

**Amund Tjellaug Løvstad**

**Effekten av to blokker med høyfrekvent styrketrening med redusert blodstrøm på økning i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal**

Er satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealresponsen opprettholdt i andre blokk når den adskilles fra første blokk med 10 dager hvile?

**Masteroppgave i idrettsvitenskap**

Seksjon for fysisk prestasjonsevne  
Norges idrettshøgskole, 2014



## Sammendrag

**Innledning:** Det er vist at høyfrekvent styrketrening med redusert blodstrøm og lav motstand kan resultere i stor satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealøkning på kort tid. Satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealresponsen er imidlertid rapportert å stagnere allerede etter én uke med trening, og det kan spekuleres i om en hvileperiode kan gjenopprette sensitiviteten i systemet. Målet med denne studien var derfor å undersøke om satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealresponsen kunne opprettholdes ved å legge inn en 10 dagers hvileperiode mellom to blokker med høyfrekvent styrketrening med redusert blodstrøm på lav motstand.

**Metode:** Ti forsøkspersoner gjennomførte 14 økter med styrketrening med redusert blodstrøm med lav motstand fordelt på to blokker á syv økter på fem dager, adskilt av en 10-dagers hvileperiode. Treningsprotokollen bestod av fire serier til utmattelse i kneekstensjon med en motstand på 20 % av 1 repetisjon maksimum (1 RM) (30 sekunder mellom hvert sett). Reduksjon i blodstrøm ble induisert med en 13,5 cm bred trykkmansjett (100 mmHg for menn, 90 mmHg for kvinner). Muskelbiopsier ble tatt fra *m. vastus lateralis* (VL) før, fire ganger underveis og to ganger etter intervensjonen. Muskelvevet ble kutte i åtte  $\mu\text{m}$  tykke snitt og merket mot satellittceller (NCAM + laminin og Pax7 + laminin) muskelcellekjerner (DAPI) og fibertype (SC71 + dystrofin). Fluorescens mikroskop ble brukt til å kvantifisere satellittcellene og muskelcellekjerner. Muskelstyrke i kneekstensjon ble testet som 1 RM og maksimalt isokinetisk dreiemoment (moment ved 60 g/s). Muskeltykkelse- og tverrsnittareal av lårmuskulatur ble målt med henholdsvis ultralyd (UL) og Magnetresonanstomografi (MR).

**Resultater:** I type I og II fibre økte satellittcelleantallet signifikant etter første treningsuke (henholdsvis  $115 \pm 101$  % og  $132 \pm 168$  %) og økte videre for type II etter andre uke ( $228 \pm 174$  %, fra baseline), mens satellittcelleantallet i type I fibre stagnerte ( $115 \pm 95$  %, fra baseline). Ingen signifikante endringer ble funnet for antall muskelcellekjerner i type I eller II fibre etter første treningsuke, men etter siste treningsuke tenderte kjerneantallet å øke i både type I og II fibre ( $28 \pm 29$  % og  $28 \pm 31$  %,  $p=0,10$  og  $p=0,13$ ). Muskelfiberareal av type I og II fibre var uendret etter første treningsuke, men viste en signifikant økning fra hvileperioden til etter andre treningsuke

på  $25 \pm 23$  % for type I fibre og  $32 \pm 27$  % for type II fibre. Muskeltverrsnittareal av *m. quadriceps* endret seg ikke i løpet av intervensjonen, men muskeltykkelse av VL økte signifikant etter først ( $3,3 \pm 2,1$  %) og andre treningsblokk ( $5,7 \pm 2,5$  %).

Muskelstyrke i kneekstensjon ble ikke signifikant endret gjennom intervensjonen.

**Diskusjon:** Noe overraskende fant vi kun økning i antall satellittceller etter første treningsuke. Til tross for hvileperioden på 10 dager var det ingen videre økning i antall satellittceller i type I fibre i andre treningsuke, men de andre variablene viste en økning. Da responsen på den første treningsblokken ble mindre enn forventet er det vanskelig å bedømme betydningen av hvileperioden på endringer i andre treningsblokk. Ingen signifikant økning i tverrsnittsareal av *m. quadriceps* eller i muskelstyrke kan tyde på at treningsbelastningen ble for stor med denne protokollen.

**Nøkkelord:** Styrketrening med redusert blodtilførsel, satellittceller, muskelcellekjerner, muskelfiberareal, muskeltykkelse, muskeltverrsnittareal og muskelstyrke.

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag .....</b>	<b>3</b>
<b>Forord.....</b>	<b>8</b>
<b>Forkortelser .....</b>	<b>10</b>
<b>1. Innledning.....</b>	<b>12</b>
1.1 <b>Problemstilling .....</b>	<b>14</b>
1.1.1 <b>Hypotese.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Teori .....</b>	<b>15</b>
2.1 <b>Okklusjonstrening.....</b>	<b>16</b>
2.1.1 <b>Fysiologien bak okklusjonstrening .....</b>	<b>17</b>
2.2 <b>Styrkeøkning etter SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening .....</b>	<b>20</b>
2.3 <b>Muskelvekst etter SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening .....</b>	<b>25</b>
2.4 <b>Satellittceller.....</b>	<b>30</b>
2.4.1 <b>Identifisering av satellittceller .....</b>	<b>31</b>
2.4.2 <b>Molekylære mekanismer involvert i satellittcelleaktivering.....</b>	<b>33</b>
2.4.3 <b>Molekylære mekanismer ved SRB med lav motstand som kan føre til satellittcelleaktivering .....</b>	<b>39</b>
2.5 <b>Muskelcellekjerner.....</b>	<b>41</b>
2.5.1 <b>Identifisering av muskelcellekjerner .....</b>	<b>41</b>
2.6 <b>Satellittcellens og muskelcellekjernes rolle ved hypertrofi .....</b>	<b>42</b>
2.7 <b>Effekten av trening på satellittceller og muskelcellekjerner.....</b>	<b>45</b>
2.7.1 <b>Effekten av SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening på antall satellittceller.....</b>	<b>45</b>
2.7.2 <b>Effekten av SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening på antall muskelcellekjerner .....</b>	<b>49</b>
2.8 <b>Oppsummering.....</b>	<b>52</b>

<b>3.</b>	<b>Metode .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Studiedesign .....</b>	<b>53</b>
3.1.1	Utvalg.....	53
3.1.2	Rekruttering av forsøkspersoner .....	54
<b>3.2</b>	<b>Treningsprotokoll.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3</b>	<b>Styrketester .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Maksimal isokinetisk og isometrisk kneekstensjon .....	56
3.3.2	1 repetisjon maksimum (1RM) kneekstensjon.....	57
<b>3.4</b>	<b>Magnetresonans .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5</b>	<b>Ultralyd .....</b>	<b>58</b>
<b>3.6</b>	<b>Måling på muskelfibernivå .....</b>	<b>59</b>
3.6.1	Muskelbiopsier.....	59
3.6.2	Snitting av muskelbiopsier .....	59
3.6.3	Immunhistokjemi .....	60
3.6.4	Mikroskopi .....	62
<b>3.7</b>	<b>Statistikk.....</b>	<b>70</b>
<b>4.</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Muskelstyrke.....</b>	<b>72</b>
4.1.1	1RM og MVC .....	72
<b>4.2</b>	<b>Muskelstørrelse på m. Vastus lateralis .....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Muskeltverrsnittareal .....	73
4.2.2	Muskeltykkelse .....	73
<b>4.3</b>	<b>Muskelfiberareal .....</b>	<b>74</b>
4.3.1	Frekvensdiagram: Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ ).....	75
<b>4.4</b>	<b>Satellittceller.....</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Muskelcellekjerner og muskelfiberareal per muskelcellekjerne .....</b>	<b>78</b>
4.5.1	Pax7 positive celler per cellekjerne .....	80
<b>4.6</b>	<b>Korrelasjoner .....</b>	<b>81</b>
4.6.1	Sammenheng mellom muskelfiberareal og muskelcellekjerner .....	81
4.6.2	Sammenheng mellom muskelfiberareal og satellittceller .....	81

<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>82</b>
<b>5.1 Endringer i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal.....</b>	<b>82</b>
5.1.1 Første treningsblokk.....	82
5.1.2 Andre treningsblokk.....	86
5.1.3 Satellittcellemarkører; Pax7 versus NCAM .....	90
<b>5.2 Endringer i muskelvekst .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3 Endringer i muskelstyrke .....</b>	<b>93</b>
<b>5.4 Metodekritikk .....</b>	<b>95</b>
<b>6. Konklusjon .....</b>	<b>97</b>
<b>Referanser .....</b>	<b>98</b>
<b>Figuroversikt .....</b>	<b>116</b>
<b>Tabelloversikt.....</b>	<b>119</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>120</b>
<b>Vedlegg 1: Informasjonsskriv.....</b>	<b>120</b>
<b>Vedlegg 2: Merkeprotokoller for immunhistokjemi .....</b>	<b>126</b>
Merkeprotokoll 1: Pax7 + Laminin.....	126
Merkeprotokoll 2: NCAM + Laminin.....	128
Merkeprotokoll 3: SC71 + Dystrofin .....	130

## Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Norges idrettshøgskole og var en del større prosjekt: «Okklusjon 3». Jeg vil benytte anledningen til å takke alle de som har vært til hjelp og støtte under arbeidet med masteroppgaven:

Først og fremst en stor takk til Truls Raastad og Gøran Paulsen for grundig veiledning, for oppfølgingen og interessen dere viser gjennom hele prosessen. Med dine travle dager på olympiatoppen Gøran, så har du alltid vært tilgjengelig om det var noe jeg lurte på. Hos Truls føler man seg alltid velkommen, selv med mine uanmeldte besøk fikk jeg alltid utfyllende og gode svar på det jeg lurte på.

Tusen takk til Mathias Wernbom for din ide som startet hele prosjektet, all kunnskap og litteratur du har delt. Din hjelp og støtte i prosjektet har vært uvurderlig!

Stor takk til Torstein Dalen og Thomas Bjørnsen for et godt samarbeid i prosjektet og alle gode faglige og ikke faglige diskusjoner vi har hatt underveis.

Stor takk til Ingrid Ugelstad for god labopplæring, biopsibehandling og gode svar på håpløse spørsmål.

Takk til Hege Nymo Østgaard for behandling av blodprøver og biopsier.

Takk til Håvard Wiig, Kristoffer Toldnes Cumming og Tormod Skogstad Nilsen for at dere lærte meg å snitte muskelvev, mikroskopere, artikkelutskrivning og gode innspill underveis!

Takk til Ingrid Egner for gode innspill underveis, deling av kunnskap og at du tok deg tid til å rette og lese igjennom masteroppgaven min.

Takk til Anne Lene for gode innspill underveis og at du tok deg tid å lese igjennom masteroppgaven min i en hektisk periode!



Takk til resten av masterstudentene på SFP, for deling av kontor og et sosialt miljø som har vært viktig i en hverdag preget med mye jobbing og alvor.

Stor takk til mamma og pappa for all støtte underveis i hele prosessen. Dere betyr veldig mye og har vært viktige støttespillere.

Sist men ikke minst; en stor takk til alle forsøkspersoner som stilte sine lån til disposisjon for oss. Deres samarbeidsvilje og innsats underveis i hele prosjektet har vært uvurderlig! Uten dere hadde det ikke blitt noe prosjekt eller masteroppgave på meg.

Amund Tjellaug Løvstad

Oslo 2014

## Forkortelser

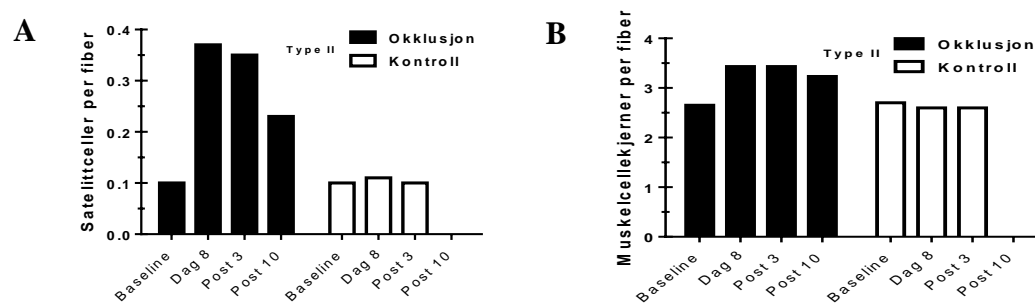
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalsium
<b>CaM</b>	Calmodulin
<b>CDK1</b>	Cyclin-dependent kinase 1
<b>CDK2</b>	Cyclin-dependent kinase 2
<b>CSA</b>	Muskeltverrsnittareal ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole (DNA-markør)
<b>DOMS</b>	Delayed Onset Muscle Soreness
<b>ECM</b>	Ekstra cellulær matrix
<b>EMG</b>	Electromyography
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>GH</b>	Vekstfaktor (Growth hormone)
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
<b>HSPs</b>	Heat shock proteins
<b>IGF-1</b>	Insulin like growth factor 1
<b>IHC</b>	Immunhistokjemi
<b>IL4</b>	Interleukin 4
<b>IL6</b>	Interleukin 6
<b>JNKs</b>	c-jun N-terminal kinases
<b>MAPKs</b>	Mitogen aktiverede proteinkinaser
<b>MGF</b>	Mechano growth factor
<b>MK</b>	Muskelcellekjerner
<b>MMPs</b>	Matrix metalloproteinaser
<b>MR</b>	Magnetresonanstomografi
<b>MRFs</b>	Myogenetiske reguleringsfaktorer
<b>MRF4</b>	Myogenic regulatory factors4
<b>mRNA</b>	Messenger RNA (RNA = ribonukleinsyre)
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin

<b>MVC</b>	Maksimal voluntær kraft
<b>MyoD</b>	Myogenic differentiation 1
<b>Myf5</b>	Myogenic factor 5
<b>NCAM</b>	Neural cell adhesion molecule, også kjent som CD56 og Leu-19
<b>NO</b>	Nitrogenoksid
<b>NOS</b>	Nitrogenoksid synthase
<b>Pax7</b>	Paired box protein
<b>P38MAPKs</b>	p38 mitogen aktiverte proteinkinaser
<b>PG</b>	Proteoglykaner
<b>REDD</b>	Regulated in development and DNA damage responses
<b>SC</b>	Satellittceller
<b>SRB</b>	Styrketrening med redusert blodstrøm
<b>Srf</b>	Serumresponse faktor
<b>UL</b>	Ultralyd
<b>1 RM</b>	1 Repetisjon maksimum

## 1. Innledning

Styrketrening med redusert blodstrøm (SRB) også populært kaldt okklusjonstrening har det siste tiåret blitt en populær treningsmetode. I en nylig studie observerte Nielsen et al. (2012) at SRB med lett motstand (20 % av 1RM) resulterte i en kraftig økning i antall satellittceller (~150 %) og muskelcellekjerner (~30 %). Disse tallene er i størrelsesorden med hva man har sett etter lengre periode med styrketrening (10-16 uker) (Kadi & Thornell, 2000; Petrella, Kim, Cross, Kosek, & Bamman, 2006). Det ble også sett en kraftig muskelvekst der muskelfiberarealet økte med 30-40 %, etter kun fem dager med trening (7 økter). Observasjonene til Nielsen et al. (2012) føyer seg inn i rekkene med tidligere studier som har vist at styrketrening av overarms- og knestrekermuskulaturen med redusert blodstrøm gir tilsvarende eller kraftigere muskelvekst enn tradisjonell styrketrening (Loenneke, Wilson, Marín, Zourdos, & Bemben, 2012b; Wernbom, Augustsson, & Raastad, 2008).

I studien til Nielsen et al. (2012) ble det gjennomført tre sammenhengende treningsuker med 7 til 9 treningsøkter i uken, på fem dager. Interessant er det at satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealøkningen kom allerede etter første treningsuke for deretter å flate av (figur 1,1). Økningene var fortsatt signifikante 10 dager etter intervensjonen, som indikerer at denne treningsmetoden kan gi en permanent økning for de nevnte variablene. Den høye treningsfrekvensen uten hvileperiode kan ha bidratt til at treningseffekten stagnerer etter første treningsuke. Stagnasjonen kan komme av at systemet blir «mettet» og ikke klarer å ta til seg mer trening. Å gjennomføre høyfrekvent SRB med lav motstand i flere sammenhengende uker, virker derfor ikke optimalt dersom en vedvarende treningseffekt er målet.



**Figur 1.1** Pre; baseline, mid8; etter 1 uke trening, post 3 og 10; 3 og 10 dager etter siste treningsuke. A; Pax 7<sup>+</sup> positive satellittceller per muskelfiber i type II fibre. B; Muskelcellekjerneantall per muskelfiber i type II fibre. Modifisert etter Nielsen et al. (2012).

Å legge inn en hvileperiode mellom to blokker med høyfrekvent SRB kan derfor være interessant i denne sammenheng fordi hvileperioden gir den trente muskulaturen muligheten og hente seg inn igjen, og resultatet kan være at en unngår å stagnere etter først treningsuke. At en hvileperioden kan resette den anabole responsen i muskelfibrene, støttes av Ogasawara, Yasuda, Ishii, & Abe, (2013b), Ogasawara, Yasuda, Sakamaki, Ozaki, & Abe, (2011) og Ogasawara, Kobayashi, et al. (2013a). Etter 18 styrkeøkter observerte Ogasawara et al. (2013a), at den anabole signaliseringen i skjelettmuskelfibrene ble mindre sensitiv. Sensitiviteten var imidlertid tilbake da en ny styrkeøkt ble gjennomført etter 12 dager med hvile. Samme forfatter kan også vise til to studier der det ble vist at hypertrofi skjedde i en tidlig fase av treningen. (Ogasawara et al., 2011, 2013b). De diskuterte derfor at å legge inn en hvileperiode underveis i intervensjonen, kunne føre til at adaptasjonsresponsen i musklene ble resensitivert.

Det finnes ingen studier som har undersøkt om en hvileperiode etter høyfrekvent SRB med lav motstand vil resensitivere adaptasjonsresponsen i muskelfibrene. Dette er et interessant og viktig område og undersøke dersom denne treningsmetoden skal gjennomføres over flere uker, med bakgrunn i resultatene til Nielsen et al. (2012). Gjennom denne studien ønsket vi derfor å undersøke om en hvileperiode på 10 dager, etter høyfrekvent (syv økter på fem dager) SRB med lav motstand kan resensitivere muskelfibrene og gi en ny treningsadaptasjon på gjeldene variabler: satellittceller- og muskelcellekjerneantall, samt muskelfiberareal. I tillegg undersøkes muskeltverrsnittareal og muskeltykkelse målt med MR og UL, samt muskelstyrke målt som 1RM og moment ved 60 g/s (isokinetisk styrke).

## **1.1 Problemstilling**

Hvilken effekt har to uker med høyfrekvent (syv økter på fem dager) SRB med lav motstand, avskilt med en 10 dagers hvileperiode etter første treningsuke på økning i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal.

### **1.1.1 Hypotese**

- Det vil være en økning i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal etter første treningsuke.

*Likt med første del av Nielsen et al. (2012).*

- Ved å legge inn en hvileperiode på 10 dager vil det være en ytterligere økning i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal etter andre treningsuke.

*Dette til forskjell fra Nielsen et al. (2012) der responsen stagnerte etter første treningsuke.*

## 2. Teori

Skjelettmuskulatur har en unik evne til å tilpasse seg de stimuli den utsettes for. Den muligheten muskelfibrene har til å adaptere seg i respons til eksternt stimuli kalles muskel plastisitet (Gundersen, 2011). Fysiologiske egenskaper som utholdenhet og muskelstyrke er eksempler på muskulære egenskaper som er plastiske.

Hovedfokuset i denne oppgaven er plastisiteten rundt muskelfiberareal, satellittcelle- og kjerneantall. I skjelettmuskulaturen er muskelcellekjernerne det øverste styringsorganet og er sammen med translasjonsmaskineriet med å bestemme kapasiteten for proteinsyntesen. Proteinsyntesen kan grovt sett deles opp i transkripsjonsprosessen og translasjonsprosessen. I muskelcellekjernerne kan vi i transkripsjonsprosessen skru av eller på gener som kan bidra til økt syntese av spesifikke muskelproteiner. Hver enkelt muskelcellekjerne kontrollerer produksjonen av mRNA og proteinsyntesen over et begrenset cytoplasmavolum, et konsept kjent som kjernedomene eller DNA-enheten (Cheek, 1985; Hall & Ralston, 1989). For å kunne opprettholde kjernedomene når muskelfiberne vokser, aktiveres satellittceller som deler seg og senere smelter sammen med muskelfibre som vokser.

Videre i dette kapitlet vil jeg gjøre rede for styrkeøkning og muskelvekst etter styrketrening med redusert blodstrøm (SRB) med lav motstand sammenlignet mot tradisjonell tung styrketrening. Satellittceller og muskelcellekjerner beskrives nøye, der satellittcelleaktivering, identifisering av begge celletyper samt hvilken rolle de har i forbindelse med hypertrofi blant annet trekkes frem. Til slutt gjøres det rede for satellittcelle- og muskelkjernerresponsen til SRB og tradisjonell tung styrketrening.

## 2.1 Okklusjonstrening

Effekten av et styrketreningsprogram er i stor grad bestemt av manipulering av ulike variabler som treningsmostand, intensitet, volum, frekvens, type øvelse, rekkefølge, aksjonsform, bevegelseshastighet og lengde på hvileperioder mellom seriene (Bird, Tarpennig, & Marino, 2005). Styrketrening med lav motstand (20-50 % av 1RM) og redusert blodstrøm (SRB) har de siste 10-20 årene blitt en stadig mer populær treningsform. Treningsformen er tatt i bruk til flere ulike formål som for eksempel ved rehabilitering og opptrening (Yasuda et al., 2011b). SRB omfatter bruk av en tourniquet (Shinohara, Kouzaki, Yoshihisa, & Fukunaga, 1998), en oppblåsbar mansjett (Takano et al., 2005) eller elastiske bånd (Loenneke, Kearney, Thrower, Collins, & Pujol, 2010) rundt den proksimale ende av en ekstremitet for å redusere blodtilførselen og stenge den venøse tilbakestrømningen. Dette induserer en lokal hypoksisk tilstand (iskemi) i muskulaturen som trenes (Wernbom, Augustsson, & Raastad, 2008). Den Japanske fysioterapeuten Yoshiako Sato begynte allerede sent på 1960- tallet å eksperimentere med denne treningsmetoden og kalte denne treningsformen for ”Kaatsu training” (”Kaatsu” betyr tillagt press). I ettertid har mange definisjoner blitt benyttet om denne treningsformen som okklusjonstrening, iskemisk styrketrening, styrketrening med vaskulær okklusjon og styrketrening med redusert blodstrøm. I denne oppgaven brukes styrketrening med redusert blodstrøm (SRB).

I den opprinnelige japanske modellen ble det benyttet et mansjett- trykk rundt 200 mmHg (Takarada et al., 2000a; 2000b) selv om nyere funn har demonstrert gunstige resultater med et mansjett- trykk på 50 mmHG (Sumide, Sakuraba, Sawaki, Ohmura, & Tamura, 2009). Imidlertid ble det i den opprinnelige japanske modellen benyttet smale mansjetter (33 mm) sammenlignet mot Sumide et al. (2009) der mansjettbredden var på 150 mm. En rekke faktorer kan påvirke den akutte responsen til SRB med lav motstand, inkludert mansjett- trykket, mansjett plassering, bredde og type, om mansjett- trykket slippes opp i hvilepauser eller ikke, treningsbelastning og volum, samt frekvensen og varigheten på treningsøkta og om treningen gjennomføres til utmattelse eller ikke (Bird et al., 2005; Scott, Slattery, Sculley, & Dascombe, 2014). Dette er alle faktorer som burde tas høyde for når en vurderer effekten av SRB på hypertrofi og styrkeøkning.

Shinohara et al. (1998) gjennomførte den første engelskspråklige studien som demonstrerte at SRB med lav motstand økte muskelstyrken. American Collage of



Sports Medicine (Adams et al., 2009; Kraemer et al., 2002) anbefaler at optimal hypertrofi- og styrkeøkning oppnås gjennom tradisjonell tung styrketrening med en moderat eller høy motstand, tilsvarende >65 % av 1RM gjennomført to til tre ganger i uken, 6-12 repetisjoner. Likevel har flere studier demonstrert en betydelig hypertrofi og styrkeøkning etter 1 til 16 uker med SRB med motstand så lav som 20 % av 1RM (Abe, et al., 2005a, 2005b; Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2012; Madarame et al., 2008; Nielsen et al., 2012; Shinohara, Kouzaki, Yoshihisa, & Fukunaga, 1998; Takarada et al., 2004; 2002; 2000b).

### 2.1.1 Fysiologien bak okklusjonstrening

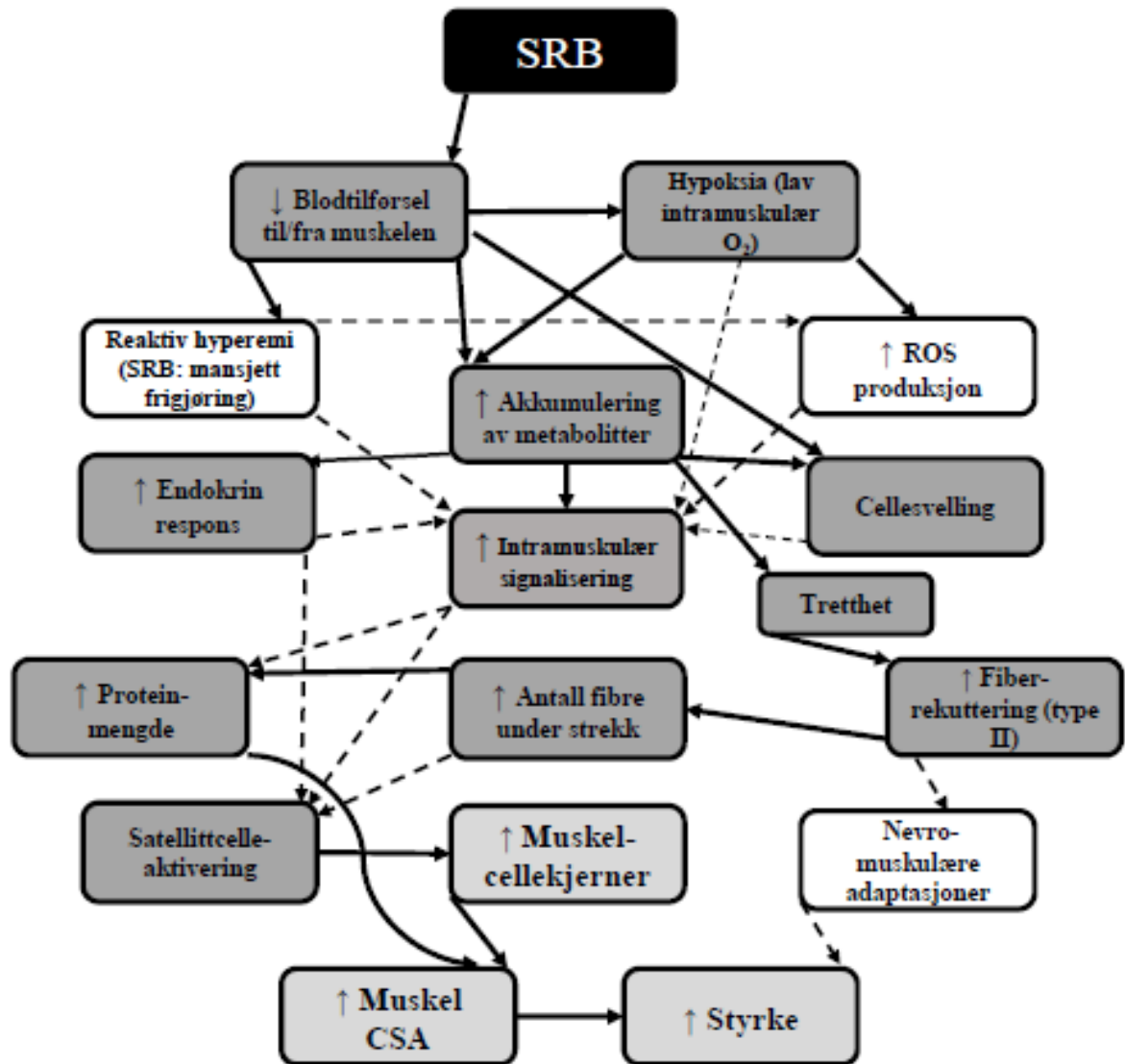
Selv om mekanismene er uklare, er den anabole responsen på SRB med lav motstand antatt å stimuleres av flere mekanismer (figur 2,1). Studier der SRB med lav motstand er gjennomført, har vist at denne treningsformen resulterer i et stort metabolsk stress via markant reduksjon i kreatinfosfat (PCr) (Suga et al., 2009; 2012), økt konsentrasjon av uorganisk fosfat ( $P_i$ ) (Suga et al., 2009; Takada et al., 2012), pH- reduksjon (Suga et al., 2009, 2012) og en økt laktatproduksjon (Fujita et al., 2007; Pierce, Clark, Ploutz-Snyder, & Kanaley, 2006; Reeves et al., 2006; Takano et al., 2005; Takarada et al., 2000a). Oppsummert tyder disse funnene på at den reduserte blodstrømmen til de arbeidene musklene under SRB, øker avhengigheten av anaerob metabolisme (Kawada, 2005) og reduserer laktat fjerning. Det er antydning at den kraftige metabolske responsen som er observert etter SRB, resulterer i en større rekruttering av type II fibre, hormon respons, intramuskulær signalisering og intracellulær svelling, sammenlignet med trening som induserer et større mekanisk stress (Schoenfeld, 2013; Scott et al., 2014).

SRB med lav motstand fremmer en gunstig anabol endokrin respons (oppsummert av Scott et al., 2014), lik tradisjonelle tunge styrketreningsprogrammer designet for å fremme hypertrofi (Kraemer, Kilgore, Kraemer, & Castracane, 1992). Det synes som at veksthormon (GH) er hormonet som i størst grad stimuleres av SRB med lav motstand (Godfrey, Madgwick, & Whyte, 2003). Flere studier har observert en kraftig økning i plasma GH konsentrasjonen etter SRB med lav motstand (Reeves et al., 2006; Takano et al., 2005; Takarada et al., 2000a). Imidlertid er det diskutert i litteraturen i hvor stor grad GH og generelt den systematiske endokrine responsen bidrar til en anabol respons lokalt i muskulaturen (Godfrey et al., 2003; West & Phillips, 2010). Det er foreslått at

den trenings-induserte hypertrofien er mer lokalt forankret og blant annet er avhengig av intramuskulær signalering (West, Burd, Staples, & Phillips, 2010).

Flere studier har demonstrert at SRB med lav motstand kan stimulere til intramuskulær signalering (Fry et al., 2010; Fujita et al., 2007; Gundermann et al., 2014; Wernbom et al., 2013). Regulering av proteinsyntesen via intramuskulære signalveier diskuteres mer i en annen masteroppgave (Dalen, 2014).

En rekke studier har demonstrert cellulær svelling i forbindelse med SRB med lav motstand (Abe et al., 2012; Loenneke, Fahs, Rossow, Abe, & Bemben, 2012a; Schoenfeld, 2013). I litteraturen er det vist at svelling av muskelfibre kan øke proteinsyntesen, redusere proteinnedbrytningen og muligens trigge proliferering av satellittcellen og videre legge til rette for sammensmelting med i den voksende muskelfiberen (Dangott, Schultz, & Mozdziak, 2000; Lang et al., 1998). Flere undersøkelser har rapportert økt grad av muskelaktivering etter SRB, målt som EMG (Moore et al., 2004; Takarada et al., 2000b; Yasuda et al., 2009). Andre studier har derimot ikke observert noen forskjell i muskelaktivering under SRB (Kacin & Strazar, 2011; Wernbom, Jarrebring, Andreasson, & Augustsson, 2009).



**Figur 2.1.** Simplifisert skjematisk fremstilling av det foreslåtte samspillet mellom potensielle mekanismer, som kan meditere den adaptive responsen etter SRB. Sannsynlige mekanismer er representert i de mørkegrå boksene. Mekanismer som det kreves mer forskning på er representert i de hvite boksene. Utfall/ resultat av SRB er representert i de lysegrå boksene. Hele piler indikerer sannsynlig sammenheng mellom foreslåtte mekanismer. Stiplede piler indikerer en mulig sammenheng mellom foreslåtte mekanismer, som krever mer forskning. CSA: tverrsnittsareal, ROS: reaktive oksygenradikaler. SRB: styrketrening med redusert blodstrøm. Modifisert etter Scott et al. (2014).

## **2.2 Styrkeøkning etter SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening**

Shinohara et al. (1998) var den første engelskspråklige studien som rapporterte at SRB med lav motstand resulterte i styrkefremgang. I etterkant er det gjennomført flere studier med denne treningsmetoden som støtter resultatene til Shinohara et al. (1998). I studiene rapporteres en styrkeøkning på mellom 5 til 40 % (gjennomsnitt 19 %) målt som endring i maksimal voluntær kontraksjon (MVC) eller 1RM, etter 12 til 36 økter med en varighet fra 1 til 16 uker (tabell 2,1) (Abe et al., 2005a; 2005b; Burgomaster et al., 2003; Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2012; Madarame et al., 2008; Shinohara et al., 1998; Takarada et al., 2004; 2000b; 2002).

Studier som har sammenlignet styrketrening med eller uten redusert blodstrøm med en lav motstand (<50 % av 1 RM) rapporterer en større styrkeframgang når treningen kombineres med redusert blodstrøm (SRB) (8,9 til 40,1 %, gjennomsnitt = 17,8 %) enn når blodtilførselen er normal (1,3 til 20,7 %, gjennomsnitt = 7,3 %). Dette tilsvarte en styrkeøkning per dag for SRB på mellom 0,16 til 1,6 % (gjennomsnitt; 0,8 %) og for kontroll på mellom 0,06 til 0,63 % (gjennomsnitt; 0,26 %) (Abe et al., 2005a; 2005b; Laurentino et al., 2012; Shinohara et al., 1998; Takarada et al., 2002; 2004). Disse resultatene indikerer at dersom styrketreningen gjennomføres med en lav motstand, så gir en redusert blodstrøm en ekstra styrkeeffekt målt som økning i 1 RM eller MVC. Det virker imidlertid som det kan være en øvre grense hvor høy motstanden kan være for at SRB skal gi noen ekstra styrkefremgang sammenlignet mot om man gjennomfører samme treningen uten redusert blodstrøm (Wernbom et al., 2008). Denne påstanden støttes av Laurentino et al. (2008) og Burgomaster et al. (2003). De kunne ikke observerte noen forskjell i styrkefremgang når styrketreningen ble gjennomført med eller uten redusert blodstrøm på en moderat til høy motstand (50-80 % av 1RM). I en oversiktsartikkel av Wernbom et al. (2008) diskuteres det intramuskulære trykket som bygges opp i muskulaturen når motstanden øker, og dette kan være en mulig årsak til at SRB ikke gir noen ekstra muskelvekst og videre styrkeøkning når motstanden kommer over 50-60 % av 1 RM.

I studier der SRB med lav motstand (<50 % av 1RM) er sammenlignet tradisjonell tung styrketrening (>70 % av 1RM) viser resultatene en like stor styrkefremgang (Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2008; 2012; Takarada et al., 2000). Takarada et al. (2008) observerte en økning i muskelstyrke for gruppen som trente SRB med lav motstand (20 % av 1RM) og tradisjonell tung styrketrening (80 % av 1RM) på 18,4 % (0,16 % per dag) og 22,6 % (0,20 % per dag) i løpet av intervensjonsperioden på 112 dager. Etter å ha benyttet samme motstand på gruppen som trente SRB og tradisjonell tung styrketrening registrerte Laurentino et al. (2012) en økning i muskelstyrke på henholdsvis 40,1 % (0,71 % per dag) og 36,2 % (0,64 % per dag) etter intervensjonsperioden på 56 dager.

I studier der mer ekstreme protokoller er benyttet i kombinasjon med SRB viser resultatene en stor styrkerespons etter kort tid (Abe et al., 2005a; 2005b; Nielsen et al., 2012). I de nevnte studiene som hadde en varighet på mellom 8 og 21 dager og fra 7 til 12 økter i uken, ble det registret en styrkeøkning fra 9,6 % til 16 % i løpet av intervensjonsperioden. Dette tilsvarer en økning per dag på mellom 0,5 % til 1,2 % (gjennomsnitt; 0,8 %). SRB er også vist å kunne være en effektiv treningsmetode under rehabilitering for å øke muskelstyrken hos pasienter som har gjennomført fremre korsbånd kirurgi (Ohta, Kurosawa, Ikeda, Iwase, & Satou, 2003). Alt i alt tyder litteraturen på at SRB med en lav motstand har potensiale til å øke muskelstyrken, på nivå med det som er sett etter tradisjonell tung styrketrening.

**Tabell 2.1** Oversikt over studier som har gjennomført SRB med kontrollgruppe på prosentvis endring styrke. Skrift i kursivformat er kontrollgruppe og/eller bein for de gjeldene studiene, som trente med normal blodtilførsel (uten okklusjon). Modifisert etter Wernbom et al. (2008).

