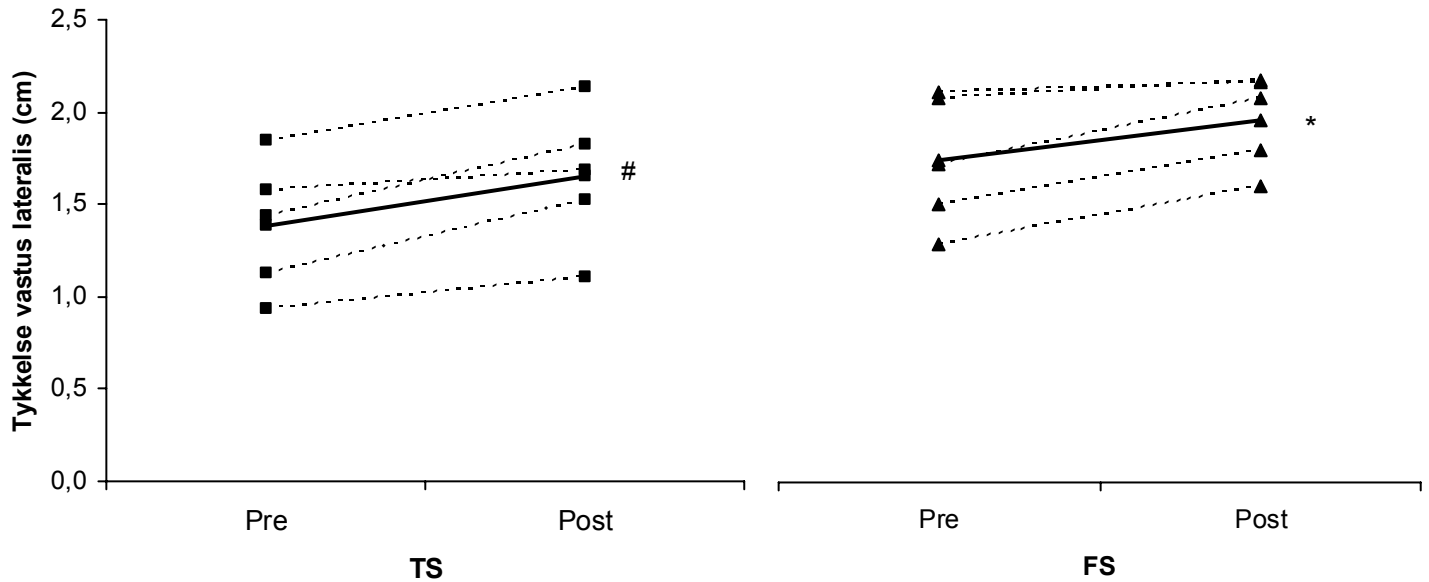


Figur 4.3. Maksimalstyrken målt som 1 repetisjon maksimum (1RM) i kneekstensjonsapparat før og etter treningsperioden. Heltrukket linje illustrerer de gjennomsnittlige verdiene, stiplet linje viser de individuelle verdiene i muskelstyrken. # signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,01$).

Det var ingen forskjell i muskelstyrken mellom gruppene ved begynnelsen av treningsperioden. Begge gruppene viste en signifikant økning ($P \leq 0,01$) i maksimal styrken målt som 1RM i kneekstensjon på 36 ± 8 % hos tradisjonell styrketrening og 24 ± 5 % hos funksjonell styrketrening (figur 4.3). Selv om gruppen som trente tradisjonell styrketrening hadde størst prosentvis økning, var det ikke signifikant mer enn de som trente funksjonell styrketrening.

4.4 Muskeltykkelse og muskelfiberareal

4.4.1 Tykkelse av *m. vastus lateralis*



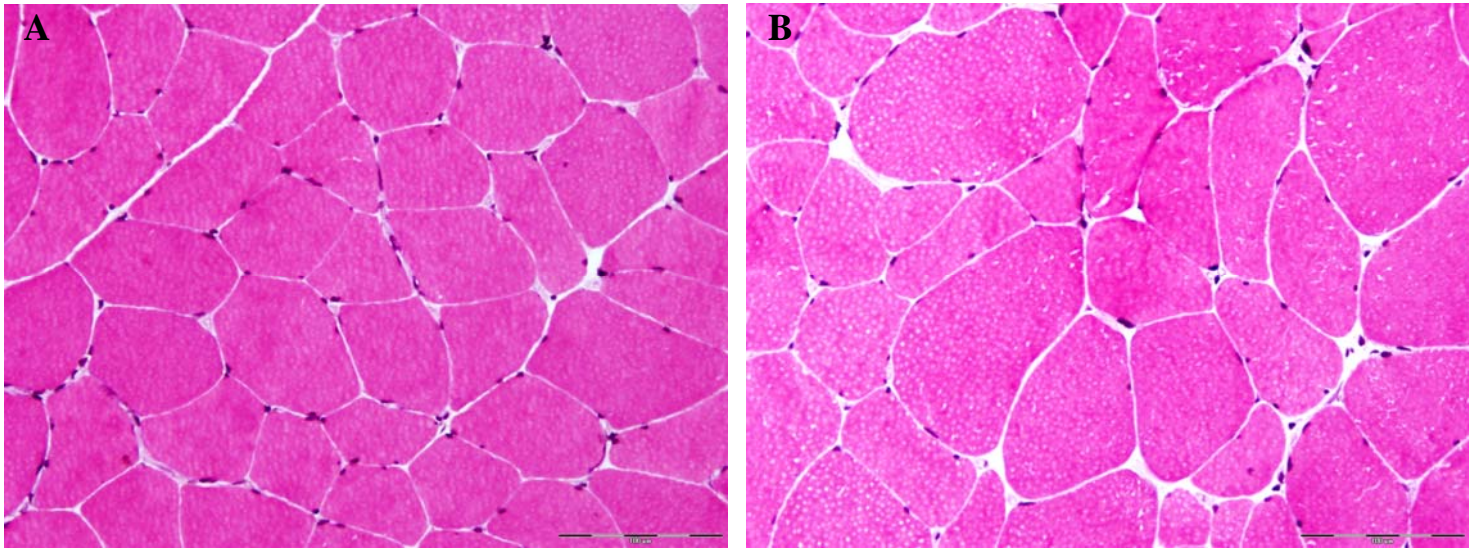
Figur 4.4. Tykkelsen av *m. vastus lateralis* før og etter treningsperioden. Heltrukket linje representerer de gjennomsnittlige verdiene, stiplet linje representerer de individuelle verdiene over intervensjonsperioden.

signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,01$).

* signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,05$).

Tradisjonell- og funksjonell styrketrening hadde en signifikant økning på henholdsvis $21 \pm 5\%$ ($P \leq 0,01$) og $15 \pm 5\%$ ($P \leq 0,05$) i tykkelsen av *m. vastus lateralis* etter treningsperioden (figur 4.4).

4.4.2 Muskelfiberareal



Figur 4.5. Ved å gjennomføre en vanlig eosin-hematoxylin merking kunne man observere at det var store forskjeller mellom deltagerne. Enkelte deltagere og områder av muskelsnittet viste tilnærmet "normal" muskulatur (A), mens andre viste typiske tegn til sarkopeni som variert størrelse og unormal form på muskelfibrene (B).

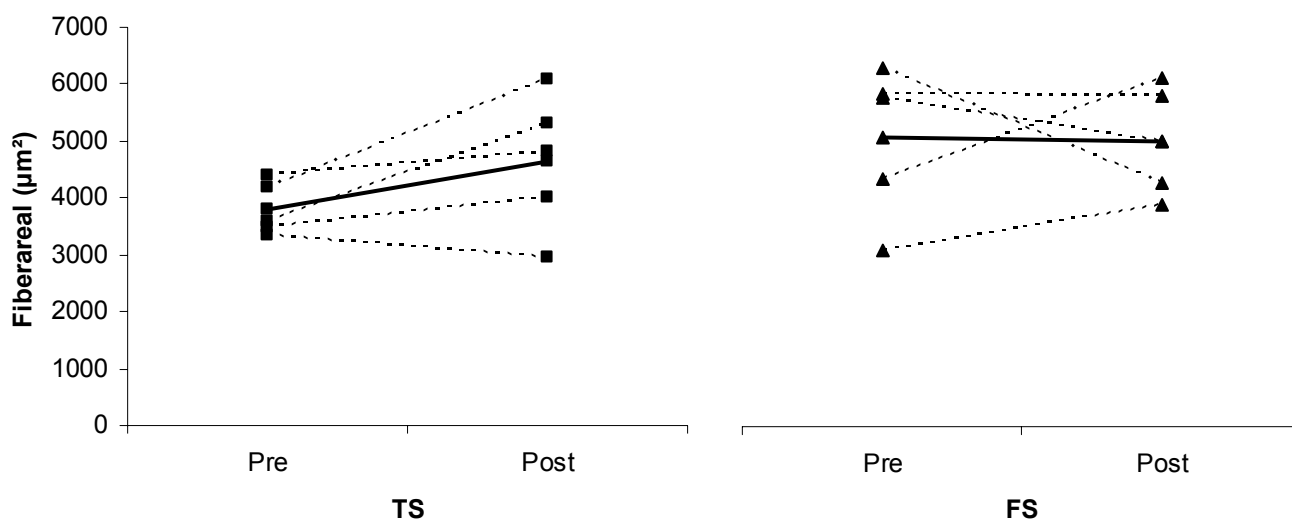
Tabell 4.2. Muskelfibersammensetning av antall type I og II muskelfibere som prosent (%) av antall muskelfibere analysert (gjennomsnittlig±SEM).

	Type I		Type II	
	Pre	Post	Pre	Post
TS	31±6	27±7	69±6	73±7
FS	44±9	41±7	56±9	59±7

Tabell 4.3. Muskelfibersammensetning som prosent (%) av det totale muskelfiberarealet (gjennomsnittlig±SEM).

