

Sven Anders Sødal

---

## VARME BAD ETTER STYRKETRENING:

Kan varme bad tatt umiddelbart etter hver treningsøkt påvirke treningseffekten målt som endring i muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, antall cellekjerner og satelittceller over 10 uker tung styrketrening?

---

Masteroppgave i idrettsvitenskap  
Seksjon for fysisk prestasjonsevne  
Norges idrettshøgskole, 2016



# Sammendrag

**Innledning:** Flere akuttstudier på dyr og mennesker har vist at varmemstress kan øke muskelmassen og aktivere systemer som regulerer muskelstyrke og muskelmasse; bl.a. aktivering av satellittceller og regulatorer av muskelproteinsyntesen. På mennesker er det tidligere kun utført én studie der man har undersøkt langtidseffekten av muskeloppvarming på muskelvekst og muskelstyrke. Hensikten i denne studien var å undersøke om varme bad (Hot water immersjon, HWI) tatt rett etter styrketreningsøkter kan påvirke effekten av styrketreningen målt som endringer i muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, satellittcelle- og cellekjerneantall over en 10 uker lang treningsperiode.

**Metode:** 16 (12 menn og 4 kvinner) relativt godt styrketrente personer ble rekruttert og tilfeldig fordelt i en intervensjonsgruppe (HWI) og en kontrollgruppe (PAS). Gruppene gjennomførte det samme styrketreningsprogrammet i 10 uker. Etter hver styrketreningsøkt satt forøkspersoner i HWI, 10 minutter i 45 graders varmt vann, mens PAS satt like lenge inntil en vegg i romtemperatur. Muskelmasse ble målt med Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) og Magnetresonanstomografi (MR), mens muskelstyrke ble målt som 1 RM tester i beinpress, kne-ekstensjon og kne-fleksjon. Satellittceller, cellekjerener, fiberareal og fibertyper ble undersøkt ved immunhistokjemiske metoder på tynne snitt fra muskelbiopsier. Måling av muskelmasse, muskelstyrke og biopsier ble gjenno mført før og etter treningsperioden.

**Resultat:** Begge gruppene økte muskelmasse og muskelstyrke gjennom treningsperioden ( $p < 0,01$ ), men HWI gruppen hadde en mindre økning av muskelmasse i beina, sammenliknet med PAS (2 vs. 5 %,  $p = 0,01$ ), målt med DEXA. Antall cellekjerener i type II-fiber tenderte mot signifikant økning for HWI ( $p = 0,06$ ), men det var ikke forskjell mellom gruppene. Det var heller ingen forskjell mellom gruppene i endring av muskelstyrke, satellittceller, cellekjerener, fiberareal eller fibertyper.

**Konklusjon:** Varme bad gjennomført rett etter styrketrening medførte redusert økningen i muskelmasse i underekstemiteten. Den reduserte muskelveksten i HWI gruppen kan ikke forklares av målte endringer i muskelfiberareal eller cellekjerener, og den ga ikke utslag i mindre økning i muskelstyrke.

**Nøkkelord:** Hot water immersjon, muskelvekst, adaptasjon, restitusjon, hydroterapi.

# Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet i forbindelse med prosjektet "Hot water immersion " som ble gjennomført som et samarbeid mellom Norges idrettshøgskole og University of Queensland.

Først og fremst vil jeg takke min hovedveileder Truls Raastad og bi-veileder Kristoffer Toldnes Cumming. Truls, takk for at du delte av din store fagkunnskap, for at døren til kontoret alltid var åpen, og takk for at du alltid var trygg på fasiten. Kristoffer, takk for raske tilbakemeldinger, takk for din genuine interesse for mitt arbeid, og takk for at du alltid var tilgjengelig. Enten det var på NIH, på telefon eller på facetime.

Takk også til stipendiat Hamish McGorm for godt samarbeid om prosjektet. Selv om vi hadde våre uenigheter underveis, fikk vi gjennomført i fin stil.

Takk til Ingrid, Hege og Håvard H for opplæring på lab, biopsitaging og for svar på dumme spørsmål. Takk også til Håvard W for hjelp med software til fibertypeutregning.

Takk til min familie for støtte i alle år. Takk til min far for gode tilbakemeldinger og min mor for korrekturlesing.

Takk til gjengen på kontoret for god stemning, samt gode og dårlige diskusjoner. Takk til Jørgen for daglig sjakkammer. Selv om du utklasset meg sammenlagt (56-52), kan det nevnes at det statistisk sett ikke var noe forskjell mellom oss ( $p=0,85$ ).

Arbeidet har vært tidkrevende, men svært lærerikt. Fire år på NIH er over og jeg ser frem til nye utfordringer. Takk for alle nye vennskap, (u)faglige diskusjoner og utviklende år.

Sognsvann, oktober 2016

Sven Anders Sødal

# Innhold

Sammendrag .....	3
Forord .....	4
Innhold.....	5
1.0 Introduksjon.....	7
1.1 Problemstilling .....	8
2.0 Teori .....	9
2.1 Temperaturstimulus og hydroterapi .....	9
2.2 Studier med varmpåvirkning .....	9
2.2.1 Studier på dyr og mennesker med varmpåvirkning.....	10
2.2.2 Studier på mennesker med kombinert varme og trening .....	13
2.2.3 Studier på dyr hvor det er kombinert varme og trening .....	17
2.3 Muskelvekst .....	21
2.3.1 Innledning.....	21
2.3.2 Signalering og varme .....	21
2.3.3 Lokale og systemiske vekstfaktorer – faktorer for muskelvekst .....	23
2.3.4 Satellittceller: En generell introduksjon .....	26
2.3.5 Aktivering, regulering, proliferering og differensiering av satellittceller .....	27
2.3.6 Myonukleært domene. Trengs tilførsel av satellittceller for å oppnå muskelvekst?30	
2.4 Oppsummering.....	32
3.0 Metode .....	34
3.1 Studiedesign .....	34
3.2 Utvalg .....	35
3.3 Tester .....	36
3.3.1 Styrketester.....	36
3.3.2 Magnetresonanstomografi.....	37
3.3.3 Dual-energy X-ray absorptiometry .....	38
3.4 Treningsprotokoll.....	39
3.4.1 Treningsøvelser .....	39
3.4.2 Treningsøkten .....	40
3.4.3 Treningsprogresjon.....	41
3.5 Registrering av trening og ernæring.....	42
3.6 Intervensjon.....	42
3.7 Muskelbiopsier.....	43

3.7.1 Snitting av muskelbiopsier.....	44
3.8 Immunhistokjemi .....	44
3.8.1 Mikroskopi.....	45
3.8.2 Utrekning av fibertyper og fiberareal .....	45
3.8.3 Muskelcellekjerner .....	47
3.8.4 Satellittceller – Kvantifisering og relatering til fibertype .....	48
3.9 Statistikk .....	50
4.0 Resultater .....	52
4.1 Baseline.....	52
4.2 Endring i muskelstyrke gjennom treningsperioden .....	53
4.3 Endring i muskelmasse gjennom treningsperioden.....	54
4.4 Endring i immunhistokjemiske variabler gjennom treningsperioden .....	55
5.0 Diskusjon.....	59
5.1 Muskelmasse og muskelstyrke .....	59
5.2 Satellittceller, Cellekjerner og Fiberareal.....	64
5.3 Tidspunkt for varme bad; før eller etter styrketrening? .....	67
5.4 Metodekritikk.....	68
5.5 Praktiske implikasjoner .....	70
6.0 Konklusjon.....	71
Referanser .....	71
Tabelloversikt .....	94
Figuroversikt.....	95
Vedlegg .....	96

# 1.0 Introduksjon

Under en styrketreningsøkt blir komponenter i muskulaturen brutt ned, og fasen der muskler bygges opp igjen, omtales som restitusjon. Dersom flere treningsøkter settes i sekvens vil tilpasningene i muskulaturen ofte bli tydeligere; en langtidseffekt vi gjerne omtaler som adaptasjon til trening. Fasilitert restitusjon over tid, kan trolig føre til økte adaptasjoner av muskelmasse og muskelstyrke. Det er velkjent at søvn og kosthold er avgjørende for restitusjonen, men fordi det ofte er svært små marginer som skiller eliteutøvere i idrettskonkurranser, bruker flere utøvere additive restitusjonsstrategier som nedjogging, massasje, tøying og endring av kroppstemperatur for å fasilitere restitusjon/adaptasjon etter trening.

Immersjon i vann, kalt hydroterapi, er vist som en effektiv metode for å endre muskeltemperaturen og er et interessefelt som de senere år har blitt viet stadig større oppmerksomhet (Versey, Halson, & Dawson, 2013). Oppvarming av kroppen i varmt vann, kalt "hot water immersjon (HWI) fører bl.a. til økt intramuskulær temperatur, vasodilatasjon og økt blodsirkulasjon (Yoshihara et al., 2013). Daglig oppvarming av muskulatur over flere uker har vist å kunne øke muskelmassen hos middelaldrende menn (Goto et al., 2011), mens oppvarming av dyr øker muskelveksten etter immobilisering (Selsby et al., 2007) og knusningsskader (Takeuchi et al., 2014). Hos mennesker er det vist at varmestimulus etter tung eksentrisk styrketrening bedrer restitusjonen av muskelstyrken i beina de første 72 timene (Vaile, Halson, Gill, & Dawson, 2008), mens oppvarming av dyr med (Takeuchi et al., 2014) eller uten trening (Kojima et al., 2007; Uehara et al., 2004), indikerer at aktivering av satellittceller (SC) kan spille en rolle for varmeindusert muskelvekst.

Selv om flere studier på både dyr og mennesker samlet sett indikerer at varme har fordelaktige effekter på muskelvekst og muskelstyrke, er det kun gjennomført én studie som undersøker langtidseffekten av trening og varme (Goto et al., 2007). I denne studien førte submaksimale albuefleksjoner til økning av tverrsnittsareal og isometrisk styrke, kun for gruppen som inkluderte muskeloppvarming i tillegg til treningen. Hvilke mekanismer muskeloppvarming kan påvirke er delvis ukjente. Men en fasilitert muskelvekst eller muskelstyrke kan f.eks. hjelpe idrettsutøvere til bedre prestasjoner i konkurranse.

Denne oppgaven vil øke kunnskapen om et lite undersøkt, men spennende felt innen idrett- og helseforskning. Denne studien kan således være med å bestemme utforming av restitusjons-

og adaptasjonsstrategier for idrettsutøvere, mosjonister og pasienter, som ønsker å øke sin muskelstyrke og muskelmasse. Det er ikke tidligere undersøkt hvordan tung styrketrening kombinert med muskeloppvarming over flere uker kan påvirke muskulære tilpasninger til treningen.

## 1.1 Problemstilling

Min problemstilling var:

*Vil varme bad tatt umiddelbart etter hver treningsøkt, bedre effekten av 10 uker med tung styrketrening hos styrketrente unge mosjonister? Effekten av styrketreningen vil bli målt som endring i muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, satellittcelle- og cellekjerneantall.*

Jeg stilte disse hypotesene:

*$H_0$  : Varme bad tatt umiddelbart etter hver treningsøkt vil ikke føre til en økning i muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, satellittcelle- og cellekjerneantall*

*$H_1$  : Varme bad tatt umiddelbart etter hver treningsøkt vil føre til en økning i muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, satellittcelle- og cellekjerneantall*



## 2.0 Teori

### 2.1 Temperaturstimulus og hydroterapi

Bruk av varme og kuldekammer, varmestråling, varme og dampgenererende matter, tempererte vannpakker, puter eller varmetepper er utbredte metoder for å påføre mennesker eller dyr eksterne temperaturstimulus og en påfølgende endring av muskeltemperaturen. Metoden som i nyere tid har blitt viet mest oppmerksomhet er immersjon (bading) i temperert vann, kalt hydroterapi. Immersjon i vann kan foregå som kaldtvannsbehandling (*cold water immersion* (CWI)), varmtvannsbehandling (*hot water immersion* (HWI)), thermonøytral behandling (*thermoneutral water immersion* (TWI)) og kontrast vannterapi (*contrast water immersion* (CWT)). Hydroterapi innebærer at en omgir hele eller deler av kroppen med vann av ulik temperatur, og er en stadig økende restitusjonsstrategi for idrettsutøvere som ønsker å minimere muskulær trøtthet, eller akselerere restitusjonen etter trening eller konkurranse (Versey et al., 2013). I sin oversiktsartikkel har Versey et al. (2013) klassifisert de fire ulike hydroterapibehandlingene etter temperatur. CWI;  $\leq 20^{\circ}\text{C}$ , HWI;  $\geq 36^{\circ}\text{C}$ , TWI; 20 til  $36^{\circ}\text{C}$  CWT; vekslende mellom  $\leq 20^{\circ}\text{C}$  og  $\geq 36^{\circ}\text{C}$ . Felles for de ulike studiene innen de ulike behandlingsmetodene er at vanntemperatur, immersjonslengde og hvor stor del av kroppen som omkranses av vann, er svært varierende. Svært kort oppsummert har seks studier med TWI gitt varierende respons. Tre av studiene har gitt positive effekter på enkelte målinger, mens de resterende studiene ikke fant noen forskjell mellom gruppene. Ved bruk av CWT har ni studier funnet positive restitusjonseffekter, mens 11 studier har funnet ingen eller liten forskjell mellom gruppene. For studier som har brukt CWI-behandling har 12 studier funnet fordelaktige effekter, mens fem studier har funnet at CWI ser ut til å ha en hemmende restitusjonseffekt. Majoriteten av studiene (16) har ikke funnet noen direkte effekt av CWI. Studiene presentert ovenfor er hentet fra nevnte oversiktsartikkel. Det tas forbehold om nyere studier etter dette, som ikke er inkludert. Tidligere studier med bruk av HWI vil gjennomgås grundigere videre i oppgaven.

### 2.2 Studier med varmepåvirkning

Det er gjennomført et titalls studier hvor muskulatur på ulike måter har blitt varmet opp. Oppvarmingen er gjennomført både med og uten annen stimulus, på både mennesker og dyr.