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Økter/u ke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM/ MVC)	Fremgang (%)	Komment ar
Shinohara et al. (1998)	M	5 19-23	Kne-ekstensjon	Utrent	3	28	~ 36	1	40	+26 (MVC) (+0,92 % per dag)	Mansjett- trykk og bredde; 250 mmHg, 80 mm.
			<i>Kne-ekstensjon</i>			3	28	~ 36	1	40	+9 (MVC) (0,32 % per dag)
Takarada et al. (2000)	K	11 58±2	Albu-fleksjon (unilateral)	Utrent	2	112	~ 18	3	53	+18,4 (MVC) (+0,16 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; 110 mmHg, 33 mm.
			<i>Albu-fleksjon (unilateral)</i>			2	112	~ 19	3	76	+2,6 (MVC) (+0,20 % per dag)
	K	8 57±2	<i>Albu-fleksjon (unilateral)</i>	<i>Utrent</i>	2	112	~ 18	3	54	+1,0 (MVC) (+0,009 % per dag)	<i>Kontroll- gruppe.</i>
Takarada et al. (2002)	M	6 25±1	Kne-ekstensjon (bilateral)	Styrke-trente rugby spillere	2	56	~ 16	5	50	+14,3 (MVC) (+0,26 % per dag)	Mansjet- trykk- og bredde; ~ 196 mmHG, 33mm
	<i>M</i>	5 26±1	<i>Kne-ekstensjon (bilateral)</i>	<i>Styrke-trente rugby spillere</i>	2	56	~ 16	5	50	+3,2 (MVC) (+0,06 % per dag)	<i>Kontroll- gruppe med samme motstand</i>
Burgomas ter et al. (2003)	M	8 20±0	Kne-fleksjon (unilateral)	Utente	2	56	~ 5-10	3-6	~50	+23 (IRM) (+0,41 % per dag) +10 (MVC) (+0,17 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; 100 mmHG, 70mm
			<i>Kne-fleksjon (unilateral)</i>			2	56	~ 5-10	3-6	~50	+23 (IRM) (+0,41 % per dag) +0 (MVC)

**1RM: en repetisjon maksimum. MVC: maksimal voluntær (isometrisk) kontraksjon.**

Tabell 2.1 Fortsettelse

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Økter/u ke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM/ MVC)	Fremgang (%)	Komment ar
Takarada et al. (2004)	M	6 21±1	Kne-ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	2	56	16-23	5	16-22	+9,2 (MVC) (+0,16 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; ~ 218 mmHg, 90 mm
	M	6 22±1	Kne-ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	2	56	16-23	5	16-22	+3,1 (MVC) (+0,06 % per dag)	Kontroll- gruppe
Abe et al. (2005b)	M	-	Knebøy (maskin)	Trente	16	8	15	3	20	+9,6 (1RM) (+0,68 % per dag)	Mansjett- trykk økte fra ~ 160 til 240 mmHg
	M	-	Knebøy (maskin)	Trente	16	8	15	3	20	+4,8 (1RM) (+0,34 % per dag)	Kontroll- gruppe
Abe et al. (2005a)	M	9 24±8	Knebøy (maskin)	Fysisk aktive	12	14	15	3	20	+16,8 (1RM) (+1,2 % per dag)	Mansjett- trykk økte fra ~ 160 til 240 mmHg
			Kne-fleksjon	Fysisk aktive	12	14	15	3	20	+22,6 (1RM) (+1,6 % per dag)	
	M	7 24±8	Knebøy (maskin)	Fysisk aktive	12	14	15	3	20	+8,9 (1RM) (+0,63 % per dag)	Kontroll- gruppe
			Kne-fleksjon	Fysisk aktive	12	14	15	3	20	+1,3 (1RM) (+0,09 % per dag)	
Kubo et al. (2006)	M	9 25±2	Kne-ekstensjon (unilateral)	Utente	3	84	12-25	4	20	+7,8 (MVC) (+0,09 % per dag)	Mansjett- trykk økte fra ~ 180 til 240 mmHg
			Kne-ekstensjon (unilateral)	Utrente	3	84	10	4	80	+16,8 (MVC) (+0,2 % per dag)	Kontroll- bein

1RM: en repetisjon maksimum. MVC: maksimal voluntær (isometrisk) kontraksjon.

Tabell 2.1 Fortsettelse

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Økter/u ke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM/ MVC)	Fremgang (%)	Komment ar
Madaram e et al. (2008)	M	8 22±2	Kne-ekstensjon (bilateral)	Utrente	2	70	15-30	3	30	+19,6 (MVC) (+0,28 % per dag)	Mansjett- trykk økte fra ~ 160 til 240 mmHg. Mansjett- bredde; 40 mm
			Kne-fleksjon (bilateral)		2	70	15-30	3	30	+18,3 (MVC) (+0,26 % per dag)	
	M	7 22±4	Kne-ekstensjon (bilateral)	Utrent	2	70	15-30	3	30	+4,6 (MVC) (+0,07 % per dag)	Kontroll- gruppe
			Kne-fleksjon (bilateral)		2	70	15-30	3	30	+2,9 (MVC) (+0,04 % per dag)	
Laurentin o et al. (2008)	M	8 24±3	Kne-ekstensjon (unilateral)	Fysisk aktive	2	56	6	3-4	~ 80	+34,5 (1RM) (+0,61 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; 126 mmHg, 140mm
			Kne-ekstensjon (unilateral)		2	56	6	3-4	~ 80	+36,9 (1RM) (+0,65 % per dag)	Kontroll- bein.
	M	8 22±3	Kne-ekstensjon (unilateral)	Fysisk aktive	2	56	12	3-4	~ 60	+35,3 (1RM) (+0,63 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; 131 mmHg, 140mm
			Kne-ekstensjon (unilateral)		2	56	12	3-4	~ 60	+3,6 (1RM) (+0,67 % per dag)	Kontroll- bein
Laurentin o et al. (2012)	M	10	Kne-ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	-	56	15	3-4	~20	+40,1 (1RM) (+0,71 % per dag)	Mansjett- trykk- og bredde; 94,8 mmHG. 175 mm
	M	9	Kne-ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	-	56	8	3-4	~80	+36,2 (1RM) (+0,64 % per dag)	Kontroll- gruppe

1RM: en repetisjon maksimum. MVC: maksimal voluntær (isometrisk) kontraksjon.



### **2.3 Muskelvekst etter SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening**

I tråd med at SRB har et potensial til å øke muskelstyrke på lik linje med tradisjonell tung styrketrening, så viser litteraturen at denne treningsmetoden også kan resultere i tilsvarende muskelvekst målt med magnetresonanstomografi (MR) og ultralyd (UL) (Abe et al., 2005a; 2005b ; Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2008; Madarame et al., 2008; Takarada et al., 2000b; 2002; 2004; Yasuda, Ogasawara, Miakako, et al., 2011) sammenlignet mot hva som er sett etter tradisjonell tung styrketrening (Holm et al., 2008; Jones & Rutherford, 1987; Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2012; 2008; McCall, Byrnes, Dickinson, Pattany, & Fleck, 1996; Takarada et al., 2000b) (Tabell 2.2).

I en oversiktsstudie av Wernbom et al. (2007) viste de aktuelle studiene der tradisjonell tung styrketrening ble utført to til tre økter per uke på *m. quadriceps* å gi en gjennomsnittlig økning i tverrsnittsarealet på 0,11 % per dag (0,03 – 0,26 %). Med samme antall økter i uken kunne også Holm et al. (2008) og Jones & Rutherford, (1987) observere en økning i tverrsnittsarealet for *m. quadriceps* på 7.6 % (0,09 % per dag) og 5% (0,06 % per dag) etter 12 uker med tradisjonell tung styrketrening. I tråd med disse resultatene har styrketrening på knestrektermuskulaturen med redusert blodstrøm med lav motstand (16-50 % av 1 RM) vist å gi tilsvarende muskeltverrsnittarealøkning (henholdsvis 0,04 – 0,22 % økning per dag) utført to til tre økter i uken (Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2012; Madarame et al., 2008; Takarada et al., 2002; 2004). Takarada et al. (2000b) dokumenterte også at SRB med relativ lav motstand (56 % av 1RM) på overarmsmuskulaturen resulterte i en tilsvarende muskeltverrsittøkning (*m. biceps brachii*; 20,3 % (0,18 % per dag), *m. brachialis*; 17,8 % (0,16 % per dag)) som tradisjonell tung styrketrening (76 % av 1RM; *m. biceps brachii*; 18,4 % (0,16 % per dag), *m. brachialis*; 11,8 % (0,11 % per dag)), der totalt 32 økter ble gjennomført over 112 dager.

Det kan tyde på at trente kan få en muskelbyggende effekt av SRB på nivå med tradisjonell tung styrketrening (Abe et al., 2005b; Manimmanakorn et al., 2012; Takarada et al., 2002). Etter 56 og 35 dager med SRB (<50 % av 1 RM), registrerte Takarada et al. (2002) og Manimmanakorn et al. (2012) en tverrsnittøkning i *m. quadriceps* på 12,3 % (0,22 % per dag) og fleksor –og ekstensormuskulaturen på 7,7 %

(0,22 % per dag) og 5,7 % (0,16 % per dag), der rugbyspillere og nettbball-utøvere deltok som forsøkspersoner.

SRB med mer ekstreme protokoller er også blitt gjennomført. Med 6 til 14 økter i uken med en motstand på 20 % av 1RM viser resultatene en vesentlig muskelvekst målt som muskeltverrsnittareal på 3,5 til 8,5 % (gjennomsnitt 6 %) (Abe et al., 2005b; Fujita et al., 2008), muskeltykkelse 3,0 til 7,7 % (gjennomsnitt 5,5 %) (Abe et al., 2005a; 2005b; Fujita et al., 2008) og muskelfiberareal ~ 35 % (Nielsen et al., 2012) i løpet av 6 til 21 dager. Dette tilsvarer en gjennomsnittlig økning i muskeltverrsnittareal, muskeltykkelse og muskelfiberareal per dag på 0,59 %, 0,59 % og 1,66 %. Sammenlignet opp mot hva en kan forvente i muskelvekst etter tradisjonell tung styrketrening er et slik resultat 4-5 ganger større (Wernbom, 2011). Resultatet fra studiene til Abe et al. (2005a; 2005b), Fujita et al. (2008) og Nielsen et al. (2012) kan derfor gi en indikasjon på hvilket potensial SRB med lav motstand har til å skape et stimuli for muskelvekst. Det kan imidlertid diskuteres i hvilken grad muskelsvelling kan ha vært noe av årsaken til disse resultatene, men målinger tatt åtte dager eller mer etter siste treningsøkt bør være lang nok tid til at en eventuell svelling har lagt seg (Wernbom, 2011).

I en metaanalyse ble SRB med lav motstand sammenlignet mot styrketrening med lav motstand uten redusert blodstrøm (Loenneke et al., 2012b). Her ble det registret signifikante forskjeller mellom gruppene der gruppen som trente SRB med lav motstand viste en signifikant hypertrofi. Spesielt i studier der treningsmotstanden var mellom 15 – 30 % av MVC/ 1 RM var effekten på muskelvekst størst med redusert blodstrøm. Disse resultatene er tråd med an annen metaanalyse av Krieger, (2010) som tok for seg studier der tradisjonell tung styrketrening og hypertrofitrening ble gjennomført. Dette indikerer at SRB kan skape samme hypertrofi som ved tradisjonell tung styrketrening og at det er reduksjonen i blodstrømmen som er en viktig årsak til dette. Loenneke et al. (2012b) kunne i kontrast med Wernbom et al. (2007) sine resultater vise at flere av studiene pekte mot at kvinner muligens har en mindre effekt av SRB enn menn når det gjelder muskelvekst. Det er i midlertid ikke gjort noen rene studier på kvinner og SRB og flere studier må til for å kunne dra en sammenheng mellom variablene, noe også Loenneke et al. (2012b) nevner i sin studie.

**Tabell 2.2** Oversikt over studier som har gjennomført SRB med kontrollgruppe på prosent endring i muskelvekst (muskeltvernsnittareal og muskeltykkelse). Studier på overkropp øverst og underkropp nederst. Skrift i kursiv er kontrollgruppe i de respektive studier, som trente med normal blodtilførsel (uten redusert blodstrøm). Modifisert etter Wernbom et al. (2008).

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Øker /uke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	Måle- metode	Muskelvekst. CSA/tykkelse (% per dag)
Takarada et al. (2000b)	K	11 58±2	Albu-fleksjon (unilateral)	Utreint	2	112	~ 18	3	53	MRI	+20,3 (0,18 % per dag) (biceps) +17,8 (0,16 % per dag) (brachialis) RB
			<i>Albu-fleksjon (unilateral)</i>		2	112	~ 19	3	76	<i>MRI</i>	<i>+18,4 (0,16 % per dag) (biceps) +11,8 (0,11 % per dag) (brachialis) NB</i>
Yasuda et al. (2011)	M	40	Benkpress	-	3	42	15-30	4	30	MRI	+4,9 og + 8,3 % (Triceps og pectoralis major) (0,11 og 0,19 % per dag) RB
Takarada et al. (2002)	M	6 25±1	Kne- ekstensjon (bilateral)	Styrketrente rugby spillere	2	56	~ 16	5	50	MRI	+12,3 (0,22 % per dag) (quadriceps) RB
Takarada et al. (2004)	M	6 21±1	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	2	56	16-23	5	16-22	MRI	+10,3 (0,18 % per dag) RB
	<i>M</i>	<i>6 22±1</i>	<i>Kne- ekstensjon (bilateral)</i>	<i>Fysisk aktive</i>	2	56	16-23	5	16-22	<i>MRI</i>	<i>+1 (0,01 % per dag) NB</i>
Abe et al. (2005a)	M	9 24±8	Knebøy (maskin)	Fysisk aktive	12	14	13	3	20	MRI	+8,5 (0,60 % per dag) (quadriceps) RB
	M	9 24±8	Knebøy (maskin)	Fysisk aktive	12	14	13	3	20	UL	+7,7 (0,55 % per dag) (quadriceps) RB
	<i>M</i>	<i>7 24±8</i>	<i>Knebøy (maskin)</i>	<i>Fysisk aktive</i>	12	14	15	3	20	<i>MRI</i>	<i>+1,8 (0,13 % per dag) (quadriceps) NB</i>
	<i>M</i>	<i>7 24±8</i>	<i>Knebøy (maskin)</i>	<i>Fysisk aktive</i>	12	14	15	3	20	<i>UL</i>	<i>+1,4 (0,1 % per dag) (quadriceps) NB</i>

**MRI: magnetresonanstomografi. UL: ultralyd. RB: redusert blodstrøm. NB: normal blodstrøm**

Tabell 2.2 Fortsettelse

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Økter /uke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	Måle- metode	Muskelvekst. CSA/tykkelse (% per dag)
Abe et al. (2005b)	M	-	Knebøy (maskin)	Trente	16	8	15	3	20	UL	+5,9 (0,73 % per dag) (quadriceps) RB
	M	-	Knebøy (maskin)	Trente	16	8	15	3	20	UL	±0 (quadriceps) NB
Kubo et al. (2006)	M	9 25±2	Kne- ekstensjon (unilateral)	Utente	3	84	12-25	4	20	MRI	+5,9 (0,07 % per dag) (quadriceps) RB
	M		Kne- ekstensjon (unilateral)	Utrente	3	84	10	4	80	MRI	+7,4 (0,08 % per dag) (quadriceps) NB
Fujita et al. (2008)	M	8 22±3	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	12	6	~18	4	20	MRI	+ 3,5 (0,58 % per dag) (quadriceps) RB
	M	8 22±3	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	12	6	~18	4	20	UL	+ 3,0 (0,50 % per dag) (quadriceps) RB
	M	8 21±3	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	12	6	~18	4	20	MRI	- 1,0 (- 0,16 % per dag) (quadriceps) NB
	M	8 21±3	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	12	6	~18	4	20	UL	- 0,7 (- 0,11 % per dag) (quadriceps) NB
Madaram e et al. (2008)	M	8 22±2	Kne- ekstensjon (bilateral)	Utrente	2	70	15-30	3	30	MRI	+4,2 (0,06 % per dag) (quadriceps) RB
	M	7 22±4	Kne- ekstensjon (bilateral)	Utent	2	70	15-30	3	30	MRI	-1,3 (-0,01 % per dag) (quadriceps) NB

MRI: magnetresonanstomografi. UL: ultralyd. RB: redusert blodstrøm. NB Normal blodstrøm

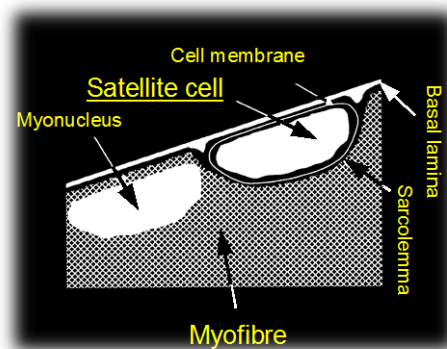
Tabell 2.2 Fortsettelse

Studie	Kjønn	n (alder)	Øvelse	Trening- status	Økter /uke	Trenings- periode (dager)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	Måle- metode	Muskelvekst. CSA/tykkelse (% per dag)
Laurentino et al. (2008)	M	8 24±3	Kne- ekstensjon (unilateral)	Fysisk aktive	2	56	6	3-4	~ 80	MRI	+5,0 (0,09 % per dag) (quadriceps) RB
	M		<i>Kne- ekstensjon (unilateral)</i>		2	56	6	3-4	~ 80	MRI	+6,1 (0,11 % per dag) (quadriceps) NB
	M	8 22±3	Kne- ekstensjon (unilateral)	Fysisk aktive	2	56	12	3-4	~ 60	MRI	+4,5 (0,08 % per dag) (quadriceps) RB
	M		<i>Kne- ekstensjon (unilateral)</i>		2	56	12	3-4	~ 60	MRI	+3,2 (0,06 % per dag) (quadriceps) NB
Laurentino et a. (2012)	M	10	Kne- ekstensjon (bilateral)	Fysisk aktive	2	56	15	3-4	20	MRI	+6,3 (0,11 % per dag) (quadriceps) RB
	M	9	<i>Kne- ekstensjon (bilateral)</i>	<i>Fysisk aktive</i>	2	56	8	3-4	80	MRI	+6,1 (0,11 % per dag) (quadriceps) NB
Manimman akom et al. (2012)	K	30 20±3.3	Kne- ekstensjon- og fleksjon (bilateralt)	Nett- ballspillere	3	35	Utmattels e	6	20	MRI	+ 6,6 (0,18 % per dag) (hele låret) RB

**MRI: magnetresonanstomografi. UL: ultralyd. RB: redusert blodstrøm. NB Normal blodstrøm**

## 2.4 Satellittceller

Satellittceller er mononukleære celler lokalisert perifert i muskelfiberen mellom sarkolemma og basallamina (Mauro, 1961). På grunn av cellens lokalisasjon, så gav Mauro navnet satellittceller. Satellittcellene har egen plasmamembran som ligger mot muskelcellens plasmamembran og bulet innover mot muskelcellens cytoplasma og organeller (figur 2,2).



*Figur 2.2 Lokalisasjon av satellittcellen i skjelettmuskelfiberen. Modifisert etter Vierck et al. (2000).*

I ustresset skjelettmuskulatur er satellittcellene i dvale, det vil si at de er ute av cellesyklus (G0 fase) (Hawke & Garry, 2001). I dvale karakteriseres satellittcellen ultrastrukturelt ved den tydelig plassering mellom basallamina og sarcolemma, dens høye kjerne- cytoplasmaforhold med få organeller, liten kjerne og større mengde heterokromatin<sup>1</sup> enn muskelkjerne (Kadi et al., 2005). Den store mengden heterokromatin betyr at cellen ikke bruker arvestoffet aktivt (Dahl, 2008).

Selv om satellittcellen i dvale ikke har noen mitotisk aktivitet og er ute av cellesyklus, så kan satellittcellen aktiveres å ha flere viktige oppgaver i muskelfiberen. I reparasjon og regenerering av skadde fibre har litteraturen lenge demonstrert at satellittcellene spiller en sentral rolle (Bischoff et al., 1975; Lipton and Schultz, 1979). Siden muskelcellekjerne er postmitotisk og ikke har evnen til å dele seg, så trenger muskelfiberen en tilegning av nye cellekjerne for å kunne opprettholde kjerne – cytoplasma forholdet (kjernedomene teorien) ved hypertrofi (Hawke, 2005; Relaix & Zammit, 2012). Satellittcellene kan etter aktivering og prolifering opprettholde eller øke satellittcelleantallet rundt muskelfiberen, eller smelte sammen og danne nye muskelfibre

<sup>1</sup> Generelt ”inaktive” regioner av kromosomet

(hyperplasi) (Kadi, Eriksson, Holmner, Butler-Browne, & Thornell, 1999). Om hyperplasi forekommer i humane muskelceller er fortsatt usikkert på grunn av metodiske utfordringer (Kadi et al., 2005)

#### 2.4.1 Identifisering av satellittceller

Det finnes hovedsakelig to metoder å identifisere satellittceller på. Elektronmikroskop er den klassiske metoden som brukes for å finne dem. Med denne metoden kan preparatene forstørres og man kan identifisere dem ut i fra anatomisk plassering. Siden elektronmikroskopering er en tidkrevende metode og begrenser derfor størrelsen på datamaterialet, egner den seg ikke så godt til kvantifisering. Til kvalitativ forskning på satellittceller egner denne metoden seg derimot godt. Immunhistokjemiske metoder der en benytter et antistoff for å identifisere satellittcellene, er de siste årene blitt mer vanlig å benytte. For oversikt over ulike antistoffer brukt til å identifisere satellittceller på muskelsnitt, se Nilsen, (2007).

Et av antistoffene benyttet i denne oppgaven for å identifisere satellittcellene på muskelsnittene var *anti- Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)*. *Anti – NCAM* er i dag ansett som reliabel markør for satellittceller og er benyttet med suksess i flere humane studier (oppsummert av Mackey et al., 2009). Antistoffet binder seg til Neural Cell Adhesion Molecule<sup>2</sup>. Ved hjelp av immunhistokjemi merket Covault og Sanes (1986) muskelsnitt mot NCAM for å identifisere synapser og endeplater. I analysearbeidet observerte de at NCAM også merket satellittceller. På bakgrunn av disse resultatene ble det i et nyere studie antydnet at NCAM merket både satellittceller i dvale og aktiverte satellittceller (Hawke & Garry, 2001). Flere har stilt seg spørrende til NCAM som satellittcellemarkør (oppsummert av Lindström & Thornell, 2009). Imidlertid er det blitt observert at NCAM og Pax7<sup>3</sup> kolokaliseres på 95 % av nabosnittene som merkes (Lindström & Thornell, 2009; Verdijk & Koopman, 2007). I tillegg rapporterte Dreyer, Blanco, Sattler, Schroeder, & Wiswell, (2006) ingen insidenser hvor NCAM-positive celler ble lokalisert på utsiden av basallamina. I tråd med dette lokaliserte Mackey et al. (2011) kun én positiv NCAM celle per 250

---

<sup>2</sup> NCAM et glykoprotein lokalisert på muskelcelleoverflaten og satellittcellemembranen, samt på perifere nerver og spiller en rolle i nervesynapsens tilknytning til muskelfiberen, ved at molekylet binder nervecellen til en muskelcelle (Cashman et al., 1987; Mackey et al., 2009).

<sup>3</sup> Paired Box Protein. Transkripsjonsfaktor

muskelfibre (0,004 NCAM+ celler per fiber) på utsiden av basallamina sammenlignet mot 0,11-15 NCAM+ celler per fiber på innsiden av basallamina. Disse funnene viser at NCAM merkede celler på utsiden av muskelfiberen i liten grad forekommer. På muskelsnittet vil merkingen av satellittcellen der NCAM er benyttet som markør ses forskjellig avhengig av hvor satellittcellen er kuttet over. Dette henger samme med at *anti*- NCAM merker rundt satellittcellen og vil ses som en ring hvis satellittcellen kuttet midt på, eller en ring som er fylt hvis man har kuttet av toppen eller bunnen (endene) av satellittcellen.

Det andre antistoffet benyttet for å identifisere satellittceller i denne oppgaven var *anti*- Pax7. *Anti*- Pax7 er likhet med NCAM et mye brukt antistoff som binder seg til Pax7 i satellittcellens kjerne. Etter å ha undersøkt Pax7 knock-out mus for å studere Pax7 sin rolle i satellittcellene, så observerte Sale (2000) et totalt fravær av satellittceller hos Pax7<sup>-/-</sup> mus. Andre studier som har diskutert Pax7 sin rolle i satellittcelleutviklingen (Halevy et al., 2004; Rudnicki, Le Grand, McKinnell, & Kuang, 2008), styrker hypotesen om at Pax7 er essensielt for satellittcelleutvikling. På bakgrunn av observasjonene til Sale (2000), mente Hawke & Garry, (2001) at antistoff mot Pax7 var en markør for satellittceller i dvale, samt aktiverte og prolifererende satellittceller

Klare tellekriterier når satellittceller merket mot NCAM og Pax7 skal kvantifiseres er helt essensielt. Det virker til å være en svakhet i litteraturen at tellekriteriene ikke er mer samkjørte mellom ulike forskere (Lindström & Thornell, 2009; Mackey et al., 2009). To av tellekriteriene som går igjen i studier der NCAM og Pax7 er benyttet som satellittcellemarkør er; cellen er lokalisert i utkanten av fiberen og viser en overlapping mellom NCAM-ringen eller Pax7- merking og en tilhørerne kjerne (oppsummert av Lindström & Thornell, 2009). Lindström og Thornell (2009) trekker også frem at merking av basallamina er viktig når NCAM+ og Pax7+ celler skal kvantifiseres. Merking av basallamina vil øke nøyaktigheten i kvantifiseringen og muliggjør det å etablere om cellen ligger på innsiden eller utsiden av basallamina (Lindström & Thornell, 2009). Da satellittcellens lende og kjerneareal er vist å fordoble seg seks timer etter et iskemisk stress (Gregory & Chb, 2004), så øker også risikoen for å identifisere flere positive celle som følge av svelling og ikke en økning i antall (Wernbom et al., 2013). Dette er noe det må tas høyde for da NCAM og/ eller Pax7 benyttes som satellittcellemarkører.



Et metodisk problem kan oppstå når en skal sammenligne Pax7 og NCAM merking. Etter å ha dobbeltmerket med *anti-Pax7* og *anti-NCAM* observerte Mackey et al. (2009) at 23 % færre satellittceller ble identifisert med Pax7, noe som gjør at absolutte tall fra disse metodene ikke kan sammenlignes direkte. Siden Pax7 merker kjernen og NCAM membranen er det sannsynlig at antall nabosnitt satellittcellen kan identifiseres på varier mellom antistoffene. Dette bekreftes av Mackey et al. (2009) som registrerte at mens Pax7 merkede satellittceller bare ble funnet på to tilstøtende 7µm tykke nabosnitt, så ble satellittceller merket med NCAM lokalisert på fem tilstøtende 7µm tykke nabosnitt.

Av andre antistoffer som er blitt benyttet er for eksempel *anti-M.cadherin* blitt prøvd ut og binder seg til M-cadherin<sup>4</sup> som finnes mellom sarkolemma og satellittcellen. På rotter er antistoffet brukt med suksess, men det er kun brukt i en studie på mennesker (Reimann et al., 2004). *Anti c-met* og *anti-MNF*<sup>5</sup> er to andre antistoffer som ikke er blitt brukt systematisk på mennesker (Kadi et al., 2005).

#### 2.4.2 Molekylære mekanismer involvert i satellittcelleaktivering

Satellittcellen aktiveres i respons til både fysiologiske stimuli (eks trening) og patologiske tilstander (eks skade). I litteraturen blir satellittcellen etter aktivering ofte omtalt som voksende myoblaster eller myogene precursor celler og etter differensiering og fusjon som myotuber.

##### *Cellesyklus og transkripsjonsfaktorer involvert i cellesyklus*

Satellittcellens progresjon gjennom cellesyklus er tett regulert av et hierarki av ulike transkripsjonsfaktorer (figur 2,3). Hos voksne uttrykkes transkripsjonsfaktoren Pax7 når satellittcellen er i dvale (Seale et al., 2000). I satellittcellen binder pax7 seg til gener som promoterer proliferasjon og undertrykker gener som induserer det endelige differensieringsprogrammet (Soleimani et al., 2012). Understrøms av Pax7 finner vi de myogene reguleringsfaktorene (MRFs) som tilhører familien av basic-helix-loop-helix transkripsjonsfaktorer. MRF-familien består av Myf5<sup>6</sup>, MyoD<sup>7</sup>, myogenin og MFR4<sup>8</sup> og

---

<sup>4</sup> Muscle Ca<sup>2+</sup>- dependent adhesion molecule

<sup>5</sup> Myocyte nuclear factor

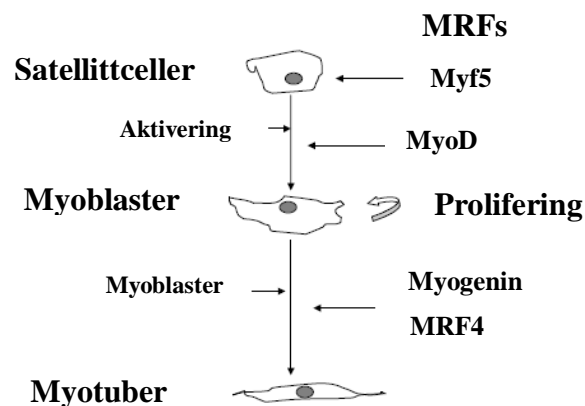
<sup>6</sup> Myogenetisk faktor 5

<sup>7</sup> Myoblast differensieringsfaktor protein

<sup>8</sup> Muskel-spesifikk regulatorisk faktor 4

fungerer som transkripsjonsfaktorer i satellittcellekjernen (Chang & Rudnicki, 2014). MRFene styrer dermed satellittcellens funksjon i de ulike stadiene i cellesyklus.

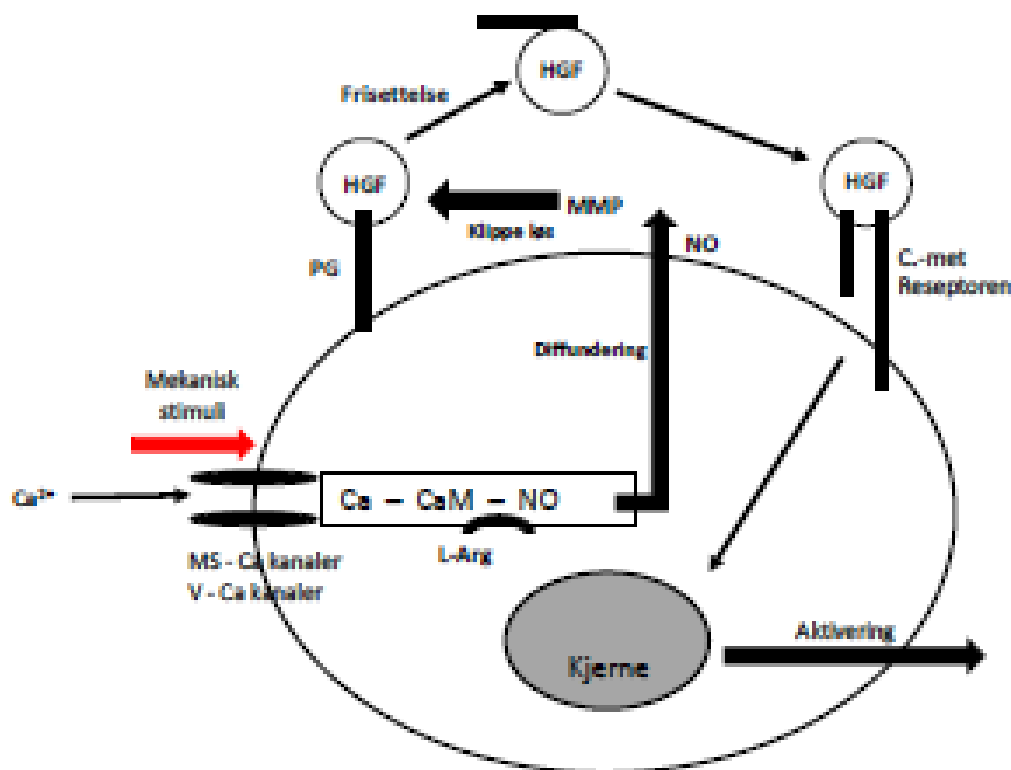
Oppregulering av Myf5 markerer satellittcellens entre i den første fasen i cellesyklus fulgt av en samtidig uttrykkelse av MyoD som sammen utgjør majoriteten nylige aktiverte satellittceller (Chargé & Rudnicki, 2004; Dhawan & Rando, 2005). I oppreguleringen av Myf5 og spesielt MyoD spiller Pax7 en sentral rolle. Pax7 er vist å regulere og inducere uttrykkelse av både myf5 og MyoD ved å binde seg til genene for de respektive MRFene (Bajard et al., 2006; Hu, Geles, Paik, DePinho, & Tjian, 2008; McKinnell et al., 2008). Begge de tidlige MRFene ser ut til å uttrykkes i satellittcellen under prolifering, satellittcellen er imidlertid avhengig av MyoD for å sette i gang differensieringen (Cooper et al., 1999; Megeney, Kablar, Garrett, Anderson, & Rudnicki, 1996). Etter prolifisering kan satellittcellen trekkes ut av cellesyklus ved aktivering av cellesyklus arrestprotein p21 (CDK1) (Chargé & Rudnicki, 2004), eller starte på sitt endelige differensieringsprogram. I den endelige modningsfasen uttrykkes myoblast- differensieringsfaktorene MRF4 og myogenin som markerer den siste fase i cellesyklus (Chargé & Rudnicki, 2004; Dhawan & Rando, 2005; Rudnicki et al., 2008).



**Figur 2.3** MRFene uttrykkes i satellittcellen på ulike tidspunkter i aktiveringsforløpet. Modifisert etter Chen, Zajac, & MacLean, (2005)

### Ekstracellulære mekanismer involvert i satellittcelleaktivering

I en studie av Tatsumi (2010) oppsummeres flere lokale faktorer som kan omsette et mekanisk stimuli til aktivering av satellittcellen som ligger i dvale. Faktorene studien trekker frem er calcium<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>), matrix metalloproteinaser (MMPs), hepatocyte Growth factor (HGF), der mekanobiologien<sup>9</sup> brukes som samlebetegnelse for alle faktorene. Sluttproduktet i denne kaskaden er HGF, som frigjøres fra proteglykaner og binder seg til c-met reseptoren som starter en signalkaskade videre til kjernen og aktiverer satellittcellen (figur 2,4) (oppsummert av Tatsumi, 2010).



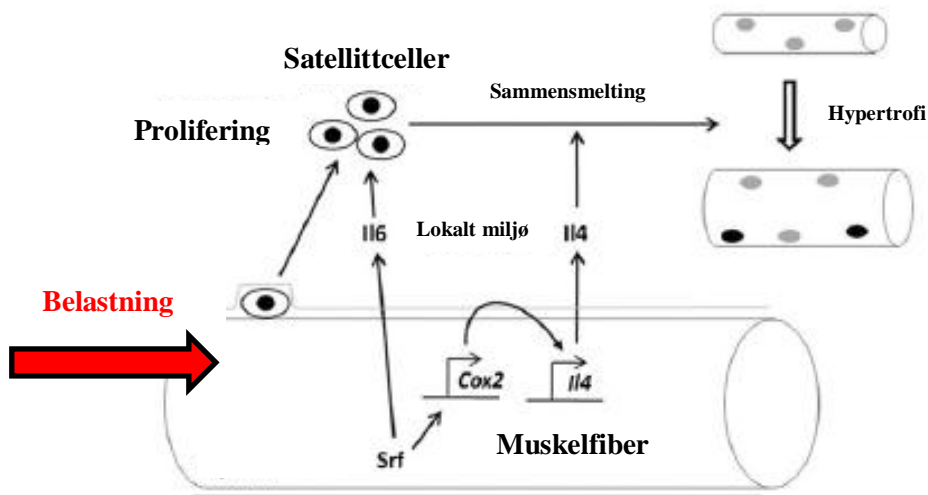
**Figur 2.4** Mekanobiologien. Skjematisk fremstilling av mulige mekanismer for satellittcelleaktivering i respons til mekanisk stimuli. Et drag i muskulaturen fører til Ca<sup>2+</sup>-innfluks inn i satellittcellen gjennom kalsiumkanaler i membranen. Ca<sup>2+</sup> aktiverer kalsium – Calmodulin (Ca-CaM), som aktiverer nitrogenoksid syntase (NOS). Aktivert NOS produserer nitrogenoksid (NO) fra aminosyren L-arginin og NO diffunderer ut av satellittcellen. Ekstracellulært aktiverer NO MMP2, som videre frigjør HGF fra proteglykanet. Etter frigjøring fra proteglykanet translokeres og binder HGF seg til c-met reseptoren som starter en signalkaskade videre til kjernen og aktiverer satellittcellen. Modifisert etter Tatsumi, (2010).

<sup>9</sup> Molekylær kaskade av ulike hendelser som inkluderer; NO- produksjon, MMP- aktivering, frigjøring av HGF fra ECM og translokasjon av HGF til c-met reseptoren for satellittcelleaktivering (Tatsumi et al., 2010).