	Type I		Type II	
	Pre	Post	Pre	Post
TS	40±7	32±7**	60±7	68±7**
FS	55±9	53±6	45±9	47±6

** signifikant forskjellig fra FS ($P \leq 0,05$)



Figur 4.6. Muskelfiberarealet før og etter treningsintervensjonen. Heltrukket linje representerer de gjennomsnittlige verdiene, stiplet linje representerer de individuelle verdiene.

Det var ingen signifikant forskjell i muskelfibersammensetning mellom funksjonell styrketrening og tradisjonell styrketrening før og etter treningsintervensjonen målt som prosent (%) av antallet muskelfibere analysert (tabell 4.2). Muskelfibersammensetning målt som prosent (%) av totale arealet var treningsgruppene ikke forskjellige før trening. Etter treningen viste kun tradisjonell styrketrening en signifikant forskjell fra funksjonell styrketrening ($P \leq 0,05$) (tabell 4.3).

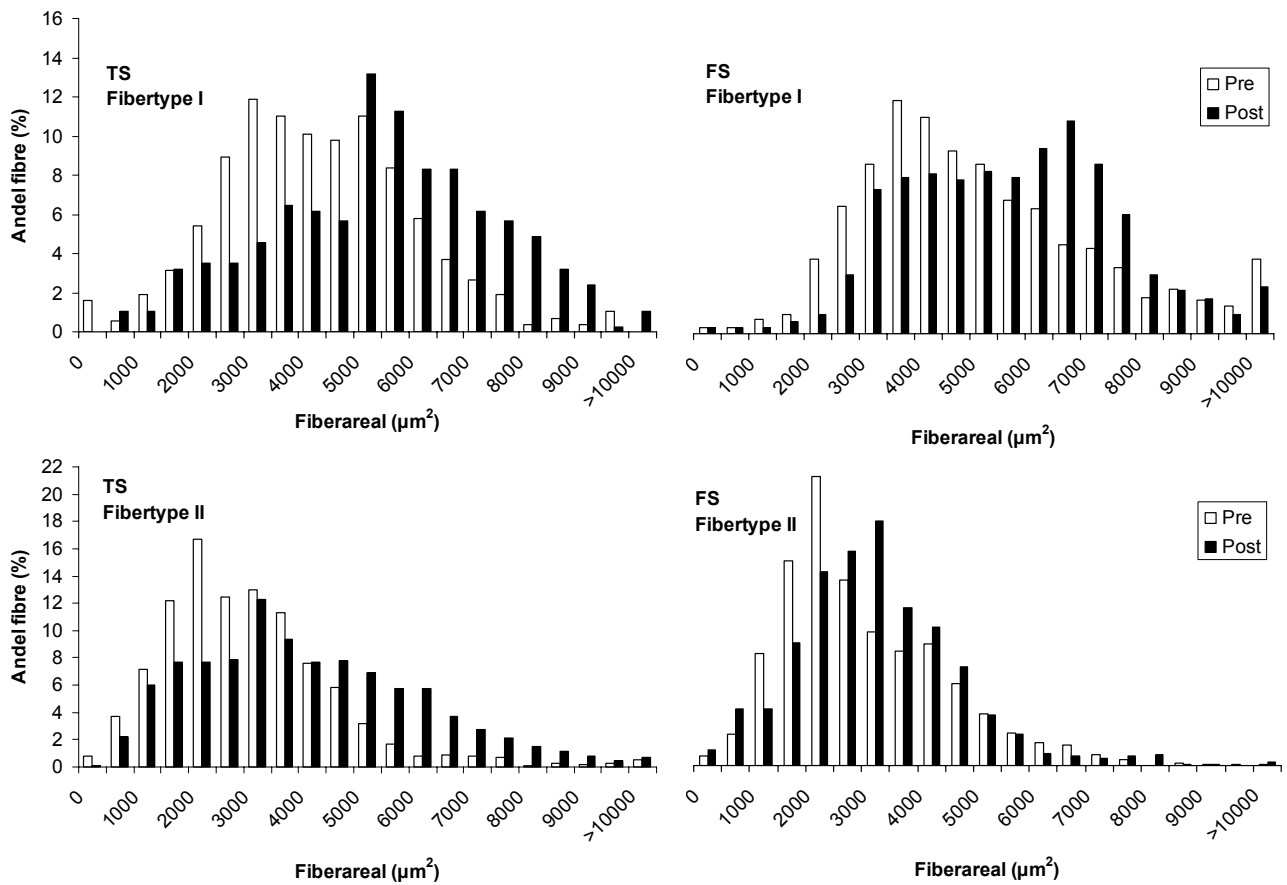
Tradisjonell styrketrening viste en tendens til økning av det totale muskelfiberarealet (21 ± 11 %) gjennom treningsperioden, hvor den største økningen fantes i type II muskelfibrene (34 ± 16 %) (tabell 4.4). Funksjonell styrketrening hadde ingen signifikant økning i det totale muskelfiberarealet (4 ± 13 %) (figur 4.6).

Tabell 4.4. Antall muskelfibere analysert for arealberegningen og muskelfiberarealet (μm^2) på type I og II muskelfiberne før og etter treningsintervensjonen (gjennomsnittlig \pm SEM).

	TS				FS			
	I		II		I		II	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Antall fibre	115 \pm 27	74 \pm 18**	259 \pm 108	199 \pm 31	139 \pm 34	123 \pm 15	205 \pm 76	189 \pm 32
Snitt areal	5197 \pm 438	5721 \pm 459	3241 \pm 222	4366 \pm 633	5603 \pm 734	5730 \pm 380	3401 \pm 453	3397 \pm 282

** signifikant forskjellig fra FS ($P \leq 0,05$)

4.4.3 Størrelsefordeling av muskelfibere



Figur 4.7. Fiberarealfordelingen før og etter treningsintervensjonen for tradisjonell styrketrening (TS) og funksjonell styrketrening (FS) for muskelfibertype I og II.

Tradisjonell styrketrening viste en tendens til reduksjon i den totale andelen muskelfibere av mindre størrelse ($\leq 3000 \mu\text{m}^2$) etter treningsperioden. Etter treningsperioden ser man at andelen muskelfibere over $5000 \mu\text{m}^2$ øker signifikant ($P \leq 0,05$). For funksjonell styrketrening ser man de samme antydningene som hos tradisjonell styrketrening, men de er mindre uttalt. Hos begge gruppene ser man en høyreforskyvning i både muskelfibertype I og II. Dette betyr at andelen med større muskelfibere øker.

4.5 Satellittceller

Tradisjonell styrketrening hadde en ikke-signifikant økning i totalt antall satellittceller per muskelfiber på 17 %, mot ingen endring hos funksjonell styrketrening (tabell 4.7).

Tabell 4.5. Antall muskelfibere brukt for å analysere antall satellittceller, antall satellittceller per muskelfiber (satellittceller÷antall fibre) og andelen satellittceller som ble identifisert uten DAPI merkingen (gjennomsnittlig±SEM).

	TS		FS	
	Pre	Post	Pre	Post
Antall fibre analysert	1071±143	883±113	1363±109	1153±127
Antall satellittceller	66±7	60±12	70±13	51±8
Antall satellittceller per 100 fiber	6,4±0,8	7,0±1,0	5,2±0,8	4,7±0,8
Antall satellittceller per cellekjerne	3,0±0,7	3,1±0,5**	2,1±0,2	1,7±0,3*

* signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,05$).

** signifikant forskjellig fra funksjonell styrketrening ($P \leq 0,05$).

Det ble funnet en signifikant nedgang (-22 ± 8 %) i total mengde satellittceller som andelen av cellekjerne hos funksjonell styrketrening. Dette gjorde at treningsgruppene ble signifikant forskjellige etter treningen. Ved å samle resultatet viste type II muskelfibrene et signifikant lavere antall satellittceller per muskelfiber i forhold til type I muskelfibrene før treningen. Mens det ble sett en tendens ($P = 0,16$) til en forskjell mellom type I og II muskelfibrene på antall satellittceller per cellekjerne før treningen.

Tabell 4.6. Antall muskelfibere brukt for å analysere antall satellittceller og antallet satellittceller per muskelfibertype (satellittceller=antall fibere) (gjennomsnittlig±SEM).

	TS				FS			
	I		II		I		II	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Antall fibre analysert	336±116	214±43**	705±33	619±101	606±148	459±78	757±129	694±134
Antall satellittceller	28±8	15±5	38±6	44±10	38±9	28±5	32±8	23±5
Antall satellittceller per 100 fiber	8,0±0,3	7,3±1,7	5,6±1,2	6,7±0,9**	6,7±0,1,2	6,8±0,1,7	4,1±0,9	3,6±0,7
Antall satellittceller per cellekjerne	3,3±0,3	3,1±0,7	2,9±0,9	3,1±0,5**	2,6±0,3	2,3±0,6	1,7±0,3	1,4±0,2

** signifikant forskjellig fra funksjonell styrketrening $P \leq 0,05$

Når antall satellittceller ble undersøkt per muskelfibertype viste det seg at tradisjonell styrketrening hadde en ikke-signifikant reduksjon på -13 % hos type I muskelfibrene, mens en ikke-signifikant økning på 17 % hos type II muskelfibrene. Funksjonell styrketrening viste ingen økning i antall satellittceller per type I og II muskelfibrene.

Det ble ikke funnet noen signifikant endring i antallet satellittceller per cellekjerne for noen muskelfibertypene eller treningsgruppe. Men likevel hadde tradisjonell styrketrening en økning på 29±26 % i muskelfibertype II, og funksjonell styrketrening fikk en reduksjon på -4±26 % som førte til en signifikant forskjell mellom treningsgruppene.