Oppvarmingen har foregått før, under eller etter stimulus, eller som en kombinasjon. Stimuliene i de ulike studiene har bestått av ulike trenings- og belastningsprotokoller, injisering av gift, eller knusning av muskulatur, mm. Muskeloppvarmingen har i studiene foregått ved flere ulike metoder, vekslende immersjonslengde og med forskjellig hyppighet. De neste tre underkapitlene, vil ta for seg studier som har undersøkt effekten varme har på muskelmasse, muskelstyrke og satellittceller, med eller uten en kombinert stimulus. Tre oversiktstabeller vil presentere henholdsvis: 1) Dyr- og menneskestudier med varmepåvirkning, men uten treningspåvirkning. 2) Menneskestudier med trening og varmepåvirkning. 3) Dyrestudier med trening og varmepåvirkning. Enkelte studier vil gå igjen i to tabeller, da de både inneholder grupper som kun er oppvarmet, og grupper som både er oppvarmet og utsatt for stimuli.

### **2.2.1 Studier på dyr og mennesker med varmepåvirkning**

Ni studier fra tabell 1 sammenlikner organismer som har blitt påført varmestress, mot én kontrollgruppe. Av disse er syv studier foretatt på rotter, en studie på kyllinger, mens det kun er en studie som har undersøkt menneskers respons (Goto et al., 2011). Denne studien, er av naturlige årsaker den eneste som målte endringer i muskelstyrke. Åtte middelaldrende menn fikk det ene beinet oppvarmet av varme og dampgenererende matter åtte timer daglig, fire ganger per uke, over 10 uker. I det oppvarmede beinet økte isometrisk dreiemoment med 5,8 % i knestrekkerne, mens tverrsnittsarealet til m. vastus lateralis, m. rectus femoris og m. quadriceps femoris økte med henholdsvis 2,7, 6,1 og 1,5 %. Også fibertverrsnittet i m. vastus lateralis økte med 8.3 %, mens antall cellekjerner tenderte til å øke av varmepåvirkning. Det var ingen endringer i kontrollbeinet. Dessverre inkluderte studien kun 8 deltakere.

I alle de ni studiene ble det utført målinger av muskelmasse. Tre av studiene (Frier & Locke, 2007; Naito et al., 2000; Oishi et al., 2009) fant hverken noen målbar effekt, eller tendens til at varmestimulering kan endre tilvekst av muskelmasse. Det kan være verdt å merke seg at Frier and Locke (2007) med 15 minutter varmebehandling, har klart kortest total immersjonstid av samtlige studier. Brorparten av studiene (Goto et al., 2004; Kobayashi et al., 2005; Kojima et al., 2007; Uehara et al., 2004) indikerer liten forskjell mellom gruppene. Samtidig finner alle disse studiene enkelte resultater som indikerer at varme kan ha positiv effekt på muskelmasse. Den eneste studien som finner en negativ utvikling av muskelmasse er utført av Halevy, Krispin, Leshem, McMurtry, and Yahav (2001). I studien ble kyllinger oppvarmet i et rom som holdt 37.5°C i 24 timer, den tredje levedagen. Levedag fire var

brystmuskelvekten signifikant redusert. Til gjengjeld var det ingen forskjell i muskelmasse ved levedag 5-8, mens det ved levedag 42 var de oppvarmede kyllingene som hadde en signifikant økning i muskelmasse. Oppvarmingstemperaturen i dette studiet er klart lavere enn de andre studiene, men samtidig er total immersjonstid klart lengst.

Fire av studiene inkluderte målinger av satellittceller. Kojima et al. (2007) og Oishi et al. (2009) brukte PAX-7 som markør for satellittceller, Halevy et al. (2001) brukte hemocytometer, mens Uehara et al. (2004) målte proliferasjon med 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) og proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Hvilken målemetode som benyttes vil kunne påvirke når de ulike målingene er forventet å være på sitt høyeste, da oppregulering skjer i ulike stadier av satellittcelleresponsen. Tendensen fra de fire studiene viser at fra syv dager og senere, er det ingen påvirkning på satellittcelleresponsen. Med unntak av studien til Oishi et al. (2009), som kun har målinger etter syv og 14 dager, finner de andre studiene en økning i satellittcelleresponsen henholdsvis en (Uehara et al., 2004), to (Halevy et al., 2001) og tre dager (Kojima et al., 2007) etter stimulering. Uehara et al. (2004) sin studie finner som den eneste en nedgang i satellittcelleresponsen ved levedag fire; dagen etter varmestimulus.

Tabell 1. Oversiktstabell over studier som har undersøkt effekten av varmpåvirkning på endringer i muskelmasse, muskelstyrke og satellittceller, hos dyr og mennesker. VV, Immersjon i varmt vann. VK, varmekammer. VD, varme og dampgenererende matter, VP, varmepute. KSD, Kvinnelige Sprague-dawley. MSD, Mannlige Sprague-dawley. MW, mannlige wistar. Kolonene "muskelstyrke" og "satellittceller" viser til antall dager etter avsluttet treningsperiode, avsluttet injeksjon eller etter klekking funnet ble gjort. Relative målinger/ ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter varmeksposering. \*, Rektumtemperatur.

Studie	Deltakere	Metode	Hypighet (antall oppvaringer)	Immersjonsdetaljer (oppvarmingsdetaljer) (lengde)	Merknad	Muskelmasse	Muskelstyrke	Satellittceller
Naito et al. (2000)	40 KSD rotter	VK	1	41°C 60 min 41,6*	Kjernetemperatur på slutten av oppvarming	8 →		
Haley et al. (2001)	160 mannlige broiler kyllinger	VK	1	37,5°C 24 timer	Kyllingene ble oppvarmet 3. levedag	1 ↘ 2-5 → 39 ↗		1: ↘ 2: ↗
Goto et al. (2004)	128 MW rotter	VK	1	41°C 60 min ~41°C		0-3: → 5: → (↗) 10: →		1: ↗ 7: → (↗) 14: → (↗)
Uehara et al. (2004)	48 MW rotter	VK	1	41°C 60 min ~41°C*		1: →		1: ↗ 7: → 14: →
Kobayashi et al. (2005)	MW rotter	VK	1	41°C 60 min ~41°C*	Muskelmasse- målinger av to ulike muskler	1: → 7: ↗ → 14: →		
Frier & Locke (2007)	50 MSD rotter	VP	1	55°C 15 min 42°C	Økning i kjernetemp opp til 41°C	1-7: →		
Kojima et al. (2007)	MW rotter 25x60 rotter	VK	1	41°C 60 minutter 41°C*	Økning i kjernetemp opp til 41°C	1-3: → 7: → (↗) 14: → 28: → (↗)		3: ↗ 1,7,14 & 28: →
Oishi et al. (2009)	64 MW rotter	VK	Annenhver dag i 1 eller 2 uker	42°C 30 min Ca. 42 °C*		7: → 14: →		7: → 14: →
Goto et al. (2011)	8 middelaldrende menn	VD	40 uker	38°C** 8 timer ~38°C	Oppvarming 4 x per uke i 10 uker **Fra pilotstudie	↗		→ (↗)

### **2.2.2 Studier på mennesker med kombinert varme og trening**

Åtte studier har blitt vurdert som metodisk gode nok til å inkluderes i dette avsnittet.

Dessverre har ingen av studiene målt satellittcelleresponsen, og kun en studie (Goto et al., 2007) har undersøkt utvikling av muskelstyrke. I samtlige studier er muskelmassen undersøkt før og etter en treningsøkt eller en treningsperiode. Resultatene peker i samme retning som studiene uten treningsbelastning (kap. 2.2.1); heller ikke her er det noen resultater som indikerer at varmepåvirkning har negativ effekt på utvikling av muskelstyrke. Halvparten av studiene (Kuligowski, Lephart, Giannantonio, & Blanc, 1998; Nosaka, Sakamoto, Newton, & Sacco, 2004; Saga, Katamoto, & Naito, 2008; Viitasalo et al., 1995) indikerer at varmepåvirkning ikke påvirker muskelstyrken. På den andre siden peker funn av Nosaka, Muthalib, Lavender, and Laursen (2007) og Vaile et al. (2008) mot at oppvarming av muskulatur bedrer restitusjonen, målt som isometrisk styrke. Nosaka et al. (2007) brukte 150 W varmestråling i et "crossover" design på 15 unge menn. Studentene mottok 20 minutters oppvarming av armbøyerne, 16-20 timer før de gjennomførte 24 maksimale eksentriske albuefleksjoner. Det ble funnet signifikant forskjell mellom gruppene for restitusjon, målt som voluntære kontraksjoner, i favør varmegruppen. Resultatene Vaile et al. (2008) fant i nok et "crossover" design, viser samme trend. Trettiåtte trente menn gjennomførte her en muskelødeleggende protokoll (7 x 10 eksentriske repetisjoner) i beinpressmaskin. Isometrisk kraft mot en låst knebøymaskin var signifikant høyere for varmtvannsgruppen 24, 48 og 72 timer etter treningsprotokollen sammenlignet med en passiv gruppe. Det kan være verdt å merke seg at økningen i isometrisk kraft, ikke ga noen utslag på kraften målt mot underlaget i et spenstopp. To studier fant sprikende resultater (Goto et al., 2007; Skurvydas et al., 2008). I Skurvydas et al. (2008) sin studie med crossover design, gjennomførte elleve unge menn 100 fallhopp. Det var ingen forskjell i maksimal voluntær kraft (MVCF) 24 og 72 timer etter treningen, men 48 timer etter økten var det signifikant forskjell mellom gruppene i favør varmegruppen. Endring i hopp høyde var identisk med endringer i MVCF (ikke signifikant), mens målinger av indirekte markører for muskelødeleggelser; kreatin kinase aktivitet og subjektiv muskelstølhets, viste klare forskjeller. Ved både 24 og 48 timer var oppvarmet muskulatur signifikant mindre påvirket enn uoppvarmet muskulatur. Spesielt tydelig var forskjellen ved 24 timer, da kreatin kinase aktiviteten nesten var dobbelt så høy. Goto et al. (2007) undersøkte på sin side hvordan 3 x 30 submaksimale albuefleksjoner med eller uten varmepåvirkning, 4 ganger per uke over ti uker, påvirket maksimalt dreiemoment og CSA. Styrken i fleksjonsmuskulaturen økte med 18 % (varme) og 12 % (kontrollarm), og var kun signifikant økt for den varmepåvirkede armen. Lignende økte CSA i m. biceps brachii 7,5 %

(varme) og 0,3 % (kontroll).

Tabell 2. Oversiktstabell over studier som har undersøkt effekten av trening og varmepåvirkning på endringer i muskelmasse, muskelstyrke og satellittceller hos mennesker. VV; Immersjon i varmt vann. VS; varmestråling. VD; varme og dampgenererende matter. I kolonene "muskelstyrke" og "muskelmasse" viser tallene antall dager etter avsluttet treningsperiode eller innsjøn. Relative målinger/ ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tidspunkt for varme er i.f.t. treningsøkt. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter varmeeksponering. \*; Rektumtemperatur, \*\*; muskeltemp funnet i pilotstudie. T=timer.

Studie	Deltakere	Trenings- protokoll	Metode	Hyppighet (antall oppvarmer)	Tidspunkt for varme	Immersjonsdetaljer (oppvarmingsdetaljer) (lengde) (muskeltemperatur)	Merknad	Muskel- masse	Muskel- styrke
Viitasalo et al. (1995)	14 junior friidrettsutøvere, 6 kvinner, 8 menn	5 treningsøkter (styrke/power, over 3 dager).	VV	3 oppvarmer	Etter	37°C 20-30 min X	Jet-massage samtidig med varmebad. Crossover design. 20 - 30 min fra treningsøkt til bad.		→
Kuligowski et al. (1998)	56 unge friske kvinner og menn	10 x 5 DOMS-induserende eksentriske bicepscurl.	VV	4 oppvarmer*	Etter	38,9°C 24 min X			→
Nosaka et al. (2004)	20 utrente kvinner	12 maksimale eksentriske arm-fleksjoner	VS	Enkel oppvarming	Før	100 W 10 min 38°C	Crossover design		1-5: →
Goto et al. (2007)	9 menn	10 uker. 3 x 30 submaksimale albuefleksjoner	VD	40 oppvarmer	Før/under	X 60 min. 38°C*	Avsluttende muskeltemperatur på ca. 38°C	→(↗)	→ (↗)
Nosaka et al. (2007)	15 unge menn	4x per uke 24 maksimale albuefleksjoner	VS	Enkel oppvarming	Før	150 W 20 min 41,4°C	Crossover design		1-4 ↗

Saga et al. (2008)	9 utrente menn	24 maksimale isokinetiske eksentriske albuekontraksjoner. 2	VS	Enkel oppvarming	Før	150 W 20 min 41°C**	**Muskeltemp hentet fra en annen studie	3-10: →	
Skurvy das et al. (2008)	11 unge utrente menn,	100 CM-hopp fra 0,5meter	VV	Enkel oppvarming	Før	44°C 45 min, 40*	Crossover design	1t-24t: → 2: ↗ 3: →	
Vaile et al. (2008)	38 trente menn	DOMS induserende beinpress. 7 x 10 eksentriske repetisjoner	VV	4 oppvarminger	Etter	38°C 14 min X	Crossover design En oppvarming direkte etter trening + 3 oppvarminger de neste 72 timer	24: ↗ 48: ↗ 72: ↗	



### 2.2.3 Studier på dyr hvor det er kombinert varme og trening

Ni studier med rotter har kombinert et treningsstimuli med varmepåvirkning, jf. tabell 3. Treningsbelastningen i tabell 3 må betraktes mer som et veiledende ord da de ulike studiene har brukt immobilisering/overbelastning, injisering av gift/muskeldegraderende stoff, eksentrisk arbeid og knusningsskade, for å påvirke musklene. Ingen av studiene har forståelig nok gjennomført målinger av muskelstyrke. På den andre siden har samtlige av studiene inkludert målinger av muskelmasse. I tillegg til dette har Kojima et al. (2007), Oishi et al. (2009) og Takeuchi et al. (2014) også undersøkt ekspresjon av satellittceller. Oishi et al. (2009) brukte i sin studie bupivacaine<sup>1</sup> i kombinasjon med eller uten varme, men hverken etter 1 eller 2 uker utgjorde varmeeksponering noen forskjell i antall satellittceller, målt ved Pax7. Samme tendens ble funnet av Kojima et al. (2007), som fant at den additive effekten av varmessess både før og etter injisering av cardiotoxin (slangegift), ikke ga noen endringer i Pax7-positive cellekjerner 1, 5, 7 eller 14 dager etter injisering. Den tredje dagen var imidlertid antallet Pax7-positive satellittceller signifikant høyere i varmegruppen som mottok varmessess etter injeksjon, men ikke i gruppen som ble varmessesset før injeksjon. Den mest interessante studien fra tabell 3 når det gjelder satellittceller, er studien til Takeuchi et al. (2014). I denne studien ble rotter påført en knusningsskade i EDL (m. ekstensor digitorum longus), etterfulgt av 20 min behandling med en varmtvannspakke. Antallet Pax-7-positive satellittceller var uforandret 7, 5 og  $\leq 3$  dager etter skaden, mens antallet var økt 4 og 6 dager etter knusningsskaden. Forfatterne hevder dette kan skyldes en raskere sekundær degenerering av nekrotiske fibre, og at varme kan akselerere denne prosessen.