HGF er lokalisert i ekstracellulær matriks (ECM) som skiller den fra andre vekstfaktorer (Ryuichi Tatsumi & Allen, 2004; Ryuichi Tatsumi, 2010). Dette gjør at HGF frigjøres rask under ulike typer stress på muskelen, som ved mekanisk drag (Yamada et al., 2006). Bidchoff, (1986) og Chen og Quinn, (1992) var de første som demonstrerte at HGF stimulerte til satellittcelleaktivering og prolifering. I tråd med disse funnene har senere studier rapportert at HGF aktiverer satellittcellen tidlig i en cellekultur *in vitro* (Allen, Sheehan, Taylor, Kendall, & Rice, 1995a; Allen, Temm-Grove, Sheehan, Rice, 1997; Tatsumi, Anderson, Nevoret, Halevy, & Allen, 1998). Ved frigjøring fra sine bindeproteiner kan også de andre vekstfaktorene øke sin aktivitet akutt. Imidlertid må proteinsyntesen av de lokale vekstfaktorene øke, skal vi få en betydelig økning i den totale mengden av vekstfaktorer lokalt i muskulaturen som er belastet (Raastad & Paulsen, 2010). Mechano growth factor (MGF) har fått navnet sitt på grunn av at den responderer så rask på et mekaniske stimuli og er sammen med isoformen IGF-1Ea vist å aktivere og bidra til den endelige differensieringen av satellittcellen (Yang & Goldspink, 2002). MGF ser ut til å ha størst effekt på satellittcellene da isoformen kun uttrykkes etter skade og/ eller belastning av muskelfiberen (Owino, Yang, & Goldspink, 2001), og den er med på å aktiverer dem til økt celledeling (Raastad & Paulsen, 2010). Etter muskelskade er MGF vist å uttrykkes raskt og er korrelert med aktiveringen av satellittcellene. Etter dette kan det se ut til at splicingen av mRNA endrer seg og muskelfiberen starter å uttrykke IGF-1Ea, som i større grad promoterer den endelige differensieringsfasen av myoblastene (Hill & Goldspink, 2003; Owino et al., 2001; Yang & Goldspink, 2002). Hameed, Orrell, Cobbold, Goldspink, & Harridge, (2003) observerte økt uttrykkelse av MGF to ½ time etter unilateral kneekstensjon på eldre og yngre menn som støtter at denne IGF-isoformen uttrykkes raskt etter belastning. Fibroblast growth factor (FGF) er vist å stimulere proliferingen av satellittcellen og kan muligens spille en rolle i differensieringen ved å påvirke uttrykkelsen av MyoD og myogenin (Floss, Arnold, & Braun, 1997).

I flere studier er det vist at lokale faktorer som cytokiner kan være viktig for satellittcelleaktivering (Guerci et al., 2012; Horsley, Jansen, Mills, & Pavlath, 2003; Serrano, Baeza-Raja, Perdiguero, Jardí, & Muñoz-Cánoves, 2008). Serrano et al. (2008) demonstrerte at interleukin-6 (IL-6) knock-out mus hadde en hemmet hypertrofirespons som følge av at proliferasjonsevnen til satellittcellene og videre sammensmelting med

eksisterende fibre var svekket under påfølgende hypertrofi sammenlignet med kontrollmus. Når muskelfibrene er i ustresset tilstand har fjerning av IL-6 genet ikke vist å påvirke muskelfiberstørrelse hos voksne i mus. Dette kan indikere at IL-6 kun spiller en sentral rolle under muskelhypertrofi ved å regulere satellittcelleproliferasjonen og videre sammensmelting med den eksisterende muskelen (økning av kjerneantallet) (Serrano et al., 2008). I et studie av Guerci et al. (2012) ble det demonstrert at transkripsjonsfaktoren serum respons faktor (Srf) som kontrollerer uttrykkelsen av IL-4 og IL-6, kan være sentral for muskelhypertrofi. Studien viste at spesifikk fjerning av Srf blokkerte satellittcelleproliferasjonen og belastning-indusert muskelhypertrofi. Effekten av Srf ble mediterert av IL-4 og IL-6 som på en parakrin<sup>10</sup> måte kontrollerte satellittcelleproliferasjon og fusjon. Forfatterne antydet at Srf spiller en viktig rolle i translasjonen av et mekanisk stimuli på muskelfiberene, som videre kan aktivere satellittcellene og støtter muskelhypertrofi (figur 2,5)



**Figur 2.5** Skjematisk modell: I respons til en ytre belastning (eks trening) modulerer Srf IL-6 og Cox2/IL-4 uttrykkelsen, som på en parakrin måte kontrollerte satellittcelleproliferasjon og fusjon, som til slutt støtter muskelhypertrofi. Modifisert etter Guerci et al. (2012).

Myostatin-signalisering inhiberer satellittcelleproliferasjon ved å regulere opp CDK-1<sup>11</sup>, også kjent som p21, (McCroskery, Thomas, Maxwell, Sharma, & Kambadur, 2003; Ríos, Carneiro, Arce, & Devesa, 2001), regulere ned aktiviteten til CDK2<sup>12</sup>

<sup>10</sup> Virker på nabocellene

<sup>11</sup> Cyklin- avhengig kinase inhibitor

<sup>12</sup> Cyklin-avhengig kinase 2

(McCroskery et al., 2003) og aktiverer JNK<sup>13</sup>-signalveien (Joulia et al., 2003). Myostatin inhiberer også differensiering av myoblaster ved å nedregulere de myogenetiske reguleringsfaktorene MyoD og myogenin i musklene (Ramón Ríos, Carneiro, Arce, & Devesa, 2002).

### *Intracellulære mekanismer involvert i satellittcelleaktivering*

Brack, Conboy, Conboy, Shen, & Rando, (2008) demonstrerte at Notc- og Wnt-signalisering kan spille en sentral rolle for satellittcellefunksjonen og reguleringen. Mens Notc signalisering kan være viktig for aktivering og prolifering av satellittcellen (Conboy & Rando, 2002), så har Wnt-signalisering vist å kontrollere overgangen mellom proliferasjonsfasen til differensieringsfasen slik at satellittcellen kan smelte sammen med eksisterende muskelfiber (Brack et al., 2008). Viktigheten av Notc-signalisering blir demonstrert i aldrende og skadde muskelfibre. Det ble vist at satellittcellen hadde svekket mulighet til å proliferere og differensiere sammenlignet mot satellittceller i yngre muskler (Conboy & Rando, 2002). Disse observasjonene ble sett i sammenheng med en redusert Notc-aktivitet. Et ytre stimuli på Notc gjenopprettet imidlertid den regenerative kapasiteten i de aldrende musklene (Conboy & Rando, 2002). I samsvar med resultatene til Conboy & Rando, (2002) ble det vist i et studie at hemming av Notc-signaliseringen reduserte proliferingen av satellittceller (Qin et al., 2013). Med økende alder er også Wnt-signalisering vist å spille en rolle for den reduserte satellittcellefunksjonen (Brack et al., 2007). Aldrende muskler har vist å ha en økt Wnt-signalisering i satellittcellene. Muligens kan dette være et resultat av faktorer i det systemiske miljøet hos eldre dyr, som leder til en omforming av satellittcellen til en fibrogenetisk linje (Brack et al., 2007).

P38 MAPK<sup>14</sup> signalveien er en viktig regulator for skjelettmuskeldifferensieringen (myogenesen) og medierer cellulære responser til eksterne signaler, inkludert cellevekst, celledifferensiering, celledifferensiering, celledifferensiering, celledifferensiering og apoptose (Keren, Tamir, & Bengal, 2006). Viktigheten av p38 MAPK-signalveien i reguleringen av satellittcelleaktiveringen er vist i flere studier (Jones et al., 2005; Ruiz-Bonilla & Perdiguero, 2008). Inhibering av p38  $\alpha/\beta$  MAPK aktivitet hindret aktivering og prolifering av satellittcellen kultivert i

---

<sup>13</sup> c-Jun N-terminal kinase

<sup>14</sup> Mitogen-aktivert protein kinase

intakte muskelfibre (Jones et al., 2005). I p38 MAPK familien er  $\alpha$ -isoformen vist seg å være ansvarlig for både in vivo og in vitro regulering av myogenesen hos voksne (Ruiz-Bonilla et al., 2008). I satellittceller er p38 $\alpha$  vist å stimulere differensieringen og inhibere prolifering, mens p38 $\gamma$  gjør det omvendte og forlenger prolifering (Lassar, 2009). Det har vært foreslått at p38 $\alpha$  kontrollerer myoblast prolifering via antagonisering av JNK/c Jun-signalveien (Perdiguero & Ruiz-Bonilla, 2007)

Flere studier har rapportert at transkripsjonsfaktoren Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) og dens nedstrøms mål, Regulated in development and DNA damage responses (REDD1) er oppregulert etter hypoksi (Arsham, Howell, & Simon, 2003; Jiang, Semenza, Bauer, & Marti, 1996; Jiang et al., 1996; Liu et al., 2006; Shoshani et al., 2002). En økt uttrykning av disse proteinene er vist å nedregulere mTOR<sup>15</sup>-signalveien (Arsham et al., 2003; Brugarolas et al., 2004; Liu et al., 2006; Wang, Kubica, Ellisen, Jefferson, & Kimball, 2006). Imidlertid er oppgaven til HIF-1 $\alpha$  noe tvetydig, da proteinet er diskutert å kunne fungere understrøms av PI3K<sup>16</sup>/Akt/mTOR-signalveien og bidra til hypertryfi (Drummond et al., 2008; Fujita et al., 2007; Lunde et al., 2011). Hvis det finnes en sammenheng mellom HIF1- $\alpha$  og/ eller REDD1 og satellittcelleaktivering etter SRB med lav motstand eller trening generelt er fortsatt usikkert. Ytterligere forskning trengs for å avdekke om det finnes en sammenheng mellom disse variablene.

#### **2.4.3 Molekylære mekanismer ved SRB med lav motstand som kan føre til satellittcelleaktivering**

Det er begrenset med forskning på mekanismer som kan bidra til satellittcelleaktivering i forbindelse med SRB. I litteraturen er to mekanismer diskutert: økt NO-produksjon (Blitzer & Loh, 1996; Pattwell et al., 2004; Tatsumi et al., 2006) og redusert uttrykning av myostatin (Drummond et al., 2008; Laurentino et al., 2012). Muskelskade i forbindelse med SRB er også diskutert å kunne sette i gang flere signaler som kan bidra til satellittcelleaktivering (Grembowicz et al., 1999; Wernbom et al., 2012).

NO er diskutert som en potensiell mediator for satellittcelleaktivering i forbindelse med SRB. Gjennom hypoksisk stress, strekk og/eller kontraksjon er denne faktoren trukket frem å kunne stimulere til satellittcelleaktivering (Blitzer & Loh, 1996; Pattwell et al.,

---

<sup>15</sup> Mammilian target og rapamycin

<sup>16</sup> Fosfatidylnositol-3 Kinase

2004; Tatsumi et al., 2006). En redusert uttrykning av myostatin ble observert tre timer etter en akutt-økt med SRB med lav motstand (Drummond et al., 2008). I tråd med Drummond et al. (2008) kunne Laurentino et al. (2012) demonstrere en redusert uttrykning av myostatin 48 timer etter en akutt økt med SRB. Disse resultatene kan forklare en av mekanismene om hvorfor SRB er vist å være en effektiv måte å øke muskelmassen på (Ramón Ríos et al., 2002).

De største økningene i satellittcelleantall er observert etter uvant eksentrisk belastning der muskelskader og regenerering er tydelig (Crameri et al., 2004; Dreyer et al., 2006; Paulsen et al., 2010). Med SRB er det mulig at cellemembranen kan påføres mikrostrukturelle skader som følge av den eksterne belastningen og/eller hypoksi (Grembowicz, Sprague, & McNeil, 1999; Wernbom, Paulsen, Nilsen, Hisdal, & Raastad, 2012). I en oversiktsstudie av Loenneke, Thiebaud, & Abe, (2014) ble ulike studier som har undersøkt ulike markører for muskelskade oppsummert. Studien oppsummerer at DOMS og en akutt svelling kan forekomme etter SRB, men at disse markørene ikke trenger å bety at det også har forekommet noen form for muskelskade. Muskelsvelling og DOMS sier imidlertid ikke noe om muskelskade på et cellulært nivå (målt med muskelbiopsier), noe som gjør at konklusjonene Loenneke et al. (2014) kommer frem til må vurderes med forsiktighet. To studier viste en redusert kraftgenereringsevne og forlenget restitusjonsperiode etter SRB (Umbel et al., 2009; Wernbom et al., 2012) som begge indikerer en vis grad av muskelskade (Paulsen, Mikkelsen, Raastad, & Peake, 2012). En nylig studie kunne også rapporterte en translokasjon av stressproteiner (HSPs<sup>17</sup>) fra cytosol til strukturer i cytoskjelettet, noe som indikerer at proteiner i cytoskjelettet stresses under SRB (Cumming, Paulsen, Wernbom, Ugelstad, & Raastad, 2014). Dette tyder på at muskelfibrene utsettes for et cellulært stress med denne treningsmetoden. Cumming et al. (2014) kunne imidlertid ikke observere tegn på myofibrillære ødeleggelser og skade som typisk ses etter eksentrisk trening, som videre rekrutterer nye satellitter til regenerering (Paulsen et al., 2012). At rbdomyolyse kan forekomme etter SRB med lav motstand ble imidlertid vist i en casestudie av Iversen & Røstad, (2010).

---

<sup>17</sup> Heat Shock Proteins

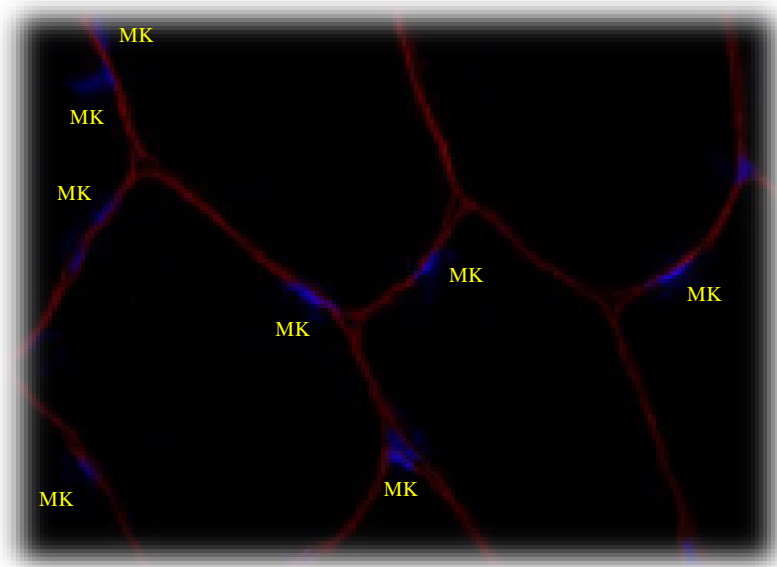


## **2.5 Muskelcellekjerner**

Med en diameter opp til 100  $\mu\text{m}$  og en lengde i desimeter er skjelettmuskelfibrene de største cellene vi har i kroppen. For å kunne håndtere det store cytoplasmiske volumet i hver muskelfiber, inneholder hver muskelcelle flere enn 100 muskelcellekjerner og er en av tre celletype sammen med osteoclaster og cytotroblaster som er flerkjernet (Allen, Roy, & Edgerton, 1999).

### **2.5.1 Identifisering av muskelcellekjerner**

Muskelcellekjerner er lokalisert perifert i muskelfiberen mellom myofibillene og cellekjernemembranet. Et stort antall studier som har undersøkt muskelcellekjerner i skjelettmuskelfibre er basert på konvensjonell histologi på muskelsnitt i lysmikroskop. I denne metoden benyttes DNA-spesifikke fargestoffer for å lokalisere muskelcellekjernene. Et problem med denne metoden er at det er vanskelig å skille mellom kjerner lokalisert på innsiden eller utsiden av muskelcellemembranen. Spesielt satellittceller med deres nære tilhørighet til muskelfiberen kan feiltolkes og telles som en muskelcellekjerne. Med utviklingen av spesifikke antistoffer mot dystrofin og laminin har det blitt enklere å skille mellom muskelcellekjerner og satellittceller. Men selv med dystrofinmerking kan identifiseringen av muskelcellekjerner være problematisk (Bruusgaard et al., 2012). Siden kjernemerkingen er lokalisert tett på og noen ganger over dystrofinmerkingen, så kan forskernes ulike subjektive vurdering av hva som skal telles som en muskelcellekjerne eller ikke variere. Dette kan introdusere feil som kan resultere i usanne konklusjoner (Bruusgaard, Johansen, Egner, Rana, & Gundersen, 2010; Egner, Bruusgaard, Eftestøl, & Gundersen, 2013). Basert studiene til Bruusgaard et al. (2010), (2012) og Egner et al. (2013) er kjerner som er lokalisert å ha sitt geometriske massesenter på innsiden av dystrofinmerkingen, telt som muskelcellekjerner i dette studiet (figur 2,6). En annen begrensning å telle muskelcellekjerner på muskeltverrsnitt er at antall kjerner man lokaliserer kan avhenge av tykkelsen på snittet og størrelsen på hver kerne (Schmalbruch & Lewis, 2000)



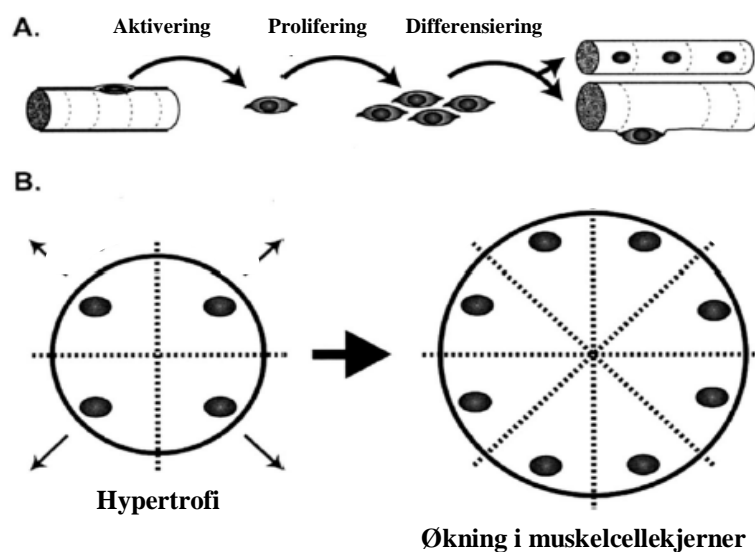
**Figur 2.6** Tellekriterier for muskellekjerne. Kjernens geometriske massesenter måtte lokaliseres på innsiden av dystrofinmerkingen for at kjernene skulle godkjennes som en muskellekjerne, merket med MK. Resisterende kjerner merket uten MK ble ikke vurdert som muskellekjerne. Muskelsnittet ble merket med antistoff mot dystrofin (rødt) og DNA/ kjerner (blått). Snittet ble kuttet 8 $\mu$ m.

## 2.6 Satellittcellens og muskellekjerne rolle ved hypertrofi

Bidraget fra satellittceller til muskelhypertrofi i voksne muskler er et omdiskuterte tema i litteraturen (Pallafacchina, Blaauw, & Schiaffino, 2013). Et sentralt spørsmål er om økning i antall muskellekjerne er nødvendig for å få endringer i muskelfiberstørrelse, slik at ratioen mellom cytoplasma og muskellekjerne (kjernedomene) holdes konstant. Litteraturen er noe tvetydig angående dette spørsmålet. Noen studier viser at hypertrofi er mulig uten en endring i antall muskellekjerne (Blaauw et al., 2009; Kadi et al., 2004b; McCarthy et al., 2011). Andre rapporterer en økning i antall muskellekjerne ved hypertrofi (Adams, Caiozzo, Haddad, & Baldwin, 2002; Allen, Monke, Talmadge, Roy, & Edgerton, 1995; Cheek, Holt, Hill, & Talbert, 1971; Eriksson, Kadi, Malm, & Thornell, 2005; Kadi et al., 1999a, b; Cabric, Apell, & Resic, 1987; McCall et al., 1998; Petrella et al., 2008; Petrella, Kim, Cross, Kosek, & Bamman, 2006; Rosenblatt, Yong, & Parry, 1994; Roy, Monke, Allen, & Edgerton, 1999; Schiaffino, Bormioli, & Aloisi, 1976; van der Meer, Jaspers, Jones, & Degens, 2011)

Siden muskellekjerne er post-mitotiske og derfor ikke kan dele seg, så er det argumentert for at muskelfibrene er avhengig å kunne aktivere satellittcellene i-

forbindelse med hypertrofi eller muskelreparasjon (Kadi et al., 1999; 2005; Relaix & Zammit, 2012). I den multikjernede muskelfiberen er det antatt at hver enkelt muskelcellekjerne regulerer genproduksjonen i et begrenset cytoplasmisk volum i muskelfiberen, også kalt kjernedomene eller DNA-enheten (Cheek et al., 1971; Cheek, 1985). Konseptet om kjernedomene innebærer at DNA-innholdet og cytoplasma øker parallelt, slik at det cytoplasmiske volumet per DNA-enhet holdes konstant (Cheek, 1985) (figur 2,7).



**Figur 2.7** Satellittcellens rolle ved muskelhypertrofi. A: Under hypertrofi, satellittceller i dvale blir aktivert, proliferer og differensierer. Noen datterceller smelter sammen med eksisterende fiber og danner nye muskelcellekjerner (nedre fibre). I enkelte tilfeller ved regenerering, smelter satellittcellene sammen og danner nye muskelfibre (øvre fibre). B: Kjernedomenteorien tyder på at hver muskelcellekjerne syntetiserer proteiner for et lokalt domene i dens umiddelbare nærhet. Derfor blir nye muskelcellekjerner addert gjennom donering av nye satellittceller under hypertrofi for å regulere økning i cytoplasma. Modifisert etter Hawke, (2005).

Viktigheten av satellittcelleadder for muskelhypertrofi er dokumentert i studier der  $\gamma$ -stråling er benyttet som er vist å inhibere den belastningsinduserte hypertrofien (Adams et al., 2002; Rosenblatt & Parry, 1993; Rosenblatt et al., 1994). Disse eksperimentene skal imidlertid tolkes med noe forsiktighet siden  $\gamma$ -stråling potensielt kan influere muskelfiberne i seg selv (Adams et al., 2002). Ytterligere støtte kommer fra studier som har vist at mRNA og store proteiner (eks; proteiner assosiert med golgi og det kontraktile apparatet) holdes nært opprinnelseskjernen, mens mindre løselige proteiner lettere kan spres rundt i cellen (Hall & Ralston, 1989; Pavlath, Rich, Webster, & Blau, 1989; Russell & Dix, 1992). Disse studiene tyder på at det eksisterer en

diffusjonsbegrensning for nukleære produkter, noe som kan begrense området hver enkelt kjerne kan influere cellulære prosesser.

I transgene musemodeller er det vist at en økning i satellittcelleantallet ikke er en forutsetning for muskelhypertrofi (Blaauw et al., 2009; McCarthy et al., 2011; Raffaello et al., 2010). Etter å ha fjernet satellittcellene og utsatt mus for to uker med synergist fjerning, observerte McCarthy et al. (2011) at de satellittcelletømte musklene hadde den samme økningen i muskeltverrsnittsareal som kontrollgruppen. Totalt ble det sett en 32 % økning i kjernedomene i de satellittcelle-tømte musklene, uten et tap av muskelfiberfunksjon. I tråd med dette har humane studier vist at en øking i muskelfiberareal etter tradisjonell tung styrketrening kan forekomme uten en samtidig økning i antall muskelcellekjerner (Aagaard et al., 2001; Hikida, Walsh, & Barylski, 1998; Kadi et al., 2004).

I motsetning kan flere humane studier vise til sterke bevis som demonstrerer nødvendigheten av en muskelcellekjerneøkning etter en lengre periode med hypertrofi (Eriksson, 2005; Kadi et al., 1999a; 1999b). Til støtte for dette har studier mennesker (Hikida et al., 1998; Kadi et al., 1999; Sinha-Hikim et al., 2002) funnet en korrelasjon mellom antall muskelcellekjerner og muskelfiberareal. Det virker som muskelfibrene og kjernedomenet kan vokse inntil en vis grense før det trengs en økning i antall muskelcellekjerner. Flere studier har diskutert en teoretisk grense for økningen i muskelfiberareal og kjernedomene, henholdsvis 26 % og  $2000 \mu\text{m}^{218}$ , før en økning i muskelcellekjerneantallet er nødvendig (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2008; 2006).

---

<sup>18</sup> Tykkelse på snitt;  $6 \mu\text{m}$

## **2.7 Effekten av trening på satellittceller og muskelcellekjerner**

### **2.7.1 Effekten av SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening på antall satellittceller**

På mennesker er det gjort en rekke studier som har undersøkt effekten av tradisjonell tung styrketrening på satellittceller. Noen har sett på endringer i satellittcelleantall akutt og etter korte intervensjoner, mens andre etter flere år med systematisk trening. På SRB med lav motstand er det kun gjennomført én studie hvor man har undersøkt endringer i satellittcelleantallet (Nielsen et al., 2012). Her ble en intensiv og kort treningsintervensjon benyttet.

Flere år med tradisjonell tung styrketrening er vist å øke satellittcelleantallet. Kadi et al. (1999) sammenlignet elitestyrkeløftere og en kontrollgruppe. Resultatene viste at styrkeløftergruppen hadde flere satellittceller per fiber sammenlignet mot kontroll. Til støtte for disse resultatene har flere studier vist at tradisjonell tung styrketrening over 4 til 16 uker kan øke satellittcelleantallet mellom 2,3 og 47 % (gjennomsnitt 30 %). Dette tilsvarer en prosentvis økningen per dag på mellom 0,03 og 1,33 % (gjennomsnitt 0,46 %) (Hanssen et al., 2012; Kadi & Thornell, 2000; Kadi et al., 2004; Mackey et al., 2007; Petrella et al., 2006; Roth et al., 2001). Metodiske forskjeller mellom studiene kan være en årsak til de sprikene resultatene. For eksempel ble ulike merkemeter for å lokalisere satellittcellene benyttet som kan påvirke antallet som telles (Lindström & Thornell, 2009; Mackey et al., 2009; McKay, Toth, Tarnopolsky, & Parise, 2010). Ikke alle finner en satellittcelleøkningen etter tradisjonell tung styrketrening. Etter 16 uker med tradisjonell tung styrketrening på bein, så kunne ikke Hikida et al. (1998) observere en økning i antall satellittceller hos yngre menn og kvinner. I studiene over ble det ikke skilt mellom fibertypene, noe Mackey, Andersen, Frandsen, & Sjøgaard, (2011b) og Verdijk et al. (2009) har gjort i sine studier. Etter 10 uker med tradisjonell tung styrketrening på overkropp observerte Mackey et al. (2011b) en økning i antall satellittceller i type I og II fibrene på 65 og 164 %. Dette var de første studiet som viste at styrketrening kan øke satellittcelleantallet i type I fibrene.

I en studie av Hanssen et al. (2012) og Mackey et al. (2011a) ble effekten av treningsvolum og motstand på satellittcelleresponsen undersøkt. Etter 2 og 11 uker med tradisjonell tung styrketrening viste studien til Hansen et al. (2012) at tre serier på underekstremiteten versus en serie ga en signifikant større økning i antall satellittceller

(2 uker: tre serier; 37 %, en serie; 14 %. 11 uker: tre serier; 44 %, en serie; 19 %).

Mackey et al. (2011a) var den første studien som undersøkte effekten av styrketrening med lav motstand på satellittceller. Etter 12 uker med tradisjonell tung styrketrening på et bein (70 % av 1RM) og styrketrening med lav motstand (15,5 % av 1RM) på det andre beinet på yngre menn, så kunne Mackey og medarbeidere rapportere en økning i antall satellittceller på 31 og 18 %. For beinet som trente tung tilsvarte dette en økning fra 0,12 til 0,15 og beinet som trente lett fra 0,11 til 0,13 satellittceller per fiber.

Økningen var ikke forskjellig mellom beinene.

I 2012 undersøkte Nielsen et al. (2012) effekten av SRB med lav motstand (20 % av 1RM) på satellittceller. Dette var den første studien som studerte satellittcelleresponsen til SRB. Yngre menn gjennomførte tre uker med sammenhengende trening. Biopsier ble tatt fra *m. vastus lateralis* før, etter første treningsuke (mid 8) og 3 og 10 (post 3 og 10) dager etter siste treningsuke og identifisert med Pax7. Pax7<sup>+</sup> celler per type I fibrer økte fra 0,11 (pre) til 0,41 (mid8), 0,36 (post3) og 0,26 (post10), som tilsvarte en økning på 292, 242 og 143 %. Pax7<sup>+</sup> celler per type II fibre økte fra 0,10 (pre) til 0,37 (mid 8), 0,35 (post 3) og 0,23 (post 10), som tilsvarte en økning på 276, 264 og 143 %.

Resultatene til Nielsen et al. (2012) indikerer at høyfrekvent SRB med lav motstand kan rekruttere til en større satellittcelleøkning etter én uke sammenlignet mot tradisjonell tung styrketrening over 8-16 uker. Treningsmetoden viser også at den effektivt kan øke satellittcelleantallet i type I fibre. Satellittcelleantallet er rapportert å øke ~ 30 – 140 % innen 24-48 timer i respons til en akuttøkt med eksentrisk belastning (Cramer et al., 2004; Dreyer et al., 2006; McKay et al., 2010; Paulsen et al., 2010). Sammenlignet med økningen i antall satellittceller Nielsen et al. (2012) observerte etter 5 dager (7 økter), kan dette gi inntrykk av hvilket potensial SRB med lav motstand har for å øke satellittcelleantallet på kort tid. I alle akutt-studiene ble NCAM benyttet til å identifisere satellittcellene. Man kan derfor ikke utelukke at økningen kan komme av en svelling av satellittcellen (Wernbom et al., 2013). Svelling kan imidlertid også forekomme når Pax7 benyttes om satellittcellemarkør (Gregory & Chb, 2004).

**Tabell 2.3** Oversikt over studier på SRB og tradisjonell tung styrketrening på endring i satellittcelleantall. Akuttstudier øverst, deretter intervensjonsstudier.

Studie	Kjønn	n (alder)	Trening- status	Økter/ uke	Trenings- periode (uker)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	% endring i satellittcelle	Metode
Crameri et al. 2004	M	8 25±3	Utrente	-	Akutt-økt	10-50	0-10	Eksentrisk	-	IHC: NCAM NB
Dreyer et al. (2006)	M	9 23-35	Utrente	-	Akutt-økt	92	-	Eksentrisk	+141 %	IHC: NCAM NB
Wernbom et al. (2013)	M/K	7 26±1	Trente	-	Akutt- økt	Ut- mattelse	3	30	+33-53%	IHC: NCAM RB
Hikida et al. (1998)	M	7 22,5±5.8	Utrente	2-3	8	3-5	4	-	+25 %	Elektron-mikroskop NB
	M	8 65±6	Utente	2	16	6-8	3	-	+18 %	Elektron-mikroskop NB
Kadi et al. (1999a)	M	10 27.7±7.5	Godt trente	-	-	3-12	4-7	-	-	IHC: Lau 19 NB
Kadi & Thornell, (2000)	K	9 38±6	Utente	3	10	10-12	3	-	+45.9 %	IHC: Lau 19 NB
Roth et al. (2001)	M/K	14 20-30	Utente	3	9	-	5	-	34.8 % til sammen for begge grupper!	Elektron-mikroskop NB
	M/K	15 60-75	Utente	3	9	-	5	-		Elektron-mikroskop NB
Kadi et al. (2004)	M	24 24±1	Utrente	3	12	6-12	4-5	-	+31.4 %	IHC: CD56 NB
Petrella et al. (2006)	M/K	26 20-35	Utente	3	16	8-12	3	80	49 %	IHC: NCAM NB
Mackey et a. (2007)	M/K	29 70-82	Utrente	3	12	8-15	3	~62-80	27 %	IHC: NCAM NB
Verdijk et al. (2009)	M	14 72±2	Utente	3	12	8-15	4	60-80	Type II: 76 %	IHC: CD56 NB

**IHC: immunhistokjemi. NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule. SC56: cluster of differentiation. 56 Pax7: Paired box protein 7. RB: redusert blodtilførsel. NB: Normal blodtilførsel.**

Tabell 2.3 Fortsettelse.

Studie	Kjønn	n (alder)	Trening- status	Økter/ uke	Trenings- periode (uker)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	% endring i satellittcelle	Metode
Mackey et al. (2011a)	M	12 25±3	Utrente	3	12	8	10	70	31%	IHC: CD56 NB
	M	Kontroll- bein	Utente	3	12	36	10	15.5	18%	IHC: CD56 NB
McKay et al. (2010)	M	12 21±2	Utente	-	Akutt-økt	10	30	Eksentrisk	Pax7 og NCAM: 36 og 28 %	IHC: Pax7 og NCAM NB
Paulsen et al. (2010)	M/K	33 26±5	Trente	-	Akutt-økt	14	5	Eksentrisk	-	IHC:CD56 NB
Mackey et al., (2011b)	K	18 44±8	Utente	3	10	8-12	3	-	Type I og II: 64 og 164 %	IHC: Pax7 NB
Nielsen et al. (2012)	M	20 22±2	Utente	7	3	Ut- mattelse	-	20	Type I og II: 143.5 og 143.9 %	IHC: Pax7 RB
Hanssen et al. (2012)	M	10 26±2	Utrente	3	11	10-7	3	-	2 uker; 37. 11 uker; 44%	IHC:CD56 NB
	M	11 26±1	Utente	3	11	10-7	1	-	2 uker; 14 %. 11 uker; 19 %	IHC: CD56 NB

**IHC: immunhistokjemi. NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule. SC56: cluster of differentiation. 56 Pax7: Paired box protein 7. RB: redusert blodtilførsel. NB: Normal blodtilførsel.**



### **2.7.2 Effekten av SRB med lav motstand versus tradisjonell tung styrketrening på antall muskelcellekjerner**

I humane studier ser det ut til at addering av nye muskelcellekjerner først finner sted ved en markant muskelhypertrofi. (Hikida et al., 1998; Kadi & Thornell, 2000; Kadi et al., 2004; Mackey et al., 2011a; Olsen et al., 2006, 2008). Dette indikerer at disse faktorene henger sammen i skjelettmuskelfibrene, noe som støttes av Kadi et al. (2004) og Petrella et al. (2006). Imidlertid er det observert at moderat muskelfiberhypertrofi kan forkomme uten en addering nye muskelcellekjerner (Kadi et al., 2004).

Muskelcellekjernerrespons til SRB med lav belastning er derimot kun undersøkt i en studie (Nielsen et al., 2012).

Etter 10 uker med tradisjonell tung styrketrening observerte Kadi og Thornell (2010) en 70 % økning muskelkjerneantall. Forfatteren registrerte også en signifikant korrelasjon mellom gjennomsnittlig antall kjerner per muskelfiber og tverrsnittsarealet rundt fibre. Denne studien indikerer at endringer i fiberstørrelse er assosiert med endring i kjerneantall. Dette støttes av Petrella et al. (2006), som konkluderte med at muskelfiberhypertrofien han observerte (+27 %) var et resultat av en inkorporering av nye muskelcellekjerner (+19 %) etter 16 uker med tradisjonell tung styrketrening på bein hos yngre menn. I en studie av Petrella et al. (2008) kom ytterligere bevis for at tradisjonell tung styrketrening kan rekruttere til en økning i muskelcellekjerneantallet. Etter å ha benyttet en kluster-analyse observerte forfatteren at gruppen som oppnådde størst muskelhypertrofi (+57 %) også hadde den største økningen i antall muskelcellekjerner per fiber (+26 %). I en studie av Hanssen et al. (2012) ble effekten av treningsvolum (ett sett versus tre sett på underekstremiteten) på muskelcellekjernerresponsen undersøkt, der tradisjonell tung styrketrening ble gjennomført. Hansen et al. (2012) kunne ikke finne noen forskjell mellom gruppene, men en økning for begge grupper etter 2 og 11 uker med trening fra baseline. Dette viser at tradisjonell tung styrketrening både resulterte i en tidlig, men også mer stabil økning i antall muskelcellekjerner. Etter andre treningsuke ble det også observert en signifikant reduksjon i kjernedomene, uten en samtidig økning i muskelfiberareal. Dette kan indikere at økningen i muskelcellekjerner kommer før hypertrofien, som er et motsatt tidsforløp Petrella et al. (2006; 2008) dokumenterer for i sine studier. Det er imidlertid vert å bemerke at det bare ble tatt biopsier før og etter intervensjonen i studiene til Petrella et al. (2006; 2008).

Ikke alle studier finner en økning i antall muskelcellekjerner. Etter 12 uker med tradisjonell tung styrketrening på bein registrerte Kadi et al. (2004) ingen signifikante endringer i antall muskelcellekjerner. I studien ble det observert en muskelhypertrofi på 17 % og signifikant økning i kjernedomene. Forfatteren mente at hypertrofien som ble oppnådd i studien ikke var av stor nok størrelse til å sette hver enkelt kjerne under press. At de eksisterende kjernene hadde kapasitet til å øke proteinsyntesen for å støtte den moderate økningen i cytoplasma. Mackey et al. (2011a) kom frem til samme konklusjon. I studien gjennomførte yngre menn 12 uker med tradisjonell tung styrketrening (70 % av 1RM) på et bein og styrketrening med lav motstand (15,5 % av 1RM) på det andre beinet. I motsetning til Mackey et al. (2011a) observerte Nielsen et al. (2012) en signifikant økning i antall muskelcellekjerner for begge fibertyper da styrketrening med lav motstand ble kombinert med redusert blodstrøm. Etter 1 og 3- og 10 dager etter siste treningsuke økte muskelcellekjerneantallet fra baseline (2,34) til 3,11, 2,98 og 2,99 muskelcellekjerner per fiber som tilsvarte en økning på 33, 27 og 28 %. Muskelcellekjerner per type II fibre økte fra baseline (2,65) med 3,43 etter første treningsuke og 3,43 og 3,23 tre og 10 dager etter siste treningsuke, som tilsvarte en økning på 29, 29 og 22 %. Resultatene til Nielsen et al. (2012) indikerer at SRB med lav motstand kan stimulere til en tilsvarende økning i antall muskelcellekjerner etter én uke sammenlignet mot tradisjonell tung styrketrening over 10-16 uker (tabell 2,4). Studiet til Nielsen et al. (2012) er også det første humane studiet som viser en lik økning i antall muskelcellekjerner per fiber i begge fibertyper. Nielsen et al. (2012) fant også en signifikant sammenheng mellom endringer i antall muskelcellekjerner per fiber og endringer i muskelfiberareal.

**Tabell 2.4** Oversikt over studier på SRB og tradisjonell tung styrketrening på endring i muskelcellekjerner. Skrift i kursivformat er kontrollgruppe og/eller bein for de gjeldene studiene.