4.7 NCAM-positive muskelfibere

Det var ingen signifikant endring i antall NCAM-positive muskelfibere etter treningsintervensjonen (tabell 4.9). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom gruppene ved pre- eller post analysen. Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike muskelfibertypene, disse blir derfor ikke presentert.

Tabell 4.7. Antall muskelfibere brukt for å analysere antall NCAM-positive (NCAM+) muskelfibere per 100 muskelfibere ((NCAM+fibere=antall fibere)x100) (gjennomsnittlig±SEM).

	TS		FS	
	Pre	Post	Pre	Post
Antall fibre analysert	1071±143	883±113	1363±109	1153±127
Antall NCAM+ per 100 fibere	0,8±0,3	0,9±0,4	1,2±0,5	0,9±0,2

4.5 Cellekjerner

Tabell 4.8. Antall muskelfibere brukt for å analysere antall cellekjerner per muskelfiber og kjernedomene (μm^2) før og etter treningsintervensjonen (gjennomsnittlig \pm SEM).

	TS		FS	
	Pre	Post	Pre	Post
Antall fibre analysert	134 \pm 16	123 \pm 6	121 \pm 9	114 \pm 3
Antall cellekjerner per fiber	2,2 \pm 0,5	2,3 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1*
Kjernedomene	1738 \pm 89	2074 \pm 222	1830 \pm 151	1624 \pm 164

* signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,05$)

Treningsgruppene var ikke signifikant forskjellige før treningen. Kun en signifikant økning ($P \leq 0,05$) på 15 \pm 6 % ble funnet hos funksjonell trening etter treningsintervensjonen. Det ble ikke funnet noen signifikant endring i kjernedomenet etter treningsintervensjonen, men en tendens til større kjernedomene hos tradisjonell styrketrening etter treningen.

Tabell 4.9. Antall muskelfibere brukt for å analysere antall cellekjerner per muskelfiber, antall sentrale cellekjerner per 100 muskelfiber (cellekjerner:antall fibre) og kjernedomene (μm^2) før og etter treningsintervensjonen (gjennomsnittlig \pm SEM).

	TS				FS			
	I		II		I		II	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Antall analyserte fibre	62 \pm 4	56 \pm 2	72 \pm 14	67 \pm 4	64 \pm 9	54 \pm 1	56 \pm 1	61 \pm 3
Cellekjerner per fiber	2,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,2	2,2 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	2,5 \pm 0,2
Sentrale kjerner per fiber	0,18 \pm 0,16	0,18 \pm 0,16	0,36 \pm 0,33	0,35 \pm 0,33	0,18 \pm 0,16	0,17 \pm 0,17	0,35 \pm 0,33	0,34 \pm 0,33
Kjernedomene	2191 \pm 134	2586 \pm 429	1593 \pm 144	1985 \pm 225	2240 \pm 173	1986 \pm 114*	1485 \pm 136	1394 \pm 157

* signifikant forskjellig fra pre verdien ($P \leq 0,05$)

Det var ingen forskjell mellom treningsgruppene før treningsperioden og det var ingen signifikant endring i antall cellekjerner per muskelfibertype I eller type II gjennom treningsperioden for noen av gruppene. Ingen av gruppene hadde noen endring i antall sentrale cellekjerner per muskelfiber for type I eller type II muskelfibrene.

Det ble ikke observert noen signifikant endring i kjernedomene hos tradisjonell styrketrening, men en tendens til økt kjernedomene kan observeres i type II muskelfibrene. I funksjonell styrketrening var det en signifikant reduksjon ($P \leq 0,05$) i kjernedomene i type I muskelfibrene, men ingen signifikant endring i type II muskelfibrene.

4.8 Korrelasjoner

Korrelasjonene ble gjort på grunnlag av de samlede resultatene for alle deltagerne fra begge treningsgruppene.

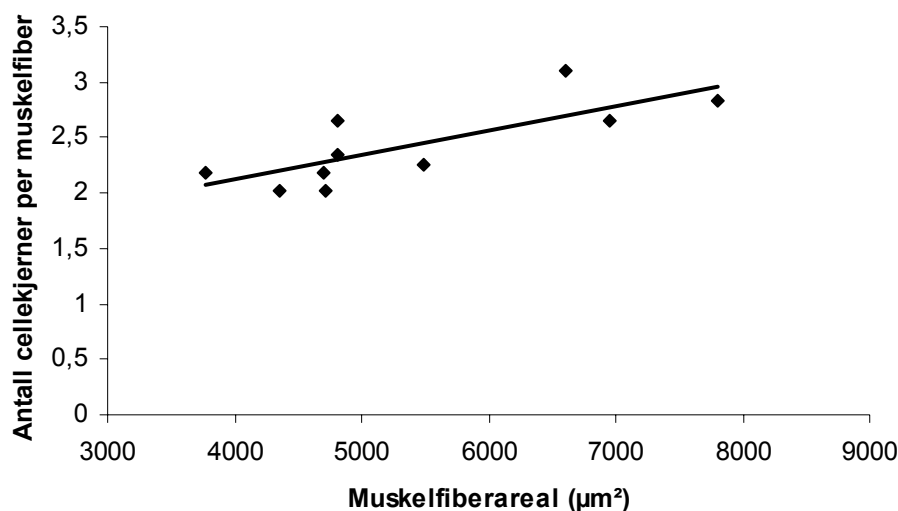
Tabell 4.10. Korrelasjoner mellom muskelstyrke, muskeltykkelse og muskelfiberareal.

Analysene er gjort med verdiene fra alle deltagerne.

	Styrke endring	Muskeltykkelse endring	Fiberareal type 1 endring	Fiberareal type 2 endring
Fiberareal endring	0,74*	0,01		
Fiberareal type 1 pre	-0,73*		-0,69*	
Fiberareal type 2 pre	-0,58			-0,49

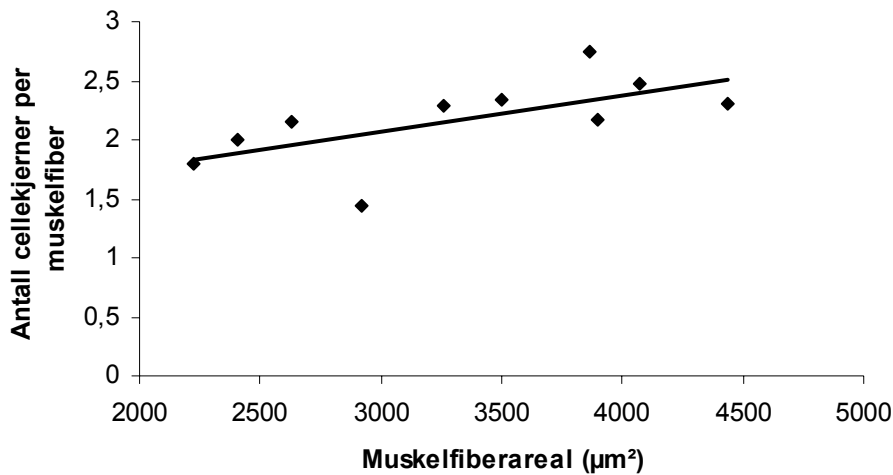
* $P \leq 0,05$

Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom endringer i muskeltykkelsen og endringer i det totale muskelfiberarealet. Det ble funnet en signifikant negativ korrelasjon ($R = -0,73$) mellom endringer i muskelstyrken og muskelfiberarealet i muskelfibertype I før treningen, dette gjelder derimot ikke for muskelfibertype II. Det ble funnet en signifikant korrelasjon ($R = 0,69$) mellom endringen og muskelfiberarealet før treningen i muskelfibertype I, mens det samme ikke ble funnet for muskelfibertype II.



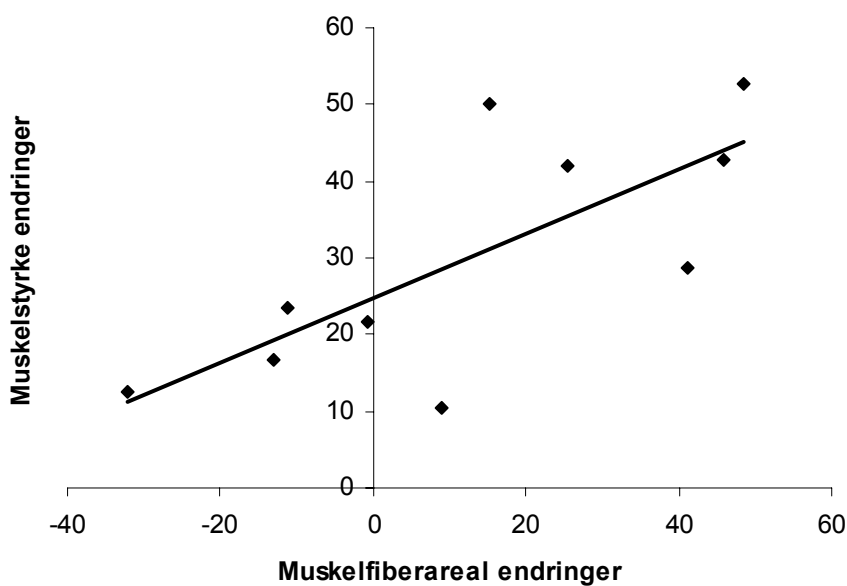
Figur 4.8. Korrelasjon mellom antall cellekjerner pre i muskelfibertype I og muskelfiberarealet (μm^2) pre i type I muskelfiberarealet.

Det ble funnet en signifikant korrelasjon ($R = 0,77$) mellom antallet cellekjerner og muskelfiberarealet i type I muskelfibrene før treningen (figur 4.8).



Figur 4.9. Korrelasjon mellom antall cellekjerner pre i muskelfibertype 2 og muskelfiberarealet (μm^2) pre i type 2 muskelfiberarealet.