Mens Oishi et al. (2009) sine resultater ikke viste noen merkbar forskjell for varmeeksponering, indikerte fire andre studier en entydig positiv utvikling av muskelmasse. Naito et al. (2000), Selsby & Dodd Selsby and Dodd (2005) og Selsby et al. (2007) brukte alle 7-8 dagers immobilisering av bakben, mens sistnevnte studie også hadde en like lang overbelastningsperiode. Alle de tre studiene utførte muskelmassemålinger på solueusmuskulaturen. Forskjellen var for alle studiene 20-32 % mellom gruppene, i favør den oppvarmede gruppen. Takeuchi et al. (2014) utførte målinger av tverrsnittsarealet (CSA) av muskelfibere med sentralt sentrerte kjerner, på regenererte muskelfiber. Små muskelfibre og stor andel sentrerte cellekjerner er et mål på nylig regenererte fibre (Goetsch, Hawke, Gallardo, Richardson, & Garry, 2003; Srikuea, Pholpramool, Kitiyanant, & Yimlamai, 2010).

---

<sup>1</sup> Bupivacaine er en lokalt virkende anestetisk medisin, som er vist å føre til degradering av muskelfiber hos gnagere (Nosaka, 1996; Plant, Beitzel, & Lynch, 2005)

På den andre siden viser Frier and Locke (2007) motstridende funn. M. Gastrocnemius hos rotter ble kirurgisk fjernet med påfølgende overbelastning av m. plantaris, i syv dager. Selv om gruppen som ble utsatt for varme hadde en betydelig økning i muskelmasse, ble det ikke oppgitt noen signifikante forskjeller i endringer mellom de to gruppene. Signifikante forskjeller var derimot til stede for muskelmasse relatert til kroppsvekt og protein- og MHC I<sup>2</sup>-innhold, etter henholdsvis 5-7 og 3-7 dager. Samlet sett indikerer Frier and Locke (2007) sine resultater en relativ entydig trend, med negativ påvirkning fra varmestimuliet.

De tre resterende studiene fra tabell 3 har til dels sprikende funn. Goto et al. (2004) gjennomførte 5 dager immobilisering og 10 dager restitusjon. Målinger av muskelens vekt viste ingen forskjell, mens totalt proteininnhold var høyere i varmegruppen 5-10 dager etter avsluttet restitusjonsperiode. Også Kojima et al. (2007) fant at totalt proteininnhold økte (etter 28 dager), til gjengjeld var det ingen forskjell i muskelvekt ved 1, 3, 7, 14 eller 28 dager. Touchberry et al. (2012) satt rotter til å gjennomføre fem minutter løping i nedoverbakke (eksentrisk arbeid). En av gruppene ble varmeeksponert før arbeidet. Målinger av total protein og neonatale MHC<sup>3</sup>, to markører for muskel regenerasjon, viste at total protein konsentrasjon mellom gruppene var uendret 2 timer etter treningen, men signifikant forhøyet for HWI-gruppen 2 dager etter varmeeksponeringen. Neonatal MHC viste en fordelaktig varmeeffekt etter 2 timer, men ikke etter 2 dager.

---

<sup>2</sup> Myosinets tunge kjede i fibertype I

<sup>3</sup> "Nyfødte" MHC

Tabell 3. Oversiktstabell over dyrestudier som har undersøkt effekten av trening og varmepåvirkning på endringer i muskelmasse og satellittceller. VV; Immersjon i varmtvann. VK; varmekammer. VD; varme og dampgenererende matter, VP; varmtvannspakke VT; varmeppe. VVP; varmtvannspakke VT; varmeppe. KSD; Kvinnelige Spraugue-dawley. MSD; Mannlige Spraugue-dawley. MW; mannlige wistar. I kolonnene "muskelmasse" og "satellittceller" viser tallene antall dager etter avsluttet treningsperiode, avsluttet invensjon eller etter klekking. Relative målinger/ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter v armeeksponering. Tidspunkt for varme er i.f.t. treningsøkt. T=timer.

Studie	Deltakere	Trenings-protokoll	Meto de	Hyppighet	Immersjonsdetaljer (oppvarmingsdetaljer) (lengde) (muskeltemp)	Tidspunkt for varme	Merknad	Muskelmasse	Satellittceller
Naito et al. (2000)	40 KSD rotter	8 dager immobiliserin g	VK	Enkel oppvarming	41°C 60 min 41,6*	Før	*Kjernetemperatur på slutten av oppvarming ** Muskeldisseksjon direkte etter treningsperioden	↗**	
Goto et al. (2004)	128 MW rotter	5 dager immobiliserin g + 10 dager restitusjon	VK	Enkel oppvarming	41°C 60 min ~41°C	Etter immobiliserin g		0-3: → 5: → (↗) 10: → (↘)	
Selsby & Dodd (2005)	27 MSD rotter	8 dagers immobiliserin g	VT	Ikke oppgitt (Mer enn en oppvarming )	X Kjernetemperatur oppvarmet til 41°C, deretter opprettholdt i 30 min	Før og under immobiliserin g	Antall oppvarming er ikke oppgitt ** Muskeldisseksjon direkte etter treningsperioden	↗**	
Frier & Locke (2007)	50 MSD rotter	Overbelastet m. plantaris i 1-7 daget.	VP	Enkel oppvarming	55°C Kjernetemperatur oppvarmet til 42°C, deretter opprettholdt i 15 min	Før	Kjernetemperatur først oppvarmet til 42°C, deretter opprettholdt i 15 min	1-2 → 3-7: → (↘)	
Kojima et al. (2007)	50 MW rotter	cardiotoxin (slangegift) injesert før varmebehandling	VK	Enkel oppvarming	41°C 60 minutter 41°C*	Enten før eller etter	*Økning i kjernetemp opp til 41°C. **Økt for post-opppvarming, ikke pre.	1-14: → 28: →	1 → 3 → ↗** 5 → 7 → 14 → 28 →

Selsby et al. (2007)	40 MSD rotter	7 dager immobilisering + 7 dager belastning	VT	Ikke oppgitt (Mer enn en oppvarming)	Kjernetemperatur oppvarmet til 41°C, deretter oppretholdt i 30 min	Før og under belastningsperioden	?	?	7: →	7: →
Oishi et al. (2009)	64 MW rotter,	Injeksjon av bupivacaine.	VK	Annenhver dag i 1 eller 2 uker	42°C 30 min Ca. 42 °C*	Etter	Kjerne og rektaltemp*	7: → 14: → (7)	14: →	7: → 14: →
Touchberry et al. (2012)	24 MW rotter. 10 uker gamle	5 min eksentrisk løp på tredemølle; (-16%)	VV	Enkel oppvarming	43°C Kjernetemperatur oppvarmet til 41°C, deretter oppretholdt i 20 min	Før	*Muskelmassemåling er på total protein og neonatalMHC	2t: → (7)* 2: 7 (-→)*		
Takeuchi et al. (2014)	110 MW rotter	Knusningskad e i EDL.	VVP	Enkel oppvarming	42°C 20 min 38°C*	Etter	*Skinntemperatur ***CSA-målinger på kun regenererte fiber.	14: 7*** 28: 7***	6t - 3: → 4: 7 5: → 6: 7 7: →	

## 2.3 Muskelvekst

### 2.3.1 Innledning

Skjelettmuskulatur har en unik evne til å tilpasse seg belastningen den blir utsatt for. Denne evnen til adaptasjon er en mekanisme som blir forsøkt utnyttet i ulike treningsprogram. En godt planlagt økende belastning med styrketrening vil derfor føre til muskelhypertrofi og økt muskelstyrke. Et stort mekanisk drag og et høyt metabolsk stress er regnet som de primære mekanismene bak muskelvekst (Pearson & Hussain, 2015), og vår totale muskelmasse kan karakteriseres som et ustabil fundament som kontinuerlig endres gjennom det totale sluttforholdet mellom proteinakkumulering og nedbryting av protein. Proteinsyntese og nedbryting er igjen regulert gjennom flere ulike signalveier (Miyazaki, McCarthy, Fedele, & Esser, 2011). Dersom syntesen er størst oppnår vi muskulær hypertrofi, og dersom nedbrytingen er størst fører dette til atrofi i muskelfibrene. Modulering av proteinsyntese og proteinnedbryting er et område innen muskelfysiologien som i dag har et stort interessefokus (Blaauw & Reggiani, 2014). For å bedre forstå de faktiske mekanismene og hvordan ulike mekanismer påvirker hverandre, forskes det bl.a. på ulike signalprotein, signalveier og cellulære adaptasjoner etter styrketrening (Blaauw & Reggiani, 2014). En økning i muskelprotein etter hypertrofi kan oppnås via enten 1) økt RNA og proteinsyntese fra allerede eksisterende kjerner eller 2) ved å vedlikeholde samme mengde RNA og proteinsyntese fra hver cellekjerne, men samtidig tilføre flere kjerner til fiberen, eller 3) danne nye muskelfiber (hyperplasi) (Blaauw & Reggiani, 2014; Folland & Williams, 2007). Siden en utviklet cellekjerne ikke kan dele seg, må nye cellekjerner ha sitt opphav utenfor fiberen, hvorav satellittceller virker å være hovedkilden (Montarras, L'Honore, & Buckingham, 2013). Satellittcellens rolle og funksjon vil bli grundig gjennomgått i avsnitt 2.4. En rekke studier (Bodine et al., 2001; Elliott, Renshaw, Getting, & Mackenzie, 2012; Hornberger et al., 2004; Kakigi et al., 2011; Nader, McLoughlin, & Esser, 2005; Rommel et al., 2001; Washington et al., 2011) har demonstrert at Akt/mTOR signalveien spiller en kritisk rolle i regulering av muskelmassen, blant annet gjennom å stimulere initieringen av proteinsyntesen. Dersom viktige signalproteiner i Akt/mTOR signalveien oppjusteres av varmestress vil dette kunne føre til en økt akkumulasjon av muskulært protein.

### 2.3.2 Signalering og varme

En håndfull *in vitro*- (Bijur & Jope, 2000; Oehler-Janne et al., 2008; Wei & Vander Heide,

2008), dyre- (Uehara et al., 2004; Yoshihara et al., 2013) og menneskestudier (Kakigi et al., 2011), har undersøkt effekten varmestress har på signalering. Økte temperaturer er vist å føre til økt fosforylering av Akt ved Ser473 (Bijur & Jope, 2000; Kakigi et al., 2011; Oehler-Janne et al., 2008; Wei & Vander Heide, 2008; Yoshihara et al., 2013), p70 S6K (Uehara et al., 2004; Yoshihara et al., 2013), p38 MAPK (Bijur & Jope, 2000), mTOR (Kakigi et al., 2011) og ved ERK 1/2 (Bijur & Jope, 2000). Yoshihara et al. (2013) viste en tydelig temperaturavhengig effekt for fosforylering av Akt og p70S6k, for målinger gjennomført ved 37, 38, 39, 40 og 41 °C. Dette gjaldt både m. soleus (hovedandel av type I fibre) og m. plantaris (hovedandel av type II fibre) hos "badende" rotter. Motstridende fra de nevnte studiene fant Touchberry et al. (2012) nedjustert ERK 1/2 fosforylering 2 timer etter trening av rotter, og ingen effekt for hverken Akt, p70 S6K eller JNK, post 2 og 48 timer. ERK 1/2 er kjent som repressor for HSP<sup>4</sup> syntese, via interaksjon med heat shock transcription factor 1 (Wang, Grammatikakis, Siganou, Stevenson, & Calderwood, 2004), mens HSP 72 tidligere er vist å ha en inhiberende effekt på JNK-aktivering (Gupte, Bomhoff, Touchberry, & Geiger, 2011).

### ***Calcineurin***

Calcineurin (CaN) er et kalsium/kalmodulin-avhengig serin/threonin protein fosfatase-enzym, som bl.a. regulerer transkripsjon (Naya et al., 2000; Olson & Williams, 2000). CaN er assosiert med myogenese (Delling et al., 2000; Friday, Mitchell, Kegley, & Pavlath, 2003), regulering av muskelfiber phenotype, størrelse og vekst (Glass, 2003; Olson & Williams, 2000; Stupka, Schertzer, Bassel-Duby, Olson, & Lynch, 2007), genregulerende signalveier, hypertrofi i myotuber (Delling et al., 2000; Musaro, McCullagh, Naya, Olson, & Rosenthal, 1999; Semsarian et al., 1999), fasilitering av muskelregenerering (Crabtree, 1999; Naya et al., 2000; Serrano, Baeza-Raja, Perdiguero, Jardi, & Munoz-Canoves, 2008), samt aktivering og differensiering av SC (Glass, 2003; Naya et al., 2000; Olson & Williams, 2000; Stupka et al., 2007). Dette indikerer at CaN kan påvirke ekspresjon av myoregulatore faktorer (MRF), translokasjon av kjerner (Abbott, Friday, Thaloor, Murphy, & Pavlath, 1998; Sakuma et al., 2003; Stupka et al., 2007) og satellittcelledifferensiering via aktivering av MyoD og myocytespecific enhancer-binding factor 2 (MEF2) (Friday, Horsley, & Pavlath, 2000; Friday et al., 2003). Studier antyder at det finnes en kobling mellom CaN og Insulin-lik vekstfaktor type I (IGF-1) (Musaro et al., 1999; Selsby & Dodd, 2005), og aktivering av signalenzymet phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), som igjen aktiverer Akt i mTOR-signalveien

---

<sup>4</sup> Heat shock protein

(Zarogoulidis et al., 2014), samt at HSP- 70 og 90 kan aktivere CaN gjennom regulering av kalmodulin og ATP-(u)avhengig signalveier (Someren, Faber, Klein, & Tumlin, 1999). Kobayashi et al. (2005) fant at varmestimulus førte til en samtidig økning av CaN og muskelmasse etter 7 og 14 dager. Denne økningen forekom derimot ikke når CaN ble innhibert av medikamentet cyclosporine A, noe som tyder på at CaN kan påvirke vekst av muskelmasse. På den andre siden er det ifølge Oishi et al. (2009)<sup>5</sup> like sannsynlig at CaN indirekte blir oppjustert av HSP, som at det er en direkte kobling mellom CaN og muskelregulerende signalveier.