Studie	Kjønn	n (alder)	Trening- status	Økter/ uke	Trenings- periode (uker)	Reps (per serie)	Serier	Motstand (% av 1RM)	% endring i muskel- cellekjerner	Metode
Kadi & Thornell, (2000)	K	9 38±6	Utente	3	10	10-12	3	-	70 %	IHC NB
Kadi et al. (2004)	M	24 24±1	Utrente	3	12	6-12	4-5	-	IS	IHC NB
Petrella et al. (2006)	M/K	13 20-35	Utente	3	16	8-12	3	80	19 %	IHC NB
Petrella et al (2008)	M7K	17 20-35/ 60-75	Utente	3	16	8-12	3	80	26 %	IHC NB
Mackey et al. (2011a)	M	12 25±3	Utrente	3	12	8	10	70	IS	IHC NB
	M	<i>Kontroll- bein</i>	<i>Utente</i>	3	12	36	10	15.5	IS	NB
Nielsen et al. (2012)	M	20 22±2	Utente	7	3	Ut- mattelse		20	Type I og II: 28 og 22 %	IHC RB
Hanssen et al. (2012)	M	10 26±2	Utrente	3	11	10-7	3	-	2 uke.; ca 15 %. 11 uker; ca 18 %.	IHC, DAPI NB
	M	11 26±1	Utente	3	11	10-7	1	-	2 uker, ca 14 %. 11 uker; ca 3 %	IHC: DAPI NB

**IHC: immunhistokjemi. IS: ikke signifikant. RB: redusert blodtilførsel. NB: Normal blodtilførsel.**

## **2.8 Oppsummering**

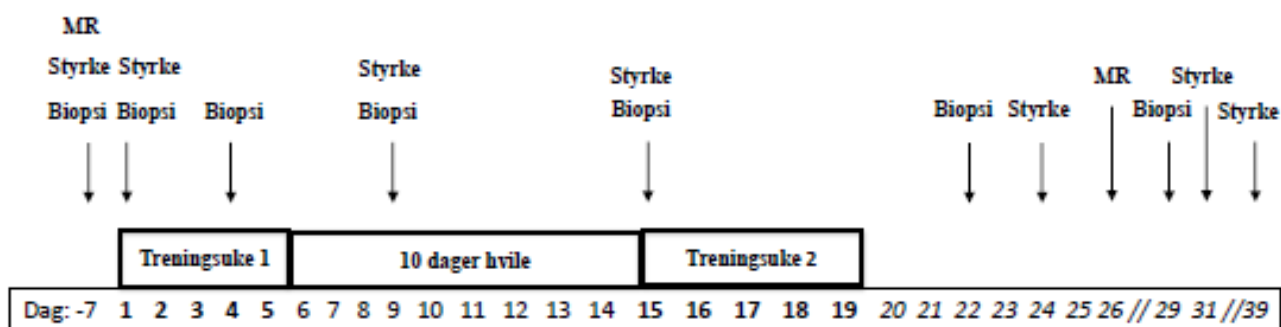
Det er godt dokumentert at tradisjonell tung styrketrening fra 3-16 uker kan stimulere til økning i antall satellittceller, muskelcellekjerner, hypertrofi og styrkefremgang. SRB med lav motstand er en relativt ny treningsmetode og har vist å gi en like stor hypertrofi og styrkefremgang som tradisjonell tung styrketrening. Kun en studie har undersøkt effekten av SRB med lav motstand på satellittceller og muskelcellekjerner (Nielsen et al., 2012). Etter fem dager med trening (syv økter) observerte Nielsen et al. (2012) en stor satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealøkning på lik linje eller større enn det som er sett etter tradisjonell tung styrketrening. For samtlige variabler stagnerte imidlertid responsen etter første treningsuke. I denne sammenheng er det interessant å undersøke om en hvileperiode lagt inn etter første treningsuke kan resette systemet og bidra med en ytterligere økning for de nevnte variablene.

### 3. Metode

Datainnsamlingen til denne masteroppgaven var en del av et større prosjekt kalt «Okklusjon 3» som ble gjennomført på Norges idrettshøgskole høsten 2013.

#### 3.1 Studiedesign

I forkant av treningsintervensjonen gjennomførte forsøkspersonene tilvenning til styrketestene, prebiopsier og pretester. Etter en ukes opphold startet første treningsperiode med styrketrening med redusert blodstrøm (SRB) der de trente syv økter i løpet av fem dager (figur 3,1). Deretter fulgte en ti dager lang hvileperiode før de igjen gjennomførte en treningsbolke på syv økter fordelt på fem dager.



Figur 3.1 Studiedesign.

##### 3.1.1 Utvalg

Til sammen 12 forsøkspersoner (tabell 3,1) meldte seg frivillig til studien. To forsøkspersoner trakk seg underveis på grunn av årsaker ikke relatert til studiet. For å kunne delta i studien ble det satt ulike inklusjons- og eksklusjonskriterier (tabell 3,2).

**Tabell 3.1** Antropometriske data av forsøkspersonene.

	Menn (n=7)	Kvinner (n=3)
<b>Alder (år)</b>	24 år (2)	23 år (2)
<b>Høyde (cm)</b>	182 cm (7)	173 cm (5)
<b>Vekt (kg)</b>	85 kg (10)	67 kg (2)

Alle verdier er gjennomsnitt (SD)

**Tabell 3.2** Inklusjons -og eksklusjonskriterier for deltagelse i studien.

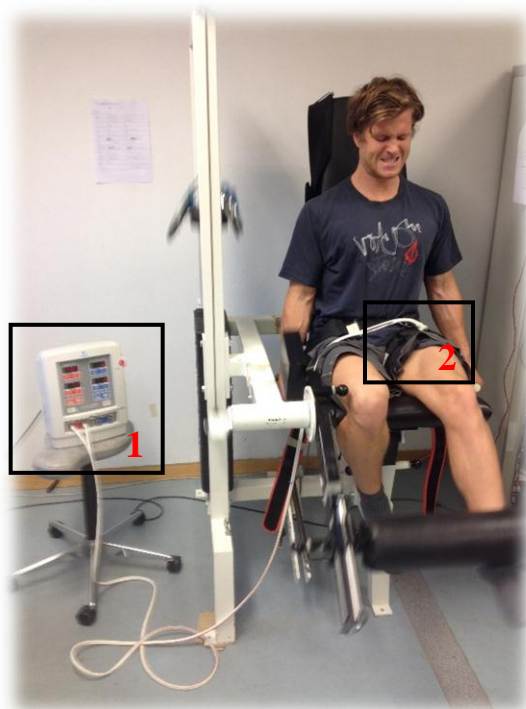
Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menn og kvinner mellom 20 og 35 år</li> <li>- Ikke drevet med regelmessig styrketrening på lårmusklene de siste 6 måneder (<math>\leq 1</math> økt hver annen uke).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Skader i muskelskjelettapparatet som hindrer de i å gjennomføre treningen</li> <li>- Bruk av medikamenter og/ eller kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende) under treningsperioden</li> </ul>

### 3.1.2 Rekruttering av forsøkspersoner

Forsøkspersoner ble rekruttert fra høgskoler og Universitetet i Oslo der informasjon om studiet ble distribuert gjennom plakater, studentmail, sosiale medier, informasjon via forelesninger og stands. Det ble i forkant av studiet holdt informasjonsmøte og alle forsøkspersoner fikk utdelt skriftlig informasjon om studien (vedlegg 1).

## 3.2 Treningsprotokoll

Styrketrening med redusert blodtilførsel (SRB) ble utført med en 135 mm pneumatisk mansjett (9-7350-003, Delfi Medical, Vancouver BC, Canada) som ble plassert proksimalt på låret (figur 3,2).



**Figur 3.2** Styrketrening med redusert blodtilførsel (SRB) i kneekstensjons- apparat. 1: 135 mm pneumatisk mansjett. 2: Datastyrt torniquetsystem.

Mansjetten var koblet opp til et datastyrt torniquetsystem (Zimmer A.T.S. 2000, USA) som kontrollerte at trykket ble holdt tilnærmet konstant under gjennomføring av treningen. Trykket i mansjetten ble satt til 100 mmHg for menn og 90 mmHg for kvinner. Forsøkspersonene gjennomførte en kort oppvarming uten okklusjon (15 repetisjoner med 5 kg motstand) før fire serier med unilateral kneekstensjon ved en belastning på 20 % av 1RM til utmattelse. Det var lagt inn 30 sek pause mellom seriene. Høyre bein ble trent før venstre, avskilt med fem minutters pause. Mansjettrykket ble opprettholdt under hele gjennomføringen, og ble sluppet opp umiddelbart etter det fjerde settet var gjennomført. Hastighet på muskelaksjonene ble satt til 1 sekund konsentrisk og 1 sekund eksentrisk, kontrollert ved hjelp av en metronom (korg metronome MA-30. Kina). Den totale arbeidsvinkelen var satt fra 90° og opp til 10° kneekstensjon (0° = full ekstensjon). Ingen tilvenning av SRB ble gjennomført i forkant av treningsukene, men forsøkspersonene fikk prøve mansjetten før oppstart av studien. For å måle endring i blodstrøm både med og uten okklusjon ble blodstrøm før og etter treningsintervensjonen målt like distalt for mansjetten i *a. femoralis* og *a. superficialis*, der det ble benyttet et doplersystem (Vivid 7. GE Vingmed Ultrasound, Horten). I gjennomsnitt ble blodstrømmen redusert før og etter intervensjonen med henholdsvis

66±13 % og 64±17 % med en minste og største verdi på 41 % og 82 % før intervensjonen og 34 % og 88 % etter intervensjonen.

### **3.3 Styrketester**

Styrketestene ble utført dag -7, 1, 9, 15, 24 (post 5), 31 (post 12) og 39 (post 20) (figur 3,1). Individuelle innstillinger av styrkeapparatene ble registrert under tilvenning og brukt ved senere testing. Styrketestene ble innledet med en generell oppvarming bestående av 5 min sykling der wattbelastning ble standardisert for å kunne bruke samme belastning ved senere testing. Til å regne ut treningsbelastningen ble baselineverdien fra tilvenningen og pretestene benyttet.

#### **3.3.1 Maksimal isokinetisk og isometrisk kneekstensjon**

De isokinetiske<sup>19</sup> og isometriske<sup>20</sup> testene ble gjennomført i et dynamometer (HUMAC 2009 NOMR CSM). Testing and Rehabilitation System. USA) (figur 3,3). Den isokinetiske testen og oppvarmingen hadde kun fokus på ekstensjonsdelen og forsøkspersonene ble instruert om ikke å yte muskelkraft under fleksjonsdelen. Den spesifikke oppvarmingen bestod av fire sammenhengende isokinetiske repetisjoner på 60 grader i sekundet, der forsøkspersonene gradvis økte kraften. Testen ble gjennomført med totalt tre repetisjoner ved samme hastighet. Bevegelsesutslaget var 95 °, fra 95° fleksjon til full ekstensjon. De maksimale isometriske testene ble gjort etter de isokinetiske testene. Testene ble gjennomført på tre ulike vinkler, 90°, 80° og 70°. Der det ble testet to repetisjoner med 5 sekunders varighet per vinkel, med 60 sekunders mellomrom. Under testingen ble forsøkspersonene instruert til å yte maksimalt til testleder ga beskjed.

---

<sup>19</sup> Bevegelseshastigheten i leddet er konstant

<sup>20</sup> Ingen bevegelse i leddet





*Figur 3.3 Dynamometer benyttet til isokinetiske -og isometriske styrketester. 1: Dynamometer.*

### **3.3.2 1 repetisjon maksimum (1RM) kneekstensjon**

1 RM-testen ble gjennomført i kneekstensjonsapparat (GYM 2000 Gym Equipment) og ble alltid gjort etter den isometriske testen. Stolen ble stilt inn slik at forsøkspersonene fikk omdreiningspunktet til apparatet i samme linje som omdreiningspunktet i kneleddet (med utgangspunkt i den laterale epikondylen) og fotputen plassert rett over ankelen. Sikkerhetssele ble benyttet rundt livet under testing og forsøkspersonene holdt armene langs siden. Under testingen ble høyre bein testet før venstre, uten pause mellom beinene. For at 1 RM skulle godkjennes måtte kneleddet nå en vinkel på  $10^{\circ}$  eller lavere ( $0^{\circ}$  = full ekstensjon) med en startvinkel på  $90^{\circ}$ . For å kontrollere dette, ble høyden på vektmagasinet kontrollert mot et referansepunkt for hver forsøksperson. Den spesifikke oppvarmingen bestod av tre sett med henholdsvis 10 (50 % av 1RM), 6 (70 % av 1RM) og 3 repetisjoner (80 % av 1RM). Den tyngste vekten forsøkspersonene klarte å løfte i én godkjent repetisjon, ble registrert som deres 1 RM. 1 RM fra baseline testen ble benyttet til å regne ut treningsmotstanden (20 % av 1 RM).

### 3.4 **Magnetresonans**

MR undersøkelse av lårene ble gjennomført en uke før intervensjonen og en uke etter treningsintervensjonen (figur 3,1). Målingene ble gjennomført i en MR-maskin (Siemens MAGNETOM Avanto, A Tim+Dot System 1,5-T) hvor samtlige muskler i quadriceps (*m. vastus lateralis* (VL), *m. vastus medialis* (VM), *m. vastus intermedius* (VI) og *m. rectus femoris* (RF)) ble analysert på totalt 9 snitt. Musklene ble analysert med 5 mm tykke snitt med 39,7 til 40,0 mm mellom hvert snitt. Dataprogrammet OsiriX (OsiriX medical imaging software, OsiriX, Atlanta, USA) ble benyttet til å analysere tverrsnittet (CSA) til musklene. Mest distale snitt ble lagt 40 mm ovenfor leddspalten i kneleddet, og hadde ikke alltid synlig muskelvev. Fra det mest distale snittet, ble bildene tatt med 39,7 til 40,0 mm intervaller proksimalt oppover på låret. Det mest proksimale snittet ble tatt 35,95mm proksimalt for leddspalten i kneet på femur. I tilfellene der grensene mellom musklene var vanskelig å skille, ble et MR-atlas (Möller & Reif, 2007) benyttet som veiledning.

### 3.5 **Ultralyd**

Muskeltykkelse av *m. vastus lateralis* (VL) og tverrsnittareal (CSA) av *m. rectus femoris* (RF) ble målt ved hjelp av ultralyd (Philips HD11XE Ultrasound system). Ultralyd ble målt i forkant av alle treningsdagene foruten akuttdagene, der det ble undersøkt både før og etter treningsøkten. Målinger ble også gjennomført på dager der det kun ble tatt muskelbiopsi og 1RM-test. Under målingene lå forsøkspersonene på en undersøkelsesbenk, og var totalt avslappet i underekstremiteten. Muskeltykkelse av VL ble målt midt på låret og ble definert som halvparten av distansen mellom trochanter major og det mest distale punktet av VL. For å sikre reliable målepunkter ble en transparent benyttet, og samtlige punkter ble merket på huden med en vannfast tusj. For å analysere bildene ble ImageJ software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) benyttet.

### 3.6 Måling på muskelfibernivå

For å studere endringer på cellenivå ble det tatt vevsprøver fra begge bein i *m. vastus lateralis* før, under og etter intervensjonen (figur 3,1).

#### 3.6.1 Muskelbiopsier

Biopsiområdet (hud og muskelfascien) på *m. vastus lateralis* ble først bedøvet (Xylocain-adrenaline, 10 mg\*ml<sup>-1</sup> + 5 µg \*ml<sup>-1</sup>, AstraZeneca, Södertälje, Sverige) og vasket med desinfiserende væske. Et 15-20 mm snitt gjennom huden og muskelfascien ble gjort med skalpell. Muskelvevet ble hentet ut med en 6 mm steril Bergstrømnlå koblet til en 50ml sprøyte, og det ble tatt ut 200-300 mg muskelvev per biopsi. Muskelvevet ble deretter fordelt til følgende analyser: fosforylering av signalmolekyler, mRNA, elektronmikroskopi (EM) og homogenat. Til immunhistokjemi (IHC) ble vevsbiter som hadde de mest parallelle og rette fibre benyttet. Bitene ble først bearbeidet der eventuelt bindevev og fett ble dissekert bort, før de ble skåret vinkelrett med barberblad og lagt i en form med stabiliserende lim (Tissuetek, O.C.T. compound, Sakura, Nederland). Umiddelbart fulgte en nedfrysning av formen med IHC-biten i isopentan, som var forhåndskjølt til ~ - 140 °C på flytende nitrogen (~ - 190°C). Formene ble deretter lagt i kryostat (CM 3050, Leica Microsystems; Nussloch, Tyskland) (~ - 22° C) før de ble lagret i ultrafryser (~ - 80° C).

#### 3.6.2 Snitting av muskelbiopsier

Muskelbiopsiene ble tatt ut av ultrafryseren (- 80°C) og lagt i kryostat (CM 1950, Leica Microsystems; Nussloch, Tyskland) i 1 time sammen med annet utstyr (pinsetter, pensler, skalpell) som benyttes under snitting. Kryostaten holdt en temperatur på ~ - 22° C. Vevsbiten ble så festet til en kutteskruer med tissuetek (Tissue-Tek. O.C.T Compound, USA) før kutteskruen ble montert til kryostaten. Vevsbiten ble trimmet for å sjekke kvalitet på snittene og få en klar kutteflate. Snittene ble kuttet med en tykkelse på åtte µm og plassert på Superfrost Plus Mikroskopglass (Menzel-Glaser, Brouschweig, Germany). Alle muskelbiopsiene fra samme forsøksperson ble fordelt på ett objektivglass. Vevsbitene ble lagt i den tidsrekkefølgen de ble tatt i fra pre til siste biopsi (figur 3,4). For hver forsøksperson ble det laget 15 nabosnitt.

<b>H. Bein</b> nr 1/Pre nr 2/Akutt1 nr 4/Dag9 nr 6/Post3	+
<b>V. Bein</b> nr 1/Pre nr 3/Dag4 nr 5/Akutt2 nr 7/Post10	-

*Figur 3.4 Muskelbiopsiene fra hver forsøksperson ble plassert på objektivglasset i den tidsrekkefølgen de ble tatt i fra pre til siste biopsi (1-7).*

### 3.6.3 Immunhistokjemi

For å kunne identifisere ulike strukturer på snittet ble det brukt spesifikke antistoffer (tabell 3,3). Dobbelmerking<sup>21</sup> ble benyttet for å kunne identifisere ulike strukturer på samme snitt. Tre ulike dobbelmerkinger ble benyttet på hver enkelt biopsi. Merkingen foregikk dermed i tre omganger der tre nabosnitt fra biopsiene ble benyttet (tabell 3,4). Ved dårlig merking av snittene eller hvor snittene er av dårlig kvalitet, ble hele merkeprosessen gjentatt, på et nytt glass.

Alle merkemethodene begynte med at snittene ble tatt ut av fryseren, tint og tørket og lagt på en benk i romtemperatur (RT). Etter 15 min legges en ring med en PAP<sup>22</sup>- penn (OmmEdge PEN. Vevtor Laboratories, Inc) rundt snittene etterfulgt av innkubering i BSA<sup>23</sup> i 45 min (NCAM+ Laminin og SC71 + Dystrofin) i RT eller 10 min (Pax7 + Laminin) i RT i egen proteinblokker (tabell 3,3). BSA ristes av og tørkes med et lofritt tørkepapir (Kimtech Science, Precision Wipes Tissue Wipers) slik at glassene var klare for påføring av primærantistoff. Samtlige antistoffer ble fortynnet i BSA etter riktige blandingsforhold (tabell 3,3), før de ble applisert med pipptette på snittene. For komplett merkeprosedyre se vedlegg 2.

<sup>21</sup> Kombinerer flere antistoffer på samme snitt

<sup>22</sup> Lipidepenn; ble benyttet for å lage lipidringer som fungerer som en barriere slik at antistoffet lå innenfor og direkte oppå snittene

<sup>23</sup> Bovine Serum Albumin; et plasmaprotein fra kveg som blokkerer uspesifikke bindingssteder på muskelvevet.

**Tabell 3.3** Primær -og sekundær antistoff og proteinblokker som benyttes til IHC.

	<b>Antistoff</b>	<b>Produsent</b>	<b>Lot</b>	<b>Bindes til</b>	<b>Vertsydyr</b>	<b>Fortynning</b>
<b>Primær-antistoff</b>	<i>Anti- NCAM</i>	ABCCam	GR 132194-2	Neural cell Adhesion molecule	Mus, monoclonal	1:200
	<i>Anti- laminin</i>	Dako	00090772	Laminin	Kanin, polyclonal	1:400
	SC-71	-	DSHB	Myosin heavy chain II	Mus, monoklonal	1:1000
	<i>Anti- Dystofin</i>	ABCCam	831009	Dystrofin	Kanin, polyklonal	1:500
	<i>Anti- Pax7</i>	DSHB	-	Satellittcellens kjerne	Mouse, monoklonal	1:100
<b>Sekundær-antistoff</b>	Alexa 488	Invitogen	1008801	Monoklonalt antistoff av mus	Geit antimus, monoklonal	1:200
	Alexa 594	Invitogen	1008648	Polyklonalt antistoff av kanin	Geit antimus, polyklonal	1:200
<b>Protein-blokker</b>	-	DAKO	10082504	-	-	Ferdig-blandet
<b>Cellekjerne-markør</b>	DAPI	Invitogen	-	DNA	-	-

#DAPI er ikke et antistoff, men en cellekjernemarkør

**Tabell 3.4** Nabosnitt dobbeltmerket med ulike antistoffer for hver forsøksperson.

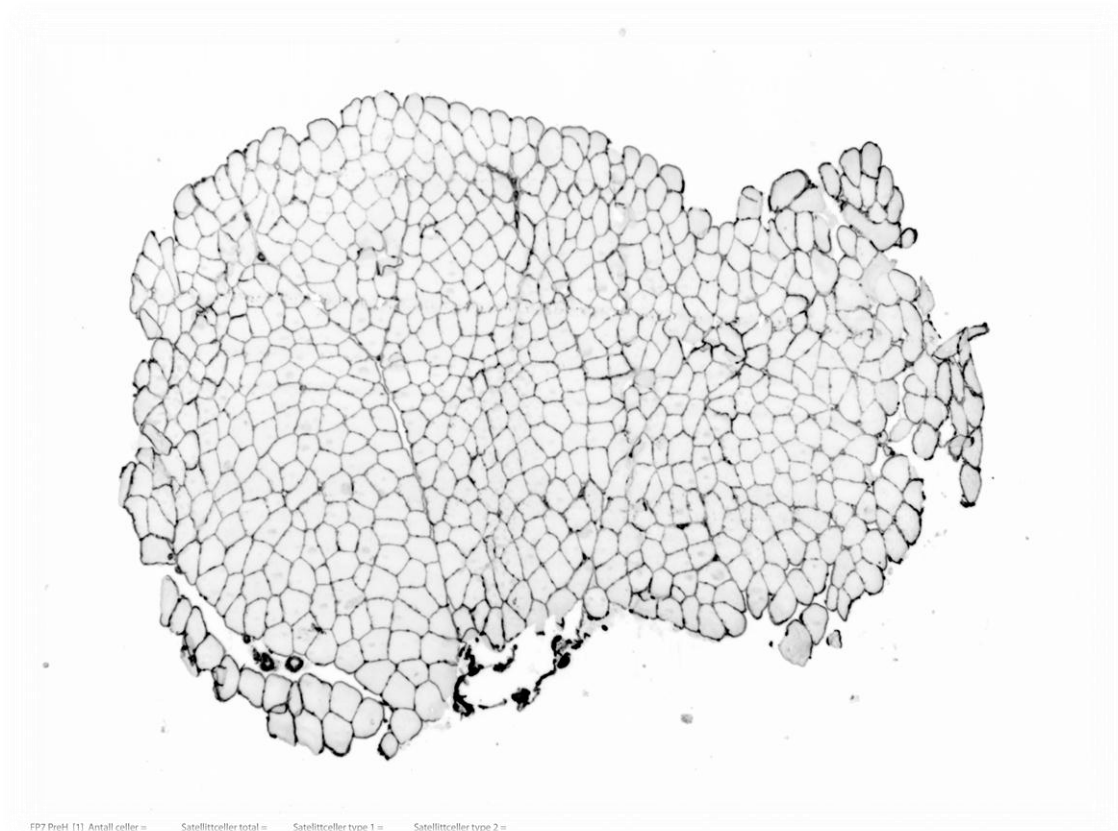
Snitt- nr	Antistoff
Snitt nr.1	NCAM + Laminin
Snitt nr.2	SC71 + Dystrofin
Snitt nr.3	Pax7 + Laminin

På grunn av støy i merkingen ble nabosnitt nummer én merket på ny for forsøksperson nummer to og ni. Nabosnitt nummer fire ble da benyttet for disse to.

#### 3.6.4 Mikroskopi

Et lysmikroskop (Olympus BX61, Japan) tilkoblet en fluoriserende lyskilde (EXFO, X1120PC-Q, Canada) ble benyttet til å kvantifisere de merkede snittene. Mikroskopet hadde også tilkoblet et digitalt kamera (Olympus DP72, Japan) som tok bilder av snittene. Ved å ta bilder med hvert filter, for så å sette sammen bildene, kan man se kolokalisering av merking. Både kamera og mikroskop blir styrt av Cell-F (Olympus, Japan) software for Windows XP (Microsoft, USA).

For å få en oversikt over snittet ble først et svart-hvitt bilde (eller deler av snittet ved store snitt) med 4x forstørrelse og texas-red filter som slipper igjennom lys fra lamininmerkingen, der nabosnittet én merket med NCAM og laminin tatt. Bildet ble invertert i Cell-F før det ble skrevet ut på papir (blueprint), og fungerte som et kart over snittet (figur 3,5).



**Figur 3.5** Blueprint, muskelsnitt merket med laminin. Invertert i Cell<sup>^</sup>F.

#### **3.6.4.1 Kvantifisering av muskelfiberantall**

Fibre ble ekskludert på bakgrunn av ulike kriterier (tabell 3,5) før identifisering av satellittceller og muskelcellekjerner. Telling av fibre ble gjort manuelt ved å merke hver fiber på blueprinten med en penn, samtidig som det blir trykket på et telleapparat (Laboratory Counter). Alle hele fibre på blueprinten blir telt, bortsett fra de fibre som fyller en eller flere av eksklusjonskriteriene (tabell 3,5). De telte muskelfibre ble brukt til å finne antall satellittceller per muskelfiber og hvilken fibertype de tilhørte.

**Tabell 3.5** Eksklusjonskriteier for muskelfibre.

---

<b>Eksklusjon av fibre</b>
Fibre hvor det er brudd på membranen
Fibre hvor snittet er brettet
Fibre som ligger utenfor det samlede snittet
Fibre som ligger skjevt og dermed er kuttet på tvers (avlang form)
Fibre med unormal form (skarpe kanter/hjørner)
Skadde fibre (frostskafer)

---

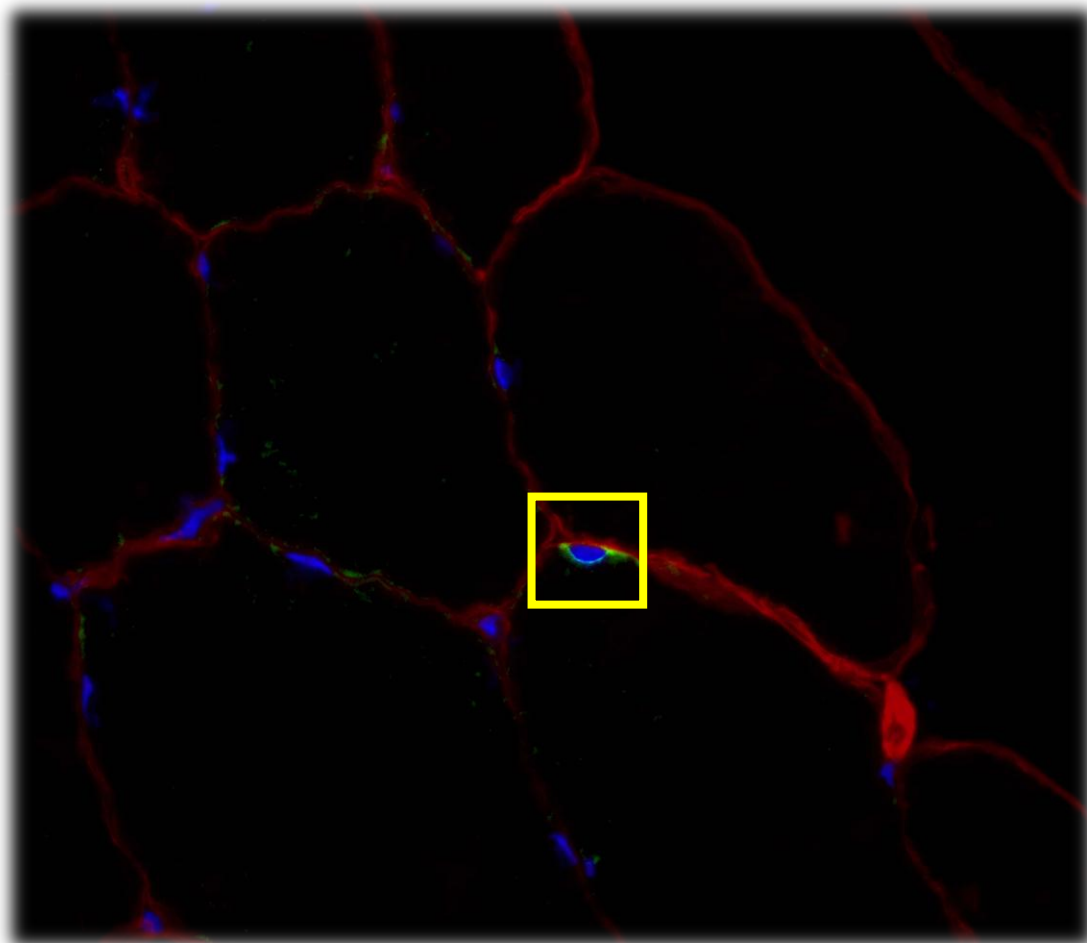
#### **3.6.4.2 Kvantifisering av satellittceller**

Kvantifisering av satellittceller ble gjort på nabosnitt nummer en og to merket mot satellittceller (NCAM og Pax7) og laminin. Telling og registrering av satellittceller skjer ved å studere snittet direkte i mikroskopet. Når satellittcellen lokaliseres i mikroskopet merkes den av på nøyaktig samme sted på blueprinten (figur 3,5). På denne måten unngår man dobbelttelling av den samme satellittcellen. Ulike tellekriterier måtte innfris for at en satellittcelle kunne registres. For nabosnitt merket med NCAM (figur 3,6) eller Pax7 (figur 3,7) måtte henholdsvis tre og to tellekriterier innfris (tabell 3,6 og tabell 3,7). Satellittcellen ble vurdert som positiv dersom den innfridde de gjeldene inklusjonskriteriene. Alle satellittceller telles manuelt etter at de er registrert. Det ble ikke telt satellittceller på ekskluderte fibre. Satellittceller blir presentert som antall per muskelfiber.



**Tabell 3.6** Tellekriterier for satellittceller merket med NCAM.

Inklusjonskriterier for satellittceller merket med NCAM
NCAM -merkingen danner minst 75 % eller mer av ringen
NCAM -merkingen ligger innenfor lamininmerkingen
DAPI -merking som ligger oppå og følger/ fyller NCAM merkingen

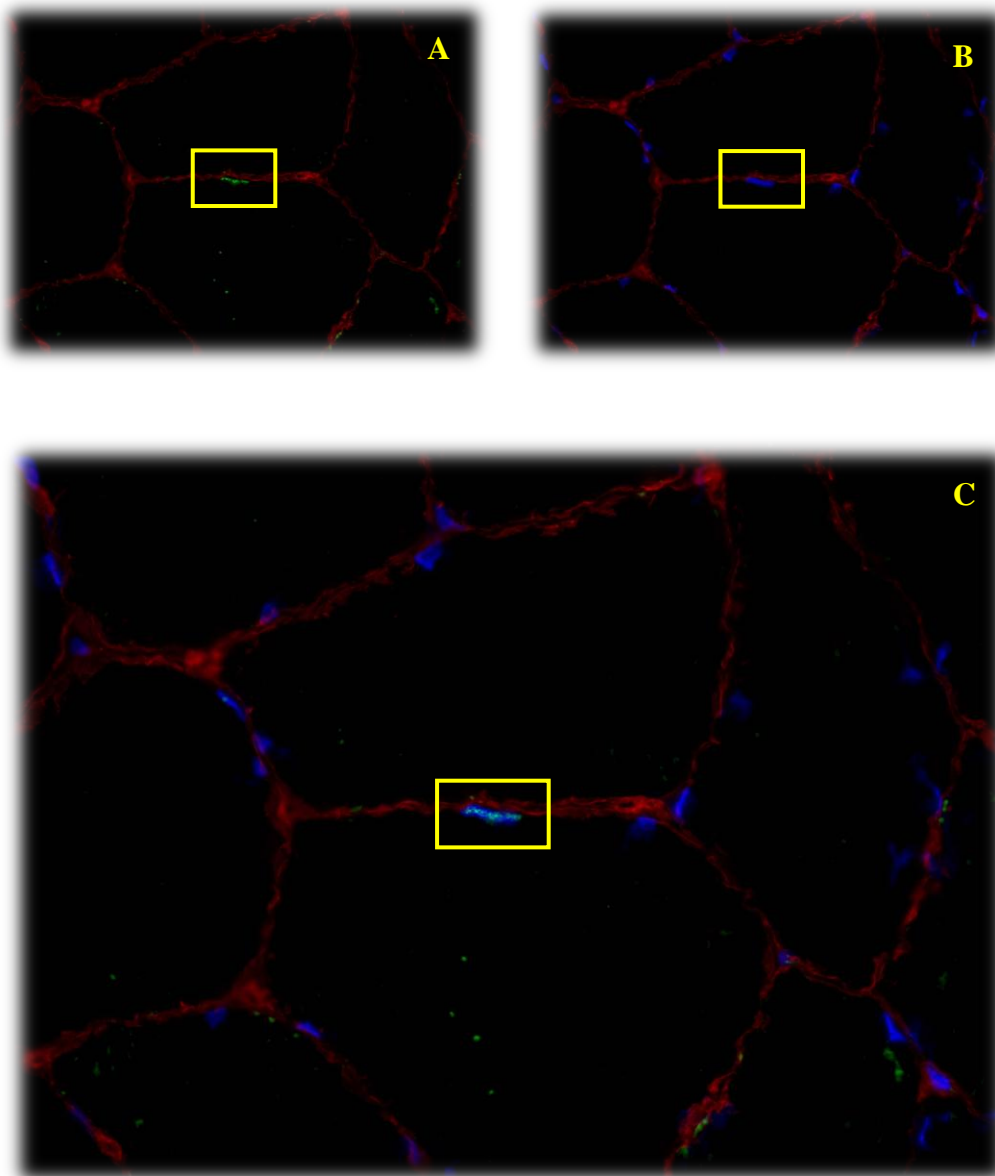
**Figur 3.6** Satellittcelle (inne i gul firkant) som fyller alle tre inklusjonskriteriene for å bli telt som satellittcelle (NCAM positiv celle). Lysegrønn merking/ring = NCAM, rød merking = laminin og blå merking = DAPI.

**Tabell 3.7** Tellekriterier for satellittceller merket med Pax7.

---

Inklusjonskriterier for satellittceller merket med Pax7
DAPI -merking som ligger oppå og følger/ fyller Pax7 merkingen
Pax7 -merkingen ligger innenfor lamininmerkingen

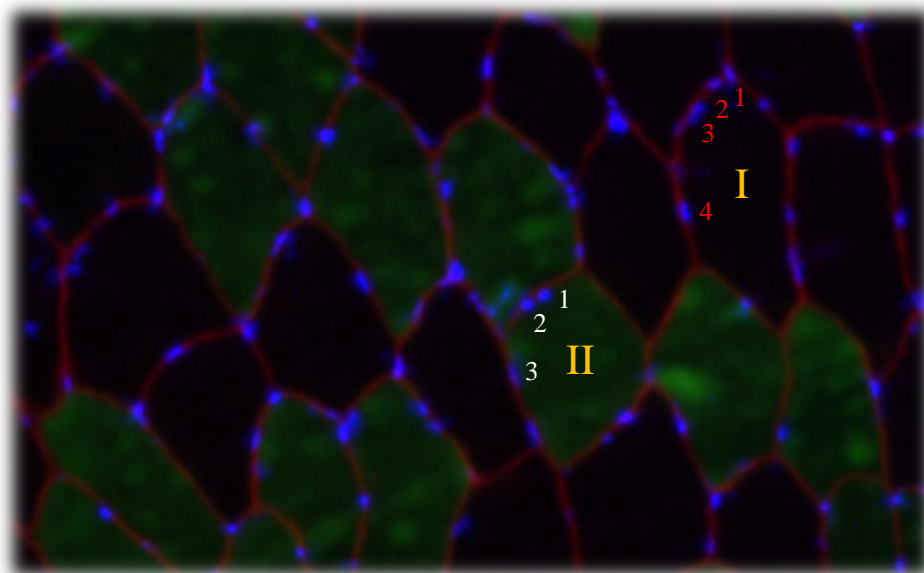
---



**Figur 3.7** Satellittceller (inne i gul firkant) som fyller begge inklusjonskriteriene for å bli telt som satellittcelle (Pax7 positiv celle). A: Rød merking= laminin, grønn merking= Pax7. B: Rød merking= laminin, blå merking= DAPI. C: S sammensatt bilde; laminin + Pax7 + DAPI.