Det samme ble funnet for muskelfibertype II, med en signifikant korrelasjon ($R = 0,64$) mellom antallet cellekjerner og muskelfiberarealet før treningen (figur 4.9).



Figur 4.10. Korrelasjon mellom endringer (%) i muskelstyrke og endringer (%) i muskelfiberarealet (μm^2).

Det ble funnet en signifikant korrelasjon ($0,74$) mellom endringen i muskelstyrken og endringen i muskelfiberarealet etter treningen (figur 4.10).

Tabell 4.11. Korrelasjoner mellom satellittceller, cellekjerner, muskelstyrke og muskelfiberareal. Analysene er gjort på grunnlag av resultatet fra alle deltagerne.

	Sat.celler pre	Sat.celler type 1 pre	Sat.celler type 2 pre	Kjerner type 1 pre	Kjerner type 1 post	Kjerner type 1 endring	Kjerner type 2 pre	Kjerner type 2 post	Kjerner type 2 endring
Styrke ending	-0,45								
Fiberareal endring	-0,69*								
Fiberareal type 1 pre		0,56		0,77*					
Fiberareal type 1 post					0,17				
Fiberareal 1 endring		-0,54				0,72*			
Fiberareal type 2 pre			-0,65*				0,64*		
Fiberareal type 2 post								0,22	
Fiberareal 2 endring			-0,65						-0,11

* $P \leq 0,05$

Det ble funnet en signifikant negativ korrelasjon ($R = -0,69$) mellom det totale antallet satellittceller før treningen og endringen i det totale fiberarealet etter treningsintervensjonen. Det ble funnet en signifikant negativ korrelasjon ($R = -0,65$) mellom antallet satellittceller i type II muskelfibere og muskelfiberarealet før treningen, men ikke mellom antallet satellittceller i muskelfibertype I og muskelfiberarealet før treningen. Det ble heller ikke funnet noen korrelasjon mellom antallet satellittceller før treningen og endringer i muskelfiberarealet for verken type I eller type II muskelfibere. Det ble ikke funnet korrelasjon mellom antallet cellekjerner og muskelfiberarealet etter treningen verken for type I eller type II muskelfibrene.

Vi fant en signifikant korrelasjon ($R = 0,72$) mellom endringer i antallet cellekjerner i type I muskelfibrene og endringer i totale muskelfiberareal. Vi fant derimot ikke det samme forløpet for endringer i cellekjerner og muskelfiberareal for type II muskelfibrene.

5.0 Diskusjon

Målet med denne studien var å undersøke endring i antall satellittceller, cellekjerner og muskelfiberareal hos selvhjulpne eldre mennesker etter 12 uker med styrketrening med ulik belastning. Kort oppsummert viste denne studien at begge treningsgruppene økte muskelstyrken i kneekstensjon med henholdsvis 36 % og 24 % for de som trente tradisjonell styrketrening og funksjonell styrketrening. Begge gruppene økte også i tykkelsen av m. vastus lateralis med 21 % for tradisjonell styrketrening, og 15 % for gruppen som trente funksjonell styrketrening. Ingen av gruppene fikk signifikant endring i muskelfiberareal, men tradisjonell styrketrening viste en tendens til økning på 21 %, hvor den største økningen fantes i type II muskelfibre. Kun gruppen som trente funksjonell styrketrening økte signifikant antall cellekjerner per muskelfiber etter treningsperioden, og denne økningen skyldtes en økning i både type I og type II muskelfibre. Tradisjonell styrketrening viste ingen signifikant endring i antall satellittceller per muskelfiber, eller antall satellittceller per cellekerne etter treningen. Deltagerne som trente funksjonell styrketrening viste ingen signifikant endring i antall satellittceller per muskelfiber, men noe overraskende viste de en signifikant nedgang (-22 %) i antall satellittceller per cellekerne etter treningen. Denne nedgangen skyldtes hovedsakelig nedgang i antall satellittceller rundt type I muskelfibre (-15 %), noe som kan være et resultat av at denne gruppen økte antallet cellekjerner per muskelfiber både i type I og II muskelfibre. Dette ble ikke observert for gruppen som trente tradisjonell styrketrening.

5.1 Muskelkarakteristikk

5.1.1 Muskeltykkelse

Muskeltykkelse ble målt med ultralyd av m. vastus lateralis. Vi fant at både tradisjonell styrketrening og funksjonell styrketrening var effektivt for å øke tykkelsen av m. vastus lateralis etter 12 uker med trening (henholdsvis 21 og 15 %). Resultatene for tradisjonell styrketrening viser en noe større økning i muskeltykkelse i forhold til Suetta et al. (2008), som forøvrig er eneste studie der man måler muskeltykkelse ved bruk av ultralyd som i vår studie. Suetta et al. (2008) viste en økning på 15 % etter 12 uker med styrketrening. Forskjellene kan skyldes at treningen i studien til Suetta et al. var noe mindre intensiv enn i vår studie, hvor deltagerne hadde en høyere treningsmotstand og større treningsmengde. Deltagerne i

tradisjonell styrketrening hadde i utgangspunktet noe lavere muskeltykkelse enn i studien til Suetta et al., mens deltagerne i funksjonell styrketrening hadde noe tykkere m. vastus lateralis enn deltagerne i studien til Suetta et al. (2008). Vi kan derfor anta at forskjellene ikke bare ligger i den gjennomførte styrketreningen, men også noe i utgangspunktet til deltagerne.

Den noe lavere økningen i muskeltykkelse ved funksjonell styrketrening kan være med å forklare at denne gruppen også hadde en noe lavere styrkeøkning i kneekstensjon enn deltagerne i den tradisjonell styrketreningen (24 % mot 36 %). En årsak til noe mindre økning i muskeltykkelse og styrke kan være at den funksjonelle styrketreningen hadde noe lavere treningsmotstand enn i tradisjonell styrketrening. Jeg vil likevel påpeke at funksjonell styrketrening førte til en signifikant økning i pennasjonsvinkel (data ikke vist) etter treningsintervensjonen, noe som også kan påvirke styrkeresultatene ved at det fysiologiske tverrsnittet øker, og dermed får muskelen en mer gunstig pennasjonsvinkel for å utvikle kraft (Folland & Williams, 2007).

Noe overraskende var det bedre korrelasjon mellom endring i muskelfiberarealet og styrke ($r=0,74$, $P \leq 0,05$) enn mellom endring i muskeltykkelsen og styrke ($r=0,014$, $P > 0,05$). Det er tidligere funnet korrelasjon mellom muskelstyrken, målt isometrisk, og muskeltverrsnittsareal av m. quadriceps femoris, målt med MRI (Häkkinen *et al.*, 1998b; Harridge *et al.*, 1999; Kryger & Andersen, 2007). Frontera et al. (2003) rapporterte ingen korrelasjon mellom en dynamisk styrketest og tverrsnittsareal (målt med CT) hos eldre før en treningsperiode, mens unge viste en korrelasjon mellom de samme faktorene. Etter treningsperioden på 12 uker ble det funnet en korrelasjon også for de eldre deltagerne. Dette betyr at muskelstyrken korrelerer bedre med muskeltverrsnittet av hele muskulaturen på fremsiden av låret enn tykkelsen av kun én muskel, som målt i vår studie. Det ser også ut til at korrelasjonen er bedre mellom en isometrisk enn en dynamisk styrketest. Dette kan skyldes at en dynamisk test antageligvis stiller et større krav til teknikk, og at eldre har gjennom en periode med styrketrening har lært seg å ta i på en styrketest. I et annet masterprosjekt på det samme prosjektet ble det funnet en god sammenheng ($r=0,91$, $P \leq 0,01$) mellom muskelstyrken i isometrisk kneekstensjon ved 90° og tverrsnittsareal av m. quadriceps femoris (målt med MRI) (Andersen, 2009). Det ble derimot ikke funnet noen signifikant korrelasjon mellom endringer i muskelstyrken og endringene i tverrsnittsarealet, men korrelasjonen var likevel relativ god ($r=0,41$, $P > 0,05$). Dette indikerer at økningen i

styrke delvis er styrt av endring i tverrsnittsarealet til m. quadriceps femoris, men en bedring i muskelkvaliteten¹³ kan også medvirke til økningen i styrke. Det lave antallet deltagere inkludert i disse korrelasjonsanalysene ($n=10$) gjør det imidlertid vanskelig å relatere styrkeøkningen direkte til endringer i tverrsnittsarealet eller til endring i muskelkvalitet.

5.1.2 Muskelfiberareal

I denne studien ble det benyttet muskelbiopsi for å undersøke muskelfiberarealet i m. vastus lateralis etter treningsintervensjonen. Flere deltagere viste morfologiske tegn til sarkopeni, men det var variasjoner mellom individer og det var stor variasjon i fiberareal innad hos enkelte deltagere. Noe overraskende fikk ingen av treningsgruppene signifikant økning i det totale muskelfiberarealet etter treningsintervensjonen. Dette skyldes spredning i resultatet, hvor én deltager i tradisjonell styrketrening, og to deltagere i funksjonell styrketrening viste en nedgang i det totale muskelfiberarealet etter treningsperioden. Likevel viste tradisjonell styrketrening 21 % mot 4 % økning hos funksjonell styrketrening. Med flere deltagere ville den statistiske styrken vært bedre, og dermed økt sjansen for å finne signifikante endringer. Det samlede muskelfiberarealet for deltagerne i denne studien er tilnærmet likt det som er rapportert for denne aldersgruppen i tidligere studier (Mackey *et al.*, 2007). Selv om økningen ikke var signifikant kan det se ut til at den gjennomsnittlige økningen hos tradisjonell styrketrening var minst like høy som det man har sett i tidligere studier (Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007).