### **2.3.3 Lokale og systemiske vekstfaktorer – faktorer for muskelvekst**

Dette delkapittelet drøfter muskelregulerende mekanismer som kan bli påvirket av varme; økt blodsirkulasjon og IGF-1, HSP og oksidativt stress.

#### ***Økt blodsirkulasjon og IGF-1***

En følge av varmessress og påfølgende økt kroppstemperatur er vasodilatasjon og økning av blodsirkulasjon. Dette fasiliterer transport av veksthormon (Yoshihara et al., 2013), blant annet transport av IGF-1 til ulike vev, slik som muskler. IGF-1 er en sirkulerende vekstfaktor produsert både av leveren og lokalt i muskelen, og er kjent for sine anabole egenskaper lokalt i muskulaturen (Schiaffino & Mammucari, 2011; Yoshihara et al., 2013). Tre ulike isoformer av IGF-1 har blitt beskrevet i skjelettmuskulatur (IGF-1Ea, IGF-1Eb, og IGF-1Ec) (Snijders et al., 2015). IGF-1Ec er hovedsakelig omtalt som MGF og vil derfor videre i oppgaven ta dette navnet. Tidligere studier har vist at varmessress både kan (Cross, Radomski, VanHelder, Rhind, & Shephard, 1996; Fisker, Jorgensen, & Christiansen, 1998), og ikke kan (Yoshihara et al., 2013) øke plasmakonsentrasjonen av sirkulerende veksthormon. Sirkulerende nivå av IGF-1 ser ikke i særlig grad ut til å bli påvirket av hverken styrketrening eller varme, da plasma-IGF ikke forhøyes, selv i studier der det er funnet økte konsentrasjoner av veksthormon etter styrketrening. Forhøyet IGF-1 lokalt i muskelen synes i stor grad å fasilitere muskelvekst. Faktisk fant Halevy et al. (2001) at oppvarming av unge kyllinger førte til en tydelig økning av muskulær IGF-1 i oppvarmede kyllinger, men ikke i kontrollgruppen. IGF-1 virker således å kunne stimulere til økt proliferasjon, samt være involvert i differensieringsprosessen og sammensmelting av satellittceller (Engert, Berglund, &

---

<sup>5</sup> Oppsummering av tre studier (Imai & Yahara, 2000; Lakshmikuttyamma, Selvakumar, & Sharma, 2006; Someren et al., 1999).

Rosenthal, 1996; Florini, Ewton, & Coolican, 1996; Halevy et al., 2001; Yin, Price, & Rudnicki, 2013). Dersom det er et faktum at økt blodsirkulasjon øker transport og opptak av Insulin/IGF-1 til musklene, vil dette kunne øke fosforyleringen av Akt og dens nedstrøms signaleringsprotein, som igjen kan påvirke translasjon og total akkumulering av protein. IGF-1 og insulin er bl.a. vist å kunne aktivere PI3K (Lau & Leung, 2012).

Etter en *in vivo* knusningskade i rottemuskulatur ble det påvist at varmestress førte til en raskere migrasjon av makrofager inn i til skadd muskulatur. Samtidig ble det også observert en tidligere ekspresjon av IGF-1 i varmegruppen (Takeuchi et al., 2014). De økte nivåene av IGF-1 virker å forekomme som et resultat av migrasjonen, da flere studier (Cantini et al., 2002; Chakravarthy, Abraha, Schwartz, Fiorotto, & Booth, 2000; Hawke & Garry, 2001; Takagi et al., 2011) viser at IGF-1 blir utskilt av makrofager. Takeuchi et al. (2014) har derfor spekulert i om proliferasjon og differensiering av satellittceller skjer mer aktivt i tidligere faser etter muskelskader når det gis varmebehandling.

I tillegg til veksthormoner er det spekulert i om økt blodsirkulasjon også kan påvirke sirkulerende nivåer av nitrogenoksid (NO), et stoff som er vist å bli mediert av økt blodsirkulasjon og varmestress (Shao et al., 2010). Dette kan igjen påvirke fosforyleringen av Akt (Drenning et al., 2009). NO er også antatt å bidra i tidlig fase av SC-aktivering (se kap. 2.3.5).

### ***Heat shock proteiner***

HSP blir klassifisert og navngitt etter deres molekylære masse og inndeles som enten små (8-27 kilodalton (kDa)) eller store (>27 kDa) (Koh, 2002; Noble, Milne, & Melling, 2008). Flere av HSP finnes i skjelettmuskulaturen, hvor de mest undersøkte er Ubiquitin (8 kDa),  $\alpha$ B-crystallin (22 kDa), HSP 60 (60kDa), HSP 70 (70 kDa) og HSP 90 (90 kDa). Proteinene fikk sitt navn da det ble funnet en økt forekomst av proteinene etter varme-stress, og i dag vet vi at HSP tilstedeværelse kan øke etter andre typer stress, slik som iskemi, proteindegradering, hypoksi, acidose, oksidativt stress, økt intracellulær kalsiumkonsentrasjon, energimangel og mekanisk stress (Koh, 2002; Morton, Kayani, McArdle, & Drust, 2009). HSP oppreguleres ved både utholdenhet og styrketrening (Oishi et al., 2009), og det er antatt at HSP virker som molekylære chaperoner som bidrar i proteinsyntese, translasjon og generell cellulær funksjon. Det kan derfor antas at HSP bidrar til adaptasjoner etter trening, samt at de fasiliterer



reparasjon etter skade, transport og folding av ulike typer proteiner (Lancaster & Febbraio, 2005; Welch, 1992). Mer spesifikt er det foreslått at ulike muskeladaptasjoner kan være mediert av *chaperoneaktivitet* i begynnelsen av peptider, som igjen fasiliteter proteinsyntesen (Touchberry et al., 2012). HSP bidrar i tillegg i modulering av immunresponsen (Chen, Voegeli, Liu, Noble, & Currie, 2007; Johnson & Fleshner, 2006), i celledifferensiering (Calderwood, Mambula, Gray, & Theriault, 2007; Csermely, Soti, & Blatch, 2007) og til å opprettholde homeostase (Morton et al., 2009). HSP kan påvirke flere viktige signalproteiner som regulerer vekst og utvikling (Nollen & Morimoto, 2002) inkludert Akt (Sato, Fujita, & Tsuruo, 2000) og *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (f.eks. p38) (Song, Takeda, & Morimoto, 2001). Etter kontraktile aktiviteter, fungerer Akt/mTOR-signalveien og MAPK som regulatorer for bl.a. transkripsjon, proliferasjon, differensiering og celleoverlevelse (Kolch, 2000; Sasai et al., 2010). MAPK signalering virker derfor å være en kritisk regulator for opprettholdelse av skjelettmuskulatur (Shi et al., 2009). En økning av HSP som en konsekvens av varmestimuli i forbindelse med trening eller muskelnedbrytning kan derfor tenkes å endre den treningsinduserte signal-responsen. I sammenheng med dette har Koren et al. (2010) vist at HSP 72 virker å kunne regulere Akt.

Flere ulike studier har vist at varme alene øker ekspresjon av HSP 25 (Oishi et al., 2009), HSP 27 (Ogura et al., 2007), HSP 60 (Oishi et al., 2002), HSP 72 (Kobayashi et al., 2005; Kojima et al., 2007; Naito et al., 2000; Ogura et al., 2007; Oishi et al., 2009; Selsby et al., 2007) og HSP 90 (Ogura et al., 2007). Økninger i HSP 72 er også observert når injeksjon av muskeldegenererende gift er kombinert med varme (Kobayashi et al., 2005; Oishi et al., 2009), men har også forekommet uten økning av HSP 72 (Kojima et al., 2007). Varme og immobilisering er vist å hemme atrofi og øke ekspresjon av HSP 72 og HSP 25 (Naito et al., 2000; Selsby & Dodd, 2005), og når varme og immobilisering blir kombinert med varme og "reload", øker ekspresjonen av HSP 25, HSP 72 og HSP 32 (Selsby et al., 2007). I tillegg har eksentrisk løpeprotokoll i kombinasjon med varme økt HSP 72, men ikke HSP 25. Studien av Ogura et al. (2007) må tolkes med forsiktighet, da den kun inkluderte fire dyr. Alle studiene er gjennomført på rotter.

### ***Oksidativt stress***

Oksidativt stress er en tilstand hvor balansen mellom produksjonen av frie radikaler og deres reduksjon via antioksidantsystemene forskyves i favør av et prooksidativt miljø (Halliwell & Cross, 1994). Frie radikaler har tidligere fått oppmerksomhet for å kunne påføre sitt miljø

skade (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006), men er også satt i sammenheng med vedlikehold av homeostase, og for å være involverte som en potensiell aktivator for treningsindusert stressrespons (Devasagayam et al., 2004; Harris & Starnes, 2001). I de allerede nevnte studiene til (2005) og Selsby et al. (2007) undersøkte de i tillegg til muskelmasse og HSP, også oksidativ skade ved markørene Nitrotyrosine og 4-Hydroxy-2-nonenol. Deres funn indikerer at varmestress under immobilisering eller *reload* hemmer treningsindusert oksidativt stress, og at dette igjen kan forklare den økte muskelveksten funnet i disse studiene. Varmestress førte faktisk til signifikant mindre oksidativ skade for begge markører, i begge studiene. Mens det tidligere er antatt at antioksidanter bidrar i beskyttelse mot oksidativ skade (Valko et al., 2006), mener Selsby and Dodd (2005) at HSP kan spille en minst like viktig rolle. Dette forklarer de med at i de i deres studie, fant at redusert oksidativ skade var uavhengig fra en rekke antioksidant-enzym<sup>6</sup>, mens det ble funnet en samtidig økning av HSP 25 og HSP 72. Det kan konkluderes med at det er stor usikkerhet knyttet til muskulære virkninger av oksidativt stress, og de faktiske mekanismene som ligger bak. Hvorvidt varmeinduserte muskulære endringer kan ha sammenheng med oksidativt stress synes foreløpig å være veldig uklart.

### **2.3.4 Satellittceller: En generell introduksjon**

Satellittceller er mononukleære celler som har fått navn etter dens perifere beliggenhet mellom cellemembranen og basalmembranen. Cellene ble først identifisert med elektronmikroskop i beinmuskulaturen hos frosker av Alexander Mauro i 1961. I dag identifiseres satellittceller via molekylære markører. De mer populære metodene inkluderer bruk av antistoff mot overflate membranproteiner, slik som NCAM, M-cadherin og CD34A1 samt transkripsjonsfaktoren Pax7 (Almeida, Fernandes, Ribeiro Junior, Keith Okamoto, & Vainzof, 2016; Snijders et al., 2015; Yin et al., 2013). Nylige studier indikerer at satellittceller bidrar i postnatal vekst og hypertrofi (Snijders et al., 2015), samt i reparasjon og regenerering etter skade (Kojima et al., 2007). For både dyre- (Lepper, Partridge, & Fan, 2011; McCarthy et al., 2011; Murphy, Lawson, Mathew, Hutcheson, & Kardon, 2011; Sambasivan et al., 2011) og menneskestudier (Cermak et al., 2013; Farup et al., 2014; McKay et al., 2009; McKay, O'Reilly, Phillips, Tarnopolsky, & Parise, 2008; Mikkelsen et al., 2009; O'Reilly, McKay, Phillips, Tarnopolsky, & Parise, 2008; Toth et al., 2011) med eksentriske modeller,

---

<sup>6</sup> Manganese superoxide dismutase, copper-zinc superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase

tradisjonelle styrkeøkter (McKay et al., 2013; McKay, Ogborn, Bellamy, Tarnopolsky, & Parise, 2012; Snijders et al., 2014; Walker et al., 2012), okklusjonstrening (Wernbom et al., 2013) og ved utholdenhetstrening (Mackey et al., 2007), endres SC aktiviteten de første dagene etter trening.

Mens vanlige muskelfibre er postmitotiske, som vil si at de ikke kan dele seg og inngå i cellyklus, kan satellittceller imidlertid gjøre dette (Almeida et al., 2016). Ved normale ikke-stressede situasjoner i en skjelettmuskel er det antatt at satellittcellene ligger i dvale. Denne dvalen er kjennetegnet av lav transkripsjonsaktivitet, lite kjernedomene, redusert mengde organeller og høy tetthet av heterokromatin<sup>7</sup> (Hawke & Garry, 2001; Shortreed, Johnston, & J., 2008). Som en udifferensiert celle kan satellittcellen ved aktivering tre inn i cellyklus. En slik aktivering er drevet av ulike mitogene faktorer og forekommer etter et stress, slik som trening eller muskelskade (Dumont, Wang, & Rudnicki, 2015). I cellyklus vil SC proliferere og de aktiverte SC etterfølgere; myoblastene kan enten 1) sammensmelte og generere nye muskelfibre (hyperplasi), 2) tilføre flere cellekjerner i den aktuelle fiberen, eller 3) returnere til "dvalestatus" (Schmalbruch, 1976; Snijders et al., 2015).

### **2.3.5 Aktivering, regulering, proliferering og differensiering av satellittceller**

Mekanismene som kontrollerer det myogene programmet SC er en del av, er et svært komplisert system. Selv om vi i dag har oversikt over flere bidragsyttere, er det fremdeles knyttet spørsmålsteget til de eksakte mekanismene. Satellittcellens mikromiljø, samt en rekke lokale og systemiske faktorer virker å regulere satellittcellenes aktivitet. Ulike vekstfaktorer og inflammatoriske cytokiner, frigjort fra muskler og omkringliggende vev etter trening, er antatt å spille en stor rolle for SC aktivitet, mens SCens progresjon gjennom det myogeniske program blir dirigert opp og ned gjennom regulering av Pax7 og MRFs (Almeida et al., 2016; Snijders et al., 2015; Yin et al., 2013).