### 3.6.4.3 Kvantifisering av muskelcellekjerner

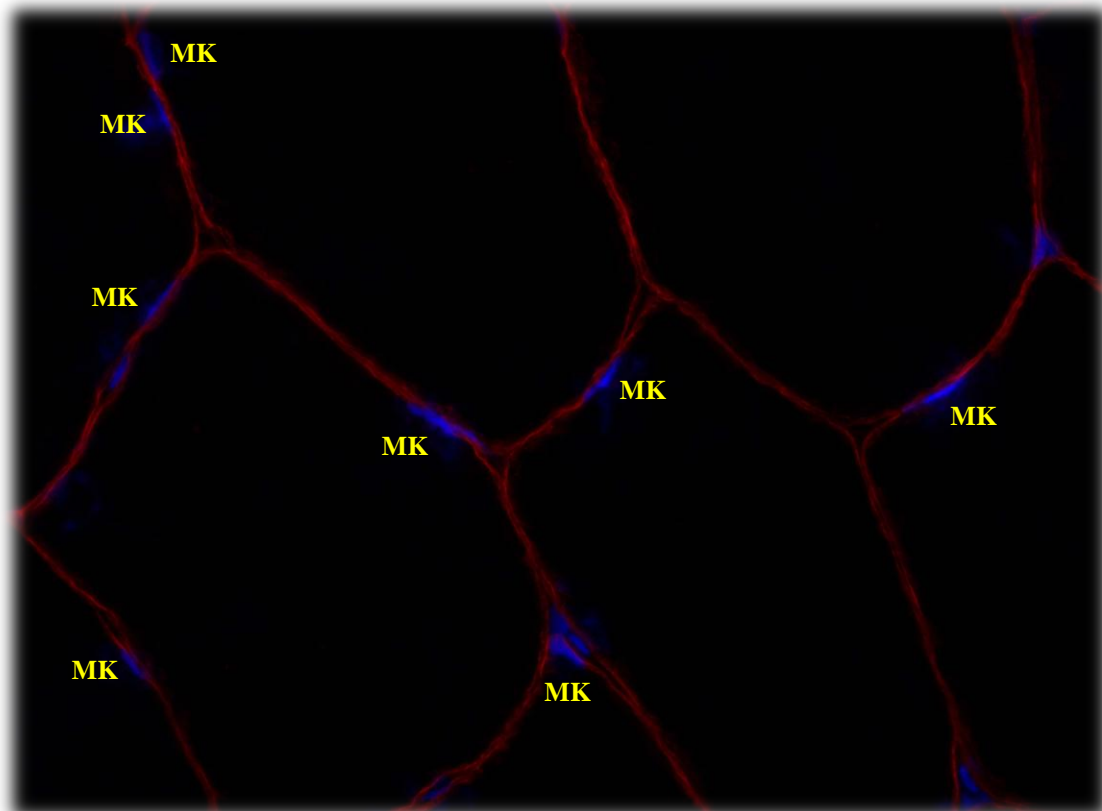
Kvantifisering av muskelcellekjerner ble utført slik at de videre kunne relateres til fibertype I eller II der nabosnitt nummer to merket med SC71- og dystrofin ble benyttet (figur 3,8). Det ble funnet minst 50 muskelfibre av både type I og II fra tilfeldig område på snittet for å oppnå tilfredstilene statistisk styrke. I motsetning til Mackey et al. (2009) er det her lagt inn en margin, da de rapporterte at 25 fibre av hver fibertypene er tilstrekkelig for å bestemme antall muskelcellekjerner. Et bilde med SC71, dystrofin og DAPI (cellekjerner) merking med 4x forstørrelse ble tatt fra samme sted med det påmonterte kameraet på mikroskopet og satt sammen i Cell<sup>^</sup> F. Det sammensatte bilde ble videre overført til et dataprogram (fiji), der kjernene ble telt manuelt direkte på pc-skjermen (figur 3,8). For at en cellekerne kunne godkjennes måtte inklusjonskriteriet innfris (tabell 3,8). Siden snittene er kuttet med åtte µm tykkelse har bildene noe ”dybde”. En mulig konsekvens av dette er ujevnheter i membranens lengderetning som kan forårsake at merkingen blir veldig bred. Bilde ble forstørret rundt den aktuelle cellekjernen dersom dette ble oppdaget på snittet. Dette for å fastslå om det geometriske senteret for cellekjernemerkingen ble lokaliseringen på innsiden dystrofinmerkingen (figur 3,9). Muskelcellekjerner presenteres som antall cellekjerner per muskelfiber.



**Figur 3.8** Telling av cellekjerner. Snitt merket mot dystrofin (rød merking), MHC II (grønn merking) og DAPI (blå merking). Romertall indikerer fibertype I og II. Hvide tall markerer muskelcellekjerner i type I fibre, røde tall i type II fibre.

*Tabell 3.8* Tellekriterier for cellekjerener (DAPI).

Inklusjonskriterier for cellekjerener
Geometriske senteret lokalisert innenfor dystrofin merkingen



*Figur 3.9* Blå merking = DAPI (muskelcellekjernemerking) og rød merking = dystrofin. Muskelcellekjerener merket med MK ble konkludert å ha sitt geometriske senter (cellekjernesenter) på innsiden av dystrofinmerkingen.

#### 3.6.4.3.1 Utregning av kjernedomene

Kjernedomene ble regnet ut ved å dele antall satellittceller på muskelfiberareal for av fibertypene.

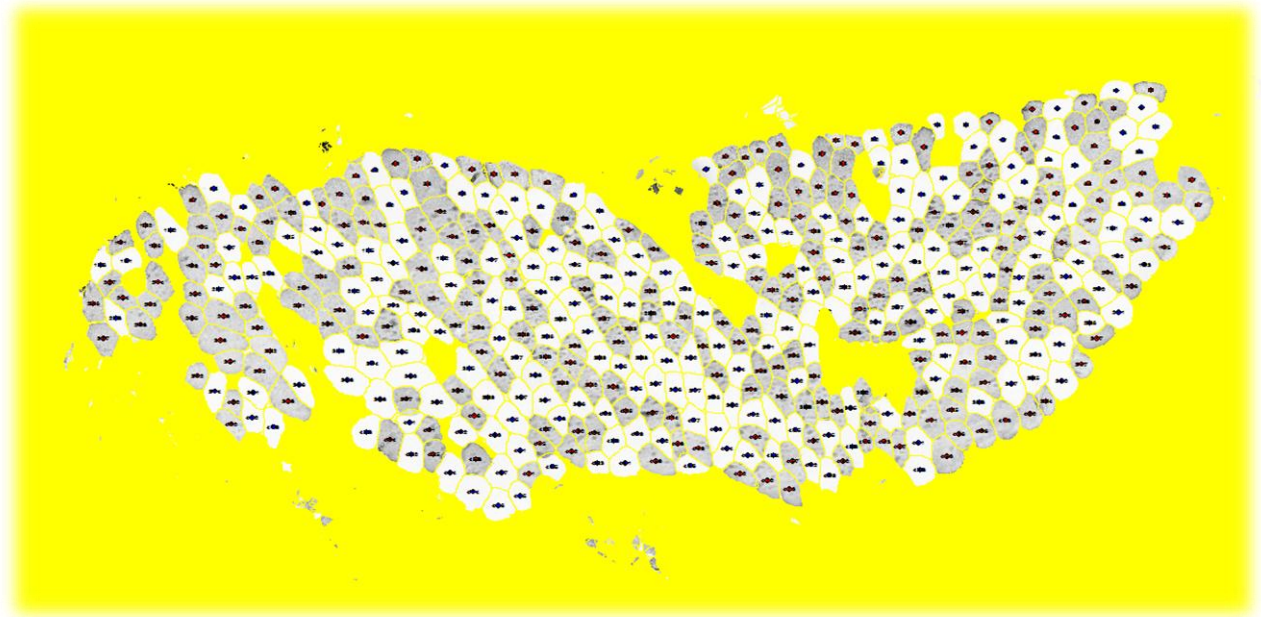
#### 3.6.4.4 Kvantifisering av muskelfibertype og muskelfiberareal

Antistoffene som ble benyttet til å merke satellittceller og fibertype er monoklonale, så de kunne ikke merkes på samme snitt for å kvantifisere satellittceller relatert til type I og II fibre. De snittene med satellittcellemerking ble dermed kontrollert opp mot nabosnitt med muskelfibertypemerking, og der hver fiber inneholdt en eller flere satellittceller på bluprinten ble funnet igjen på muskelfibertypesnittet i mikroskopet.

Kvantifisering av muskelfibertype og muskelfiberareal ble gjort på nabosnitt nummer to merket mot fibertype (SC-71) og dystrofin. Et svart-hvitt bilde med texas-red filter (dystrofin) og et med FITZ filter (SC-71) ble tatt på nøyaktige samme sted på snittet med 4x forstørrelse. Bildene ble invertert i Cell<sup>F</sup> og lagret hver for seg, før de videre ble behandlet med bildeprogramvaren TEMA (ChekVision, Hadsund, Danmark). I TEMA ble intensiteten på SC-71 merkningen analysert for å bestemme fibertype, mens muskelfiberareal analyseres ved at programmet regner ut arealet innenfor dystrofinmerkningen (figur 3,10). Muskelfibre som hadde en eller flere av eksklusjonskriteriene ble ekskludert fra kvantifiseringen (tabell 3,9). Snitt med mindre en 50 fibre av en eller begge fibertyper ble også ekskludert. Resultater ble presentert som muskelfiberareal i type I og type II fibre, og totalt muskelfiberareal type I og II fibre.

**Tabell 3.9** Eksklusjonskriterier for muskelfibre som behandles i TEMA.

<b>Eksklusjonskriterier for muskelfibre</b>
Muskelfibre som ligger i ytterkant
Muskelfibre som ikke er hele (ufullstendig dystrofinmerking)
Muskelfibre med unormal form
Muskelfibre som lå brettet over hverandre



*Figur 3.10* Kvantifisering av muskelfibertype –og areal i TEMA. Muskelfibre med grå merking er type II fibre. Ikke merkede fibre (hvite) med blått punkt i midten er type I fibre.

### 3.7 Statistikk

Studien ble gjennomført som et før- etter design med parede sammenligninger, så dataene ble analysert med en enveis-ANOVA med repeterte målinger. Det ble også benyttet en Tukey post hoc test. Gjennomsnitt av prebiopsi for høyre og venstre bein er brukt som baseline ved utregning av alle data. Basert på normalfordelingen av data ble parametrisk test valgt. Alfa nivået ble satt til 0,05 og resultatene er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik (SD). Pearson r ble benyttet til å regne ut korrelasjoner. Analysene ble gjort i Microsoft Excel 2013 (Microsoft Excel [computer software] Redmond, WA, USA.) og Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

## 4. Resultater

Før treningsperioden starter var det ingen signifikant forskjell mellom høyre og venstre bein i 1 RM eller maksimal dreiemoment i isokinetisk kneekstensjon (tabell 4,1).

**Tabell 4.1** Baselineverdier for muskelstyrke målt som 1RM og maksimal dreiemoment i isokinetisk (moment ved 60 g/s) kneekstensjon for høyre og venstre bein. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  standardfeil.

1 RM (Kg)		Maksimalt dreiemoment	
Høyre	Venstre	Høyre	Venstre
70 $\pm$ 17	71 $\pm$ 15	199 $\pm$ 56	189 $\pm$ 56

Det var signifikant flere cellekjerner per muskelfiber i type II fibre sammenlignet mot type I fibre før treningsperioden startet ( $p=0,05$ ). Kjernedomene og muskelfiberareal var signifikant større for type II fibre sammenlignet mot type I fibre ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ , tabell 4,2).

**Tabell 4.2** Baselineverdier for satellittceller (NCAM og Pax7), muskelcellekjerner, kjernedomene og muskelfiberareal, for type I og II fibre. Tallene presenteres som  $n$  per muskelfiber  $\pm$  standardfeil. \* signifikant forskjell fra type I fibre.

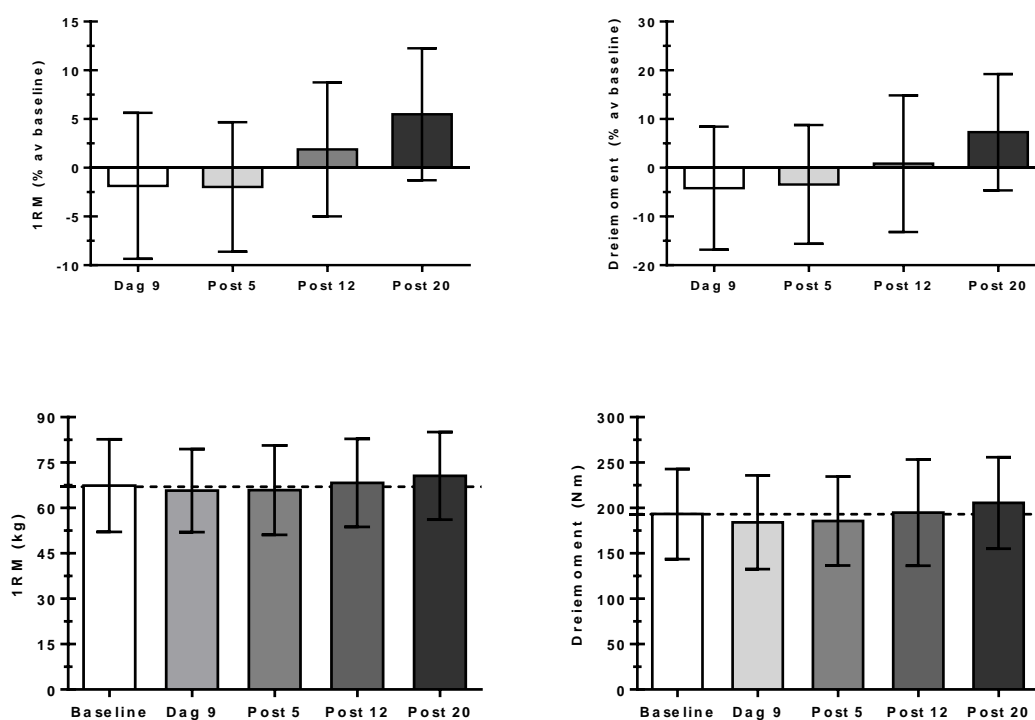
	Type I fibre	Type II fibre
Satellittceller (Pax7) (Ant/per fiber)	0,036 $\pm$ 0,007	0,036 $\pm$ 0,015
Satellittceller (NCAM) (Ant/per fiber)	0,027 $\pm$ 0,018	0,032 $\pm$ 0,011
Cellekjerner (Ant/per fiber)	3,3 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,4*
Kjernedomene ( $\mu\text{m}^2$ )	1538 $\pm$ 99	1773 $\pm$ 224*
Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ )	4689 $\pm$ 373	5933 $\pm$ 816*

## 4.1 Muskelstyrke

### 4.1.1 1RM og MVC

Det var ingen signifikant økning etter første eller andre treningsuke i muskelstyrke målt som 1 RM (figur 4,1).

For maksimalt dreiemoment i isokinetisk kneekstensjon ble det ikke funnet signifikant økning etter første treningsperiode, men funnet en økning fra dag 9 til post 20 for absolutte og relative verdier ( $p < 0,05$ ) (figur 4,1).



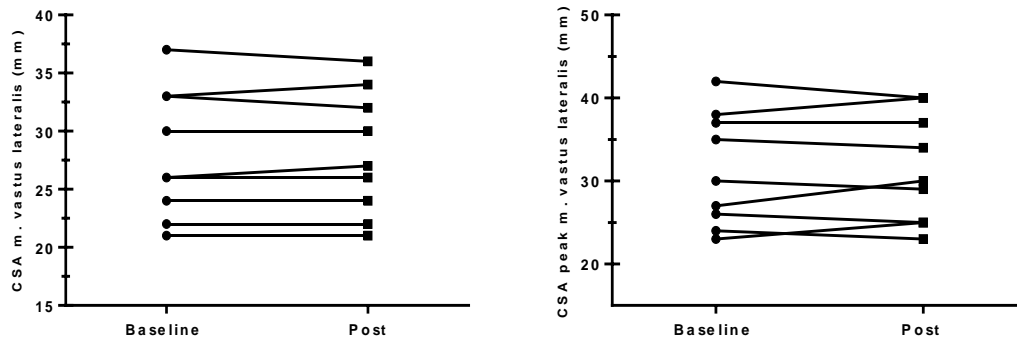
**Figur 4.1** Absolutt endring i muskelstyrke målt som 1RM i kneekstensjon (høyre) og maksimal dreiemoment i isokinetisk (60 grader/sekund) kneekstensjon (venstre). Prosentvis endring i innfelt figur. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.



## 4.2 Muskelstørrelse på m. Vastus lateralis

### 4.2.1 Muskelverrsnittareal

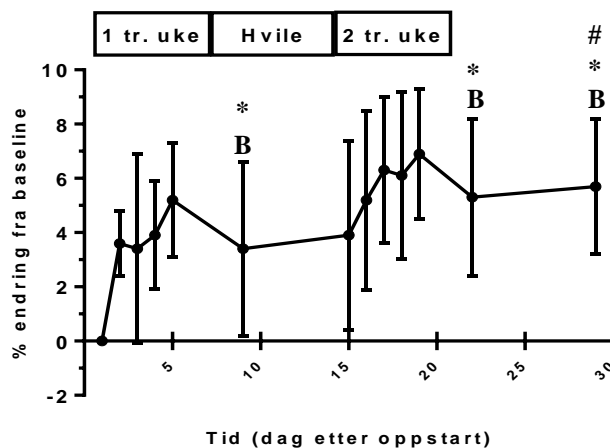
Det gjennomsnittlige muskeltverrsnittareale (CSA) av VL, samt det høyeste målte muskeltverrsnittareale (peak CSA) var uforandret etter treningsperioden ( $0,2 \pm 1 \text{ cm}^2$  og  $0,43 \pm 1,6 \text{ cm}^2$ , figur 4,2).



**Figur 4.2** Individuelle tverrsnitt (CSA) for m. vastus lateralis (høyre) og peak tverrsnitt (CSA) for m. vastus lateralis (venstre) ved baseline og 7 dager etter siste treningsøkt (post).

### 4.2.2 Muskeltykkelse

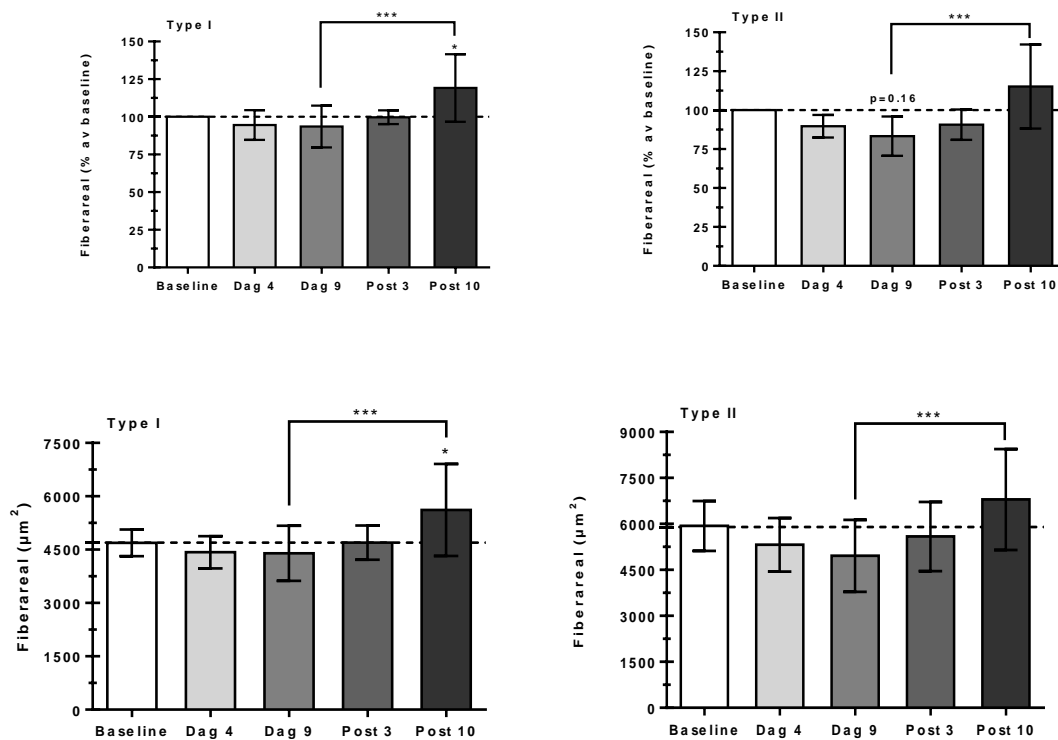
Muskeltykkelse i VL høyre bein økte fra baseline til dag 9, post 3 og post 10 med  $3,3 \pm 2,1 \%$ ,  $5,3 \pm 1,8 \%$  og  $5,7 \pm 2,5 \%$  ( $p=0,01$ ) (figur 4,3).



**Figur 4.3** Endring i tykkelse av m. vastus lateralis. Tidspunkter merket med B ble det tatt biopsi samme dag. \* Signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,05$ ). # Signifikant forskjell fra dag 9 ( $p = 0,02$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.

### 4.3 Muskelfiberareal

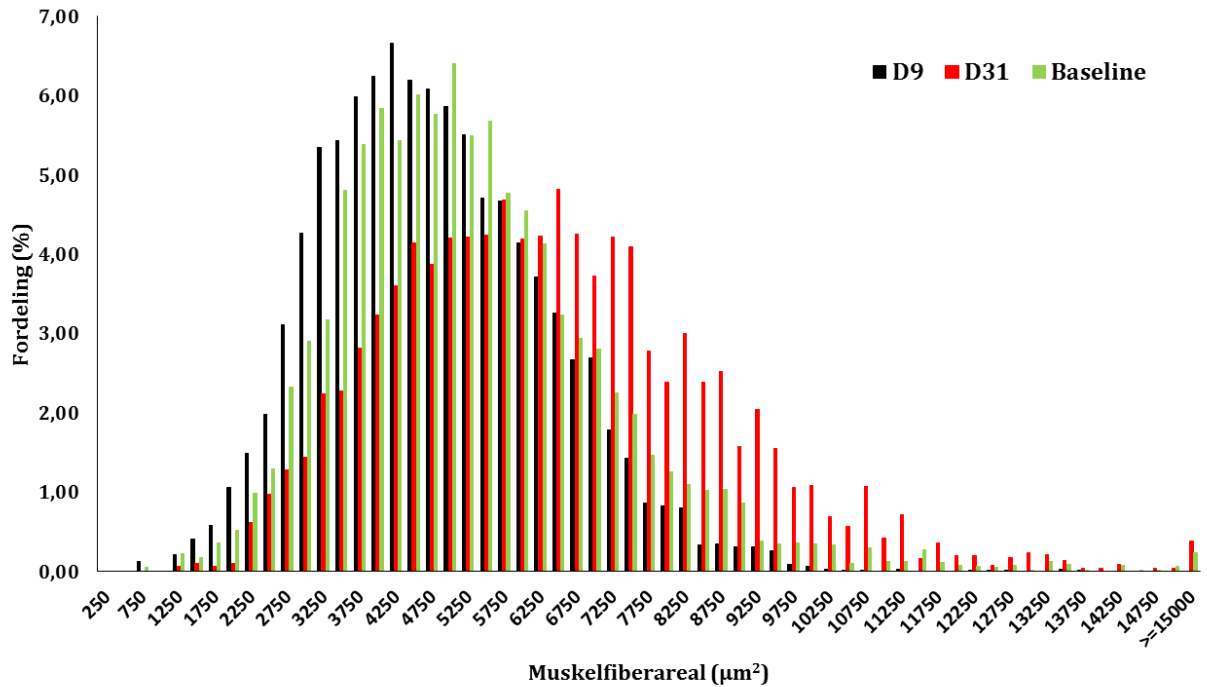
I gjennomsnitt ble 638 fibre (288 for type II fibre og 350 for type I fibre) per snitt analysert for muskelfiberareal. Muskelfiberareal målt på tverrsnitt fra biopsier økte med  $19 \pm 23$  % i type I fibre ( $p=0,04$ ) men økte ikke signifikant ( $15 \pm 27$  %, i type II fibre  $p=0,24$ ) fra baseline til post 10. For type I og II fibre ble det fra dag 9 til post 10 funnet en økning på  $25 \pm 23$  % og  $32 \pm 27$  ( $p<0.01$ ). Det var en tendens til redusert muskelfiberareal i type II fibre etter første treningsuke fra baseline  $-17 \pm 13$  % ( $p=0,16$ ) (figur 4,4).



**Figur 4.4** Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ ) målt gjennom oppfølgingsperioden for type I fibre (venstre) og type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p=0.05$ ). \*\*\* signifikant forskjell fra dag 9 ( $p<0.01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.

### 4.3.1 Frekvensdiagram: Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ )

Frekvensdiagram for muskelfiberareal før (Baseline), etter første (D9) og andre (D31) treningsuke (figur 4,4).



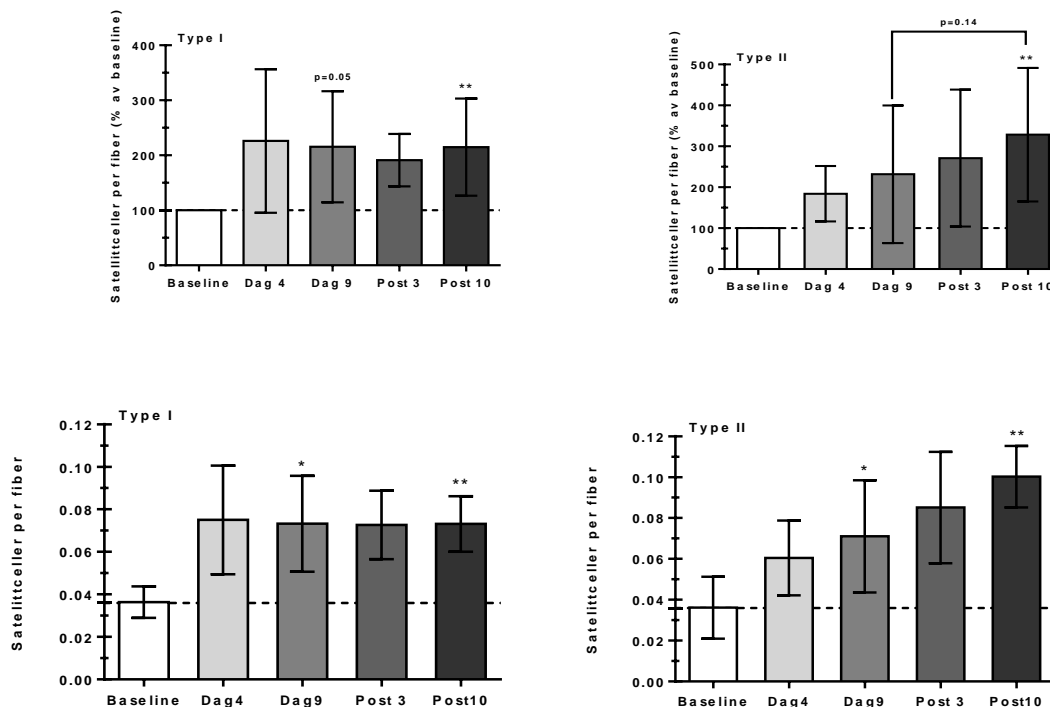
**Figur 4.5** Frekvensdiagram for muskelfiberareal før, etter første og andre treningsuke.

#### 4.4 Satellittceller

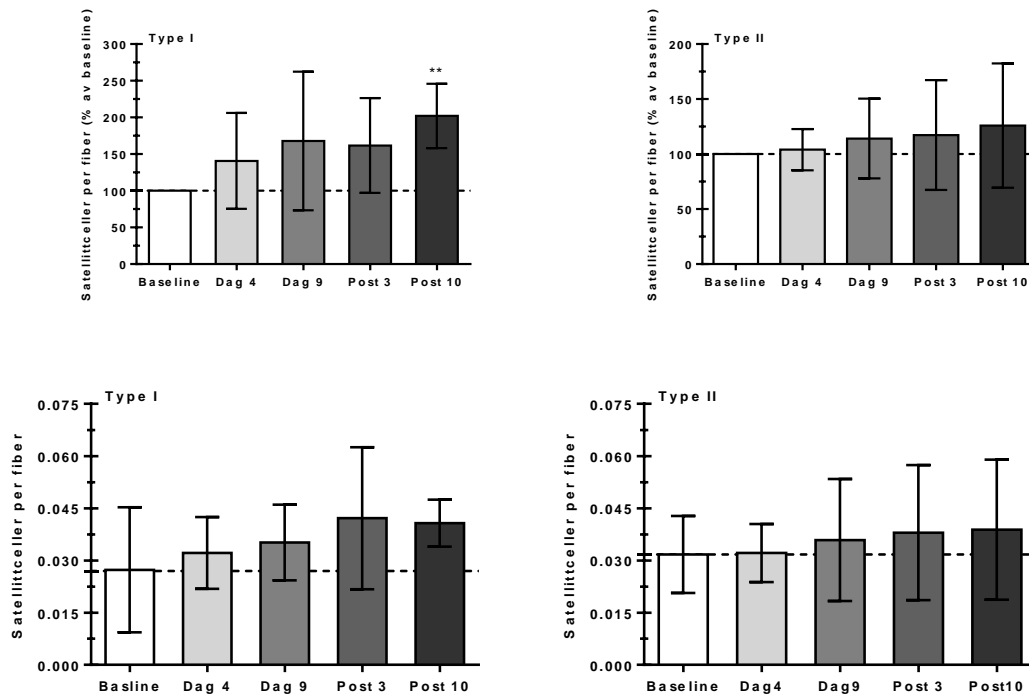
De snittene som ble analysert for satellittceller merket med Pax7 og NCAM inneholdt i gjennomsnitt 673 og 714 fibre (type I; 316 og 321, type II; 357 og 393).

Fra baseline økte antall Pax7 positive satellittceller i type I fibre signifikant etter første treningsuke med  $115 \pm 101$  % ( $p=0.01$ ), for deretter å stagnere etter andre treningsuke (forsatt  $115 \pm 95$  % fra baseline,  $p=0.03$ ) (figur 4,6). Det var en tendens til at antall Pax7 positive celler økte jevnt gjennom hele treningsperioden i type II fibre, og på siste biopsi var det en økning på  $228 \pm 174$  % ( $p=0.02$ ) fra baseline og  $97 \pm 35$  % ( $p=0.14$ ) fra dag ni. Etter trening ble det funnet flere Pax7 positive celler for type II fibre sammenlignet mot type I, henholdsvis  $0,10 \pm 0,01$  og  $0,07 \pm 0,01$  satellittceller per fiber (figur 4,6).

Antall NCAM positive celler økte jevnt gjennom hele treningsperioden i type I fibre, og på siste postbiopsi var økningen på  $102 \pm 48$  % ( $p<0.01$ ). Det var ingen økning NCAM positive celler for type II fibre gjennom hele treningsperioden (figur 4,7).



**Figur 4.6** Antall satellittceller merket med Pax7 per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p<0.05$ ). \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p<0.01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.

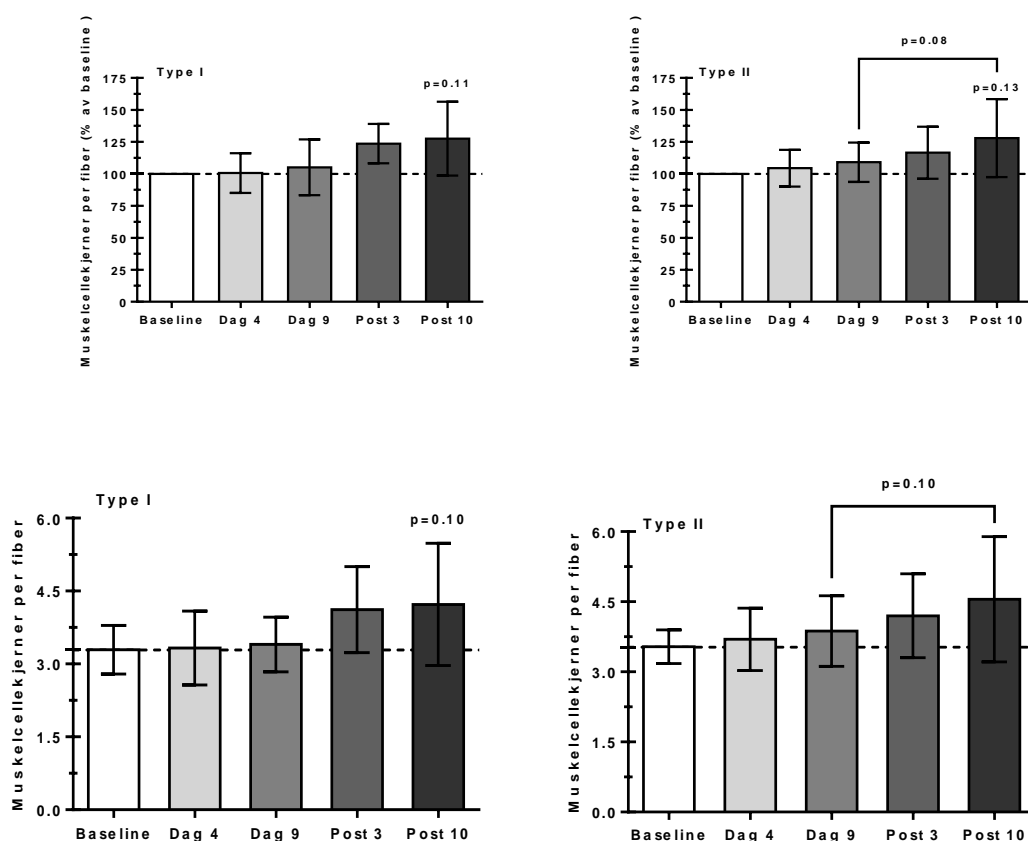


**Figur 4.7** Antall satellittceller merket med NCAM per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0.01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.

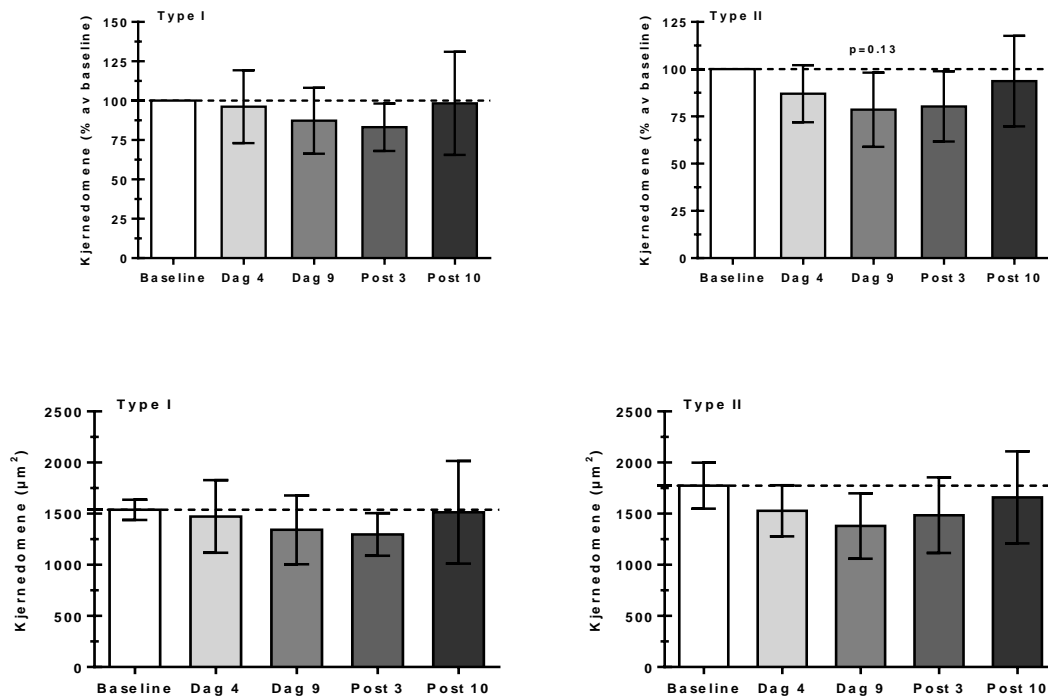
#### 4.5 Muskelcellekjerner og muskelfiberareal per muskelcellekjerne

Det ble totalt valgt ut 100 tilfeldige fibre (50 for hver fibertype) for snittene som ble analysert for muskelcellekjerner. Muskelcellekjerner, målt som antall cellekjerper per fiber, økte fra baseline til post 3 med  $24 \pm 16$  % ( $p=0,01$ ), og tenderte til økning til siste biopsi med  $28 \pm 29$  % ( $p=0,11$ ) for type I fibre. For type II fibre ble det funnet en tendens til økning fra baseline til post 10 med  $28 \pm 31$  % ( $p=0,13$ ). For type II fibre ble det også funnet en tendens til økning fra dag 9 til post 10 ( $19$  %,  $p=0,08$ ) (figur 4,8).

Det ble i gjennomsnitt analysert 638 fibre (type I; 350, type II; 288) per snitt for kjernedomene. Fra baseline til post 3 var det en tendens til reduksjon i kjernedomene for type I fibre ( $-17 \pm 18$  %,  $p=0,13$ ), og for type II fibre var det en tendens til reduksjon fra baseline til dag ni ( $-21 \pm 23$  %,  $p=0,13$ ) (figur 4,9).