Det var ingen signifikant økning i arealet av type I muskelfibre etter treningsintervensjonen verken for tradisjonell styrketrening eller funksjonell styrketrening. Likevel så vi en høyreforskyvning i fiberarealfordelingskurven for type I muskelfibre etter treningsintervensjonen. Disse resultatene er i samsvar med noen tidligere studier (Hikida *et al.*, 2000; Kryger & Andersen, 2007; Verdijk *et al.*, 2009), men det er også funnet økning i muskelfibersarealet av type I muskelfibre (Frontera *et al.*, 1988; Sipilä *et al.*, 1997; Häkkinen *et al.*, 1998a; Hikida *et al.*, 2000; Häkkinen *et al.*, 2001; Suetta *et al.*, 2008). En av grunnene til at vi ikke fant økning i muskelfiberarealet kan skyldes at type I fibre i utgangspunktet var ganske store i forhold til type II fibre. I de studiene hvor man har funnet en økning i type I muskelfiberarealet, hadde de mindre type I muskelfiberareal enn i vår studie. Det er også en rekke tverrsnittstudier som bekrefter at deltagerne i vår studie har høyere gjennomsnittareal

¹³ Spesifikk muskelstyrke: Muskelstyrke per CSA

på type I muskelfibrene sammenlignet med andre personer på samme alder (Lexell *et al.*, 1988; Lexell & Taylor, 1991; Frontera *et al.*, 2000). Dette kan indikere at deltagerne våre i utgangspunktet var i bedre fysisk form enn de deltagerne som har blitt benyttet i tidligere studier.

Økningen i muskelfiberarealet hos deltagerne i den tradisjonelle styrketreningen på 21 % skyldes i hovedsak økning i type II muskelfiberarealet på 34 %. Dette bekreftes gjennom fiberfordelingskurven, som høyreforskyves etter treningsperioden for type II muskelfibrene. Denne økningen er større enn hva man har sett i andre studier, hvor resultatene varierte fra 5 % til 28 % (Frontera *et al.*, 1988; Mackey *et al.*, 2007; Kryger & Andersen, 2007; Verdijk *et al.*, 2009). En av årsakene til at vi observerte en større økning i type II muskelfibrene enn det som er rapportert i tidligere studier kan skyldes at deltagerne i vår studie hadde et lavere muskelfiberareal i type I muskelfibere til å begynne med enn det som er rapportert i andre studier (Lexell *et al.*, 1988; Lexell & Taylor, 1991; Frontera *et al.*, 2000). Dette kan også forklare hvorfor enkelte deltagere i funksjonell styrketrening hadde en reduksjon i muskelfiberarealet ettersom disse deltagerne i utgangspunktet hadde høyest gjennomsnittlig muskelfiberareal før treningen. Siden våre deltagere hadde store type I muskelfibere betyr dette at forskjellen mellom areal av type I og type II muskelfibere var større hos våre deltagere enn det som er rapportert i andre studier. Dette kan bety at våre deltagere var aktive men bedrev fysisk aktivitet med lav intensitet som rekrutterte type I muskelfibrene i størst grad, f. eks gåturer.

Muskelfiberandelen, gitt som arealet de ulike muskelfibertypene utgjør, viser ingen signifikante endringer for verken tradisjonell- eller funksjonell styrketrening etter treningsperioden, selv om andelen type II muskelfibere økte med 17 % hos de som trente tradisjonell styrketrening. Imidlertid var det to deltagere som hadde en nedgang, noe som gjorde at resultatet ikke ble signifikant. Mens hos de som trente funksjonell styrketrening viste de en ikke-signifikant økning på 12 % for type II muskelfibrene.

5.2 Satellittceller

Ved bruk av muskelbiopsier og immunohistokjemiske metoder kunne vi kvantifisere satellittcellene etter treningsintervensjonen. NCAM antistoffet vi benyttet er brukt i flere tidligere studier (Kadi *et al.*, 2004a; Mackey *et al.*, 2007; Verdijk *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008), slik at vi kan sammenligne våre resultater med disse.

Det er tidligere funnet forskjeller mellom type I og II muskelfibere på antall satellittceller hos eldre (Verdijk *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Ved å samle dataene fra alle deltagerne viste type II muskelfibrene signifikant færre antall satellittceller per muskelfiber enn type I muskelfibrene, mens vi kun observerte en tendens til forskjeller mellom type I og II muskelfibrene i antallet satellittceller per cellekjerner. Vi observerte ingen signifikante endringer i antall satellittceller per muskelfiber etter treningsperioden på 12 uker. Her er, som nevnt tidligere, et problem at det lave antallet deltagere gir studien lav statistisk styrke. Det vil derfor være hensiktsmessig å utvide antallet deltagere for å øke den statistiske styrken videre i denne studien. Det kan tenkes at med flere deltagere ville vi funnet en signifikant økning i satellittceller per muskelfiber slik det er funnet i flere tidligere treningsstudier (Roth *et al.*, 2001; Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007; Verdijk *et al.*, 2009). Før treningen observerte vi omtrent samme antall satellittceller som vist i tidligere treningsstudier (Verdijk *et al.*, 2009), men ikke alle (Mackey *et al.*, 2007). Resultatene fra vår studie skiller seg derimot fra andre treningsstudier siden vår studie ikke fant en signifikant økning i antallet satellittceller per muskelfiber. Ved å samle dataene fra begge treningsgruppene, for å øke den statistiske styrken, blir det imidlertid heller ingen signifikant endring etter treningsintervensjonen. Dette kan skyldes at det er variasjoner innenfor gruppene både før og etter treningsintervensjonen, men også forskjeller mellom gruppene. En mulig forklaring på forskjellene mellom vår og tidligere studier er antallet muskelfibere analysert. Vi analyserte et stort antall muskelfibere (1105) sammenlignet med tidligere studier, hvor det gjennomsnittlige antallet muskelfibere analysert fra hver biopsi varierte fra 120 til 758 (Renault *et al.*, 2002a; Kadi *et al.*, 2004a; Dreyer *et al.*, 2006; Petrella *et al.*, 2006; Verdijk *et al.*, 2007; Petrella *et al.*, 2008; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Det store antallet muskelfibere inkludert i våre analyser styrker derfor holdbarheten i våre resultater, men det er vanskelig å si nøyaktig hvordan dette slår ut i forhold til at vi på den andre siden har få deltagere inkludert i analysen.

Å beregne endringer i satellittceller ved å kvantifisere de som antall satellittceller per cellekjerne har tidligere blitt hyppig brukt. Dette byr derimot på noen utfordringer ved at eventuelle endringer i antall cellekjerne vil påvirke resultatet. Med denne analysen på våre data får vi fremdeles uendret andel satellittceller av cellekjernene hos de som trente tradisjonell styrketrening. De som trente funksjonell styrketrening viser derimot en signifikant reduksjon i antall satellittceller per cellekjerne. Dette skyldes at gruppen med funksjonell styrketrening hadde en signifikant økning i det totale antallet cellekjerne per muskelfiber. Andelen satellittceller for gruppen med tradisjonell styrketrening skiller seg ikke fra tidligere studier, men andelen satellittceller før treningen er noe lavere hos funksjonell styrketrening enn det som er oppgitt i tidligere studier. Dette kan skyldes at denne treningsgruppen har et stort flertall av kvinner (4 mot 1) og det er tidligere vist at kvinner har et lavere muskelfiberareal enn menn (Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007). Dette medfører også et lavere krav til antall cellekjerne per muskelfiber for å ha et tilfredsstillende kjernedomene.

Ingen av gruppene viste noen endringer i antall satellittceller rundt type I muskelfibrene, verken ved å beregne satellittcellene per fiber, eller som andel av cellekjerne. Disse resultatene støttes av tidligere studier, hvor man heller ikke fant noen endring i satellittceller rundt type I muskelfibrene (Verdijk *et al.*, 2009). Effekten av tradisjonell styrketrening skiller seg dermed ikke fra tidligere studier (Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Effekten av funksjonell styrketrening samsvarer også med tidligere studier når vi beregner antall satellittceller per cellekjerne, men skiller seg ut fra tidligere studier når vi beregner antall satellittceller per muskelfiber (*ibid.*). En grunn til at vi ikke ser så tydelige endringer i type I muskelfibrene kan være at de i utgangspunktet hadde et stort areal i forhold til type II muskelfibrene, og ikke hadde behov for å øke ytterligere i størrelse for å tilpasse seg den nye belastningen styrketreningen tilførte. En annen forklaring kan være at en lavere andel satellittceller i type I muskelfibrene i forhold til type II muskelfibrene, kan føre til at det er utilstrekkelig med satellittceller for å støtte videre vekst av disse muskelfibrene.

Det var heller ikke noen av gruppene som fikk signifikante endringer i satellittcellene rundt type II muskelfiberne, verken gitt som antall satellittcellene per fiber, eller som andel av cellekjerne. Det er tidligere funnet en økning i antall satellittceller rundt muskelfibertype II etter en periode med styrketrening hos eldre (Verdijk *et al.*, 2009). Selv om resultatet fra tradisjonell styrketrening ikke viser signifikant økning, så hadde de den største endringen med 17 % i antall satellittceller per muskelfiber og 29 % i andelen satellittceller av cellekjernene i

type II muskelfibere. Det er derfor mulig at vi hadde for lite statistisk styrke i studien til å fange opp en reell økning. Det er også hensiktsmessig å påpeke at deltagerne i tradisjonell styrketrening hadde flere satellittceller (per fiber og som andel av cellekjerne) før treningsintervensjonen enn det som er rapportert i tidligere studier (Verdijk *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Dette kan være avgjørende for økningen videre, siden man antar at satellittceller har et tak på hvor mye de kan øke (Kadi *et al.*, 2005). Gruppen med funksjonell styrketrening hadde tilnærmet likt antall satellittceller per muskelfiber som tidligere vist, men de hadde noe større andel satellittceller per cellekerne (Verdijk *et al.*, 2007; Verney *et al.*, 2008; Verdijk *et al.*, 2009). Våre resultater kan tyde på at belastningen ved tradisjonell styrketrening er mer gunstig for å øke antallet satellittceller enn det som var tilfelle hos funksjonell styrketrening, men vi må inkludere flere personer i analysene før vi kan si dette med sikkerhet.