#### ***Mekanismer som kontrollerer hvilende satellittceller***

Negative regulatorer av cellyklus virker å fremme andelen hvilende SC. Hvilende satellittceller er ofte karakterisert av Pax7-ekspresjon, og fravær av MyoD og Myogenin (Cornelison & Wold, 1997). Også Notch er vist å være fremtredende i hvilende satellittceller, da dens tilstedeværelse minsker gjennom differensieringsprosessen, mens Notch-blokade er

---

<sup>7</sup> Generelt "inaktive" regioner av kromosomet (Cumming, 2009).

vist å tømme lageret av hvilende satellittceller (Mourikis et al., 2012). Funn fra ulike studier indikerer at FOXO3 negative celler er mer proliferative og differensierer hurtigere, mens celler med overekspresjon av Foxo3 har redusert inngang til celledyklus og redusert differensiering (Gopinath, Webb, Brunet, & Rando, 2014). *Micro RNAs* (miR) er viktige bidragsyttere i stamcelle genekspresjon, og både ekspresjonen av miR-489 (Cheung et al., 2012) og miR-31 (Crist, Montarras, & Buckingham, 2012) er vist å kunne påvirke satellittceller i "hvilemodus". MiR-31 påvirker aktivering av Myf5 mRNA til translasjonsprosessen, mens *Dek*; kjent for å kunne påvirke differensiering og selvfornyelse av SC, inhiberes av miR-489 (Cheung et al., 2012).

### ***Aktivering, proliferasjon og differensiering***

Både *in vitro* studier og dyreforsøk avslører at oppregulering av Myf5 er den første markøren som oppreguleres i aktiveringen, før en økt ekspresjon av MyoD (Cooper et al., 1999; Cornelison, Olwin, Rudnicki, & Wold, 2000; Cornelison & Wold, 1997; Grounds, Garrett, Lai, Wright, & Beilharz, 1992; Smith, Janney, & Allen, 1994) forekommer. MyoD virker å bli negativt regulert av Cdk4 (cyclin D1 induced cyclin dependent kinase 4) (Zhang, Wei, Zhao, & Paterson, 1999), mens oppregulering skjer gjennom binding av enten 1) SRF (serum response factor) eller 2) MEF2 (transkripsjonsfaktor), til SRE (serum response element) (Cornelison et al., 2000). MEF2 virker også å bli regulert av myocardin family of transcription factors (MASTR) (Mokalled, Johnson, Creemers, & Olson, 2012). p38 $\alpha/\beta$  MAPK er ifølge Jones, Tyner, Nibarger, Stanley, Cornelison, Fedorov & Olwin (2005) signalveien som først blir aktivert når hvilende satellittceller blir proliferative. Aktiveringen av p38 $\alpha/\beta$  MAPK resulterer i økt ekspresjon av MyoD og forflytning av SC inn i celledyklus. Etter muskelskader og/eller styrketrening frigjør muskelfiber en rekke veksthormoner, deriblant TNF- $\alpha$ , HGF og FGF. Disse vekstfaktorene er viktige for aktivering av flere signalveier relatert til celledyklus (Tatsumi, Anderson, Nevoret, Halevy, & Allen, 1998).

Også NO er vist å være involvert i den tidlige fasen av satellittcelleaktiveringen (Anderson, 2000; Pattwell, McArdle, Morgan, Patridge, & Jackson, 2004). Ved kontraksjoner utskilles NO grunnet de store skjæringskreftene mellom membranene, mens HGF frigjøres gjennom NO-syntese. Ved vevskade blir HGF aktivert, gjennom spalting av pro-peptide serine protease HGF aktivator (HGFA) (Anderson, 2000; Tjin, Derksen, Kataoka, Spaargaren, & Pals, 2004). Etter frigjøring blir HGF bundet til c-met, dens reseptor lokalisert på SC-membranen.

Bindingen av HGF aktiverer hvilende SC, og kan derfor påvirke aktivering og proliferasjon av satellittceller (Tatsumi, 2010; Yamada et al., 2010). I sin oversiktsartikkel viser (Snijders et al., 2015) til en økt forekomst av sirkulerende HGF etter muskelskade. HGF kan ha blitt fraktet til skadd muskulatur av granulocytter som del av den inflammatoriske prosessen en ser etter muskelskader (Ohnishi et al., 2006), eller være et resultat av proteinlekkasjer til blodet, grunnet muskelødeleggelser (Snijders et al., 2015).

Proliferasjon av SC virker å være en generell respons mot økt belastning (Petrella, Kim, Cross, Kosek, & Bamman, 2006). På laboratorier har det blitt vist at C2C12 myoblaster prolifererer etter eksponering av både IGF-1Ea og MGF (Yang & Goldspink, 2002). Også i dyreforsøk er det vist at økt MGF mRNA ekspresjon 2-24 timer etter muskelødeleggelser, ikke øker ekspresjon av IGF-1Ea mRNA, før etter 5-10 dager (Hill & Goldspink, 2003; Hill, Wernig, & Goldspink, 2003). Dette tyder på at MGF er viktig for aktiveringen av satellittceller, mens IGF-1Ea er viktigere i senere myogene faser (Yang & Goldspink, 2002) Hill, Wernig, and Goldspink (2003)) Hill, Wernig, and Goldspink (2003)) Hill, Wernig, and Goldspink (2003)) Hill, Wernig, and Goldspink (2003)) Hill, Wernig, and Goldspink (2003)). har foreslått at IGF-1Ea er relatert til den økte proteinsyntesen som forekommer i sen differensieringsfase, mens MGF videre er vist å stoppe en IGF-1 medierte differensieringsprosess (Yang & Goldspink, 2002). I cellesyklusens tidligere faser virker i tillegg basic fibroblast growth factor- (Fgf2) aktivering av ERK 1/2 og JNK, å kunne stimulere til proliferering Hill, Wernig, and Goldspink (2003).

Differensiering av myoblaster er kontrollert av de to transkripsjonsfamiliene MRFs og MEF2 (Ma, Chan, Zhu, & Wu, 2005), som igjen er regulert av flere vekstfaktorer, bl.a. IGFs, leukemia inhibitory factor (LIF), HGF, Fgf2, platelet-derived growth factor (PDGF), og transforming growth factor- $\alpha$  (Husmann, Soulet, Gautron, Martelly, & Barritault, 1996). I tillegg er flere signalveier, som Ras/MAPK, PI3K/Akt og JAK/STATs involvert i reguleringen av myoblast differensiering (Y. Yang et al., 2009). I sistnevnte signalvei er Stat3s interaksjon med MyoD vist å ha promoterende effekter på differensiering av myoblaster (Y. Yang et al., 2009). Etter proliferasjon virker oppregulering av MRF4 og myogenin å initiere differensieringen (Cornelison et al., 2000; Cornelison & Wold, 1997; Grounds et al., 1992; Smith et al., 1994; Yablonka-Reuveni & Rivera, 1994), mens PAX-7 nedregulerer differensieringen. Høy forekomst av Pax-7 syntes å påvirke SC til å avbryte differensieringsprosessen og trekke seg tilbake til hvilestatus (Olguin & Olwin, 2004; Olguin,

Yang, Tapscott, & Olwin, 2007). Også Wnt/ $\beta$ -catenin signalering virker å promotere differensiering. Laboratorieforsøk har vist at Wnt3a promoterer ekspresjon av follistatin og aktivering av myogenin, og at disse bidrar i differensiering samt sammensmeltingen av myoblaster (Jones, Price, Le Grand, Soleimani, Dick, Megeney & Rudnicki, 2015)

### ***Satellittceller, varme og mekanismer***

Ulike studier har lansert satellittceller som en av hovedmekanismene til den økte muskelveksten eller den raskere restitusjonen vi ser etter varmestimulus (Halevy et al., 2001; Kojima et al., 2007; Takeuchi et al., 2014; Uehara et al., 2004), men få har dirigert denne lanseringen mot faktiske mekanismer involvert i en slik prosess. Videre har svært få studier inkludert målinger av satellittcelleregulatorer kombinert med varmestimulus. Et unntak er de allerede nevnte studiene av Halevy et al. (2001) og Uehara et al. (2004), som indikerer at varme virker å øke proliferasjonen henholdsvis 24 & 48, og 24 timer, etter et varmestimuli, målt ved både BrdU og PCNA. Videre fant Halevy et al. (2001) en oppregulering av MEF-2 og myogenin 48 timer etter varmestimulus av kyllinger, og økt forekomst av muskulær IGF-1, men ikke [plasma IGF-1] og HGF, en og tre dager etter varmestimulus. Som vist i kap. 2.2.1 og 2.2.3 synes varme også å kunne påvirke aktivering av SC regulatoren Pax7, henholdsvis 3, (Kojima et al., 2007), 4 og 6 (Takeuchi et al., 2014), men ikke 7 og 14 (Oishi et al., 2009) dager etter stimulus.

### **2.3.6 Myonukleært domene. Trengs tilførsel av satellittceller for å oppnå muskelvekst?**

Apoptose er et fenomen som forekommer i stort omfang ved atrofi, og ifølge Gundersen & Bruusgaard (2008) er det ikke klar evidens for at antall cellekjerne blir redusert i denne prosessen. Samme forskergruppe har vist at immobiliserte mus betydelig reduserer CSA, men beholder eksakt samme kjerneantall i en atrofiert muskelfiber. Videre virker antall kjerner per fiber å være upåvirket av alder (Petrella et al., 2006). Disse resultatene indikerer at man beholder tidligere inkorporerte cellekjerne; et fenomen kjent som "muskelhukommelse". Hvorvidt en økning av cellekjerne er en viktig mekanisme ved hypertrofi har tidligere vært uklart, men de senere årene har flere studier hevdet at dette er en nødvendighet (Blaauw & Reggiani, 2014). En økning i kjerneantall skjer gjennom tilførsel av SC fra deres hvilende tilstand, og påfølgende inkorporering i eksisterende muskelfibre. For å undersøke hvilken rolle satellittceller har i muskeloppbyggingen i en atrofiert muskel studerte Jackson et al. (2012) muskeloppbyggingen hos unge mus i en "immobilisering-belastnings-modell". Svært

interessant oppnådde gruppen som fikk blokkert > 90 % av SC (SC-) like stor muskelvekst som gruppen som ikke fikk SC blokkert (SC+). Denne muskelveksten skjedde uten addering av cellekjerner, og støttes av McCarthy et al. (2011) sine samsvarende funn. Med liknende studiedesign har Egner, Bruusgaard & Gundersen (2016) i denne sammenheng funnet en tydelig hypertrofi etter overbelastning. Muskelveksten ble funnet i både *m. plantaris* og *m. extensor digitorum longus* i SC+ mus, mens hypertrofi ikke forekom etter overbelastning blant SC- mus. I Egner et al. (2016) studie er muskelveksten forklart med 1) økt antall Pax7+ celler og 2) inkorporering av flere cellekjerner. Funnene til Jackson et al. (2012) indikerer dermed at muskelfibre kan oppnå vekst gjennom andre mekanismer enn tilførsel av cellekjerner, mens Egner et al. (2016) mener muskelvekst er avhengig av rekruttering av nye kjerner.

### ***Myonukleært domene; størrelse, vekst og tak***

Hver cellekerne kontrollerer gen-transkripsjon, produksjon av mRNA og protiensyntese i et bestemt område i cytoplasma, kalt myonukleært domene (Blaauw & Reggiani, 2014; Kadi et al., 2004). I normale skjellettmuskler er det foreslått at transkripsjonskapasiteten til de eksisterende cellekjernene kan øke etter styrketrening, noe som vil si at fibrene har potensial til å øke i størrelse, noe som igjen vil føre til et høyere myonukleært domene. Når en cellekjernene når sin maksimale transkripsjonsaktivitet virker infusjon av eksterne cellekjerner nødvendig, for videre muskelvekst. I neonatal gnagermuskulatur utgjør satellittceller 30-35% av det totale kjerneantallet i muskelfiberen. Andelen SC minsker etterhvert som antallet kjerner øker gjennom de første ukene av postnatal utvikling, samtidig som myonukleært domene øker (Schultz, 1996; White, Bierinx, Gnocchi, & Zammit, 2010). Veksten i myonukleært domene kan ikke fortsette ubegrenset, da myonukleært domene kun kan vokse opp til en viss størrelse (Petrella, Kim, Mayhew, Cross, & Bamman, 2008). Det er derfor antatt at det ved hypertrofi, etterhvert er nødvendig med tilførsel av eksterne kjerner, for å oppnå ytterligere muskelvekst (Blaauw & Reggiani, 2014).

En signifikant økning av cellekjerner per fiber er funnet når fiberstørrelsen øker med mer enn 26 %, men ikke med mindre enn 25% (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006). Petrella et al. foreslo i 2006 at myonukleært domene har et tak på  $\sim 2,000 \mu\text{m}^2$ , men en senere clusteranalyse av samme forskergruppe (Petrella et al., 2008) foreslo at ekstremresponderere på styrketrening virker å ha et noe høyere tak ( $\sim 2,250 \mu\text{m}^2$ ). Samme studie viste også en signifikant høyere satellittcelleaktivering for ekstremresponderere. Dette indikerer at allerede store muskelfibre

er avhengige av infusjon av satellittceller for å øke i størrelse, mens mindre muskelfibre kan øke sin størrelse uten tilførsel av satellittceller. Ved å sammenlikne denne teorien med funn Petrella et al. (2006) gjorde etter 16 ukers styrketrening på yngre og eldre kvinner og menn, virker dette som en plausibel mekanisme. I studien hadde de yngre mennene størst fiberstørrelse i utgangspunktet (lik verdi som eldre menn), samtidig som de oppnådde størst fremgang i gjennomsnittlig fiberstørrelse. De yngre mennene fikk som eneste gruppe signifikant økt neural cell adhesion molecule (NCAM)-merkede celler og signifikant flere cellekjerner, gjennom treningsperioden. Samsvarende funn ble gjort av Bruusgaard, Johansen, Egner, Rana & Gundersen (2010) som fant vekst i antall cellekjerner forut for vekst av tverrsnittsareal. Motstridende resultater ble funnet av Kadi et al. (2004) der 15 unge menn gjennomførte 12 ukers styrketrening og oppnådde økt fiberareal, uten tendens til økning i antall cellekjerner, noe som ga utslag i økt myonukleært domene. Trolig kan fravær av endring i kjerneantall tilskrives de inaktive deltakernes og deres lave myonukleært domene på  $1522 \mu\text{m}^2$ . En kan derfor anta at deltakerne hadde noe lavt fiberareal og at hypertrofi forekom som vekst i fiberareal, uten inkorporering av nye cellekjerner. Så langt jeg kjenner til er Oishi et al. (2009) eneste studie som har undersøkt effekten varme og nedbryting av muskulatur har på antall cellekjerner. Oishi et al. (2009) brukte DAPI<sup>8</sup> som cellekjernemarkør. Deres funn viser at varme i seg selv ikke fører til tilførsel av flere cellekjerner, men at dersom injeksjon av bupivacaine kombineres med varme, reduseres cellekerneantallet i mindre grad, enn det gjør uten varmestimulus.