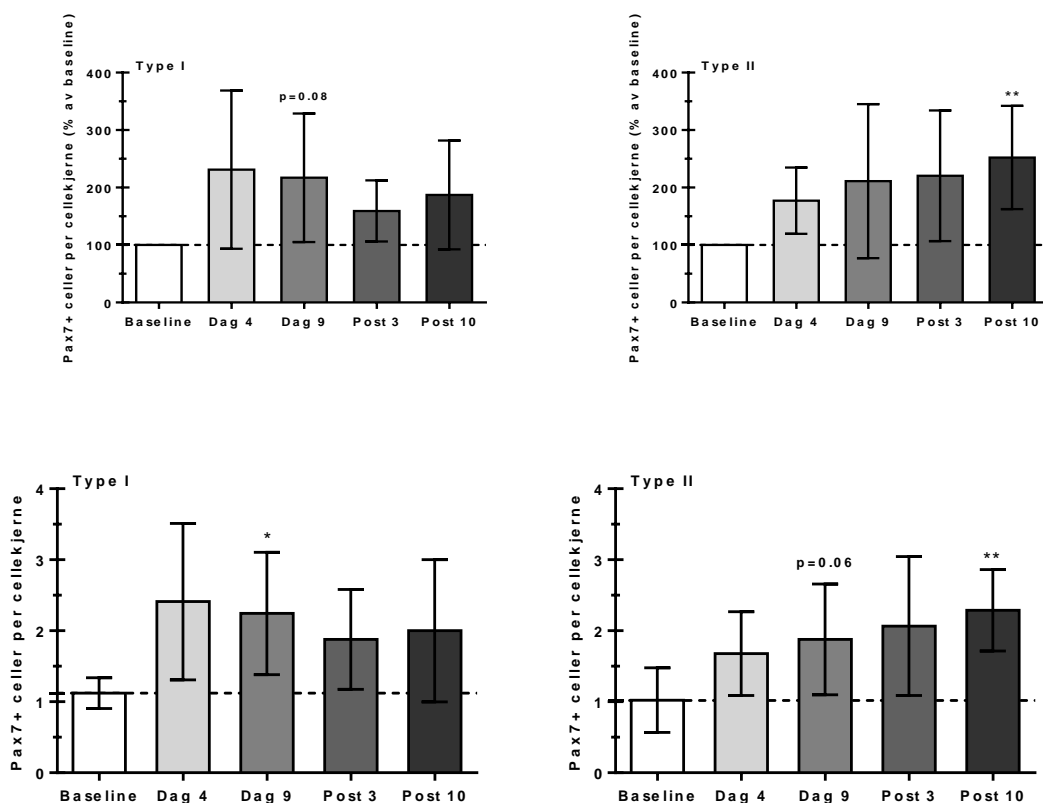
**Figur 4.8** Antall cellekjerper per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosentvis endring i innfelt figur. Fra baseline til post 10 ble det funnet en tendens til økning ( $p=0,10$ ) rundt type I fibre. Fra dag 9 til post 10 ble det funnet en tendens til økning ( $p=0,10$ ) rundt type II fibre. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.



**Figur 4.9** Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ ) per cellekjerne (kjerneromene) for type I fibre (venstre) og type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.

### 4.5.1 Pax7 positive celler per muskelcellekjerne

Fra baseline ble det i type I fibre funnet en signifikant økning ( $117 \pm 112$  %) etter første treningsuke ( $p=0,04$ ) for deretter å stagnere etter andre treningsuke ( $87 \pm 101$  %, fra baseline). Fra baseline ble det i type II fibre funnet en tendens til økning ( $111 \pm 134$  %) etter første treningsuke ( $p=0,06$ ), og en økning ( $152 \pm 96$  %) etter andre treningsuke ( $p<0,01$ ) (figur 4,10).



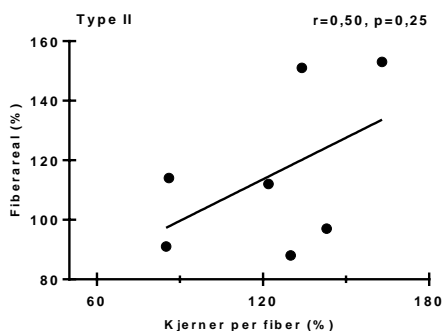
**Figur 4.10** Prosent endring Pax7 positive celler per cellekjerne for type II fibre (høyre) type I fibre (venstre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p=0.04$ ). \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p<0.01$ ). Fra baseline til dag 9 det funnet en tendens til økning ( $p=0.06$ ) for type II fibre. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik.



## 4.6 Korrelasjoner

### 4.6.1 Sammenheng mellom muskelfiberareal og muskelcellekjerner

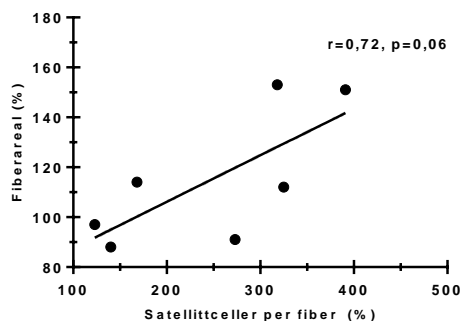
Det ble ikke funnet noen signifikant korrelasjon for noen av fibertypene (type I;  $r=0,20$ , type II;  $r=0,50$ ) mellom prosentvis endring i antall kjerner per fiber og fiberareal (figur 4,11). Endring fra baseline til post 10 ble benyttet som målepunkter for å regne ut prosent endring for begge variabler.



Figur 4.11 Sammenhengen mellom prosentvis endring i kjerner per fiber og fiberareal i type II fibre.

### 4.6.2 Sammenheng mellom muskelfiberareal og satellittceller

Det ble funnet en tendens til sammenheng mellom prosentvis endring i antall Pax7 positive satellittceller per fiber og fiberareal for type II fibre (  $r=0,73$ , figur 4,11), men ikke for type I fibre ( $r=0,23$ ). Det ble ikke funnet noen signifikant sammenheng mellom prosent endring i antall NCAM positive satellittceller og fiberareal for hverken type I eller II fibre ( $r=0,44$  og  $r=0,60$ ). Baseline til post 10 ble benyttet som målepunkter for å regne ut prosent endring for begge variabler.



Figur 4.12 Sammenhengen mellom prosentvis endring i satellittceller per fiber og fiberareal i type II

## 5. Diskusjon

Vi testet en hypotese om at vi ved å legge inn en hvileperiode på 10 dager etter en intensiv treningsuke (7 økter) med styrketrening med redusert blodstrøm kunne resette satellittcelle-, muskelcellekjerne- og muskelfiberarealresponsen til en ny intensiv treningsuke. Vi forventet derfor å finne en like stor økning i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal under andre treningsuke som under den første treningsuken. Etter første treningsuke fant vi en signifikant økning i antallet satellittceller i både type I og II fibre (henholdsvis 116 % og 132 %), men ingen endring i antall muskelcellekjerner eller muskelfiberareal. Etter andre treningsuke stagnerte satellittcelleresponsen i type I fibre, mens type II fibre hadde en økning (henholdsvis 228 %) fra baseline. Det ble ikke funnet noen signifikant økning i muskelcellekjerneantall eller muskelfiberareal fra baseline til siste biopsi for noen av fibre. Fra hvileperioden til siste biopsi økte imidlertid muskelfiberareal signifikant for både type I og II fibre (henholdsvis 26 % og 32 %).

### **5.1 *Endringer i satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal***

#### **5.1.1 Første treningsblokk**

I samsvar med Nielsen et al. (2012) fant vi en signifikant økning i antall satellittceller i type I og II fibre (116 og 132 %) etter første treningsuke, men økningen vi observerer var lavere (~300 %) for begge fibertyper. Satellittcelleresponsen vi finner er i størrelsesordenen med hva som er rapportert etter eksentrisk belastning (Crameri et al., 2004; Dreyer, Blanco, Sattler, Schroeder, & Wiswell, 2006; McKay, Toth, Tarnopolsky, & Parise, 2010; Paulsen et al., 2010). Da vi samme tidsperiode fant en økning på 117 % i antall Pax7 positive celler per muskelcellekjerne i type I fibre og sterk tendens til økning (111 %,  $p=0.06$ ) i type II fibre, så støtter dette satellittcelleøkningen vi finner etter første treningsuken.

Etter styrketrening er det fortsatt noe usikkert hva det eksakte stimuliet er for å aktivere satellittcellene. Signalveier involvert i intracellulær signaliering mediert via mekanosensitive reseptorer eller indirekte via vekstfaktor-mediterede signaler er trukket frem som potensielle aktiverings- stimulier (Tatsumi, 2010; Tidball, 2005). Etter SRB med lav motstand er det dokumentert økt produksjon av IGF-1 (Abe et al., 2005b; Takano et

al., 2005) og etter tradisjonell tung styrketrening økt uttrykkelse av ulike vekstfaktorer (IGF-1, MGF, HGF og FGF2) (Hanssen et al., 2012). Det er antydning at oppregulering av IGF-1, MGF, FGF2 og HGF kan være en god koordinert respons til mekaniske belastning under styrketrening (Clarke & Feeback, 1996; Clarke et al., 1998; Tatsumi, 2010; Tidball, 2005), og at disse vekstfaktorene via reseptor binding kan aktivere satellittcellene (Tidball, 2005). Oppregulering av IL 4 og 6 (Guerci et al., 2012; Horsley, Jansen, Mills, & Pavlath, 2003; Serrano, Baeza-Raja, Perdiguero, Jardí, & Muñoz-Cánoves, 2008) og de intracellulære signalveiene Notc og Wnt (Brack et al., 2007; Brack, Conboy, Conboy, Shen, & Rando, 2008; Conboy & Rando, 2002), samt P38 MAPK (Jones et al., 2005; Keren, Tamir, & Bengal, 2006; Lassar, A, 2009; Ruiz-Bonilla & Perdiguero, 2008) er også fremhevet å kunne bidra til aktivering og videre deling av satellittcellene. Selv om vi ikke har målinger på aktiverings- og delingsfaktorer, så kan vi spekulere i om eller flere av disse faktorene har bidratt til satellittcelleresponsen etter første treningsuke.

Satellittcelleresponsen vi finner etter første treningsuke følges imidlertid ikke av en økning i antall muskelcellekjerner. Dette kan tyde på at satellittcellene ikke har gjennomgått en endelig differensiering og sammensmelting med eksisterende muskelfibre. I samme tidsperioden endret ikke muskelfiberareal seg, men noe overraskende fant vi en tendens til reduksjon (-17 %) i type II fibre. En tendens til reduksjon i muskelfiberareal i VL er også dokumentert i et tidligere studie på mennesker etter to uker med tradisjonell tung styrketrening (Hanssen et al., 2012). Selv om vi bare kan spekulere er det fristende å antyde at tendensen vi finner i redusert muskelfiberareal kan komme av en sammensmelting av satellittceller og videre dannelse av nye små muskelfibre eller som følge av splitting av store muskelfibre. Da resultatene våre indikerte en økt frekvens av små muskelfibre etter første treningsuke, så kan dette støtte spekulasjonen om at det har skjedd en nydannelse av små muskelfibre. Det er lite dokumentert at hyperplasi forekommer i humane studier (Kadi et al., 2005), siden det ikke finnes noen sikre metoder for å måle dette. Hyperplasi er imidlertid godt dokumentert i dyrestudier (Antonio & Gonyea, 1993). Hyperplasi kan også forekomme ved splitting av store muskelfibre etter at de har gjennomgått en betydelig hypertrofi, og nærmer seg grensen for hvor store de kan være med normal funksjon (Raastad & Rønnestad, 2010). I type II fibre er det diskutert at de kan vokse opp mot  $9000\mu\text{m}^2$  (Raastad & Rønnestad, 2010). Da vi fant en hypertrofi i type II fibre fra baseline på

5933  $\mu\text{m}^2$  til 6797  $\mu\text{m}^2$  etter første treningsuke er dette under denne grensen og det er mindre sannsynlig at splitting av muskelfibrene kan ha forekommet i vår studie. Tendens vi finner i reduksjon i muskelfiberareal i type II fibrene kan også komme av en ren atrofi.

Da enkelte forsøkspersoner viste moderate til store økninger i kreatin kinasekonsentrasjon i blod, så kan det også spekuleres i om satellittcelleresponsen vi ser etter første treningsuke kan komme som et resultat ødeleggelser og påfølgende regenerering. At SRB med lav motstand kan fremprovosere muskelskade støttes av en case- rapport av Iversen & Røstad, (2010), der rbdomyolyse ble påvist hos en hockey-spiller etter å ha gjennomført denne treningsformen. Det er også dokumentert en redusert maksimal kraftgenereringsevne og forlenget restitusjonsperiode etter SRB (Umbel et al., 2009; Wernbom, Paulsen, Nilsen, Hisdal, & Raastad, 2012) som begge indikerer en vis grad av muskelskade (Gøran Paulsen, Mikkelsen, Raastad, & Peake, 2012).

En debatt i litteraturen er om hypertrofi kan forkomme uten en addering av nye muskelcellekjerner (O'Connor, Pavlath, McCarthy, & Esser, 2007; O'Connor & Pavlath, 2007) ). Et sentralt punkt i denne debatten er om størrelsen på kjernedomene er regulert via en sammensmelting av nye muskelcellekjerner. Det er foreslått at kjernedomene har maksstørrelse på 2000-2247  $\mu\text{m}^2$ /kjerne (Ishido, Kami, & Masuhara, 2004; Kadi et al., 2004; O'Connor & Pavlath, 2007; Petrella, Kim, Cross, Kosek, & Bamman, 2006) og at en addering av nye muskelcellekjerner er nødvendig hvis muskelfiberarealet øker mer en 26 % (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006). Sammenlignet med noen tidligere studier er det absolutte kjernedomene vi målte noe lavere (Petrella et al., 2006; Verney et al., 2008). Denne forskjellen kan komme av at vi snittet muskelbiopsiene med en tykkelse på åtte  $\mu\text{m}$  sammenlignet mot 10  $\mu\text{m}$  i studien til Verney et al. (2008). Petrella et al. (2008) fant i sin studie at deltagerne som hadde den største hypertrofien i respons til styrketrening også inkorporerte flest muskelcellekjerner. Dette antyder en ulik etterspørsel av nye muskelcellekjerner og at hypertrofien kom før økningen i antall muskelcellekjerner. Våre funn støtter ikke denne antydningen da vi etter første treningsuke finner en tendens til reduksjon (-21 %) i kjernedomene i type II fibrene. Når muskelfiberareal ikke øker i samme tidsperioden, kan dette indikere at økningen i muskelcellekjerner kommer før økningen i

muskelfiberareal. Disse funnene støttes av et tidligere humant studie (Hanssen et al., 2012) der det også ble dokumentert en reduksjon i kjernedomene etter to uker med tradisjonell tung styrketrening. Da vi ikke observerte en gjensidig økning i antall muskelcellekjerner og hadde få deltagere i studien (n=10) må disse spekulasjonen tolkes med forsiktighet. Resultatene i vår studie er også i tråd med funn på rotter, hvor en økning i DNA som en indirekte markør for kjerneantall, er observert før hypertrofi i belastet muskulatur (Adams et al., 1996). Funnene våre er videre sammenlignbart med tidsforløpet som er observert i overbelastningsstudier på mus, hvor en reduksjon i kjernedomene er sett 6-10 dager etter belastning og kommer før hypertrofiresponsen (Bruusgaard, Johansen, Egner, Rana, & Gundersen, 2010). Når en vurderer disse dyrestudier må det tas forbehold om at protokollene som benyttes for å fremprovosere en muskelcellekjernerrespons og hypertrofi er mer ekstreme enn treningsprotokollene som benyttes i humanstudier. Basert på våre kjernedomenerresultater etter første treningsuke, er det fristende å spekuleres om en økning i muskelcellekjerneantallet kan være nødvendig for senere hypertrofirespons. Denne spekulasjonen støttes av Hanssen et al. (2012). En annen, og kanskje sannsynlig forklaring på tendensen vi finner i redusert kjernedomene kan være tendensen vi fant i redusert muskelfiberareal da vi ikke finner noen samtidig økning i muskelcellekjerneantall.

I motsetning til våre funn kunne Nilsen et al. (2012) observere signifikant økning i muskelfiberareal i type I og II fibre (38 og 38 %), antall muskelcellekjerner (33 og 29 %) og kjernedomene etter første treningsuke. Til støtte for muskelcellekjernerresponsen Nilsen et al. (2012) observerer, overskrider han den teoretiske grensen på 26 % økning i muskelfiberareal (Bruusgaard et al., 2012; Kadi et al., 2004). Siden hovedkilden til en økning i muskelcellekjerner synes å skyldes en sammensmelting med aktiverte omkringliggende satellittceller (Allen, Roy, & Edgerton, 1999; O'Connor & Pavlath, 2007), så kan dette være bakgrunnen for at Nielsen et al. (2012) finner større satellittcelleøkning i type I og II fibre (292 og 276 %), sammenlignet mot våre funn etter første treningsuke. Da Nielsen et al. (2012) også rapporterte muskelcellekjerneøkning på ~ 30 % etter første treningsuke betyr dette at mange satellittceller har smeltet sammen med eksisterende muskelfibre. Dette kan bety at satellittcelleresponsen har vært enda større enn bare økningen i antall muskelcellekjerner i studien til Nielsen et al. (2012). Imidlertid kan flere faktorer ha medvirket til at økningen i antall satellittceller er ulikt. Det er tidligere observert at

antall satellittceller på et muskeltverrsnitt kan variere lokalt (Mackey et al., 2009). Det kan derfor ikke utelukkes at dybden på muskelbiopsien kan ha ført til støy i målingene. Til støtte for denne observasjonen, kunne Lexell, Henriksson-Larsen & Sjøstrom (1983) demonstrere at muskelfiberareal og muskelfibersammensetning hadde store variasjoner innad i m. vastus lateralis.

### 5.1.2 Andre treningsblokk

Etter siste treningsuke stagnerte satellittcelleresponsen i type I fibre i vår studie, noe også Nielsen et al. (2012) observerte i sin studie. Imidlertid fant Nielsen et al. (2012) en signifikant reduksjon i antallet etter første treningsuke til siste biopsi. Etter siste biopsi fant vi og Nielsen et al. (2012) en relativ lik økning (henholdsvis 115 % og 143 %) fra baseline. For type II fibre var derimot tidsforløpet veldig forskjellig mellom studiene. I vår studie observerte vi en tendens til at antall satellittceller økte jevnt gjennom hele intervensjonsperioden. På siste biopsi fant vi en økning på 228 % fra baseline sammenlignet mot Nielsen et al. (2012) som kunne rapporterte 143 % økning på samme tidspunkt. Etter hvileperioden fant vi en tendens til økning i antall satellittceller i type II fibre sammenlignet med Nilsen et al. (2012) som observerte en signifikant reduksjon etter første treningsuke. Økningen vi finner i antall muskelcellekjerner for begge fibertypene viser at responsen kommer etter andre treningsuke. Den sene muskelcellekjernerresponsen kan være en forklaring på at vi finner samme tidsforløp for muskelfiberareal for begge fibertypene. Fra hvileperioden fant vi en økning i muskelfiberareal i type I og II fibre på 25 og 32 % til siste biopsi. Vi kunne ikke observere noen signifikant økning i kjernedomene etter siste treningsuke for begge fibertypene, men tidslinjen viste antydning til at økningen kom etter hvileperioden. Tidslinjen for satellittcelleresponsen vi finner i type II fibre stemmer godt overens med tidslinjen for muskelcellekjerner, muskelfiberareal og kjernedomene etter andre treningsuke. Responsen i type II fibre kan også stemme med antagelsen om at muskelfibre øker muskelcellekjerneantallet før hypertrofien settes i gang (Hanssen et al., 2012). Denne tidsrekkefølgen mellom muskelcellekjerne- og muskelfiberarealrespons er i motsetning Petrella et al. (2008; 2006) som antydte at en muskelhypertrofi kom før en økning i muskelcellekjerner. Det er midlertid vært å bemerke at det bare ble tatt biopsier før og etter intervensjonen i disse studiene.

Den ulike tidslinjen vi finner i satellittcellerespons mellom type I og II fibre er utfordrende å forklare da de andre variabler viser samme tidsforløp. En mulig forklaring kan være at type I fibre i større grad stimuleres på grunn av den lave belastningen, sammenlignet mot type II fibre. Basert på elektromyografidata (EMG), har det blitt spekulert at type I fibre i den første serien gjorde mesteparten av jobben de første repetisjonene (Wernbom, Jarrebring, Andreasson, & Augustsson, 2009). Etter hvert som type I fibre utviklet tretthet ble det foreslått at type II fibre gradvis ble rekruttert utover den første serien. Videre på grunn av manglende restitusjon mellom seriene, vil sannsynlig type II fibre rekrutteres tidligere i de neste settene (Moritani, Sherman, Shibata, Matsumoto, & Shinohara, 1992; Wernbom et al., 2009). Stor rekruttering av type II fibre under SRB ble bekreftet av Krustrup, Söderlund, Relu, Ferguson, & Bangsbo, (2009). Det er imidlertid rimelig å anta at stimuleringen og stresset i type I fibre er større på grunn av den tidlige rekrutteringen. En økt stressrespons i type I fibre etter SRB med lav motstand ble bekreftet i en studie av Cumming, Paulsen, Wernbom, Ugelstad, & Raastad, (2014). Cumming og medarbeidere kunne rapportere økt HSP- respons ( $\alpha\beta$ -crystallin og HSP 70) og en akutt og forlenget glykogenetømming i type I fibre, noe som sterkt indikerer denne fibertypen ble mer stresset enn type II fibre under SRB med lav motstand. Siden type II fibre ser ut til å rekrutteres senere enn type I fibre under SRB med lav motstand (Moritani et al., 1992), så vil også type I fibre eksponeres for metabolsk stress over en lengre tidsperiode i treningsprotokollen vi benytter. Ut i fra disse resultatene kan stagnasjonen i satellittcellerespons vi ser i type I fibre etter første treningsuke komme av at de i større grad stimuleres enn type II fibre, og med treningsprotokollen vi benytter overstimuleres. Et overstimuli i type I fibre kan tenkes resultere at de i større og hurtigere grad adapteres til trening, og dermed stopper også satellittcelleresponsen opp. Imidlertid da vi fant en tendens til økning i antall muskelcellekjerner i andre periode kan dette tyde på at satellittcelleresponsen er beholdt, men også at flere smelter sammen men muskelfibre som kan ha vært en årsak til stagnasjonen.

I likhet med stagnasjonen vi fant i satellittcellene i type I fibre etter første treningsuke, så viste studien til Nilsen et al. (2012) at satellittcellene i begge fibertypene nådde et platå etter første treningsuke. I tillegg til satellittcellene observerte de at muskelcellekjerne- og muskelfiberarealresponsen også nådde et platå etter første treningsuke. Samlet viser satellittcelle, muskelcellekjerne og muskelfiberarealdataen fra

vår og Nielsen et al. (2012) sin studie at kun satellittcelleresponsen i type I fibre har en relativ lik respons gjennom hele i studien, bortsett fra at Nielsen et al. (2012) observerte en signifikant reduksjon i antall satellittceller i andre periode. Det er heller ikke usannsynlig at satellittcelleresponsen i type I fibre i studien til Nielsen et al. (2012) også stagnerer på grunn av overstimulering (Cumming et al., 2014). Imidlertid stagnerer også satellittcelleresponsen i type II fibre etter første treningsuke i studien til Nielsen et al. (2012). Siden type II fibre også rekrutteres under SRB (Krustrup et al., 2009), men antageligvis gjør det i mindre grad enn i type I fibre (Cumming et al., 2014; Wernbom et al., 2009) er det fristende å spekulere i om hvileperioden kan ha vært en årsak til den ulike satellittcelleresponsen i type II fibre mellom studiene etter andre treningsuke. Muligens kan den akkumulerte effekten av tre sammenhengende uker med trening i studien til Nielsen et al. (2012) resultere i et overstimuli og stagnasjon etter første treningsuke. Med hvileperioden underveis i intervensjonen i vår studie kan det tenkes at det akkumulerte stimuli på satellittcellene i type II fibre akkurat ikke overskrides. At en hvileperiode kan gjenopprette den anabole responsen i muskelfibre støttes av tre studier av Ogasawara og medarbeidere (Ogasawara, Yasuda, Ishii, & Abe, 2013a, 2013b; Ogasawara, Yasuda, Sakamaki, Ozaki, & Abe, 2011). Ogasawara et al. (2013a) observerte at den anabole signaleringen i muskelfibre ble mindre sensitiv etter 18 økter med tung tradisjonell styrketrening. Men etter en periode med 12 dager uten trening var sensitiviteten tilbake da en ny styrkeøkt ble gjennomført. Imidlertid da flere variabler i vår studie viser ulik respons etter første- og andre treningsuke må en eventuell effekt av hvileperioden på den andre responsen tolkes varsomt. Responsen vi finner etter første treningsuke kan påvirke responsen etter siste treningsuke uavhengig av hvileperioden på 10 dager. I de to siste treningsukene økte også treningsfrekvensen i studien til Nielsen et al. (2012) til åtte og ni økter i uken som kan ha bidratt til stagnasjonen.

Da vi ikke kunne finne noen muskelcellekjerne- eller muskelfiberarealrespons etter første treningsuke er det vanskelig å si hvilken effekt hvileperioden har hatt på disse variablene sammenlignet mot Nielsen et al. (2012). Skulle vi med større sikkerhet sagt noe om hvileperioden hadde hatt en effekt etter andre treningsuke måtte vi ha inkludert et kontrollbein som det ikke ble og er en svakhet i denne studien. Treningsdata fra vår studie viser at forsøkspersonene i gjennomsnitt for første og andre treningsuke i løpet av alle 4 settene gjennomført 85 repetisjoner. Sammenlignet mot Nielsen et al. (2012)



gjennomførte forsøkspersonene i gjennomsnitt for begge treningsukene i løpet av 4 sett 66 repetisjoner. Ut i fra dette er det fristende å spekulere i om vi presset forsøkspersonene våre hardere enn Nielsen et al. (2012). Dersom dette er tilfelle, er det også fristende å spekulere i om det har oppstått en overreaching-effekt, der musklene ikke klarer ta til seg treningen etter første treningsuke (Kraemer et al., 2006; Volek et al., 2004), men treningseffekten kommer på et senere tidspunkt (etter andre treningsblokk).

Vår og Nielsen et al. (2012) er de eneste studiene som har undersøkt endringer i antall satellittceller, muskelcellekjerner og muskelfiberareal etter SRB med lav motstand. Sammenligner vi resultatene mot studier der tradisjonell tung styrketrening er gjennomført på de nevnte variablene, ser vi at SRB med lav motstand kan gi en lik eller større respons (tabell 2,3 og tabell 2,4 (side 47 og 51)). En lik økning i antall satellittceller som vi finner, ser vi først etter mer ekstreme samt uvante eksentriske protokoller (Crameri et al., 2004; Dreyer et al., 2006; McKay et al., 2010; Paulsen et al., 2010). I disse studiene ble det også rapportert tegn på muskelskade og regenerering. Om muskelskade og regenerering forkom i vår studie er noe usikkert. Hos de fleste forsøkspersoner kunne vi ikke finne noen økning i kreatin kinase (CK) eller-myoglobinkonsentrasjon i blod akutt eller 20-24 timer etter trening (data ikke vist). Dette er i tråd med funnene til (Takarada et al., 2000a). Imidlertid viste én av våre forsøkspersoner relative høye CK- verdier etter første treningsuke. Dette er i tråd med tidligere studier som demonstrerte redusert maksimal kraftgenereringsevne og forlenget restitusjonsperiode etter SRB (Umbel et al., 2009; Wernbom et al., 2012), som begge indikerer en vis grad av muskelskade (Paulsen et al., 2012). Imidlertid måtte én forsøksperson i vår studie gi seg grunnet ekstrem stølhet i løpet av de første treningsdagene. CK- nivåene viste høye nivåer og potensielt kan muskelskade og videre regenerering ha forkommet. At Rbdomyolyse kan forkomme etter SRB med lav motstand støttes av en case- studie av Iversen & Røstad, (2010). Cumming et al. (2014) kunne imidlertid ikke observere tegn på myofibrillære ødeleggelser og skade etter SRB med lav motstand, som er sett etter eksentrisk trening (Paulsen et al., 2012). Dette er i samsvar med Loenneke, Thiebaud, & Abe, (2014), som også diskuterte at muskelskade ikke forkommer etter SRB, basert på muskelsvelling og muskelsårhet (DOMS<sup>24</sup>). Muskelsvelling og DOMS sier imidlertid ikke noe om muskelskade på et cellulært nivå

---

<sup>24</sup> Delayed Onset Muscle Soreness

(målt med muskelbiopsier), så Loenneke et al. (2014) sine tolkninger må vurderes varsomt.

Vi fant en relativ god korrelasjon mellom endring i muskelfiberareal og antall muskelcellekjerner for type II ( $r=0.50$ ), men ikke for type I fibre ( $r=0.20$ ). Ingen av sammenhengende var imidlertid signifikante, på grunn av stor variasjon i endringene mellom individene. Selv om ingen av korrelasjonene er signifikante er det interessant at økningen i muskelfiberareal i større grad virker å være avhengig av en økning i antall muskelcellekjerner i type II fibre enn i type I fibre. Det lave antall forsøkspersoner inkludert i korrelasjonsanalysen ( $n=10$ ) gjør det også vanskeligere å relatere økningen i muskelfiberareal direkte til endringer i antall muskelcellekjerner. Det er imidlertid fristende å spekulere i om etterspørreslen av nye muskelcellekjerner og rekruttering av satellittceller er større i type II fibre enn i type I fibre. Dette støttes til dels da vi fant en tendens til korrelasjon mellom endringer i muskelfiberareal og antall satellittceller per fiber i type II fibre ( $r=0.72$ ,  $p=0.06$ ), men ikke i type I fibre ( $r=0.24$ ). Da vi finner en stor økningen i antall satellittceller per fiber for begge fibertypene er det vanskelig å anslå hvorfor satellittcellene i større grad virker å ha smeltet sammen med eksisterende type II fibre enn type I fibre. Da det er vist at type II fibre virker å stresses mindre enn type I fibre under SRB med lav motstand (Cumming et al., 2014), kan det spekuleres om satellittcellene i type I er påført mer omfattende muskelskader og heller har bidratt til regnereing istedfor hypertrofi (Iversen & Røstad, 2010).

### 5.1.3 Satellittcellemarkører; Pax7 versus NCAM

I vår studie benyttet vi NCAM og Pax7 for å identifisere satellittcellene. Vi telte i gjennomsnitt flere satellittceller når vi anvendte Pax7 som satellittcellemarkør. Dette gjaldt for alle biopsitidspunktene bortsett ved baseline. Våre funn er i tråd med McKay et al. (2010) som identifiserte flere Pax7+ celler enn NCAM+ celler 24 timer etter en muskelskadeprotokoll. I motsetning til våre og McKay et al. (2010) sine funn, så observerte Mackey et al. (2009) 23 % færre positive satellittceller da Pax7 ble benyttet som satellittcellemarkør sammenlignet med NCAM på nabosnitt.

Hvorfor vi og Mackey et al. (2009) teller ulikt mellom antistoffene er vanskelig å svare på. Mackey et al. (2009) hevder at antistoffenes ulike merkeprofil kan være en årsak.

Denne påstanden støttes av Lindstrom & Thornell, (2009) som diskuterer at satellittcellen med økt sjans identifiseres når hele membranen merkes kontra en transkripsjonsfaktor (Lindström & Thornell, 2009). Dette kan henge sammen med om satellittcellen kuttet midt på eller i en av endene (Lindström & Thornell, 2009; Mackey et al., 2009). Forskjellen mellom Pax7- og NCAM merkingen kan muligens komme av at de også er vist å uttrykkes på ulike tidspunkter i cellyklus (oppsummert av Mckey et al., 2010). I cellyklusen er Pax7 (McKinnell et al., 2008; Relaix et al., 2006; Zammit, Partridge, & Yablonka-Reuveni, 2006) og NCAM (Capkovic, Stevenson, Johnson, Thelen, & Cornelison, 2008; Suzuki, Angata, Nakayama, & Fukuda, 2003) vist å representere satellittcellepopulasjonen i størst grad tidlig og sent i cellyklus. Dersom NCAM merker satellittceller sent i cellyklus (Capkovic et al., 2008; Suzuki et al., 2003), så kan dette bety at baselineverdiene våre er underestimert. Imidlertid identifiserte vi få NCAM+ celler for begge fibertyper på alle biopsiene. Hva dette kommer av er usikker, men lokale forskjeller i antall satellittceller i muskelfibrene kan være en faktor (Mackey et al., 2009). Når Pax7 er vist å uttrykkes tidlig i cellyklus (McKinnell et al., 2008; Relaix et al., 2006; Zammit et al., 2006), så kunne vi muligens ha identifisert flere satellittceller sent i cellyklus hadde dobbeltmerket samme nabosnitt med Pax7 og NCAM. Å benytte begge satellittcellemarkørene på samme nabosnitt er vist å gi en mer komplett beskrivelse av antall og identiteten av satellittcellene, i stedet for kun å benytte en markør (Mackey et al., 2009). Da satellittcellene til en hver tid også er vist å kunne være utsatt for aktiveringsstimuli (Ishido et al., 2004), så kan det ha vært litt tilfeldig hvor i cellyklus satellittcellene vi identifiserte var.

## **5.2 Endringer i muskelvekst**

Etter første treningsuke fant vi en økt tykkelse i *m. vastus lateralis* på 3,3 %. Disse resultatene er i tråd med to tidligere studier der SRB med lav motstand på bein ble gjennomført to ganger om dagen (Abe et al., 2005a; Fujita, Brechue, Kurita, Sato, & Abe, 2008). Etter 8 dager (16 økter) rapporterte Abe et al. (2005a) en økt tykkelse i quadriceps på 5,9 % og Fujita et al. (2008) en 3 % økning i quadricepstykkelse etter seks dager (14 økter). Imidlertid viste studien til Abe et al. (2005a) en noe større relativ økning per dag (0,73 %) sammenlignet mot våre verdier (0,47 %) der forskjellen kan skyldes at Abe et al. (2012) hadde en høyere treningsfrekvens. Etter 13 uker med styrketrening med lett til moderat motstand (30-60 % av 1 RM) ble det observert en

økning i VL på 6,9 % (0,07 % per dag) (Alegre, Jiménez, Gonzalo-Orden, Martín-Acero, & Aguado, 2006). Selv om treningsfrekvensen var betydelige lavere i studien til Alegre et al. (2006) sammenlignet mot vår, Abe et al. (2005a) og Fujita et al. (2008), er det fristende å spekulere i om det hypoksiske stresset i muskelfibrene også kan være en årsak til SRB-protokollene viser en høyre prosentvis økning i styrke per dag. Imidlertid kan økningen vi ser i tykkelse i VL etter første treningsuke komme av svelling da resultatene indikerer en reduksjon i tykkelse i løpet av hvileperioden. Noe overraskende er forskjellen vi finner mellom den økte tykkelsen i VL og muskelfiberareal som ikke økte etter første treningsuke. Det er vanskelig å direkte peke på årsaken til denne forskjellen. Mulige forklaringer kan være nydannelse av små muskelfibre. Indikasjoner på økt frekvens av små fibre etter første treningsuke støtter spekulasjonen at en nydannelse av fibre har forkommet i første treningsuke.

Etter siste treningsuke fant vi en økt tykkelse på 5,7 % fra baseline. Disse verdiene er i tråd med en tidligere studie der to økter om dagen med SRB med lav motstand på bein ble gjennomført i to uker (Abe et al., 2005b). Abe og medarbeidere fant en økt tykkelse i *m. quadriceps* på 7,7 %. Som prosent endring i tykkelse per dag viste våre resultater (0,27 %) noe mindre økning sammenlignet mot Abe et al. (2005b) (1,71 %). Den ekstremt høye treningsfrekvensen kan igjen være en årsak til at Abe og medarbeidere finner en høyre prosentvis endring per dag. I motsetning til ultralydresultatene fant vi ingen økning i quadricepstverrsnittareal i VL 10 dager etter siste treningsøkt målt med MR. Disse resultatene er i sterk kontrast til andre studier der SRB med lav til moderat motstand er gjennomført, oppsummert i tabell 2,2 (side 27). I et av studiene der antall treningsdager var lik vår studie ble det funnet 8,5 % økning i muskeltverrsnittareal i *quadriceps*, noe som er betydelig høyere en vi observerte (Abe et al., 2005b). Da studien ikke oppgir hvor mange dager etter siste treningsøkt siste MR måling ble gjort, så kan det ikke utelukkes om økningen er påvirket av svelling.

Da vi fant en økning i muskelfiberareal etter hvileperioden til siste biopsi for begge fibertypene og tykkelse fra baseline til siste biopsi, så er det noe overraskende at vi ikke finner noen økning i muskeltverrsnittareal 10 dager etter siste treningsøkt. Det er vanskelig å direkte peke på årsaker til denne forskjellen. En mulig forklaring kan være at biopsien ikke er representativ for endringer i hele VL sin muskelbuk. Da vi observerte at muskelfiberareal for begge fibertyper ikke flatet ut mellom nest siste og

siste biopsi. Kan det også tenkes at vi hadde sett en økning i muskeltverrsnittareal, dersom vi hadde inkludert nye MR- målinger etter siste biopsi. Denne antagelsen kan støttes da vi observerte at muskelstyrke økte fra 10-20 dager etter siste treningsuke. Resultatene våre indikerte også at de ulike muskelbukene i quadriceps kan ha blitt ulikt stresset av treningen. Krustrup et al. (2009) viste at *m. rectus femoris* var den mest aktive muskelbuen i quadricepsgruppen under kneekstensjon. Dette kan også vært tilfelle i vår studie da den var den eneste muskelen som tenderte til å øke ved MR- målingene (5 %, data ikke vist). Selv om det er rimelig å anta at alle musklene som bidrar til kneekstensjon må bidra når man nærmer seg utmattelse, så vil dette kunne tale for et misforhold vi finne mellom endringer i muskeltykkelse og muskeltverrsnittareal.