En viktig observasjon som ble gjort under analysene av satellittceller var at vi kunne se en ansamling av satellittceller i flere områder hos enkelte deltagere, både fra pre- og post muskelbiopsien. Denne grupperingen skjer uavhengig av muskelfibertypene, og kan dermed ikke forklares med endringer i det tilhørende motoneuronet. Vi kan ikke se bort ifra at det har blitt dannet et større antall med dattersatellittceller i de aktuelle områdene som et forsøk på å redde muskelfibere etter atrofi eller skade, men dette ble ikke undersøkt nærmere på dette tidspunkt. Man har i dyremodeller sett at antallet satellittceller øker etter to måneder ved denervasjon av muskelen, for så å reduseres igjen (Viguie *et al.*, 1997). Selv om denne økningen kun varte i to måneder, så vil dette være lenge i forhold til en rottes levealder. Det er derfor mulig at de ansamlinger vi observerer av satellittceller i enkelte områder både før og etter treningsintervensjonen indikerer pågående degenerative forandringer i muskulaturen. Disse ansamlingene av satellittceller vil også skape noe ”støy” i våre målinger siden de ikke er jevnt spredt utover i muskelen. Dette fenomenet gjør det derfor vanskeligere å måle endringene som følge av treningen.

Det er tidligere observert store variasjoner innad i en muskel på muskelfiberarealet og muskelfibersammensetningen (Lexell *et al.*, 1983). Det kan derfor ikke utelukkes at dybden hvor muskelbiopsien har blitt tatt kan ha innvirkning på vårt resultat. Det har også tidligere blitt observert en økt forekomst av satellittceller nær perimysium, nerver og blodårer. Dette kan kanskje forklares med at draget fra perimysium ved aktivitet kan føre til et større drag på de nærliggende muskelfibrene, mens muskelfibere som ligger i nærheten av nerver og

blodårer kan få en lokal utskillelse av vekstfaktorer fra disse. Tykkelsen på snittene som undersøkes vil også ha en innvirkning når vi sammenligner resultatet vårt med andre studier. Tykkere snitt vil kunne inneholde flere satellittceller og cellekjerner, men også størrelsen på muskelsnittet som blir analysert vil kunne påvirke sammenligningsgrunnlaget med andre studier. I vårt tilfelle har vi undersøkt klart flest muskelfibere per biopsi, noe som styrker våre resultater, men på en annen side har vi foreløpig få forsøkspersoner inkludert, noe som svekker styrken i våre resultater.

5.3 Cellekjerner

Tradisjonell styrketrening viste ingen endringer i antallet cellekjerner per muskelfiber, dette skjer selv om denne gruppen hadde størst økning i muskelfiberarealet. Vi observerte imidlertid en signifikant økning i antallet cellekjerner per muskelfiber hos de som trente funksjonell styrketrening. Økningen i antallet cellekjerner hos de som trente funksjonell styrketrening skyldes en ikke-signifikant økning i både type I og II muskelfibrene. Et økt totalt antall cellekjerner er imidlertid ikke i samsvar med tidligere studier (Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007; Verdijk *et al.*, 2009). Resultatene fra vår studie viser at våre deltagere i utgangspunktet hadde tilnærmet likt resultat som tidligere studier (*ibid.*), med unntak fra antall cellekjerner per muskelfibertype II i studien til Verdijk *et al.* (2009) som var noe lavere enn i vår studie. I tidligere studier er det rapportert at eldre har et lavere kjernedomene enn de unge (Petrella *et al.*, 2006; Verdijk *et al.*, 2007). Vår studie viser imidlertid et tilnærmet likt kjernedomene før treningen som vist for unge i det totale kjernedomenet (Petrella *et al.*, 2006). Det er tidligere funnet at muskelfiberhypertrofi opp til et visst nivå kan skje uavhengig av en økning av cellekjerner (Hikida *et al.*, 2000; Petrella *et al.*, 2006; Mackey *et al.*, 2007; Verdijk *et al.*, 2009). Økningen i antallet cellekjerner henger dermed noe etter økningen i muskelfiberarealet, og dermed skjer det en midlertidig økning i kjernedomenet ved hypertrofi. Dette skyldes økt muskelfiberareal uten økning i antall cellekjerner, som observert hos de som trente tradisjonell styrketrening i vår studie. Hos enkelte deltagere i funksjonell styrketrening observerte vi imidlertid en tilbakegang i muskelfiberarealet samtidig med en økning i antall cellekjerner, slik at kjernedomenet faktisk ble redusert. Økningen i cellekjerner hos funksjonell styrketreningsgruppen kan også være et resultat av at treningen var annerledes, slik at økningen i cellekjerner ikke nødvendigvis trigges av økningen i muskelfiberareal men av andre faktorer som f. eks metabolske

tilpassninger. Vi kan heller ikke utelukke at økningen i cellekjerner faktisk skyldes tilfeldigheter som er et resultat av få deltagere.

I studien til Verdijk et al. (2007) rapporterer de om et lavere kjernedomene for muskelfibertype I hos unge og eldre enn i vår studie. Dette kan forklares med at både de unge og de eldre hadde tilnærmet likt muskelfiberareal av muskelfibertype I som i vår studie, men de rapporterte en høyere forekomst av cellekjerner. I muskelfibertype II rapporterte de et høyere kjernedomene både for de unge og eldre enn i vår studie. Dette skjer på grunnlag av at de hadde større muskelfiberareal i type II muskelfibrene og det kunne se ut til at deres deltagere hadde noe høyere antall cellekjerner enn i vår studie. Hos eldre mennesker er det hevdet at kjernedomenet for en cellekerne har et øvre tak på ca. 2000 μm^2 , og en økning i muskelfiberareal over dette krever tilførsel av nye cellekjerner (Petrella *et al.*, 2006). Dette kan forklare hvorfor vi fant en økning i antall cellekjerner hos gruppen som trente funksjonell styrketrening, siden deltagerne i denne gruppen hadde et kjernedomene tett opp mot denne grensen. Petrella et al. (2006) sier derimot ikke noe om dette forholdet gjelder for de ulike muskelfibertypene. Tykkelsen på muskelsnittet som undersøkes vil være av betydning for disse resultatene, siden et tykkere snitt vil medføre at flere cellekjerner blir synlige. I vår studie var snittene tykkere enn de tidligere studiene (8 μm mot 5-6 μm), og i teorien bør vi da observere noen flere cellekjerner i hvert snitt og dermed få et lavere kjernedomene i våre analyser.

Det blir hevdet at muskelfibrene hos unge må øke over 26 % i størrelse for at endringer i cellekjerner vil oppstå (Kadi *et al.*, 2004b). Samtidig har dyreforsøk vist at overbelastet muskulatur fikk en rask økning av DNA, selv om hypertrofi ikke hadde oppstått (Adams & Haddad, 1996). Dette kan tyde på at muskelfibrene blir ”klargjort” for videre hypertrofi ved øke antallet cellekjerner. Vi kan ikke utelukke at endringene i antallet cellekjerner per muskelfiber er et resultat av at muskelfibrene økte over cellekjernens kapasitet, og kjernedomenet ble for stort. Om det samme gjelder for eldre er noe usikkert, siden eldre ofte har en atrofi av muskelfibrene i utgangspunktet. Et sentral spørsmål blir derfor om atrofi medfører apoptose av cellekjerner for å holde kjernedomenet relativt konstant. Både Petrella et al. (2006) og Verdijk et al. (2007) indikerer at man ikke får en nedgang i antall cellekjerner ved økt alder. Våre resultater viser at kjernedomenet for type II muskelfibrene var mindre enn for type I muskelfibrene. Dette kan komme av at spesielt type II muskelfibrene har atrofiert over tid. Type I muskelfibrene var på størrelse med det som er rapportert hos unge (Verdijk *et*

al., 2007), mens type II muskelfibrene var vesentlig mindre. Samtidig var det ingen stor forskjell mellom antallet kjerner i de ulike muskelfibertypene. Dette kan tyde på at cellekjernene ikke gjennomgår apoptose ved atrofi. Samtidig støttes dette opp av dyreforsøk hvor man heller ikke har sett noen endringer i antallet cellekjerner mellom unge og eldre dyr selv om de eldre dyrene hadde et lavere muskelfiberareal, og dermed et lavere kjernedomene (Gallegly *et al.*, 2004; Leeuwenburgh *et al.*, 2005; Bruusgaard *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2009). Dette indikerer at muskelfiberatrofi med økende alder ikke er et resultat av cellekjerneapoptose. Resultatet fra disse dyreforsøkene kan indikere at teorien om at hypertrofi over 26 % må supplementeres med flere cellekjerner ikke nødvendigvis gjelder for eldre individer, siden eldre har tilstrekkelig med cellekjerner for økt muskelhypertrofi. Det kan likevel tenkes at eldres cellekjerner er i dårligere stand til å kontrollere kjernedomenet enn unge. Videre kan man også tenke seg at en økt forekomst av cellekjerner hos eldre kan medføre at et stort antall satellittceller ikke er nødvendig, siden muskelfibrene allerede har god kapasitet til å øke i størrelse i og med de allerede har tilstrekkelig med cellekjerner.