## 2.4 Oppsummering

Hot water immersjon er en effektiv måte å øke kroppstemperaturen på. Flere studier har undersøkt hvordan økt kroppstemperatur med eller uten kombinasjon av ulike treningsprotokoller og muskelødeleggelse påvirker restitusjon, nedbryting og adaptasjoner i musklene. Brorparten av dyrestudiene finner fordelaktige effekter av oppvarming på utvikling av muskelmasse, mens effekten varmestimuli har på muskelstyrke hos mennesker er mer uklar. Muskeloppvarming virker også å kunne ha fordelaktige effekter på aktivering av satellittceller. Basert på tilgjengelige studier er det ingen enighet omkring hvor lenge

---

<sup>8</sup> 4',6-diamidino-2-phenylindole



varmebehandling bør utføres, eller hva som er optimal muskeltemperatur under gjennomføringen.

Et nettverk av faktorer regulerer vår muskelvekst. Ved vedvarende styrketrening virker tilførsel av cellekjerner å være en nødvendighet for muskelvekst. Trolig står satellittcellene for denne tilførselen. Hvordan ulike regulatorer av satellittcellers aktivitet påvirkes av varme mangler forskningsresultater. Men aktivering av IGF-1 og påfølgende oppregulering av proliferasjon, kan være en plausibel mekanisme. Ulike signalprotein, bl.a. CaN, veksthormonet IGF-1 og HSP er satt i sammenheng med fasilitert muskelrespons etter varmestimuli. Disse kan enten virke alene, eller sammen med et stimuli for muskelnedbryting.



## 3.0 Metode

Datainnsamlingen er gjennomført som del av et større norsk-australsk prosjekt, kalt "Hot water immersion". Prosjektet er et samarbeid mellom University of Queensland (UQ) og Norges idrettshøgskole (NIH). All datainnsamling ble gjennomført på NIH, og de ulike analysene ble utført både ved NIH og UQ.

### 3.1 Studiedesign

Studien ble gjennomført som en randomisert kontrollert studie over 10 uker. Med hensikt å undersøke hvordan post-immersjon i varmt vann umiddelbart etter trening påvirker muskelvekst, styrke, satellitt- og cellekjerneantall og endringer i muskelfiberstørrelse, i benmuskulaturen. For å måle treningsadaptasjoner ble det gjennomført 1 RM styrketester, isokinetiske målinger<sup>9</sup> i dynamometer, DEXA-skann og MR-målinger. I tillegg til dette ble det tatt muskelbiopsier av *m. vastus lateralis*. For en enkel oversikt over studiets design se tabell 4.

Tabell 4. Studiens forløp og timingen til de ulike testene og treningen.

	Pre-test		Intervensjon										Post-test
Uke	(1 - 2)	(3	4	5	6	7	8	9	10	11	12)	(13 - 14)	
<b>MVC</b>	<b>x</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>	
<b>1 RM</b>	<b>x</b>											<b>x</b>	
<b>TVØ</b>	<b>x</b>											<b>x</b>	
<b>Muskel -biopsi</b>	<b>x</b>											<b>x</b>	
<b>DEXA</b>	<b>x</b>											<b>x</b>	
<b>MR</b>	<b>x</b>											<b>x</b>	

*MVC = Maksimal voluntær kontraksjon; 1 RM = 1 repetisjon maks; TVØ = Tilvenningsøkt.*

<sup>9</sup> Brorparten av de isokinetiske målingene gikk tapt i softwarefeil og vil således ikke relateres til denne oppgaven.

## 3.2 Utvalg

Forsøkspersoner ble hovedsakelig rekruttert fra studentpopulasjonen ved NIH gjennom presentasjoner, oppheng av plakater i nærområdet og gjennom sosiale medier. Det ble totalt rekruttert 24 deltakere til studien. Av disse fullførte 16 studien; syv i intervensjonsgruppen og ni i kontrollgruppen. Fire av deltakerne var kvinner. Det var to kvinner i hver gruppe, som alle fullførte studien. Alle deltakerne ble informert skriftlig og muntlig om studien.

Deltakerne ga skriftlig samtykke til sin deltagelse og fylte ut et helseerklæringskjema. I helseerklæringskjemaet bekreftet deltakerne at de ikke hadde noen former for skader eller sykdommer som kunne påvirke studien, eller deres egen helse ved deltagelse. Studien var vurdert av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Sør-Øst-Norge. Deltakernes gjennomsnittlige resultat i de tre 1 RM-testene dannet grunnlag for gruppeinndelingen. To og to deltakere ble satt i par etter muskelstyrke og randomisert til hver sin gruppe. En gruppe utførte passiv restitusjon, mens den andre gruppen satt stille i varmt vann (45°C) i 10 min etter hver treningsøkt..

Tabell 5. Oversikt over forsøkspersonenes høyde og vekt ved studiets start.

<b>PAS</b>	Høyde (cm)	Vekt (kg)	<b>HWI</b>	Høyde (cm)	Vekt (kg)
Menn (n=7)	182 ± 8	87,5 ± 14,8	Menn (n=5)	186 ± 2	85,6 ± 8,8
Kvinner (n=2)	164 ± 6	68,8 ± 1,3	Kvinner (n=2)	177 ± 2	78,5 ± 9,2
Totalt (n=9)	178 ± 11	83,3 ± 15,3	Totalt (n=7)	183 ± 4	83,6 ± 8,8
Signifikansnivå	0,271	0,992		0,271	0,992

## 3.3 Tester

### 3.3.1 Styrketester

Før og etter treningsperioden ble det gjennomført 1 RM (en repetisjon maksimum) styrketester i benpress, kne-ekstensjon og kne-fleksjon for å måle utviklingen av dynamisk muskelstyrke. Før 1 RM testen ble det gjennomført en tilvenningsøkt, som bestemte oppvarmings- og startvekt for 1 RM testen. Tilvenningsøkten og 1 RM testene ble begge utført etter samme protokoll (vedlegg 3). De to protokollene ble adskilt med 48–72 timer, og samme adskillelse ble brukt i post-testen som i pre-testen, dersom dette var mulig.

Den generelle oppvarmingen bestod av fem minutter lett sykling på ergometersykkel. Deltakerne valgte selv motstand, men ble oppfordret til å holde lett motstand og et turtall mellom 70 og 90 omdreininger per minutt. Før første 1 RM løft, gjennomførte forsøkspersonene 10, 5 og 3 repetisjoner på 50, 70 og 80 % av forventet 1 RM, etter prestasjonen fra tilvenningsøkten. Under tilvenningsøkten ble vektene justert av testansvarlig med hensikt å finne 1 RM. 1 RM under tilvenningsøkten ble videre brukt til å bestemme oppvarmingsvektene under selve 1 RM testen. Det ble gitt 90 sekunders pause mellom oppvarmingsløftene. Mellom 1 RM-løft ble det gitt 90 sekunders pause dersom deltakerne syntes løftet var "lett", og 3 minutters pause ble gitt dersom deltakeren eller testansvarlig klassifiserte løftet som tungt, eller deltakeren ikke klarte løftet. Forsøkspersonene fikk maksimalt to forsøk på hver vekt. Mellom treningsøvelsene ble det gitt fem minutters pause. Både ved godkjente og ikke-godkjente løft bestemte testleder neste vekt, etter samtale med den aktuelle forsøkspersonen. Minste endring av totalvekt var 5 kilo for benpress og 2,5 kilo for kne-ekstensjon og kne-fleksjon. Forsøkspersoner som løftet mer enn maksimal vekt i kne-ekstensjon utførte 1 RM forsøkene med et ben. Løftet vekt fra høyre og venstre ben ble så summert sammen. Oppvarmingsløft ble gjennomført på begge bein for alle deltakere.

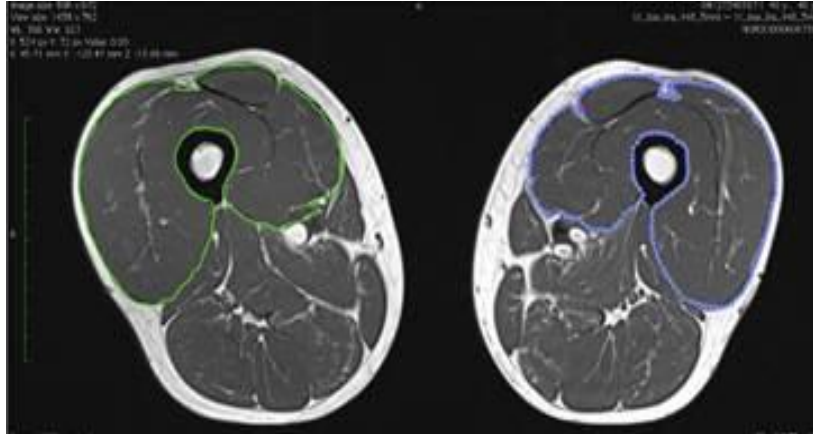
#### *Standardisering av styrketester*

I benpress ble dybde på løftet standardisert ved bruk av treklosser, mens fotplasseringen ble tilpasset slik at leggbeinets vinkel i løftets nederste fase var parallell med gulvet. En av deltakerne hadde nedsatt bevegelighet og avsluttet derfor løftets nederste fase før leggbeinet var parallelt med underlaget. I både kne-ekstensjon og kne-fleksjon ble sitteinnstillinger og ytterposisjoner standardisert slik at den var lik mellom pre- og post-tester. Ytterposisjoner ble målt med linjal og markert på teip som var festet på apparatene, samt notert ned. Posisjonen ble markert etter visuell bedømmelse fra samme testleder. Ytterposisjonen i kne-ekstensjon

ble satt til ca. 175° i kneleddet, gitt at deltakeren klarte å ekstenere kneleddet til ca. 180°. To forsøkspersoner hadde nedsatt bevegelighet og ble gitt noe lavere ytterposisjon; ca. 170°. I kne-fleksjon ble ytterposisjon bestemt der leggbeinet var vinkelrett på underlaget. Ingen deltakere hadde problemer med leddutslaget i denne testen.

### 3.3.2 Magnetresonanstomografi

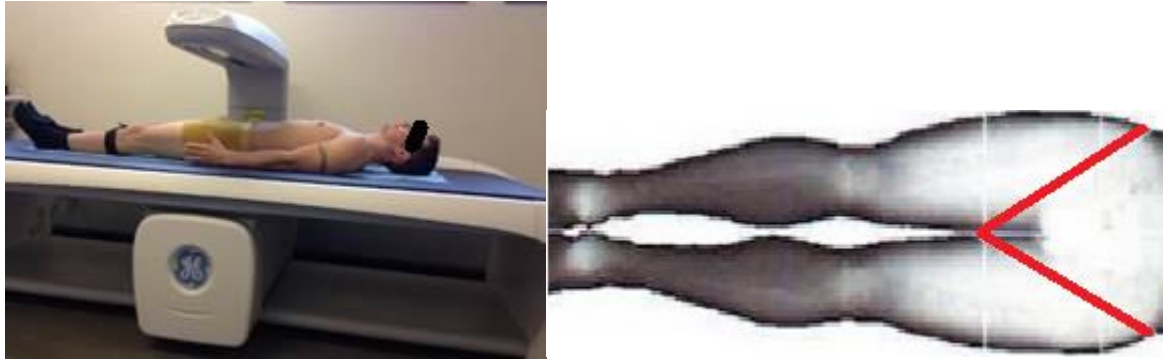
Endringer av muskelvolumet til *m. quadriceps femoris* ble målt med magnetisk resonanstomografi (MR) ved Curato Røntgen, Oslo City. Alle målinger ble utført i samme maskin (Avanto TIM 76x18, Siemens, Erlangen, Germany) og av samme radiograf. MR-bilder gir fotografiske skiver av muskulatur som etter analyser kan gi informasjon om tverrsnittsarealet og volumet av lårmuskelen (Mijnarends et al., 2013), jf. figur 1. MR er regnet som gullstandarden når det gjelder målinger av regional kroppskomposisjon, da den ikke er invasiv eller innebærer eksponering for stråling (Andreoli, Scalzo, Masala, Tarantino, & Guglielmi, 2009). Før deltakerne ankom Curato Røntgen ble femurlengden målt på NIH. Femurlengden ble definert som avstanden fra den store lårbensknuten til lateral epikondyle. Siden muskelens tverrsnittsareal kan variere i ulike deler av muskelbuken, trengs det flere målinger over muskelen for å sikre valide målinger (Raastad, Paulsen, Refsnes, Rønnestad, & Wisnes, 2010). Det ble derfor tatt 15 bilder langs *m. quadriceps femoris*, og femurlengden ble brukt til å kalkulere avstanden mellom bildene. Bildene ble produsert med Siemens software (WB19, Siemens, Erlangen, Germany) og analysert med OsiriX imaging software (Pixmeo, Geneva, Switzerland). Muskelvolum ble først kalkulert ved semi-automatisk segmentering (Yushkevich et al., 2006). Analysene inkluderte kun bilder der *m. vastus lateralis* var synlig. På enkelte av de mest proksimale og distale bildene var *m. vastus lateralis* ikke synlig. Disse bildene ble da ikke tatt med i videre analyser. Det totale muskelvolumet regnet ut fra total-segmenteringen ble omgjort til kg etter følgende formel:  $1.04 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$  (Vierdort, 1906).



Figur 1. MR bilde av høyre og venstre lår. M. Quadriseps femoris er tydeligjort. Muskler har grå farge, fett- og beinvev lys farge

### 3.3.3 Dual-energy X-ray absorptiometry

Forsøkspersoner ankom DEXA testingen på morgenen, etter minimum 10 timer fasting. Høyden og kroppsvekt ble målt på et stadiometer (Seca 217, Seca gmbh & co. kg. Hamburg, Germany). Deltakerne ble deretter posisjonert i DEXA- (Lunar iDEXA; GE Helthcare, Madison, WI) etter testleders instruksjer. Dette innebar at ankler og knær ble holdt sammen av støttebånd, og at armer ble holdt til siden med håndflaten mot hoften og tomlene pekende opp. Deltakerne lå deretter stille i ca. 10 minutter mens total og regional beinmasse, fettfri masse og fettvev ble beregnet, jf. figur x. DEXA-maskinen ble kontrollert hver morgen, de dager det ble utført målinger, og alle deltakerne ble scannet i "standard mode". Skannede filer ble automatisk analysert med enCORE software (v. 14.10.022 (GE)). Analyse av interesseområder ble etter skanning kvalitetsjekkert av analyseansvarlig. Reliabiliteten til Lunar iDEXA har lavere enn 1% variasjonskoeffisient (CV) for alle kroppskomposisjoner, med unntak av fett lokalisert i mageregionen, som har noe høyere variasjon (CV=2.32 %) (Hind, Oldroyd, & Truscott, 2011). I denne oppgaven ble kun DEXA resultater fra beinmuskulaturen brukt.