Da vi ikke fant noen respons for flere variabler etter første treningsuke, så er det vanskelig å si hvilken effekt hvileperioden har hatt på økningen vi ser i muskeltykkelse i VL etter andre treningsuke. Det er tidligere vist at den største hypertrofiresponsen kommer tidlig i en treningsintervensjon (Fujita et al., 2008; Ogasawara et al., 2011; 2013a), noe som kan tale for at hvileperioden kan ha hatt en positiv effekt på muskeltykkelse i VL i andre treningsuke.

### **5.3 Endringer i muskelstyrke**

Vi fant ingen økning i muskelstyrke etter første treningsuke, målt som 1RM og isokinetisk styrke. Dette stemmer godt overens med at vi ikke kunne finne noen økning muskelfiberareal for fibertypene i samme tidsperioden. Flere studier har undersøkt endringer i muskelstyrke etter SRB med lav motstand og tradisjonell tung styrketrening (tabell 2,1 (side 22)), men kun Abe et al. (2005a) målte styrke etter én uke med SRB med lav motstand. Abe og medarbeidere observerte en signifikant økning i muskelstyrke målt som 1 RM på 9,6 %. Høyere treningsfrekvens og styrketesting i en mer kompleks øvelse kan være to sentrale årsaker til at Abe et al. (2005a) finner en styrkeframgang i motsetning til oss. I vår studie testet vi 1RM i kneekstensjon som stiller små krav teknikk og dermed kan tenkes å være nærmere relatert til endringer i muskelgruppens tverrsnittareal (Rønnestad & Egeland, 2007). Abe et al. (2005a) benyttet beinpress som testøvelse, noe som krever mer teknikk og dermed kan noe av styrkefremgangen komme av at deltagerne har hatt en læringseffekt i løpet studiet.

Fra baseline fant vi etter andre treningsuke en tendens til at 1 RM økte (5 %), men ingen økning i isokinetisk styrke. Etter hvileperioden fant vi derimot en signifikant økning i 1RM og isokinetisk styrke på 7,5 og 11,5 % som tilsvarte en relativ økning per dag på 0,4 og 0,55 %. Dette kan indikere at styrkeresponsen kommer etter hvileperioden. Tidsforløpet for styrkeresponsen stemmer med økningen vi fant i muskelfiberareal for begge fibertyper i samme tidsperiode, og dette kan indikere at økning i muskelstyrke kommer som en effekt av hypertrofi. Imidlertid kan den sene styrkeresponsen også komme av at forsøkspersonene ikke var restituert da de ble målt etter første treningsuke. Vi kunne imidlertid ikke finne noen signifikante sammenheng mellom økning i muskeltverrsnitt og muskelstyrke målt isokinetisk og 1RM (data ikke vist). For 1 RM fant vi imidlertid en relativt god r verdi ( $r=0.52$ , data ikke vist), men på grunn av få forsøkspersoner er det vanskelig å finne signifikante verdier.

Sammenligner vi våre styrkeresultater (1 RM og isokinetisk) etter andre treningsuke fra baseline med styrkeresultatene til Nielsen et al. (2012), ser vi at Nilsen og medarbeidere oppnår en større styrkerespons (10.6 %) målt som isometrisk styrke. Da Nilsen et al. (2012) på siste biopsi finner en større økning i muskelfiberareal for både type I (31 %) og II fibre (32 %) sammenlignet mot hva vi fant fra baseline (type I; 19 %, type II; 15 %), så kan dette være en forklaring hvorfor de finner en større styrkeøkning. Det skal også nevnes at Nielsen et al. (2012) testet styrke isometrisk, til forskjell fra vår studie. Styrkeøkning etter SRB er også dokumentert i andre studier som varer i 2 uker, der Shinohara et al. (1998) fant en økning på 9 % i 1 RM kneekstasjon. I tråd med dette kunne Abe et al. (2005) observerte en 17 % økning i 1 RM beinpress. Til forskjell fra styrkeøkningen vi fant viste ytterligere to studier med en varighet fra 4-16 uker en styrkeøkning fra 7,8 til 40 % målt som MVC eller 1 RM (Kubo et al., 2006; Laurentino et al., 2012; 2008; Madarame et al., 2008; Shinohara et al., 1998; Takarada, Sato, & Ishii, 2002b; Takarada et al., 2004; Takarada et al. 2000). Hvorfor vi ikke finner større styrkerespons målt som 1 RM eller isokinetisk styrke sammenlignet mot andre SRB studier i løpet av hele intervensjonen er vanskelig å forklare. Da vi ikke fant noen endringer i muskeltverrsnittsareal i *m. quadriceps* kan dette være en mulig forklaring.

#### **5.4 Metodekritikk**

Som mange andre studier har denne studien også svakheter og begrensninger på grunn av metodevalg og utførelse av metode. Når en skal tolke og vurdere, sammenligne med andre eller generalisere resultatene er det viktig å huske på dette.

På grunn av manglende oppslutning der vi rekrutterte forsøkspersoner ble det ikke inkludert noen kontrollgruppe i denne studien. Manglende kontrollgruppe er en svakhet i denne oppgaven, da forhold som ikke har med treningsintervensjonen og gjøre kan påvirke resultatene.

Muskelfiberareal-, satellittceller- og muskelcellekjernerdata er basert på biopsidata. Vevsbiopsier har den stor svakhet at det kun er en liten del av muskelen. Man vet derfor ikke om vevet man analyserer er representativt for hele muskelen

Siden jeg hadde en sentral rolle i datainnsamlingen, er denne prosessen ikke blindet. Jeg både trente og testet forsøkspersonene, var med på biopsier, gjorde immunhistokjemiske analyser og kvantifiserte dataen. Siden jeg viste forsøkspersonnummeret og hvilket tidspunkt de ulike snittene tilhørte, så kan dette i teorien påvirke datainnsamlingen. Bevisst eller ubevisst kan man begynne å se etter resultater og telle færre eller flere celler. Jeg var imidlertid meget bevisst på tellekriteriene og la meg på en lik linje da alle snittene ble kvantifisert.

En metodisk utfordring var når biopsiene skulle snittes. Ikke alle snittene ble av like god kvalitet, der noen var små og hadde få fibre mens noen hadde avlange fibre. Utfallet av dette er at satellittcellene ble vanskeligere å identifisere på enkelte snitt som kan påvirke resultatet ved at jeg telte færre positive celler på enkelte snitt. Når jeg kvantifiserte satellittcellene og/ eller muskelcellekjerne ble det ofte tatt subjektive vurderingen om noen celler skulle inkluderes eller ekskluderes. Derfor er immunhistokjemi ofte en semi-kvantitativ metode der klare tellekriterier er viktig, noe jeg hadde i dette studiet. Det vil allikevel komme tvilstilfeller. Å benyttet en annen person til å telle snittene ville ha økt den metodiske styrken. For å kontrollere tellingen sammenliknet vi kvantifiseringen av celler på et utvalg av prøver med en erfaren satellittcelleteller, noe som viste god samvariasjon.

For to av forsøkspersene ble samtlige biopsier utsatt for frostskafer da vevsprøvene ble tint opp for hurtig da de skulle snittes. Dette påvirket merke kvaliteten og gjorde det vanskeligere å identifisere satellittcellene. For gjeldene biopsier som ble utsatt for frostskafer ble ikke muskelfiberareal kvantifisert. Dette grunnet at arealet rundt hver fiber kan endres når de utsettes for disse skadene og man kan derfor ikke se på endringer i muskelfiberareal i løpet av intervensjonsperioden for disse forsøkspersonene.



## 6. Konklusjon

Hensikten med denne studien var å undersøke om en innlagt hvileperiode på 10 dager mellom to blokker med høyfrekvent styrketrening med redusert blodstrøm på lav motstand kunne føre til en like stor økning i antall satellittceller, cellekjerne og fiberareal i andre treningsblokk som i første. Etter første treningsuke fant vi en signifikant økning i antall satellittceller i type I og II fibre (henholdsvis 115 % og 132 %). Dette ble imidlertid ikke observert økning i muskelcellekjerneantallet eller muskelfiberareal i første treningsuke. Da muskelfiberareal og kjernedomene i type II fibre viste tendens til reduksjon kan dette indikere en nydannelse av små muskelfibere eller en ren atrofi.

Etter andre treningsuke fant vi en videre økning i satellittcelleantallet i type II fibre (228 %) fra baseline, men satellittcelleantallet i type I fibre var uendret i denne perioden. Antall muskelcellekjerne tenderte til å øke og muskelfiberareal i både type I og II fibre økte gjennom andre treningsuke, men responsen kom sent og de høyeste verdier ble målt 10 dager etter siste treningsøkt. Til tross for en sen respons, var økningen i muskelfiberareal fra baseline relativt beskjeden og da vi heller ikke kunne observere noen økning i muskeltverrsnittareal målt med MR kan dette forklare den beskjedne styrkeresponsen på treningsperioden. Da responsen på den første treningsblokken ble mindre enn forventet er det vanskelig å vurdere hvilken betydning hvileperioden hadde for de endringer vi observerte i den andre treningsperioden. Ingen signifikant økning i tverrsnittareal av *m. quadriceps* eller i muskelstyrke sammen med den sene responsen i noen av de andre variablene kan muligens tyde på at treningsbelastningen ble for stor med denne protokollen

## Referanser

- Aagaard, P., Andersen, J. L., Dyhre-Poulsen, P., Leffers, a M., Wagner, a, Magnusson, S. P., ... Simonsen, E. B. (2001). A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. *The Journal of Physiology*, 534(2), 613–23.
- Abe, T., Kawamoto, K., Yasuda, T., Kearns, C. F., Midorikawa, T., & Sato, Y. (2005). Eight days KAATSU-resistance training improved sprint but not jump performance in collegiate male track and field athletes. *International Journal of KAATSU Training Research*, 1(1), 19–23.
- Abe, T., Loenneke, J. P., Fahs, C. a, Rossow, L. M., Thiebaud, R. S., & Bemben, M. G. (2012). Exercise intensity and muscle hypertrophy in blood flow-restricted limbs and non-restricted muscles: a brief review. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 32(4), 247–52.
- Abe, T., Yasuda, T., Midorikawa, T., Sato, Y., Kearns, C., Inoue, K., & Ishii, N. (2005). Abe T 2005 1 p. 6-12 Skeletal muscle size and circulating IGF-1 are increased after two weeks of twice daily KAATSU resistance training.pdf.
- Adams, G. R., & Bamman, M. M. (2012). Characterization and regulation of mechanical loading-induced compensatory muscle hypertrophy. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2829–70.
- Adams, G. R., Caiozzo, V. J., Haddad, F., & Baldwin, K. M. (2002). Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 283(4), C1182–95.
- Adams, K., Cafarelli, E., Gary, A., Dooly, C., Matthew, S., Fleck, S. J., ... Triplett-mcbride, T. (2009). Progression Models in Resistance Training for Healthy Adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 41(3), 687–708.
- Adams, G. R., Haddad, F., Shimoyama, D., Takatsuru, Y., Iwasaki, T., Shimokawa, N., ... Roy, R. R. (1996). The relationships among IGF-1 , DNA content , and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy rats and mice The relationships among IGF-1 , DNA content , and protein accumulation during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 81, 2509–2516.
- Alegre, L. M., Jiménez, F., Gonzalo-Orden, J. M., Martín-Acero, R., & Aguado, X. (2006). Effects of dynamic resistance training on fascicle length and isometric strength. *Journal of Sports Sciences*, 24(5), 501–8.
- Allen, D. L., Monke, S. R., Talmadge, R. J., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (1995). Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 78(5), 1969–76.

- Allen, D. L., Roy, R. R., & Edgerton, V. R. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle & Nerve*, 22(10), 1350–60.
- Allen, R. E., Sheehan, S. M., Taylor, R. G., Kendall, T. L., & Rice, G. M. (1995). Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 165(2), 307–12.
- Antonio, J., & Gonyea, W. J. (1993). Progressive stretch overload of skeletal muscle results in hypertrophy before hyperplasia. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 75(3), 1263–71.
- Arsham, A. M., Howell, J. J., & Simon, M. C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29655–60.
- Bajard, L., Relaix, F., Lagha, M., Rocancourt, D., Daubas, P., & Buckingham, M. E. (2006). A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Development*, 20(17), 2450–64.
- Bamman, M. M., Petrella, J. K., Kim, J., Mayhew, D. L., & Cross, J. M. (2007). Cluster analysis tests the importance of myogenic gene expression during myofiber hypertrophy in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 102(6), 2232–9.
- Bird, S. P., Tarpinning, K. M., & Marino, F. E. (2005). Programmes to Enhance Muscular Fitness A Review of the Acute Programme Variables. *Sports Medicine*, 35(10), 841–851.
- Bischoff, R. (1986). A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Development Biology*, 115, 140-147.
- Bischoff, R. (1975). Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *The Anatomical record*, 182 (2), 215-235.
- Blaauw, B., Canato, M., Agatea, L., Toniolo, L., Mammucari, C., Masiero, E., ... Reggiani, C. (2009). Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3896–905.
- Blitzer, M., & Loh, E. (1996). Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans. *Journal of the ...*, 28(3), 591–6.
- Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J., & Rando, T. a. (2008). A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*, 2(1),

- Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., & Rando, T. a. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5839), 807–10.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., ... Kaelin, W. G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, *18*(23), 2893–904.
- Bruusgaard, J. C., Egner, I. M., Larsen, T. K., Dupre-Aucouturier, S., Desplanches, D., & Gundersen, K. (2012). No change in myonuclear number during muscle unloading and reloading. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *113*(2), 290–6.
- Bruusgaard, J. C., Johansen, I. B., Egner, I. M., Rana, Z. a, & Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15111–6.
- Bruusgaard, J. C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K., & Gundersen, K. (2003). Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *The Journal of Physiology*, *551*(Pt 2), 467–78.
- Burgomaster, K. a, Moore, D. R., Schofield, L. M., Phillips, S. M., Sale, D. G., & Gibala, M. J. (2003). Resistance training with vascular occlusion: metabolic adaptations in human muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *35*(7), 1203–8.
- Cabric, M., Appell, H. & Resic, A. (1987). Effects of Electrical Stimulation of Different Frequencies on the Myonuclei. *Journal of Sports Medecine*, *8*, 323–326.
- Capkovic, K. L., Stevenson, S., Johnson, M. C., Thelen, J. J., & Cornelison, D. D. W. (2008). Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation. *Experimental Cell Research*, *314*(7), 1553–65.
- Chargé, S. B. P., & Rudnicki, M. a. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiology Reveiw*, *84*(1), 209–38.
- Cheek, D. (1985). The control of cell mass and replication. The DNA unit-a personal 20-year study. *Early Human Development*, *12*(3), 211–39. Retrieved from
- Cheek, D., Holt, A., Hill, D., & Talbert, J. (1971). Skeletal muscle cell mass and growth: the concept of the deoxyribonucleic acid unit. *Pediatric Research*, *5*, 312–328.
- Che, G., & Quinn, L. S. (1992). Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract. *Journal of Cell Physiology*, *153*, 563-574.
- Chen, Y., Zajac, J. D., & MacLean, H. E. (2005). Androgen regulation of satellite cell function. *The Journal of Endocrinology*, *186*(1), 21–31.

- Chang, C. C., Rudnicki, M. A. (2014) Satellite Cells: The Architects of Skeletal Muscle. *Current Topics in Development Biology*, 107, 161-181.
- Clarke, M., & Feedback, D. (1996). Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. *The FASEB Journal*, 10, 502–509.
- Clarke, M. S. F., Bamman, M. M., Feedback, D. L., Shipp, J. R., Jiang, J., Gower, B. A., ... Physiol, C. (1998). Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release humans growth hormone Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release. *Japanese Journal of Physiology*, 85, 593–600.
- Conboy, I. M., & Rando, T. a. (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Developmental Cell*, 3(3), 397–409.
- Cooper, R. N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., & Butler-Browne, G. S. (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *Journal of Cell Science*, 112 ( Pt 1, 2895–901.
- Covault, J., & Sanes, J. R. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 102(3), 716–30.
- Crameri, R. M., Langberg, H., Magnusson, P., Jensen, C. H., Schrøder, H. D., Olesen, J. L., ... Kjaer, M. (2004). Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 1), 333–40.
- Cumming, K. T., Paulsen, G., Wernbom, M., Ugelstad, I., & Raastad, T. (2014). Acute response and subcellular movement of HSP27,  $\alpha$  B-crystallin and HSP70 in human skeletal muscle after blood flow restricted low-load resistance exercise. *Acta Physiologica*, Epub.
- Dahl, H, A. (2008). *Mest om muskel. Essensiel muskelbiologi*. Oslo: Cappelen Akademiske Forlag.
- Dangott, B., Schultz, E., & Mozdziak, P. E. (2000). Dietary creatine monohydrate supplementation increases satellite cell mitotic activity during compensatory hypertrophy. *International Journal of Sports Medicine*, 21(1), 13–6.
- Dhawan, J., & Rando, T. a. (2005). Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in Cell Biology*, 15(12), 666–73.
- Dreyer, H. C., Blanco, C. E., Sattler, F. R., Schroeder, E. T., & Wiswell, R. a. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle & Nerve*, 33(2), 242–53. doi:10.1002/mus.20461

- Drummond, M. J., Fujita, S., Abe, T., Takashi, A., Dreyer, H. C., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2008). Human muscle gene expression following resistance exercise and blood flow restriction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *40*(4), 691–8.
- Egner, I. M., Bruusgaard, J. C., Eftestøl, E., & Gundersen, K. (2013). A cellular memory mechanism aids overload hypertrophy in muscle long after an episodic exposure to anabolic steroids. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 24), 6221–30.
- Eriksson, A., Kadi, F., Malm, C., & Thornell, L.-E. (2005). Skeletal muscle morphology in power-lifters with and without anabolic steroids. *Histochemistry and Cell Biology*, *124*(2), 167–75.
- Floss, T., Arnold, H.-H., & Braun, T. (1997). A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & Development*, *11*(16), 2040–2051.
- Fry, C. S., Glynn, E. L., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., Fujita, S., Abe, T., ... Rasmussen, B. B. (2010). Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *108*(5), 1199–209.
- Fujita, S., Abe, T., Drummond, M. J., Cadenas, J. G., Dreyer, H. C., Sato, Y., ... Rasmussen, B. B. (2007). Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *103*(3), 903–10.
- Fujita, T., Brechue, W. F., Kurita, K., Sato, Y., & Abe, T. (2008). Increased muscle volume and strength following six days of low-intensity resistance training with restricted muscle blood flow. *International Journal of KAATSU Training Research*, *4*(1), 1–8.
- Godfrey, R. J., Madgwick, Z., & Whyte, G. P. (2003). The exercise-induced growth hormone response in athletes. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *33*(8), 599–613.
- Gregory, M. A., & Chb, M. M. M. B. (2004). Mobilisation of satellite cells following ischaemia and reperfusion in primate skeletal muscle, *16*(1), 17–24.
- Grembowicz, K. P., Sprague, D., & McNeil, P. L. (1999). Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress. *Molecular Biology of the Cell*, *10*(4), 1247–57.
- Guerci, A., Lahoute, C., Hébrard, S., Collard, L., Graindorge, D., Favier, M., ... Sotiropoulos, A. (2012). Srf-dependent paracrine signals produced by myofibers control satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metabolism*, *15*(1), 25–37.

- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 86(3), 564–600.
- Gundermann, D. M., Walker, D. K., Reidy, P. T., Borack, M. S., Dickinson, J. M., Volpi, E. & Rasmussen, B. B. (2014). Activation of mTORC1 Signaling and Protein Synthesis in Human Muscle Following Blood Flow Restriction Exercise is Inhibited by Rapamycin. *Endocrinology and Metabolism*
- Halevy, O., Piestun, Y., Allouh, M. Z., Rosser, B. W. C., Rinkevich, Y., Reshef, R., ... Yablonka-Reuveni, Z. (2004). Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 231(3), 489–502.
- Hall, Z. W., & Ralston, E. (1989). Nuclear Domains in Muscle Cells Minireview. *Cell Press*, 59, 771–772.
- Hameed, M., Orrell, R. W., Cobbold, M., Goldspink, G., & Harridge, S. D. R. (2003). Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *The Journal of Physiology*, 547(Pt 1), 247–54.
- Hanssen, K. E., Kvamme, N. H., Nilsen, T. S., Rønnestad, B., Ambjørnsen, I. K., Norheim, F., ... Raastad, T. (2012). The effect of strength training volume on satellite cells, myogenic regulatory factors, and growth factors. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 23(6), 728–39.
- Hawke, T. (2005). Muscle stem cells and exercise training. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 3, 63–68.
- Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(2), 534–51.
- Hikida, R., Walsh, S., & Barylski, N. (1998). Is hypertrophy limited in elderly muscle fibers? A comparison of elderly and young strength-trained men. *BAM-PADOVA-*, 8, 419–427.
- Hill, M., & Goldspink, G. (2003). Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *The Journal of Physiology*, 549(Pt 2), 409–18.
- Holm, L., Reitelseder, S., Pedersen, T. G., Doessing, S., Petersen, G., Flyvbjerg, A., ... Kjaer, M. (2008). Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. *Journal of Applied ...*, 105, 1454–1461.
- Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T., & Pavlath, G. K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell*, 113(4), 483–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757709>

- Hu, P., Geles, K. G., Paik, J.-H., DePinho, R. a, & Tjian, R. (2008). Codependent activators direct myoblast-specific MyoD transcription. *Developmental Cell*, 15(4), 534–46.
- Ishido, M., Kami, K., & Masuhara, M. (2004). Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiologica Scandinavica*, 180(3), 281–9.
- Iversen, E., & Røstad, V. (2010). Low-load ischemic exercise-induced rhabdomyolysis. *Clinical Journal of Sport Medicine : Official Journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, 20(3), 218–9.
- Jaspers, R. T., Feenstra, H. M., van Beek-Harmsen, B. J., Huijting, P. a, & van der Laarse, W. J. (2006). Differential effects of muscle fibre length and insulin on muscle-specific mRNA content in isolated mature muscle fibres during long-term culture. *Cell and Tissue Research*, 326(3), 795–808.
- Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C., & Marti, H. H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *The American Journal of Physiology*, 271(4 Pt 1), C1172–80.
- Jiang, B., Rue, E., Guang, L., Roe, R., Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1996). Nucleic Acids , Protein Synthesis , and Molecular Genetics : Dimerization , DNA Binding , and Transactivation Properties of Dimerization , DNA Binding , and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1 \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 17771.
- Jones, D., & Rutherford, O. (1987). Human muscle strength training: the effects of three different regimens and the nature of the resultant changes. *The Journal of Physiology*, 391, 1–11. Retrieved from <http://jp.physoc.org/content/391/1/1.short>
- Jones, N. C., Tyner, K. J., Nibarger, L., Stanley, H. M., Cornelison, D. D. W., Fedorov, Y. V, & Olwin, B. B. (2005a). The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *The Journal of Cell Biology*, 169(1), 105–16.
- Jones, N. C., Tyner, K. J., Nibarger, L., Stanley, H. M., Cornelison, D. D. W., Fedorov, Y. V, & Olwin, B. B. (2005b). The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *The Journal of Cell Biology*, 169(1), 105–16.
- Jouliia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., & Cabello, G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*, 286(2), 263–275.
- Kacin, a, & Strazar, K. (2011). Frequent low-load ischemic resistance exercise to failure enhances muscle oxygen delivery and endurance capacity. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(6), e231–41.



- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., Lexell, J., Andersen, J. L., Schjerling, P., ... Kjaer, M. (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 451(2), 319–27.
- Kadi, F., Eriksson, a, Holmner, S., Butler-Browne, G. S., & Thornell, L. E. (1999). Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochemistry and Cell Biology*, 111(3), 189–95.
- Kadi, F., Eriksson, A., Holmner, S. & Thornell, L. E. (1999b). Effects of anabolic steroids on the muscle cells of strenght- trained athletes. *Medecine & Science in Sport Exercise*, 31 (11), 1528-1539.
- Kadi, F., Schjerling, P., Andersen, L. L., Charifi, N., Madsen, J. L., Christensen, L. R., & Andersen, J. L. (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 3), 1005–12. d
- Kadi, F., & Thornell, L. E. (2000). Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochemistry and Cell Biology*, 113(2), 99–103.
- Kawada, S. (2005). What phenomena do occur in blood flow-restricted muscle? *International Journal of KAATSU Training Research*, 1(2), 37–44.
- Keren, A., Tamir, Y., & Bengal, E. (2006a). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252(1-2), 224–30.
- Keren, A., Tamir, Y., & Bengal, E. (2006b). The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252(1-2), 224–30.
- Kraemer, R. R., Kilgore, J., Kraemer, G., & Castracane, V. D. (1992). Growth hormone, IGF-I, and testosterone responses to resistive exercise.pdf.
- Kraemer, W. J., Adams, K., Cafarelli, E., Dudley, G. A., Dooly, C., Feigenbaum, M. S., ... Triplett-McBride, T. (2002). American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 34, 364–380.
- Kraemer, W. J., Ratamess, N. a, Volek, J. S., Häkkinen, K., Rubin, M. R., French, D. N., ... Dioguardi, F. S. (2006). The effects of amino acid supplementation on hormonal responses to resistance training overreaching. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 55(3), 282–91.
- Krieger, J. W. (2010). SINGLE VS. MULTIPLE SETS OF RESISTANCE EXERCISE FOR MUSCLE HYPERTROPHY: A META-ANALYSIS. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(4), 1150–1159.

- Krustrup, P., Söderlund, K., Relu, M. U., Ferguson, R. a., & Bangsbo, J. (2009). Heterogeneous recruitment of quadriceps muscle portions and fibre types during moderate intensity knee-extensor exercise: effect of thigh occlusion. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *19*(4), 576–84.
- Kubo, K., Komuro, T., Ishiguro, N., Tsunoda, N., Sato, Y., Ishii, N., ... Fukunaga, T. (2006). Effects of low-load resistance training with vascular occlusion on the mechanical properties of muscle and tendon. *Journal of Applied Biomechanics*, *22*(2), 112–9.
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Vökl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., & Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, *78*(1), 247–306.
- Lassar, A. B. (2009). The p38 MAPK family, a pushmi-pullyu of skeletal muscle differentiation. *The Journal of Cell Biology*, *187*(7), 941–943.
- Laurentino, G. C., Ugrinowitsch, C., Roschel, H., Aoki, M. S., Soares, A. G., Neves, M., ... Tricoli, V. (2012). Strength training with blood flow restriction diminishes myostatin gene expression. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *44*(3), 406–12.
- Laurentino, G., Ugrinowitsch, C., Aihara, a Y., Fernandes, a R., Parcell, a C., Ricard, M., & Tricoli, V. (2008). Effects of strength training and vascular occlusion. *International Journal of Sports Medicine*, *29*(8), 664–7.
- Lindström, M., & Thornell, L.-E. (2009). New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochemistry and Cell Biology*, *132*(2), 141–57.
- Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular Cell*, *21*(4), 521–31.
- Loenneke, J., Kearney, M., Thrower, A., Collins, S., & Pujol, T. (2010). The acute response of practical occlusion in the knee extensors. *The Journal of ...*, *24*, 2831–2834.
- Loenneke, J. P., Fahs, C. a, Rossow, L. M., Abe, T., & Bembem, M. G. (2012). The anabolic benefits of venous blood flow restriction training may be induced by muscle cell swelling. *Medical Hypotheses*, *78*(1), 151–4.
- Loenneke, J. P., Thiebaud, R. S., & Abe, T. (2014). Does blood flow restriction result in skeletal muscle damage? A critical review of available evidence. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Epub.
- Loenneke, J. P., Wilson, J. M., Marín, P. J., Zourdos, M. C., & Bembem, M. G. (2012). Low intensity blood flow restriction training: a meta-analysis. *European Journal of Applied Physiology*, *112*(5), 1849–59.

- Lipton, B. H. & Schultz, E. (1979). Developmental fate of skeletal muscle cells. *Science*, 205 (4412), 1292-1294.
- Lunde, I. G., Anton, S. L., Bruusgaard, J. C., Rana, Z. a, Ellefsen, S., & Gundersen, K. (2011). Hypoxia inducible factor 1 links fast-patterned muscle activity and fast muscle phenotype in rats. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 6), 1443–54.
- Mackey, a L., Esmarck, B., Kadi, F., Koskinen, S. O. a, Kongsgaard, M., Sylvestersen, a, ... Kjaer, M. (2007). Enhanced satellite cell proliferation with resistance training in elderly men and women. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 17(1), 34–42.
- Mackey, a L., Holm, L., Reitelseder, S., Pedersen, T. G., Doessing, S., Kadi, F., & Kjaer, M. (2011). Myogenic response of human skeletal muscle to 12 weeks of resistance training at light loading intensity. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(6), 773–82.
- Mackey, A. L., Andersen, L. L., Frandsen, U., & Sjøgaard, G. (2011). Strength training increases the size of the satellite cell pool in type I and II fibres of chronically painful trapezius muscle in females. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 22), 5503–15.
- Mackey, A. L., Kjaer, M., Charifi, N., Henriksson, J., Bojsen-Moller, J., Holm, L., & Kadi, F. (2009). Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies. *Muscle & Nerve*, 40(3), 455–65.
- Madarame, H., Neya, M., Ochi, E., Nakazato, K., Sato, Y., & Ishii, N. (2008). Cross-transfer effects of resistance training with blood flow restriction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 40(2), 258–63.
- Manimmanakorn, A., Hamlin, M. J., Ross, J. J., Taylor, R., & Manimmanakorn, N. (2012). Effects of low-load resistance training combined with blood flow restriction or hypoxia on muscle function and performance in netball athletes. *Journal of Science and Medicine in Sport / Sports Medicine Australia*, 16(4), 337–42.
- McCall, G. E., Allen, D. L., Linderman, J. K., Grindeland, R. E., Roy, R. R., Mukku, V. R., & Edgerton, V. R. (1998). Maintenance of myonuclear domain size in rat soleus after overload and growth hormone/IGF-I treatment. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 84(4), 1407–12.
- McCall, G. E., Byrnes, W. C., Dickinson, a, Pattany, P. M., & Fleck, S. J. (1996). Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 81(5), 2004–12.
- McCarthy, J. J., Mula, J., Miyazaki, M., Erfani, R., Garrison, K., Farooqui, A. B., ... Peterson, C. a. (2011). Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)*, 138(17), 3657–66.

- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., & Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of Cell Biology*, 162(6), 1135–47.
- McKay, B. R., Toth, K. G., Tarnopolsky, M. a, & Parise, G. (2010). Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 17), 3307–20.
- McKinnell, I. W., Ishibashi, J., Le Grand, F., Punch, V. G. J., Addicks, G. C., Greenblatt, J. F., ... Rudnicki, M. a. (2008). Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex. *Nature Cell Biology*, 10(1), 77–84. d
- Megeney, L. a, Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. a. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes & Development*, 10(10), 1173–1183.
- Moeller T., Reif E. (2007). Pocket Atlas of Sectional Anatomy, Vol. III: Spine, Extremities, Joints: Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. hieme Medical Publishers.
- Moore, D. R., Burgomaster, K. a, Schofield, L. M., Gibala, M. J., Sale, D. G., & Phillips, S. M. (2004). Neuromuscular adaptations in human muscle following low intensity resistance training with vascular occlusion. *European Journal of Applied Physiology*, 92(4-5), 399–406.
- Moritani, T., Sherman, W., Shibata, M., Matsumoto, T., & Shinohara, M. (1992). Moritani et al., 1992. Oxygen availability and motor unit activity in humans.pdf.
- Nielsen, J. L., Aagaard, P., Bech, R. D., Nygaard, T., Hvid, L. G., Wernbom, M., ... Frandsen, U. (2012). Proliferation of myogenic stem cells in human skeletal muscle in response to low-load resistance training with blood flow restriction. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 17), 4351–61.
- Nielsen, T, S. (2007). *Effekten av styrketrening med én og tre serier på satellittcelle, myogene regulerings faktorer og muskelcellekjerner*. Masteroppgave ved Norges Idrettshøgskole, Oslo.
- O'Connor, R. S., & Pavlath, G. K. (2007). Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(3), 1099–100.
- O'Connor, R. S., Pavlath, G. K., McCarthy, J. J., & Esser, K. a. (2007). Last Word on Point:Counterpoint: Satellite cell addition is/is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(3), 1107.

- Ogasawara, R., Kobayashi, K., Tsutaki, A., Lee, K., Abe, T., Fujita, S., ... Ishii, N. (2013). mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 114(7), 934–40.
- Ogasawara, R., Yasuda, T., Ishii, N., & Abe, T. (2013). Comparison of muscle hypertrophy following 6-month of continuous and periodic strength training. *European Journal of Applied Physiology*, 113(4), 975–85.
- Ogasawara, R., Yasuda, T., Sakamaki, M., Ozaki, H., & Abe, T. (2011). Effects of periodic and continued resistance training on muscle CSA and strength in previously untrained men. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 31(5), 399–404. doi:10.1111/j.1475-097X.2011.01031.
- Ohta, H., Kurosawa, H., Ikeda, H., Iwase, Y., & Satou, N. (2003). Low-load resistance muscular training with moderate restriction of blood flow after anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 74(1), 62–68.
- Olsen, S., Aagaard, P., Kadi, F., Tufekovic, G., Verney, J., Olesen, J. L., ... Kjaer, M. (2006). Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *The Journal of Physiology*, 573(Pt 2), 525–34.
- Owino, V., Yang, S. Y., & Goldspink, G. (2001). Age-related loss of skeletal muscle function and the inability to express the autocrine form of insulin-like growth factor-1 (MGF) in response to mechanical overload. *FEBS Letters*, 505(2), 259–63.
- Pallafacchina, G., Blaauw, B., & Schiaffino, S. (2013). Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 23 Suppl 1, S12–8.
- Pattwell, D. M., Patwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. a, & Jackson, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(7), 1064–72.
- Paulsen, G., Egner, I. M., Drange, M., Langberg, H., Benestad, H. B., Fjeld, J. G., ... Raastad, T. (2010). A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 20(1), e195–207.
- Paulsen, G., Mikkelsen, U. R., Raastad, T., & Peake, J. M. (2012). Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise Immunology Review*, 18, 42–97.
- Pavlati, G., Rich, K., Webster, S., & Blau, H. (1989). Localization of muscle gene products in nuclear domains. *Nature*, 337, 570–573.
- Perdiguer, E., & Ruiz-Bonilla, V. (2007). Genetic deficiency of p38 $\alpha$  reveals its critical role in myoblast cell cycle exit. ... *Cycle*, 6(June), 1298–1303.

- Petrella, J. K., Kim, J., Cross, J. M., Kosek, D. J., & Bamman, M. M. (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women.
- Petrella, J. K., Kim, J., Mayhew, D. L., Cross, J. M., Bamman, M. M., Jk, P., ... Mm, B. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition : a cluster analysis. *Journal of Applied Physiology*, *104*, 1736–1742.
- Pierce, J. R., Clark, B. C., Ploutz-Snyder, L. L., & Kanaley, J. a. (2006). Growth hormone and muscle function responses to skeletal muscle ischemia. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *101*(6), 1588–95.
- Qin, L., Xu, J., Wu, Z., Zhang, Z., Li, J., Wang, C., & Long, Q. (2013). Notch1-mediated signaling regulates proliferation of porcine satellite cells (PSCs). *Cellular Signalling*, *25*(2), 561–9.
- Raffaello, A., Milan, G., Masiero, E., Carnio, S., Lee, D., Lanfranchi, G., ... Sandri, M. (2010). JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *The Journal of Cell Biology*, *191*(1), 101–13.
- Raastad, R. & Paulsen, P. (2010). Hva er stimuli for muskelvekst ved styrketrening? Raastad, R., Paulsen, P., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R. & Wisnes, *Styrketrening i teori og praksis*. Oslo: Gyldendal Undervisning
- Raastad, R. & Rønnestad, B. R. (2010). Adaptasjon til styrketrening. Raastad, R., Paulsen, P., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R. & Wisnes, *Styrketrening i teori og praksis*. Oslo: Gyldendal Undervisning
- Reeves, G. V., Kraemer, R. R., Hollander, D. B., Clavier, J., Thomas, C., Francois, M., & Castracane, V. D. (2006). Comparison of hormone responses following light resistance exercise with partial vascular occlusion and moderately difficult resistance exercise without occlusion. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *101*(6), 1616–22.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., ... Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of Cell Biology*, *172*(1), 91–102.
- Relaix, F., & Zammit, P. S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development (Cambridge, England)*, *139*(16), 2845–56.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V. M., & Devesa, J. (2001). Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *280*(2), 561–6.

- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V. M., & Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 282(5), C993–9.
- Rosenblatt, J. D., & Parry, D. J. (1993). Adaptation of rat extensor digitorum longus muscle to gamma irradiation and overload. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 423(3-4), 255–264.
- Rosenblatt, J., Yong, D., & Parry, D. (1994). Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat muscle. *Muscle & Nerve*, 17(June), 608–613.
- Roth, S. M., Martel, G., Ivey, F. M., Lemmer, J., Tracy, B. L., Jeffrey Metter, E., ... Rogers, M. (2001). Skeletal muscle satellite cell characteristics in young and older men ... *The Journal of Gerontology*, 6, 240–247.
- Roy, R. R., Monke, S. R., Allen, D. L., & Edgerton, V. R. (1999). Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87(2), 634–42.
- Rudnicki, M. a, Le Grand, F., McKinnell, I., & Kuang, S. (2008). The molecular regulation of muscle stem cell function. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73, 323–31.
- Ruiz-Bonilla, V., & Perdiguero, E. (2008). Efficient adult skeletal muscle regeneration in mice deficient in p38beta, p38gamma and p38delta MAP kinases. *Cell ...*, 7(July), 2208–2214.
- Russell, B., & Dix, D. J. (1992). Mechanisms for intracellular distribution of mRNA: in situ hybridization studies in muscle. *The American Journal of Physiology*, 262(1 Pt 1), C1–8.
- Rønnestad, B., & Egeland, W. (2007). Dissimilar effects of one-and three-set strength training on strength and muscle mass gains in upper and lower body in untrained subjects. ... *Journal of Strength & ...*, 21(1), 157–163.
- Schiaffino, S., Bormioli, S. P., & Aloisi, M. (1976). The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. *Virchows Archiv. B: Cell Pathology*, 21(2), 113–8.
- Schmalbruch, H., & Lewis, D. M. (2000). Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle & Nerve*, 23(4), 617–26.
- Schoenfeld, B. J. (2013). Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 43(3), 179–94.
- Scott, B. R., Slattery, K. M., Sculley, D. V, & Dascombe, B. J. (2014). Hypoxia and Resistance Exercise: A Comparison of Localized and Systemic Methods. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*.