6.0 Konklusjon

Som forventet økte begge treningsgruppene muskelstyrken etter treningsperioden. Denne økningen kan blant annet forklares med økt tykkelse av m. vastus lateralis. Til tross for at de som trente tradisjonell styrketrening økte prosentvis mer, var det ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for endringene i muskelstyrke og muskeltykkelse. Selv om treningsgruppene økte i styrke og muskeltykkelse fant vi ingen signifikante endringer i muskelfiberarealet hos noen av treningsgruppene. Tradisjonell styrketrening viste imidlertid en tendens til økning med 21 % i det totale muskelfiberarealet, hvor den største økningen skjedde i type II muskelfibrene med 34 %. Dette forsterkes av fiberfordelingskurvene som viser en høyreforsyning etter treningsperioden. En av forklaringene til at vi ikke fant noen signifikante endringer i muskelfiberarealet kan skyldes få deltagere.

I og med at gruppen som trente funksjonell styrketrening ikke økte i muskelfiberarealet var det noe overraskende at vi fant en økning i antall cellekjerne per muskelfiber hos gruppen som trente funksjonell styrketrening. Tradisjonell styrketrening viste ingen signifikante endringer i antallet satellittceller (per muskelfiber og per cellekjerne), mens gruppen som trente funksjonell styrketrening viste en signifikant reduksjon i antall satellittceller per cellekjerne som følge av økningen i antall cellekjerne. Vi har foreløpig ingen gode forklaringen på hvorfor antallet cellekjerne endres forskjellig i de to treningsgruppene og det kan ikke utelukkes at dette funnet er utslag av tilfeldigheter i vårt lille utvalg.

På grunn av det lave antallet forsøkspersoner inkludert i disse analysene blir den statistiske styrken lav og vi må være forsiktig med å trekke en endelig konklusjon. Ved å inkludere flere deltagere til analysene vil vi øke den statistiske styrken og antageligvis få flere signifikante forskjeller på de ulike parameterne. Vi må også huske at funnene i vår studie gjort med biopsier har metodiske svakheter ved seg; blant annet fordi det er vanskelig å forutsi hvor representative biopsiene er for muskelgruppen vi undersøker.

7.0 Referanseliste

Adams GR & Haddad F (1996). The relationships among IGF-1, DNA content, and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* **81**, 2509-2516.

Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G, & Smith CA (2002). Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C66-C76.

Andersen JL (2003). Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand J Med Sci Sports* **13**, 40-47.

Andersen V. Effekten av tre ulike treningsregimer på muskelmasse, muskelstyrke og fysisk funksjon, blant eldre. 2009, Masteroppgave Norges idrettshøgskole, Oslo

Anderson JE (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* **11**, 1859-1874.

Aniansson A, Grimby G, & Hedberg M (1992). Compensatory muscle fiber hypertrophy in elderly men. *J Appl Physiol* **73**, 812-816.

Bamman MM, Ragan RC, Kim JS, Cross JM, Hill VJ, Tuggle SC, & Allman RM (2004). Myogenic protein expression before and after resistance loading in 26- and 64-yr-old men and women. *J Appl Physiol* **97**, 1329-1337.

Benbassat CA, Maki KC, & Unterman TG (1997). Circulating levels of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and -3 in aging men: relationships to insulin, glucose, IGF, and dehydroepiandrosterone sulfate levels and anthropometric measures. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1484-1491.

Brooks NE, Schuenke MD, & Hikida RS (2009). Ageing influences myonuclear domain size differently in fast and slow skeletal muscle of rats. *Acta Physiol (Oxf)*.

Brunner F, Schmid A, Sheikhzadeh A, Nordin M, Yoon J, & Frankel V (2007). Effects of aging on Type II muscle fibers: a systematic review of the literature. *J Aging Phys Act* **15**, 336-348.

Bruusgaard JC, Liestol K, & Gundersen K (2006). Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *J Appl Physiol* **100**, 2024-2030.

Charifi N, Kadi F, Feasson L, & Denis C (2003). Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve* **28**, 87-92.

Cornelison DD & Wold BJ (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* **191**, 270-283.

Covault J & Sanes JR (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J Cell Biol* **102**, 716-730.

Cramer RM, Langberg H, Magnusson P, Jensen CH, Schroder HD, Olesen JL, Suetta C, Teisner B, & Kjaer M (2004). Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *J Physiol* **558**, 333-340.

D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B, & Bottinelli R (2003). The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* **552**, 499-511.

Dennis RA, Przybyla B, Gurley C, Kortebein PM, Simpson P, Sullivan DH, & Peterson CA (2008). Aging alters gene expression of growth and remodeling factors in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Physiol Genomics* **32**, 393-400.

Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, & Wiswell RA (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve* **33**, 242-253.

Edstrom E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramirez-Leon V, & Ulfhake B (2007). Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol Behav* **92**, 129-135.

Fayet G, Rouche A, Hogrel JY, Tome FM, & Fardeau M (2001). Age-related morphological changes of the deltoid muscle from 50 to 79 years of age. *Acta Neuropathol* **101**, 358-366.

Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Gilkison C, Jiang J, Achacosa A, Lieberman SA, Tipton K, Wolfe RR, & Urban RJ (2002). Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E601-E607.

Ferri A, Scaglioni G, Pousson M, Capodaglio P, Van HJ, & Narici MV (2003). Strength and power changes of the human plantar flexors and knee extensors in response to resistance training in old age. *Acta Physiol Scand* **177**, 69-78.

Folland JP & Williams AG (2007). The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Med* **37**, 145-168.

Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, Fiatarone MA, Evans WJ, & Roubenoff R (2000). Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol* **88**, 1321-1326.

Frontera WR, Hughes VA, Krivickas LS, Kim SK, Foldvari M, & Roubenoff R (2003). Strength training in older women: early and late changes in whole muscle and single cells. *Muscle Nerve* **28**, 601-608.

Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG, & Evans WJ (1988). Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol* **64**, 1038-1044.

Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, & Dupont-Versteegden EE (2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. *J Appl Physiol* **97**, 1082-1090.

Giannoulis MG, Sonksen PH, Umpleby M, Breen L, Pentecost C, Whyte M, McMillan CV, Bradley C, & Martin FC (2006). The effects of growth hormone and/or testosterone in healthy elderly men: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 477-484.

Gibson MC & Schultz E (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve* **6**, 574-580.

Greiwe JS, Cheng B, Rubin DC, Yarasheski KE, & Semenkovich CF (2001). Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J* **15**, 475-482.

Grounds MD (1998). Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 78-91.

Häkkinen K, Kallinen M, Izquierdo M, Jokelainen K, Lassila H, Malkia E, Kraemer WJ, Newton RU, & Alen M (1998a). Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. *J Appl Physiol* **84**, 1341-1349.

Häkkinen K, Newton RU, Gordon SE, McCormick M, Volek JS, Nindl BC, Gotshalk LA, Campbell WW, Evans WJ, Hakkinen A, Humphries BJ, & Kraemer WJ (1998b). Changes in muscle morphology, electromyographic activity, and force production characteristics during progressive strength training in young and older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53**, B415-B423.

Häkkinen K, Pakarinen A, Kraemer WJ, Hakkinen A, Valkeinen H, & Alen M (2001). Selective muscle hypertrophy, changes in EMG and force, and serum hormones during strength training in older women. *J Appl Physiol* **91**, 569-580.

Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, & Harridge SD (2003). Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J Physiol* **547**, 247-254.

Harridge SD, Kryger A, & Stensgaard A (1999). Knee extensor strength, activation, and size in very elderly people following strength training. *Muscle Nerve* **22**, 831-839.

Hawke TJ (2005). Muscle stem cells and exercise training. *Exerc Sport Sci Rev* **33**, 63-68.

Hawke TJ & Garry DJ (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* **91**, 534-551.

Herbert J (1995). The age of dehydroepiandrosterone. *Lancet* **345**, 1193-1194.

Hikida RS, Staron RS, Hagerman FC, Walsh S, Kaiser E, Shell S, & Hervey S (2000). Effects of high-intensity resistance training on untrained older men. II. Muscle fiber characteristics and nucleo-cytoplasmic relationships. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, B347-B354.

Hikida RS, Walsh S, Barylski N, Campos G, Hagerman FC, & Staron RS. Is Hypertrophy Limited in Elderly Muscle Fibers? A Comparison of Elderly and Young Strength-Trained Men. 419-427. 1998.

Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, Pollanen E, Hakkinen K, Alen M, Selanne H, Kovanen V, & Mero AA (2007). Postexercise myostatin and activin IIB mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 289-297.

Hunter GR, McCarthy JP, & Bamman MM (2004). Effects of resistance training on older adults. *Sports Med* **34**, 329-348.

Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, & Kenny AM (2002). Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, M772-M777.

Kadi F, Charifi N, Denis C, & Lexell J (2004a). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* **29**, 120-127.

Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J, Andersen JL, Schjerling P, Olsen S, & Kjaer M (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch* **451**, 319-327.

Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, & Andersen JL (2004b). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* **558**, 1005-1012.

Khosla S, Melton LJ, III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, & Riggs BL (1998). Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2266-2274.

Kim JS, Kosek DJ, Petrella JK, Cross JM, & Bamman MM (2005). Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. *J Appl Physiol* **99**, 2149-2158.

Klein CS, Marsh GD, Petrella RJ, & Rice CL (2003). Muscle fiber number in the biceps brachii muscle of young and old men. *Muscle Nerve* **28**, 62-68.

Kryger AI & Andersen JL (2007). Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scand J Med Sci Sports* **17**, 422-430.

Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M, & Rudnicki MA (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* **172**, 103-113.

Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, & Dupont-Versteegden EE (2005). Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**, R1288-R1296.

Lexell J, Downham D, & Sjoström M (1986). Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. *J Neurol Sci* **72**, 211-222.

Lexell J, Henriksson-Larsen K, & Sjoström M (1983). Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. 2. A study of cross-sections of whole m. vastus lateralis. *Acta Physiol Scand* **117**, 115-122.

Lexell J & Taylor CC (1991). Variability in muscle fibre areas in whole human quadriceps muscle: effects of increasing age. *J Anat* **174**, 239-249.