Figur 2. Eksempel på forsøksperson under DEXA måling (venstre) og muskulatur som inkluderes i DEXA-bein (høyre). Muskelmasse distalt (venstre) for rød markeringen ble inkludert i analysene.

### 3.4 Treningsprotokoll

Totalt 10 ukers styrketrening ble gjennomført ved to ukentlige treninger, noe som resulterte i gjennomføring av totalt 20 treningsøkter. All trening ble overvåket av en trener, så langt det lot seg gjøre. En deltaker trente av logistikkmessige årsaker to uker på NIH og åtte uker på eget treningsstudio, uten direkte treningstilsyn. Undertegnede og en annen trener hadde ansvar for treningen av deltakerne.

#### 3.4.1 Treningsøvelser

De fire styrkeøvelsene beinpress, kne-ekstensjon, kne-fleksjon (Technogym, Italia) og gående utfall ble benyttet gjennom hele treningsperioden. I tillegg ble de fem plyometriske øvelsene "countermovement drop jumps", "slow eccentric squat jumps", "split lunge jumps", "countermovement dumbbell jumps" og "countermovement box jumps" benyttet. Kun en av de plyometriske øvelsene ble benyttet under en treningsøkt, og hver spenstøvelse ble gjennomført over to uker, i nevnt rekkefølge. Med unntak av de to første ukene hvor det ikke ble benyttet hantler (Technogym, Italia), ble plyometriske øvelser gjennomført med 50% av vekten benyttet i utfall.





Figur 3. Forsøksperson utfører treningsøvelsene beinpress (A), kne-ekstensjon (B), kne-fleksjon (C) og gående utfall (D).

### 3.4.2 Treningsøkten

Forsøkspersonene varmet rolig opp i 10 minutter på ergometersykkel (Ergomedic 828E, Monark, Sverige) før de startet med treningsøvelsene. Det ble ikke gjennomført spesifikk oppvarming før styrketreningen. Forsøkspersonene gjennomførte seks sett med beinpress, mens det ble gjennomført tre sett i de andre treningsøvelsene. Hvert sett bestod av 8-28 repetisjoner, og totalt gjennomførte deltakerne 18 sett. I gående utfall utførte deltakerne steg med annet hvert bein, totalt 20-28 steg per sett. De plyometriske hoppene ble utført på kasser (Eleiko, Sverige) fra 40 cm høyde. Det ble gitt 90 sekunders pause mellom settene og to minutters pause mellom øvelsene. Treningsøkten er vist i tabell 6.

Tabell 6. Viser de ulike øvelsene, antall sett og antall repetisjoner som ble brukt under treningsøktene.

Øvelse	Antall sett	Antall repetisjoner per sett
Beinpress	6	8-12
Kne-ekstensjon	3	12
Kne-fleksjon	3	12
Gående utfall	3	20-28*
Plyometrisk øvelse	3	12

\*Totalt antall steg for begge bein

### 3.4.3 Treningsprogresjon

1 RM i beinpress, kne-ekstensjon og kne-fleksjon dannet utgangspunkt for startvekt ved første treningsøkt. En startvekt på 65-70 % av 1RM ble benyttet for beinpress og kne-ekstensjon, mens startvekten for kne-fleksjon ble satt til 55-65 % av 1RM. Belastningen ble justert under og etter de to første treningsøktene, for å tilpasse en optimal individuell belastning til hver deltaker. Dette fordi startvekten for enkelte deltakere var for lett, mens den for andre var for tung. I gående utfall ble 40 % av kroppsvekt brukt som belastning, mens det for plyometriske øvelser ble brukt 20 %. Hantelvektene ble rundet opp i de tilfeller der deltakere havnet mellom to vekter. Deltakerne ble heller ikke presset maksimalt under de to første treningsøktene for å unngå muskelstølhets (DOMS; Delayed onset muscle soreness). Annenhver uke ble treningsmotstanden justert for alle øvelser. For gående utfall og de plyometriske øvelsene var økningen på forhånd bestemt til to og en kilo, mens økningen i beinpress, kne-ekstensjon og kne-fleksjon ble bestemt av de treningsansvarlige. Økningen ble gjort etter subjektiv vurdering av den treningsansvarlige. Dersom økningen i treningsmotstand viste seg å være suboptimal (FP klarte å gjennomføre seriene lett), ble treningsmotstanden justert på neste treningsøkt. For detaljert beskrivelse av treningsopplegget se vedlegg 4. Treningsprogrammet er basert på tidligere studier av Roberts et al. (2015). Ved skader eller sykdom ble treningsmotstand, øvelser og pauser tilpasset deltakeren yteevne. To av deltakerne fikk tilpasset treningsopplegget i henholdsvis 4 og 5 uker, pga. belastningskader. En i hver gruppe. Flere deltakere ble gitt lengere pauser i treningsøvelsen utfall de siste 4 ukene av treningsperioden, fordi de ikke maktet å gjennomføre repetisjonene uten lengere

pauser. Dette gjaldt nær alle deltakere, og det er derfor ikke registrert hvilken gruppe disse tilhørte.

### **3.5 Registrering av trening og ernæring**

For å kontrollere og ha oversikt over treningen deltakerne utførte utenom prosjektet, ble deltakerne bedt om å registrere sin ukentlige trening i et eget skjema (vedlegg 5). Denne informasjonen kunne i etterkant av studiene brukes i tolkningen av innsamlede data og i ytterste tilfelle ekskludere deltakere som ikke oppfylte kriteriene i studien.

For å sikre at deltakerne inntok tilstrekkelig mengde protein før og etter treningsøkten, inntok deltakerne en proteinshake med ~ 21 gram protein (Proteinfabrikken) en time før, og direkte etter treningsøkten. Deltakerne målte selv opp proteinmengde etter opplæring fra en av de treningsansvarlige. I uke 3, 5, 7 og 9 registrerte deltakerne sitt eget kosthold over fire dager (vedlegg 6). Kostholdet ble analysert, slik at deltakere som inntok for lite protein eller for lav energimengde kunne bli identifisert og oppmuntret til å øke sitt protein eller energiinntak. Ingen deltakere fikk beskjed om å øke sitt protein- eller energiinntak.

### **3.6 Intervensjon**

Deltakere som ble randomisert til varme bad satt 10 minutter i et oppblåsbart basseng (iCool iBody, iCoolSport, Australia) etter hver treningsøkt. Deltakerne satt med utstrakte bein og med vann til mellom nedre del av sternum og navlen, jf. figur 4. Vannet ble oppvarmet av et eksternt varmeelement (iLite, iCoolSport, Australia). Vanntemperaturen ble kontrollert med et håndholdt termometer (Hanna, HI147-00, Italia). Dette ble gjort på morgenen hver treningsdag, og umiddelbart før 61 % av treningsøktene. Gjennomsnittstemperaturen i bassenget var  $44,6 \pm 0,9$  °C. To av deltakerne brukte tennissokker under badingen for å redusere smerte rundt ankler, grunnet vanntemperaturen. For å opprettholde et hygienisk klima i bassenget ble vannet skiftet ut og bassenget vasket en gang per uke. Deltakerne i

passive restitusjonsgruppen satt posisjonert inntil en vegg med utstrakte bein i romtemperatur i 10 minutter.



Figur 4. Forsøksperson bader i det oppblåsbare bassenget..

### 3.7 Muskelbiopsier

Det ble tatt muskelbiopsier før treningsperioden startet, og direkte etter siste treningsøkt. I tillegg ble det tatt muskelbiopsier 2, 24 og 48 timer etter siste treningsøkt. Muskelbiopsiene ble tatt fra *m. vastus lateralis* midtre del i dominant ben. Pre-biopsien ble tatt på 1/3 av lengden til *m. vastus lateralis* (distal del), mens postbiopsien ble tatt 3 cm over pre-biopsien. Før inngrepet ble biopsiområdet vasket med desifiserende væske (klorhexidin), før det ble gitt lokal bedøvelse (Xylocain-adrenalin,  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} + 5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , AstraZeneca, Södertälje, Sverige). Ved bruk av skalpell ble det snittet 15-20 mm gjennom hud og muskelfascien. En 6 mm steril Bergström-nål (Pelomi, Albertslund, Danmark), koblet til 50 milliliters vakuumsprøyte ble ført inn i snittet og det ble hentet ut totalt 200-300 mg muskelvev på 1-3 "klipp". Dersom det ble utført flere klipp, ble disse tatt i ulike retninger. Muskelvev til histokjemiske analyser ble rensert for blod, bindevev og fett og skjært vinkelrett på fiberretningen med et barberblad, før de ble lagt i form med stabiliserende medium (Cat#Kma-0100-00a; CellPath Ltd, Newtown Powys, Mid Wales, UK). Formen med IHC-biter ble så direkte nedfrost i isopentan, nedkjølt i flytende nitrogen ( $\sim -120^\circ\text{C}$ ), før de ble lagret i ultrafryser ( $\sim -80^\circ\text{C}$ ). Da muskelvev var blitt hentet ut ble såret lukket med strips og

dekket med plaster. 6-7 dager etter inngrepet var såret grodd og deltakerne fjernet selv bandasje og strips.

### **3.7.1 Snitting av muskelbiopsier**

Det ble tatt en muskelbiopsi før treningsperioden. I tillegg ble det tatt muskelbiopsier umiddelbart, 2, 24 og 48 timer etter treningsperioden. Muskelbiopsier tatt før og umiddelbart etter treningsperioden ble analysert. Muskelbiopsiene ble tatt ut av ultrafryser og lagt i kryostat (CM1950, Leica Microsystems, Nußloch, Tyskland) ved -20 °C i 30 min. Vevsbiten ble så festet til en kutteskruer med lim (Cat#Kma-0100-00a; CellPath Ltd, Newtown Powys, Mid Wales, UK) før skruen ble montert på objekthodet til kryostaten. For å få en ren kutteflate og undersøke kvaliteten på vevsbiten ble det kuttet noen snitt av vevsbiten, før snitt med åtte µm tykkelse ble lagt på dekkglass (VWR, Tyskland). Muskelbiopsier fra samme forsøksperson ble lagt på samme glass, til sammen fem stk. Bitene ble lagt i kronologisk rekkefølge og det ble til sammen laget 10 nabosnitt. Nabosnitt fra samme forsøksperson ble pakket inn i linsepapir (Assistent, Germany) og aluminiumsfolie før de ble lagt tilbake i ultrafryseren.

## **3.8 Immunhistokjemi**

For å identifisere ulike strukturer i muskelsnittet ble det brukt spesifikke antistoff. To ulike merkeprotokoller (vedlegg 8A og 8B) ble brukt for å identifisere satellittceller, fibertyper og cellekjerner. For å undersøke endringer i antall satellittceller ble snitt merket med antistoff mot laminin og NCAM, mens dystrofin og SC71 ble benyttet som antistoff for å identifisere fibertyper og fiberareal. Lim som inneholdt DAPI (Dapi ProLong, USA) ble brukt som markør for å identifisere cellekjerner. For oversikt over antistoff og deres egenskaper se tabell 7.

Tabell 7. Oversikt over antistoff og cellekjernemarkør brukt i studien, deres bindingsegenskaper, lot nr., produsent og fortynning.

	Antistoff	Vertsdyr	Bindes til	Lot nr.	Produsent	Fortynning
Primærantistoff	Anti-NCAM	Mus, monoklonal	NCAM	GR236708-1	Abcam	1:400
Primærantistoff	SC-71	Mus, monoklonal	MHC II	X	DSHB	1:1000
Primærantistoff	Anti-laminin	Kanin, polyklonal	Laminin	00051761	DAKO	1:500
Primærantistoff	Anti-dystrofin	Kanin, polyklonal	Dystrofin	GR226781-5	Abcam	1:1000
Sekundærantistoff	CF-488	Geit, monoklonal	Anti-mus	14C1013	Biotium	1:200
Sekundærantistoff	CF-594A	Geit, polyklonal	Anti-kanin	14C0916	Biotium	1:200
Cellekjernemarkør	DAPI		DNA	1266174	Invitogen	*

\* DAPI kommer ferdig levert i monteringsmedium

### 3.8.1 Mikroskopi

Et lysmikroskop (Olympus BX61, Japan) tilkoblet en fluoriserende lyskilde (EXFO, XI120PC-Q, Canada) ble brukt for å analysere snittene merket med ulike antistoff. Et digitalt kamera (Olympus DP72, Japan) var tilkoblet mikroskopet. Mikroskop og kamera ble styrt av Cell<sup>^</sup>-F (Olympus, Japan. Software for Windows XP Microsoft, USA). Mikroskopet har tre ulike filterkuber; DAPI, Texas-red og FITC.