- Seale, P., Sabourin, L. a, Girgis-Gabardo, a, Mansouri, a, Gruss, P., & Rudnicki, M. a. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777–86.
- Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., & Muñoz-Cánoves, P. (2008). Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metabolism*, 7(1), 33–44.
- Shinohara, M., Kouzaki, M., Yoshihisa, T., & Fukunaga, T. (1998). Efficacy of tourniquet ischemia for strength training with low resistance. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 77(1-2), 189–91.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Tenne, T., Gorodin, S., Moshel, Y., ... Leshkowitz, D. (2002). Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Involved in Apoptosis Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene , RTP801 , Involved in Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 2283–2293.
- Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N., Singh, A. B., Lee, M. I., ... Bhasin, S. (2002). Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 283(1), E154–64.
- Soleimani, V. D., Punch, V. G., Kawabe, Y., Jones, A. E., Palidwor, G. a, Porter, C. J., ... Rudnicki, M. a. (2012). Transcriptional dominance of Pax7 in adult myogenesis is due to high-affinity recognition of homeodomain motifs. *Developmental Cell*, 22(6), 1208–20.
- Suga, T., Okita, K., Morita, N., Yokota, T., Hirabayashi, K., Horiuchi, M., ... Tsutsui, H. (2009). Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 106(4), 1119–24.
- Suga, T., Okita, K., Takada, S., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Yokota, T., ... Tsutsui, H. (2012). Effect of multiple set on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *European Journal of ...*, 112(2), 3915–3920.
- Sumide, T., Sakuraba, K., Sawaki, K., Ohmura, H., & Tamura, Y. (2009). Effect of resistance exercise training combined with relatively low vascular occlusion. *Journal of Science and Medicine in Sport / Sports Medicine Australia*, 12(1), 107–12.
- Suzuki, M., Angata, K., Nakayama, J., & Fukuda, M. (2003). Polysialic acid and mucin type o-glycans on the neural cell adhesion molecule differentially regulate myoblast fusion. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49459–68.
- Takada, S., Okita, K., Suga, T., Omokawa, M., Kadoguchi, T., Sato, T., ... Tsutsui, H. (2012). Low-intensity exercise can increase muscle mass and strength proportionally to enhanced metabolic stress under ischemic conditions. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 113(2), 199–205.



- Takano, H., Morita, T., Iida, H., Asada, K., Kato, M., Uno, K., ... Nakajima, T. (2005). Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. *European Journal of Applied Physiology*, 95(1), 65–73.
- Takarada, Y., Nakamura, Y., Aruga, S., Onda, T., Miyazaki, S., & Ishii, N. (2000a). Rapid increase in plasma growth hormone after low-intensity resistance exercise with vascular occlusion. *Journal of Applied Physiology*, 88(1), 61–65.
- Takarada, Y., Sato, Y., & Ishii, N. (2002a). Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *European Journal of Applied Physiology*, 86(4), 308–314.
- Takarada, Y. T., Suruta, T. T., & Shii, N. I. (2004). Cooperative Effects of Exercise and Occlusive Stimuli on Muscular Function in Low-Intensity Resistance Exercise. *Japanese Journal of Physiology*, 54(6), 585–592.
- Takarada, Y., Takazawa, H., Sato, Y., Takebayashi, S., Tanaka, Y., & Ishii, N. (2000b). Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 88, 2097–2106.
- Tatsumi, R. (2010). Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 81(1), 11–20.
- Tatsumi, R., & Allen, R. E. (2004). Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & Nerve*, 30(5), 654–8.
- Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O., & Allen, R. E. (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Developmental Biology*, 194(1), 114–28.
- Tatsumi, R., Liu, X., Pulido, A., Morales, M., Sakata, T., Dial, S., ... Allen, R. E. (2006). Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 290(6), C1487–C1494.
- Tidball, J. G. (2005). Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(5), 1900–8.
- Umbel, J. D., Hoffman, R. L., Dearth, D. J., Chleboun, G. S., Manini, T. M., & Clark, B. C. (2009). Delayed-onset muscle soreness induced by low-load blood flow-restricted exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 107(6), 687–95.

- Van der Meer, S. F. T., Jaspers, R. T., Jones, D. a, & Degens, H. (2011). The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 193(1), 56–63.
- Verdijk, L. B., Gleeson, B. G., Jonkers, R. a M., Meijer, K., Savelberg, H. H. C. M., Dendale, P., & van Loon, L. J. C. (2009). Skeletal muscle hypertrophy following resistance training is accompanied by a fiber type-specific increase in satellite cell content in elderly men. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(3), 332–9.
- Verdijk, L., & Koopman, R. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of ...*, 292, 151–157.
- Verney, J., Kadi, F., Charifi, N., Féasson, L., Saafi, M. A., Castells, J., ... 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(3), 1147–54.
- Vierck, J., O'Reilly, B., Hossner, K., Antonio, J., Byrne, K., Bucci, L., & Dodson, M. (2000). Satellite cell regulation following myotrauma caused by resistance exercise. *Cell Biology International*, 24(5), 263–72.
- Volek, J. S., Ratamess, N. a, Rubin, M. R., Gómez, A. L., French, D. N., McGuigan, M. M., ... Kraemer, W. J. (2004). The effects of creatine supplementation on muscular performance and body composition responses to short-term resistance training overreaching. *European Journal of Applied Physiology*, 91(5-6), 628–37.
- Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L. W., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2006). Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39128–34.
- Wernbom, M., Apro, W., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Blomstrand, E., & Raastad, T. (2013b). Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 113(12), 2953–65.
- Wernbom, M., Augustsson, J., & Raastad, T. (2008). Ischemic strength training: a low-load alternative to heavy resistance exercise? *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 18(4), 401–16.
- Wernbom, M., Augustsson, J., & Thomeé, R. (2007). The influence of frequency, intensity, volume and mode of strength training on whole muscle cross-sectional area in humans. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 37(3), 225–64.
- Wernbom, M., Jarrebring, R., Andreasson, M., & Augustsson, J. (2009). Acute effects of blood flow restriction on muscle activity and endurance during fatiguing dynamic knee extensions at low load. *The Journal of ...*, 23(8), 2389–2395.

- Wernbom, M. W. (2011). *Effects of and Acute Bout of Low-Load Resistance Training with Blood Flow Restriction*. Doktorgradsavhandling ved Norges idrettshøgskole, Oslo.
- Wernbom, M., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Hisdal, J., & Raastad, T. (2012). Contractile function and sarcolemmal permeability after acute low-load resistance exercise with blood flow restriction. *European Journal of Applied Physiology*, *112*(6), 2051–63.
- West, D. W. D., Burd, N. a, Staples, A. W., & Phillips, S. M. (2010). Human exercise-mediated skeletal muscle hypertrophy is an intrinsic process. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*(9), 1371–5.
- West, D. W. D., & Phillips, S. M. (2010). Anabolic processes in human skeletal muscle: restoring the identities of growth hormone and testosterone. *The Physician and Sportsmedicine*, *38*(3), 97–104.
- Yamada, M., Tatsumi, R., Kikuri, T., Okamoto, S., Nonoshita, S., Mizunoya, W., ... Allen, R. E. (2006). Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve*, *34*(3), 313–319.
- Yang, S. Y., & Goldspink, G. (2002). Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Letters*, *522*(1-3), 156–60.
- Yasuda, T., Brechue, W. F., Fujita, T., Shirakawa, J., Sato, Y., & Abe, T. (2009). Muscle activation during low-intensity muscle contractions with restricted blood flow. *Journal of Sports Sciences*, *27*(5), 479–89.
- Yasuda, T., Ogasawara, R., Miakako, S., Ozaki, H., Sato, Y., & Abe, T. (2011). Combined effects of low-intensity blood flow restriction training and high-intensity resistance training on muscle strength and size. *European Journal of Applied Physiology*, *111*, 2525–2533.
- Yasuda, T., Ogasawara, R., Sakamaki, M., Bemben, M. G., & Abe, T. (2011). Relationship between limb and trunk muscle hypertrophy following high-intensity resistance training and blood flow-restricted low-intensity resistance training. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, *31*(5), 347–51.
- Zammit, P. S., Partridge, T. a, & Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, *54*(11), 1177–91.

## Figuroversikt

<b>Figur 1.1</b> Pre; baseline, mid8; etter 1 uke trening, post 3 og 10; 3 og 10 dager etter siste treningsuke. A; Pax 7 <sup>+</sup> positive satellittceller per muskelfiber i type II fibre. B; Cellekjerneantall per muskelfiber i type II fibre. Modifisert etter Nielsen et al. (2012).....	13
<b>Figur 2.1.</b> Simplifisert skjematisk fremstilling av det foreslåtte samspillet mellom potensielle mekanismer, som kan meditere den adaptive responsen etter SRB. Sannsynlige mekanismer er representert i de mørkegrå boksene. Mekanismer som det kreves mer forskning på er representert i de hvite boksene. Utfall/ resultat av SRB er representert i de lysegrå boksene. Hele piler indikerer sannsynlig sammenheng mellom foreslåtte mekanismer. Stiplede piler indikerer en mulig sammenheng mellom foreslåtte mekanismer, som krever mer forskning. CSA: tverrsnittsarea., ROS: reaktive oksygenradikaler. SRB: styrketrening med redusert blodstrøm.. Modifisert etter Scott et al. (2014).....	19
<b>Figur 2.2</b> Lokalisasjon av satellittcellen i skjelettmuskelfiberen. Modifisert etter Vierck et al. (2000). ....	30
<b>Figur 2.3</b> MRFene uttrykkes i satellittcellen på ulike tidspunkter i aktiveringsforløpet. Modifisert etter Chen, Zajac, & MacLean, (2005).....	34
<b>Figur 2.4</b> Mekanobiologien. Skjematisk fremstilling av mulige mekanismer for satellittcelleaktivering i respons til mekanisk stimuli. Et drag i muskulaturen fører til Ca <sup>2+</sup> -innfluks inn i satellittcellen gjennom kalsiumkanaler i membranen. Ca <sup>2+</sup> aktiverer kalsium – Calmodulin (Ca-CaM), som aktiverer nitrogenoksid syntase (NOS). Aktivert NOS produserer nitrogenoksid (NO) fra aminosyren L-arginin og NO diffunderer ut av satellittcellen. Ekstracellulært aktiverer NO MMP2, som videre frigjør HGF fra proteglykanet. Etter frigjøring fra proteglykanet translokeres og binder HGF seg til c-met reseptoren som starter en signalkaskade videre til kjernen og aktiverer satellittcellen. Modifisert etter Tatsumi, (2010). .	35
<b>Figur 2.5</b> Skjematisk modell: I respons til en ytre belastning (eks trening) modulerer Srf IL-6 og Cox2/IL-4 utykkelsen, som på en parakrin måte kontrollerte satellittcelleproliferasjon og fusjon, som til slutt støtter muskelhypertrofi. Modifisert etter Guerci et al. (2012). ....	37
<b>Figur 2.6</b> Tellekriterier for muskelcellekjerner. Kjernens geometriske massesenter måtte lokaliseres på innsiden av dystrofinmerkingen for at kjernene skulle godkjennes som en muskelcellekjerne, merket med MK. Resisterende kjerner merket uten MK ble ikke vurdert som muskelcellekjerner. Muskelsnittet ble merket med antistoff mot dystrofin (rødt) og DNA/ kjerner (blått). Snittet ble kuttet 8µm. ....	42
<b>Figur 2.7</b> Satellittcellens rolle ved muskelhypertrofi. A: Under hypertrofi, satellittceller i dvale blir aktivert, proliferer og differensierer. Noen datterceller smelter sammen med eksisterende fiber og danne nye muskelcellekjerner (nedre fibre). I enkelte tilfeller ved regenerering, smelter satellittcellene sammen og danner nye muskelfibre (øvre fibre). B: Kjernedomeneteorien tyder på at hver muskelcellekjerne syntetiserer proteiner for et lokalt domene i dens umiddelbare nærhet. Derfor blir nye muskelcellekjerner addert gjennom donering av nye satellittceller under hypertrofi for å regulere økning i cytoplasma. Figuren er hentet fra (Hawke, 2005).....	43
<b>Figur 3.1</b> Studiedesign. ....	53
<b>Figur 3.2</b> Styrketrening med redusertblodtilførsel (SRB) i knekestensjons- apparat. 1: 135 mm pneumatisk mansjett. 2: Datastyrt torniquetsystem. ....	55
<b>Figur 3.3</b> Dynamometer benyttet til isokinetiske -og isometriske styrketester. 1: Dynamometer.....	57
<b>Figur 3.4</b> Muskelbiopsiene fra hver forsøksperson ble plassert på objektivglasset i den tidsrekkefølgen de ble tatt i fra pre til siste postbiopsi (1-7). ....	60
<b>Figur 3.5</b> Blueprint, muskelsnitt merket med laminin. Invertert i Cell <sup>^</sup> F. ....	63

- Figur 3.6** Satellittcelle (inne i gul firkant) som fyller alle tre inklusjonskriteriene for å bli telt som satellittcelle (NCAM positiv celle). Lysegrønn merking/ring = NCAM, rød merking = laminin og blå merking = DAPI. .... 65
- Figur 3.7** Satellittceller (inne i gul firkant) som fyller begge inklusjonskriteriene for å bli telt som satellittcelle (Pax7 positiv celle). A: Rød merking= laminin, grønn merking= Pax7. B: Rød merking= laminin, blå merking= DAPI. C: Sammensatt bilde; laminin + Pax7 + DAPI. .... 66
- Figur 3.8** Telling av cellekjerner. Snitt merket mot dystrofin (rød merking), MHC II (grønn merking) og DAPI (blå merking). Romertall indikerer fibertype I og II. Hvite tall markerer muskelcellekjerner i type I fibre, røde tall i type II fibre. .... 67
- Figur 3.9** Blå merking = DAPI (muskelcellekjernemerking) og rød merking = dystrofin. Muskelcellekjerner merket med MK ble konkludert å ha sitt geometriske senter (cellekjernesenter) på innsiden av dystrofinmerkingen. .... 68
- Figur 3.10** Kvantifisering av muskelfibertype –og areal i TEMA. Muskelfibre med grå merking og rødt punkt i midten er type II fibre. Ikke merkede fibre (hvite) med blått punkt i midten er type I fibre. .... 70
- Figur 4.1** Absolutt endring i muskelstyrke målt som 1RM i kneekstensjon (høyre) og maksimal dreiemoment i isokinetisk (60 grader/sekund) kneekstensjon (venstre). Prosentvis endring i innfelt figur. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 72
- Figur 4.2** Individuelle tverrsnitt (CSA) for m. vastus lateralis (høyre) og peak tverrsnitt (CSA) for m. vastus lateralis (venstre) ved baseline og 7 dager etter siste treningsøkt (post). .... 73
- Figur 4.3** Endring i tykkelse av m. vastus lateralis. Tidspunkter merket med B ble det tatt biopsi samme dag. \* Signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,05$ ). # Signifikant forskjell fra dag 9 ( $p = 0,02$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 73
- Figur 4.4** Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ ) målt gjennom oppfølgingsperioden for type I fibre (venstre) og type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p = 0,05$ ). \*\*\* signifikant forskjell fra dag 9 ( $p < 0,01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 74
- Figur 4.5** Frekvensdiagram for muskelfiberareal før, etter første og andre treningsuke. .... 75
- Figur 4.6** Antall satellittceller merket med Pax7 per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,05$ ). \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 76
- Figur 4.7** Antall satellittceller merket med NCAM per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,01$ ). Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 77
- Figur 4.8** Antall cellekjerner per muskelfiber rundt type I fibre (venstre) og rundt type II fibre (høyre). Prosentvis endring i innfelt figur. Fra baseline til post 10 ble det funnet en tendens til økning ( $p = 0,10$ ) rundt type I fibre. Fra dag 9 til post 10 ble det funnet en tendens til økning ( $p = 0,10$ ) rundt type II fibre. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 78
- Figur 4.9** Muskelfiberareal ( $\mu\text{m}^2$ ) per cellekjerne (kjernedomene) for type I fibre (venstre) og type II fibre (høyre). Prosent endring i innfelt figur. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 79
- Figur 4.10** Prosent endring Pax7 positive celler per cellekjerne for type II fibre (høyre) type I fibre (venstre). Prosent endring i innfelt figur. \* signifikant forskjell fra baseline ( $p = 0,04$ ). \*\* signifikant forskjell fra baseline ( $p < 0,01$ ). Fra baseline til dag 9 det funnet en tendens til økning ( $p = 0,06$ ) for type II fibre. Verdier er gjennomsnitt og feilmarkører beskriver standard avvik. .... 80
- Figur 4.11** Sammenhengen mellom prosentvis endring i kjerner per fiber og fiberareal i type II fibre. ... 81

**Figur 4.12** Sammenhengen mellom prosentvis endring i satellittceller per fiber og fiberareal i type II...81

## Tabelloversikt

<b>Tabell 2.1</b> Oversikt over studier som har gjennomført SRB med kontrollgruppe på prosentvis endring styrke. Skrift i kursivformat er kontrollgruppe og/eller bein for de gjeldene studiene, som trente med normal blodtilførsel (uten okklusjon). Modifisert etter Wernbom et al. (2008). .....	22
<b>Tabell 2.2</b> Oversikt over studier som har gjennomført SRB med kontrollgruppe på prosent endring i muskelvekst (muskeltvernsnitsareal og muskeltykkelse). Studier på overkropp øverst og underkropp nederst. Skrift i kursiv er kontrollgruppe i de respektive studier, som trente med normal blodtilførsel (uten okklusjon). Modifisert etter Wernbom et al. (2008). .....	27
<b>Tabell 2.3</b> Oversikt over studier på SRB og tradisjonell tung styrketrening på endring i satellittcelleantall. Akuttstudier øverst, deretter intervensjonsstudier. ....	47
<b>Tabell 2.4</b> Oversikt over studier på SRB og tradisjonell tung styrketrening på endring i muskelcellekjerner. Skrift i kursivformat er kontrollgruppe og/eller bein for de gjeldene studiene. ....	51
<b>Tabell 3.1</b> Antropometriske data av forsøkspersonene.....	54
<b>Tabell 3.2</b> Inklusjons -og eksklusjonskriterier for deltagelse i studien.....	54
<b>Tabell 3.3</b> Primær -og sekundær antistoff og proteinblokker som benyttes til IHC. ....	61
<b>Tabell 3.4</b> Nabosnitt dobbeltmerket med ulike antistoffer for hver forsøksperson. ....	62
<b>Tabell 3.5</b> Eksklusjonskriteier for muskelfibre.....	64
<b>Tabell 3.6</b> Tellekriterier for satellittceller merket med NCAM. ....	65
<b>Tabell 3.7</b> Tellekriterier for satellittceller merket med Pax7. ....	66
<b>Tabell 3.8</b> Tellekriterier for cellekjerner (DAPI).....	68
<b>Tabell 3.9</b> Eksklusjonskriterier for muskelfibre som behandles i TEMA.....	69
<b>Tabell 4.1</b> Baselineverdier for muskelstyrke målt som 1RM og maksimal dreiemoment i isokinetisk kneekstensjon for høyre og venstre bein. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt ± standardfeil. ....	71
<b>Tabell 4.2</b> Baselineverdier for satellittceller (NCAM og Pax7), cellekjerner, kjernedomene og muskelfiberareal, for type I og II fibre. Tallene presenteres som n per muskelfiber ± standardfeil. * signifikant forskjell fra type I fibre.....	71

## Vedlegg

### ***Vedlegg 1: Informasjonsskriv***



Forespørsel om deltakelse som forsøksperson

*Styrketrening med redusert blodstrøm og muskelhukommelse*

Dette skrevet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltakelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene:

- 1) Du må være i alderen 18-45 år (begge kjønn).
- 2) Du skal *ikke* ha drevet regelmessig styrketrening på lårmusklene under de siste 6 måneder (dvs. >1 økt hver annen uke).
- 3) Du må være frisk og uten skader i kneleddene og lårmusklene.
- 4) Du kan ikke bruke noen form for medikamenter eller benytte deg av kosttilskudd under treningsperioden (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende).
- 5) Du kan ikke delta om du er allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende det man får hos tannlegen).

#### **Bakgrunn og hensikt med forsøket**

Tidligere studier har vist kraftig muskelvekst selv med relativ lett motstand (20-50 % av maksimal styrke) om blodtilførselen til muskelen reduseres med en trykkmansjett under trening («okklusjonstrening»). Det interessante med denne metoden er at muskelveksten synes å være målbare etter bare få dager med trening. I denne studien ønsker vi å studere denne treningsformen nærmere, og vi er spesielt interessert i å avdekke de cellulære mekanismene. Vi er også ute etter å undersøke om muskelen kan «huske» at den har vært igjennom en kort periode med betydelig muskelvekst. Teorien bak denne hukommelsen ligger i at



muskelcellene permanent øker antall cellekjerner (som inneholder arvematerialet); så selv om muskelen svinner på grunn av redusert trening vil muskelen raskt gjenvinne størrelsen ved re-trening.

Treningsmetoden med redusert blodstrøm kan ha viktige implikasjoner for en bred målgruppe, fra idrettsutøvere til eldre med kraftig redusert muskelmasse (sarkopeni) og pasienter som skal gjennom en kneoperasjon.

### **Gjennomføringen av forsøket**

Forsøket går ut på at du trener 7 treningsøkter på 5 dager i 2 runder. De to treningsperiodene er avskilt med 10 dager hvile. Treningen består av sittende kneekstensjoner (forsiden av lårene), mens en trykkmansjett er plassert øverst på låret (i lysken).

Du vil bli rekruttert til én av to grupper. Den ene gruppen vil trene begge beina samtidig (gruppe 1), mens den andre gruppen kun vil trene ett, tilfeldig valgt bein (gruppe 2). Rekrutteres du til sistnevnte gruppe vil du om ca ett år fra nå gjennomføre en 10-ukers treningsperiode med tradisjonell, tung styrketrening for begge beina (muskelhukommelsesforsøket; se under).

For at vi skal kunne studere cellulære mekanismer i musklene, må vi ta prøver av musklene dine. Slike muskelprøver (biopsier) vil tas ved flere tidspunkt (se under). Vi vil maksimalt ta 5 prøver fra hvert lår. Blodprøver vil også tappes fra en vene i armen (vanlig blodprøvetakning).

Muskel-styrke og -tykkelse vil registreres ved flere tilfeller før, underveis og etter treningsperiodene. Til dette benytter vi styrketester der du tar i alt du kan, og vi bruker ultralyd og magnetresonans (MR) til å studere muskeltykkelsen.

Alt i alt vil du møte i laboratoriet vårt 12-15 ganger denne høsten. I tillegg kommer oppmøter for forsøket om ett år, hvis du rekrutteres til muskelhukommelsesforsøket (gruppe 2). Da vil du måtte møte i laboratoriet ytterligere 4-6 ganger, samt trene styrke 3 ganger per uke i 10 uker. Denne treningen vil du gjøre på Norges idrettshøgskole, men du kan selv velge når du skal trene. Laboratorieoppmøtene for testing og prøvetakninger vil fordeles til før og etter treningsperioden. Vi gjør individuelle avtaler.

#### *Før forsøket*

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 2-3 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, måling av muskeltykkelse med ultralyd, og en legesjekk i ukene før forsøket. Hver seanse varer i 1-2 timer. MR må gjøres på et røntgensenter i Oslo sentrum. Syv dager før forsøket tas den første biopsien og blodprøven, dette tar ca 30 minutter og foregår på formiddagen. Tidspunkter avtales individuelt. Du kan ikke drive krevende fysisk aktivitet (trening) i 2 dager før tester og biopsitakning.

*Styrketrening med redusert blodstrøm*

Du vil gjennomføre 7 treningsøkter på 5 dager under første og tredje uke av forsøksperioden. På mandag, tirsdag og onsdag har du én treningsøkt, mens torsdag og fredag har du en formiddagsøkt og ettermiddags/kvelds-økt. Treningen vil foregå i styrkelaboratoriet ved Norges idrettshøgskole, og du vil få assistanse med trykkmansjetten og gjennomføringen av selve treningen.

Treningsøkten består av 5 serier med 30 % av maksimal motstand til utmattelse i et kneekstensjonsapparat. Det vil være 45 sekunder pause mellom seriene. Denne trening gjøres med et eller to bein (avhengig av hvilken gruppe du er i), og blodstrømmen til arbeidende muskulatur vil være begrenset med ca 50 % pga. trykkmansjetten.

Er du i gruppe 1, vil du på første treningsdag i hver femdagersperiode teste maksimal isometrisk styrke før og etter treningen, samt 4 timer senere og dagen etter. Det vil også tas en biopsi 1,5 timer etter treningsøkten. Videre muskelprøver vil tas på dag 9, 15, 21 og 29.

Er du i gruppe 2, vil biopsier tas på dag 15 og 29, samt før og etter treningsperioden om et år.

*Muskelhukommelsesforsøket*

Er du i gruppe 2 vil du om ca et år fra nå starte på en 10 ukersperiode med tradisjonell styrketrening av beina tre ganger per uke. Øvelsene vil være knebøy, beinpress og kneekstensjon (5-16 repetisjoner á 2-4 serier). Tester av styrke, muskeltykkelse (MR), samt biopsier og blodprøver tas før og etter treningsperioden.

**Tester og undersøkelser**

*MR-skanning:* Denne testen innebærer at du ligger stille i ca 30 minutter i en trommel. Målingen utføres ved et røntgeninstitut i Oslo sentrum.

*Muskelfunksjonstest:* Testingen av maksimal styrke gjøres i ulike kneekstensjonsapparater, slik at vi tester både din isometriske (statiske) og dynamiske styrke – inkludert en test av 1 repetisjon maksimum (1RM).

*Blodprøver:* Blod tappes fra en vene i albuen («vanlig blodprøve»).

*Biopsier:* Det vil tas mellom 4-5 biopsier fra hvert lår (totalt 9). Biopsiene tas ut på følgende måte:

- Huden og bindevevet lokalbedøves der prøven skal tas.
- Et snitt på ca. 1 cm gjøres gjennom hud og muskelfascien.
- En nål med diameter på 5-6 mm føres inn (2-3 cm) og 1-3 små biter av muskulaturen, på størrelse med et fyrstikkhode, tas ut.
- Snittet lukkes med tape.

#### **Eventuelle ulemper ved å delta**

- Deltakelse i prosjektet vil kreve mye tid og oppmerksomhet. Du må møte ved NIH på totalt 12-14 dager denne høsten, samt neste høst om du er i gruppe 2.
- Trening skal gjennomføres vil medføre en viss risiko for muskelskader, og følelse av sårhet/stølhets i muskulaturen vil du oppleve.
- Trening med redusert blodstrøm kan oppleves som meget ubehagelig, men det er ikke knyttet stor risiko til denne typen trening.
- Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet.
- Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.
- Blodprøvetaking (veneprobe) medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig.
- En MR-skanning medfører at du ligger inne i en trommel og støynivået er betydelig; selv om du har på deg hørselsvern, kan støynivået oppleves som noe ubehagelig.

#### **Personvern**

Vi vil kun lagre informasjon om deg under ditt forsøkspersonnummer. Undervis i forsøket vil vi oppbevare en kodeliste med navn og forsøkspersonnummer. Denne kodelisten vil fysisk være låst inne, slik at det er kun forskerne tilknyttet studien som har adgang til den. Representanter fra kontrollmyndigheter i inn- og utland kan få utlevert studieopplysninger og gis innsyn i relevante deler av din journal. Formålet er å kontrollere at studieopplysningene stemmer overens med tilsvarende opplysninger i din journal. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt. Innsamlet data vil bli anonymisert etter 15 år (kodelisten destrueres).

Alle prøver vil analyseres ”blindet”, det vil si at forskerne som utfører den enkelte analysen ikke vet hvilken forsøksperson prøven kommer fra (verken forsøkspersonnummer eller gruppe)

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

**Biobank**

Biopsiene og blodprøvene vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser. Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2028. Ansvarlig for biobanken er Prof. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk.

**Innsynsrett og oppbevaring av materiale**

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

**Informasjon om utfallet av studien**

Etter at data er innsamlet og analysert vil vi avholde et møte for alle forsøkspersonene der vi presenterer resultatene fra studien.

**Forsikring**

Du som er deltaker i prosjektet er forsikret dersom det skulle oppstå skade eller komplikasjoner som følge av forskningsprosjektet. Norges idrettshøgskole er en statlig institusjon og er således selvassurandør. Dette innebærer at det er Norges idrettshøgskole som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringsselskap.

**Finansiering**

Prosjektet er fullfinansiert av Norges idrettshøgskole, Universitet i Agder og Universitetet i Oslo og Universitet i Göteborg. Det er mottatt midler fra Centrum för idrottsforskning (Sverige).

**Publisering**

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfelleurderte, tidsskrift. Du vil få tilsendt artiklene hvis du ønsker det.

### Samtykke

Hvis du har lest informasjonsskrivet og ønsker å være med som forsøksperson i prosjektet, ber vi deg undertegne “Samtykke om deltakelse” og returnere dette til en av personene oppgitt nedenfor. Du bekrefter samtidig at du har fått kopi av og lest denne informasjonen.

Det er frivillig å delta og du kan når som helst trekke deg fra prosjektet uten videre begrunnelse. Alle data vil, som nevnt ovenfor, bli aidentifisert før de blir lagt inn i en database, og senere anonymisert.

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med

Gøran Paulsen på tlf: 93429420, eller

Truls Raastad på tlf: 23 26 23 28 el. 913 68 896

Vennlig hilsen

Gøran Paulsen (forsker)

Truls Raastad (Professor)

## Vedlegg 2: Merkeprotokoller for immunhistokjemi

### Merkeprotokoll 1: Pax7 + Laminin

1. Snittene tørkes i RT (tas ut av fryser)
2. Tegn rundt snittene med PAPpenn (lipidepenn. OmmEdge PEN. Vektor Laboratories, Inc) i 5 min

**OBS!**

- Gjøres i avtrekkskap
3. Tilsett protein- blokker<sup>25</sup> (Protein Block. Serum Free. Ready- to- use. DAKO) på snittene i 10 min
    - a. Objektivglass plasseres i fuktammer<sup>26</sup>
    - b. Rist og tørk av BSA med lofritt pappir (Kimtect Science, Precision Wipes Tissue Wipers)
  4. Tilsett primærantistoff og la stå i 60 min i RT
    - a. Objektivglassene plasseres i fuktammer
    - b. Ca 400 µl per/glass
    - c. Pax7. **Mouse, mono. 1:100**
    - d. Laminin. **Rabbit, poly. 1:400**
    - e. Primærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSAen

**OBS!**

- Bytte pipettespiss for hvert antistoff for å unngå kontaminering<sup>27</sup>
5. Rist av primærantistoffene
  6. Vask: 3x10 min PBS-t<sup>28</sup>
    - a. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskubbe for vask for å unngå kontaminering

<sup>25</sup> Bovine Serum Albumin; et plasmaprotein fra kveg som blokkerer uspesifikke bindingssteder på muskelvevet.

<sup>26</sup> Fuktammer bestod av en plastikkboks med bunnen dekt av tørkepappir og PBS-t og lokket dekket med aluminiumsfolie

<sup>27</sup> Sammenblanding av antistoffene

<sup>28</sup> Saltvannsløsning som inneholder Phoshat Buffered Salin bladet med 0,05 % tween 20. Fungerer som en vaskebuffer som er stabiliserende på pH- verdien og hindrer ikke- spesifikke antistoffbindinger.

7. Tilsett sekundærantistoff i 45 min
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Ca 400 µl per/glass
  - c. A- 488 **anti-mouse, 1:200**
  - d. A- 594 **anti-rabbit, 1:200**
  - e. Sekundærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSA
  - f. Rist og tørk av sekundærantistoff

**OBS!**

- Spinn sekundærantistoffene før bruk
- Ikke pipetter fra bunnen av sekundærantistoffløsningen
- Bytte pipettespiss for hvert sekundærantistoff
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

8. Vask: 3x10 min PBS-t.
  - b. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskub for å unngå kontaminering
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

9. Snittene monteres med et tynt objektivglass med lim som inneholder DAPI
  - a. Tørkes til neste dag i avtrekkskap

**OBS!**

- Unngå luftbobler når objektivglassene monteres
- Hold snittene lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene
- Gjøres i avtrekkskap

**Merkeprotokoll 2: NCAM + Laminin**

1. Snittene tørkes i RT (tas ut av fryser)
2. Tegn rundt snittene med PAPpenn (lipidepenn. OmmEdge PEN. Vektor Laboratories, Inc) i 5 min

**OBS!**

- Gjøres i avtrekkskap
3. Tilsett 1% BSA<sup>29</sup> på snittene i 45 min
    - a. Objektivglass plasseres i fuktammer<sup>30</sup>
    - b. Rist og tørk av BSA med lofritt pappir (Kimtect Science, Precision Wipes Tissue Wipers)
  4. Tilsett primærantistoff og la det stå over natten i kjøleskap (4°C)
    - a. Objektivglassene plasseres i fuktammer
    - b. Ca 400 µl per/glass
    - c. NCAM Mouse, **mono. 1:200**
    - d. Laminin, **Rabbit, rabbit. 1:400**
    - e. Primærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSAen

**OBS!**

- Bytte pipettespiss for hvert antistoff for å unngå kontaminering<sup>31</sup>

**Neste dag:**

5. Rist og tørk av primærantistoffene med lofritt pappir
6. Vask: 3x10 min PBS-t<sup>32</sup>
  - a. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskub for vask for å unngå kontaminering

<sup>29</sup> Bovine Serum Albumin; et plasmaprotein fra kveg som blokkerer uspesifikke bindingssteder på muskelvevet.

<sup>30</sup> Fuktammer bestod av en plastikkboks med bunnen dekt av tørkepappir og PBS-t og lokket dekket med aluminiumsfolie

<sup>31</sup> Sammenblanding av antistoffene

<sup>32</sup> Saltvannsløsning som inneholder Phoshat Buffered Salin bladet med 0,05 % tween 20. Fungerer som en vaskebuffer som er stabiliserende på pH- verdien og hindrer ikke- spesifikke antistoffbindinger.



7. Tilsett sekundærantistoff i 45 min
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Ca 400 µl per/glass
  - c. A- 488 **anti-mouse, 1:200**
  - d. A- 594 **anti-rabbit, 1:200**
  - e. Sekundærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSA
  - f. Rist og tørk av sekundærantistoff

**OBS!**

- Spinn sekundærantistoffene før bruk
- Ikke pipetter fra bunnen av sekundærantistoffløsningen
- Bytte pipettespiss for hvert sekundærantistoff
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

8. Vask: 3x10 min PBS-t.
  - a. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskub for å unngå kontaminering
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

9. Snittene monteres med et tynt objektivglass med lim som inneholder DAPI
  - a. Tørkes til neste dag i avtrekkskap

**OBS!**

- Unngå luftbobler når objektivglassene monteres
- Hold snittene lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene
- Gjøres i avtrekkskap

**Merkeprotokoll 3: SC71 + Dystrofin**

1. Snittene tørkes i RT (tas ut av fryser)
2. Tegn rundt snittene med PAPpenn (lipidepenn) i 5 min

**OBS!**

- Gjøres i avtrekkskap
3. Tilsett 1% BSA<sup>33</sup> på snittene i 45 min
    - c. Objektivglass plasseres i fuktammer
    - d. Rist og tørk av BSA med lofritt pappir
  4. Tilsett primærantistoff og la det stå over natten i kjøleskap (4°C)
    - f. Objektivglassene plasseres i fuktammer
    - g. Ca 400 µl per/glass
    - h. **SC71. Mouse, mono. 1:1000**
    - i. **Dystrofin. Rabbit, poly.1:500**
    - j. Primærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSAen

**OBS!**

- Bytte pipettespiss for hvert antistoff for å unngå kontaminering

**Neste dag:**

5. Rist og tørk av primærantistoff med lofritt pappir
6. Vask: 3x10 min PBS-t.
  - b. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskubbe for vask for å unngå kontaminering
7. Tilsett sekundærantistoff i 45 min
    - g. Objektivglassene plasseres i fuktammer
    - h. Ca 400 µl per/glass
    - i. A- 488 **anti-mouse**, grønn. **1:200**
    - j. A- 594 **anti-rabbit**, rød. **1:200**
    - k. Sekundærantistoffene blandes i samme endorfrør i BSA
    - l. Rist og tørk av sekundærantistoff

**OBS!**

- Spinn sekundærantistoffene før bruk
- Ikke pippeter fra bunnen av sekundærantistoffløsningen
- Bytte pipettespiss for hvert sekundærantistoff
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

---

<sup>33</sup> Bovine Serum Albumin; et plasmaprotein fra kveg som blokkerer uspesifikke bindingssteder på muskelvevet.

8. Vask: 3x10 min PBS-t.
  - c. Rist og tørk av PBS-t med lofritt pappir

**OBS!**

- Skyld av snitt i PBS-t før de settes i klasskub for å unngå kontaminering
- Holdes lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene

9. Snittene monteres med et tynt objektglass med lim som inneholder DAPI
  - b. Tørkes til neste dag i avtrekkskap

**OBS!**

- Unngå luftbobler når objektivglassene monteres
- Hold snittene lysfritt for å unngå blekning av fluorokromene
- Gjøres i avtrekkskap