Lexell J, Taylor CC, & Sjoström M (1988). What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* **84**, 275-294.

Loland NW (2004). Exercise, health, and aging. *J Aging Phys Act* **12**, 170-184.

Machida S & Booth FW (2004). Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proc Nutr Soc* **63**, 337-340.

Mackey AL, Esmarck B, Kadi F, Koskinen SO, Kongsgaard M, Sylvestersen A, Hansen JJ, Larsen G, & Kjaer M (2007). Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. *Scand J Med Sci Sports* **17**, 34-42.

Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493-495.

McCartney N, Hicks AL, Martin J, & Webber CE (1996). A longitudinal trial of weight training in the elderly: continued improvements in year 2. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **51**, B425-B433.

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, & Kambadur R (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* **162**, 1135-1147.

McPherron AC, Lawler AM, & Lee SJ (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.

Moore SE & Walsh FS (1985). Specific regulation of N-CAM/D2-CAM cell adhesion molecule during skeletal muscle development. *EMBO J* **4**, 623-630.

Morley JE, Kaiser F, Raum WJ, Perry HM, III, Flood JF, Jensen J, Silver AJ, & Roberts E (1997). Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7537-7542.

Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, Vittone JL, Klee GG, Basu A, Basu R, Cobelli C, Toffolo G, Dalla MC, Tindall DJ, Melton LJ, III, Smith GE, Khosla S, & Jensen MD (2006). DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N Engl J Med* **355**, 1647-1659.

Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varricchio M, & D'Onofrio F (1998). Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* **275**, E294-E299.

Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, & Bamman MM (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E937-E946.

Petrella JK, Kim JS, Mayhew DL, Cross JM, & Bamman MM (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol* **104**, 1736-1742.

Porter MM, Vandervoort AA, & Lexell J (1995). Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scand J Med Sci Sports* **5**, 129-142.

Raastad T (2005). *Fysiologisk adaptasjon til styrketrening* Norges idrettshøgskole, Oslo.

Rantanen T, Guralnik JM, Foley D, Masaki K, Leveille S, Curb JD, & White L (1999). Midlife hand grip strength as a predictor of old age disability. *JAMA* **281**, 558-560.

Rantanen T, Harris T, Leveille SG, Visser M, Foley D, Masaki K, & Guralnik JM (2000). Muscle strength and body mass index as long-term predictors of mortality in initially healthy men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, M168-M173.

Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, & Trappe S (2006). Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J Appl Physiol* **101**, 53-59.

Renault V, Piron-Hamelin G, Forestier C, DiDonna S, Decary S, Hentati F, Saillant G, Butler-Browne GS, & Mouly V (2000). Skeletal muscle regeneration and the mitotic clock. *Exp Gerontol* **35**, 711-719.

Renault V, Rolland E, Thornell LE, Mouly V, & Butler-Browne G (2002a). Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging. *Exp Gerontol* **37**, 1513-1514.

Renault V, Thornell LE, Eriksson PO, Butler-Browne G, & Mouly V (2002b). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* **1**, 132-139.

Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Metter EJ, Hurley BF, & Rogers MA (2000). Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat Rec* **260**, 351-358.

Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Tracy BL, Metter EJ, Hurley BF, & Rogers MA (2001). Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men and women after heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, B240-B247.

Roubenoff R & Hughes VA (2000). Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, M716-M724.

Ruiz JR, Sui X, Lobelo F, Morrow JR, Jr., Jackson AW, Sjostrom M, & Blair SN (2008). Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ* **337**, a439.

Ryall JG, Schertzer JD, & Lynch GS (2008). Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology* **9**, 213-228.

Sadeh M (1988). Effects of aging on skeletal muscle regeneration. *J Neurol Sci* **87**, 67-74.

Sajko S, Kubinova L, Cvetko E, Kreft M, Wernig A, & Erzen I (2004). Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J Histochem Cytochem* **52**, 179-185.

Sasaki H, Kasagi F, Yamada M, & Fujita S (2007). Grip strength predicts cause-specific mortality in middle-aged and elderly persons. *Am J Med* **120**, 337-342.

Sayer AA, Syddall H, Martin H, Patel H, Baylis D, & Cooper C (2008). The developmental origins of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* **12**, 427-432.

Schultz E & Lipton BH (1982). Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev* **20**, 377-383.

Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, & Rudnicki MA (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-786.

Shortreed K, Johnston A, & Hawke TJ. Satellite Cells and Muscle Repair. I: Tiidus, P. M. (Red.), *Skeletal Muscle Damage and Repair*. 2008. Human Kinetics.

Sipilä S, Elorinne M, Alen M, Suominen H, & Kovanen V (1997). Effects of strength and endurance training on muscle fibre characteristics in elderly women. *Clin Physiol* **17**, 459-474.

Smerdu V & Soukup T (2008). Demonstration of myosin heavy chain isoforms in rat and humans: the specificity of seven available monoclonal antibodies used in immunohistochemical and immunoblotting methods. *Eur J Histochem* **52**, 179-190.

Snow MH (1977). The effects of aging on satellite cells in skeletal muscles of mice and rats. *Cell Tissue Res* **185**, 399-408.

SSB. Eldrebølgen slår lenger inn over Europa enn Norge. Statistisk sentralbyrå . 2003.
Ref Type: Electronic Citation

Suetta C, Aagaard P, Rosted A, Jakobsen AK, Duus B, Kjaer M, & Magnusson SP (2004). Training-induced changes in muscle CSA, muscle strength, EMG, and rate of force development in elderly subjects after long-term unilateral disuse. *J Appl Physiol* **97**, 1954-1961.

Suetta C, Andersen JL, Dalgas U, Berget J, Koskinen S, Aagaard P, Magnusson SP, & Kjaer M (2008). Resistance training induces qualitative changes in muscle morphology, muscle architecture, and muscle function in elderly postoperative patients. *J Appl Physiol* **105**, 180-186.

Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, & Allen RE (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* **194**, 114-128.

Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, & Allen RE (2002). Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* **13**, 2909-2918.

Velloso CP (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* **154**, 557-568.

Verdijk LB, Gleeson BG, Jonkers RA, Meijer K, Savelberg HH, Dendale P, & van Loon LJ (2009). Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**, 332-339.

Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, & van Loon LJ (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E151-E157.

Verney J, Kadi F, Charifi N, Feasson L, Saafi MA, Castells J, Piehl-Aulin K, & Denis C (2008). Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve* **38**, 1147-1154.

Viguie CA, Lu DX, Huang SK, Rengen H, & Carlson BM (1997). Quantitative study of the effects of long-term denervation on the extensor digitorum longus muscle of the rat. *Anat Rec* **248**, 346-354.

Welle S, Bhatt K, Shah B, & Thornton C (2002). Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp Gerontol* **37**, 833-839.

Welle S, Totterman S, & Thornton C (1996). Effect of age on muscle hypertrophy induced by resistance training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **51**, M270-M275.

Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, & Anderson JE (2005). Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve* **31**, 283-300.

VIP og DAB merking: Protokoll

- 1) Snittene tas ut av fryser for å tines og tørkes i 30 minutter ved romtemperatur.
- 2) Merk av snittene med lipidpenn.
- 3) 1 % BSA tilføres snittene i 30 minutter ved romtemperatur.
- 4) Primær antistoffet inkuberes over natt ved +4 °C.
- 5) Snittene vaskes i 10 minutter i TBS-t.
- 6) Snittene inkuberes med sekundær antistoff (biotinyl) i 30 minutter ved romtemperatur.
- 7) Snittene vaskes i 10 minutter i TBS-t.
- 8) Snittet inkuberes med ABC-reagent (VECTASTAIN ELITE, Vector Laboratories, USA) i 30 minutter ved romtemperatur.
- 9) Snittene vaskes i 10 minutter i TBS-t.

VIP-kit:

- 10) Snittene inkuberes med VIP-substrate (VECTOR VIP, Vector Laboratories, USA) i maks 15 minutter ved romtemperatur.
- 11) Snittene vaskes i 10 minutter i TBS-t.
- 12) Snittene inkuberes i methyl green i maks 5 minutter.
- 13) Overflødig methyl green blir vasket vekk i dH₂O.
- 14) Snittene senkes i xylene i maks 1 minutt.
- 15) Snittene monteres med pertex og dekkglass.
- 16) Glassene tørkes til monteringsmediet har tørket.

DAB:

- 10) Snittene inkuberes med DAB-substrate i maks 5 minutter ved romtemperatur.
- 11) Snittene vaskes i 10 minutter i TBS-t.
- 12) Snittene inkuberes i haematoxylin i maks 10 sekunder.
- 13) Overflødig haematoxylin vaskes vekk med dH₂O.
- 14) Snittene senkes i xylene/metanol i maks 2 minutt:
 - a. 70 % etanol i maks 2 minutter
 - b. 95 % etanol i maks 2 minutter
 - c. xylene i maks 2 minutter
- 15) Snittene monteres med pertex og dekkglass.
- 16) Glassene tørkes til monteringsmediet har tørket.

Immunofluorescence

- 1) Snittene tas ut av fryser for å tines og tørkes i 30 minutter ved romtemperatur.
- 2) Merk av snittene med lipidpenn.
- 3) 1 % BSA tilføres snittene i 30 minutter ved romtemperatur.
- 4) Snittene inkuberes i primær antistoffet:
 - i. NCAM: over natt ved +4 °C
 - ii. Dystrofin og SC71: 2 – 4 timer ved romtemperatur
- 5) Snittene vaskes i 10 minutter i PBS-t.
- 6) Snittene inkuberes i sekundær antistoff i 30 minutter lysfritt og ved romtemperatur.
- 7) Snittene vaskes i 10 minutter i PBS-t lysfritt.
- 8) Glassene monteres med dekkglass og monteringsmedium (med DAPI).