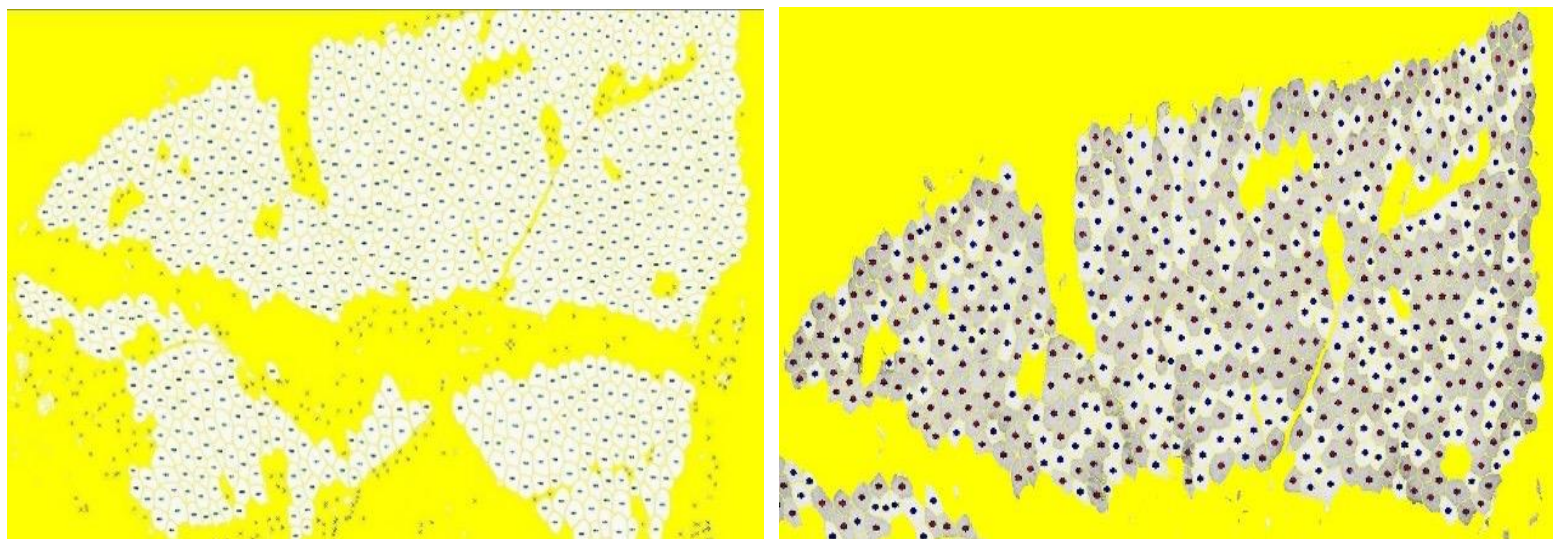
### 3.8.2 Utrekning av fibertyper og fiberareal

Snitt som ble brukt til analyser av fibertyper og fiberareal, ble merket mot dystrofin og MHC II. Bilder ble tatt i Cell<sup>^</sup>-F med 4x objektiv. Begge bildene ble tatt i sort/hvitt, før de ble invertert i samme program. Bildene ble deretter behandlet og analysert i TEMA (ChekVision, Hadsund, Danmark). Membransensitiviteten ble satt til "125" eller "126" og "max gap size" til 35 for optimal tilpasning av cellemembranene. Minimum og maksimum fiberstørrelse ble satt til henholdsvis 1000  $\mu\text{m}^2$  og 400  $\text{mm}^2$ . Fibre større enn 15000  $\mu\text{m}^2$  ble manuelt undersøkt, for å utelukke inkludering av felter programvaren feilregistrerte som fiber. I analysene ble muskelfibrene programvaren hadde registrert enten beholdt, addert eller ekskludert. Addering foregikk ved å manuelt tegne på nye membraner der programvaren ikke hadde registrert den faktiske membranen. Både faktiske og feilaktig registrerte muskelfibre ble ekskludert, etter kriterier oppsummert i tabell 8. Programvaren ble så brukt til å måle cellearealet innenfor dystrofinmerkingen, før et bilde av fibertypemerkingen ble lagt over det behandlede bildet.

Fibertypesammensetningen blir lagt frem som prosentvis fordeling mellom type I og type II fibre, mens muskelfiberarealet blir presentert per muskelfibertype. Alle analyser med unntak av to pre-snitt, ble gjort på samme nabosnitt for alle forsøkspersonene.

Tabell 8. Kriterier for eksklusjon av muskelfibre.

<b>Eksklusjon av fibre</b>
Fibre med unormal form <sup>10</sup>
Fibre som ligger utenfor det samlede snittet
Fibre hvor det er brudd på membranen
Fibre som ligger omkranset av ekskluderte fiber
Fibre som ligger skjevt og dermed er kuttet på tvers (avlang form)
Store områder med generelt dårlig kvalitet
Fibre langs ytterkant av snitt med unormal form eller tydelig avflatet kant
Fibre med flere membraner i seg/membranen er sammenflettet med andre fiber
Frostskadde fibre



Figur 5. Utrekning av fiberareal (venstre) og klassifisering av fibertype (høyre). Skjermdump er hentet fra analyser i TEMA.

<sup>10</sup> Fibre som har skarpe kanter, dvs. fibre som tar form som pizzastykker e.l.

### 3.8.3 Muskelcellekjerner

For hver forsøksperson ble det identifisert muskelcellekjerner fra 50 type I- og 50 type II fibre. Antall identifiserte fibre ble valgt etter funn av Mackey et al. (2009), som viste at identifisering av både 25 og 50 fibre gir svært høy reliabilitet. Fargebilder ble tatt i Cell-F med 10x objektiv med tre ulike båndpassfiltre (DAPI, FITC og Texas-red). Bildene ble sammensmeltet (se figur 6) før antall cellekjerne manuelt ble telt i bildeprogramvaren Fiji (open source software). I denne analysen ble det brukt et bilde fra hvert filter, samt to ulikt sammensmeltede bilder.

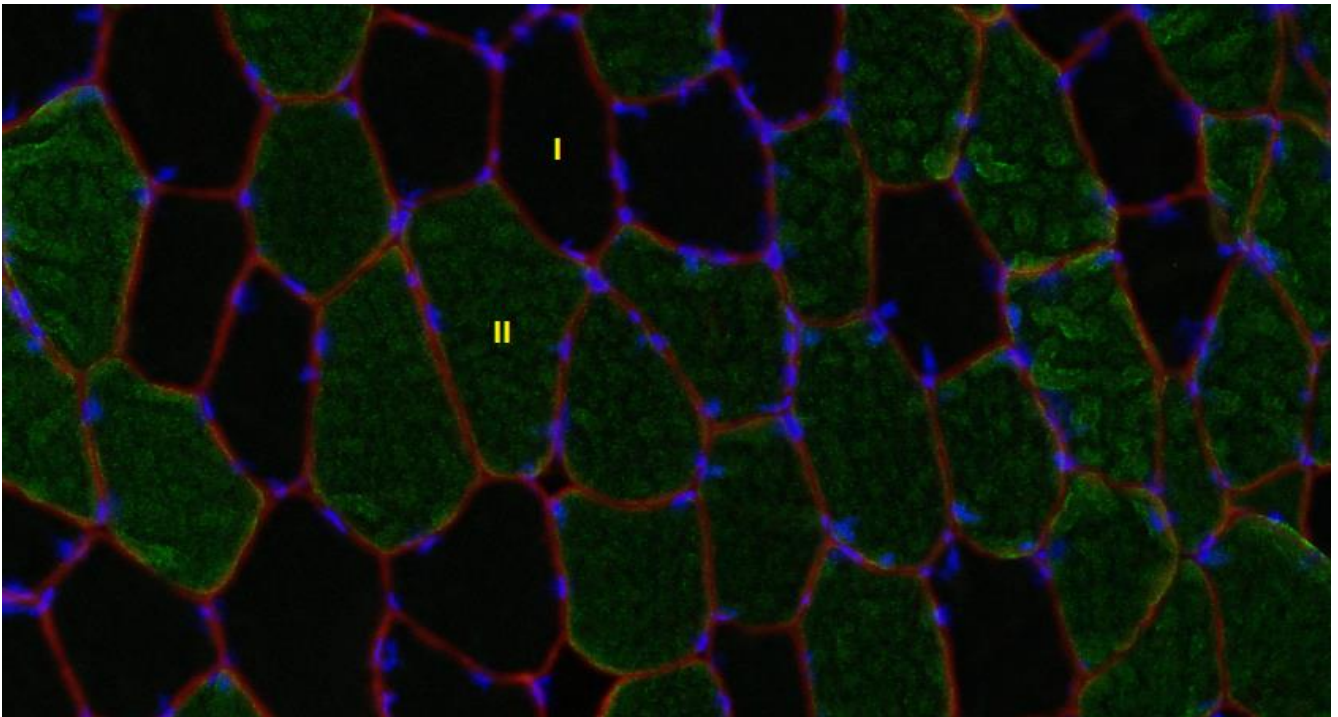
Kun kjerner som oppfylte kriteriene i tabell 9 ble inkludert. Ved uklarhet om en kjerne skulle inkluderes eller ikke, ble bildet forstørret (zoom) for lettere å kunne avgjøre hvorvidt en cellekerne oppfylte inklusjonskriteriene. Fordi snittet har en tykkelse på åtte  $\mu\text{m}$  kunne membranen bli kuttet noe uregelmessig eller skjevt, noe som kunne vanskeliggjøre identifiseringsarbeidet. I disse tilfeller ble "sentrum" av den sterkeste merkingen brukt til å vurdere hvorvidt en cellekerne skulle inkluderes, eller ikke. Dersom det fremdeles var tvil om en kjerne skulle medregnes, var lokasjonen av den svakere merkingen avgjørende. For å skille kjerner med svært lav DAPI-markering fra støy ble "de minste" markeringene kun inkludert som kjerner dersom intensiteten på merkingen var sterk.

Muskelcellekjerner presenteres som antall cellekjerne per muskelfiber og relatert til fibertype. Kjernerommet ble uttrykt for hver fibertype, og ble regnet ut som kvotienten av muskelfiberarealet og antall cellekjerne. Alle analyser med unntak av to pre-snitt ble gjort på samme nabosnitt for alle forsøkspersonene.

Tabell 9. Inklusjonskriterier for muskelcellekjerner.

Inklusjonskriterier for muskelcellekjerner
DAPI-merkingens geometriske midtpunkt er sentrert innenfor dystrofinmerkingen (subjektiv vurdering)
DAPI-merkingen må være klar





Figur 6. Bilde av merking mot cellekjerner, dystrofin og MHC II<sup>11</sup>. Cellekjerner vises med blå farge, dystrofin med rød. Grønn farge markerer merking mot MHC II, mens muskelfiber med svart farge viser fravær av merking mot MHC II og indikerer type I fiber.

### 3.8.4 Satellittceller – Kvantifisering og relatering til fibertype

I tellingen av satellittceller ble det først tatt et oversiktsbilde av lamininmerkingen. Hvis snittet var så stort at hele snittet ikke ble inkludert på et bilde ble en del av snittet med tydelige membraner, god NCAM-merking og praktisk fasong valgt ut. Bildet ble tatt i sort/hvit i Cell<sup>^</sup>F, hvor det også ble invertert. Videre ble det tatt fargebilder av laminin, NCAM og DAPI-merkingen med 20x objektiv. Fargebildene ble lastet opp i FIJI hvor kvantifiseringen forgikk. Kun merking som oppfylte kriteriene i tabell 10, ble registrert. Fordelen med denne metoden og programvaren er at man både kan forstørre og veksle mellom bildene. Det er også enkelt å kontrollere registrerte satellittceller i ettertid. Alle fibre som ble undersøkt for satellittceller ble markert med tusj på oversiktskartet, mens fibre som oppfylte eksklusjonskriterier (tabell 8) ble krysset ut. Satellittceller ble tydelig markert som en prikk. Antall fibre ble telt og markert manuelt i FIJI og ved hjelp av en telleapparat (Laboratory Counter). Denne telle- og markeringsmetoden bidro til å øke troverdigheten og nøyaktigheten i en krevende telleprosess.

<sup>11</sup> Myosinets tunge kjede i fibertype II

På bakgrunn av resultater fra Mackey et al. (2009) ble antall telte fibre satt til å være minst 50 type I, og 75 type II fiber. Et av snittene inneholdt områder med store partier støy (uspesifikke bindinger). Disse områdene ble fjernet fra analysene, noe som førte til at dette snittet kun inneholdt 52 type II fiber. I gjennomsnitt ble 147 type I og 218 type II fiber kvantifisert for SC. Antall telte fiber er derfor godt over standarden satt av Mackey et al. (2009), og burde indikere høy reliabilitet.

En konsulent med stor erfaring med kvantifisering av SC bidro til å telle SC på 8 forsøkspersoner, fire i hver gruppe. Merking, bildetaking, resterende SC-tellinger telling og utregning av totalt fiberantall ble foretatt av undertegnede på Norges idrettshøgskole.

Satellitceller presenteres videre som antall satellittceller dividert på antall telte fiber, per fibertype (SC/F). Alle analyser med unntak av to pre-snitt, ble gjort på samme nabosnitt for alle forsøkspersonene.

Tabell 10. Inklusjonskriterier for NCAM.

---

#### Inklusjonskriterier for NCAM

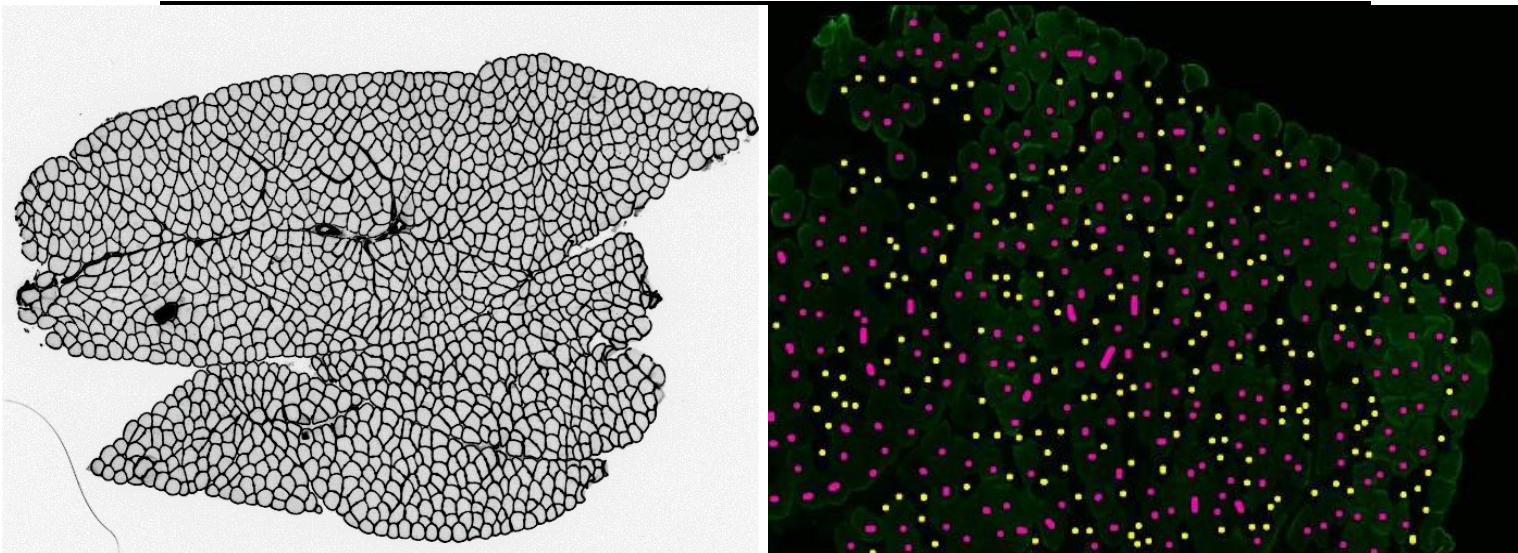
---

NCAM-merkingen merker minst 50 % av omkretsen til cellekjernen

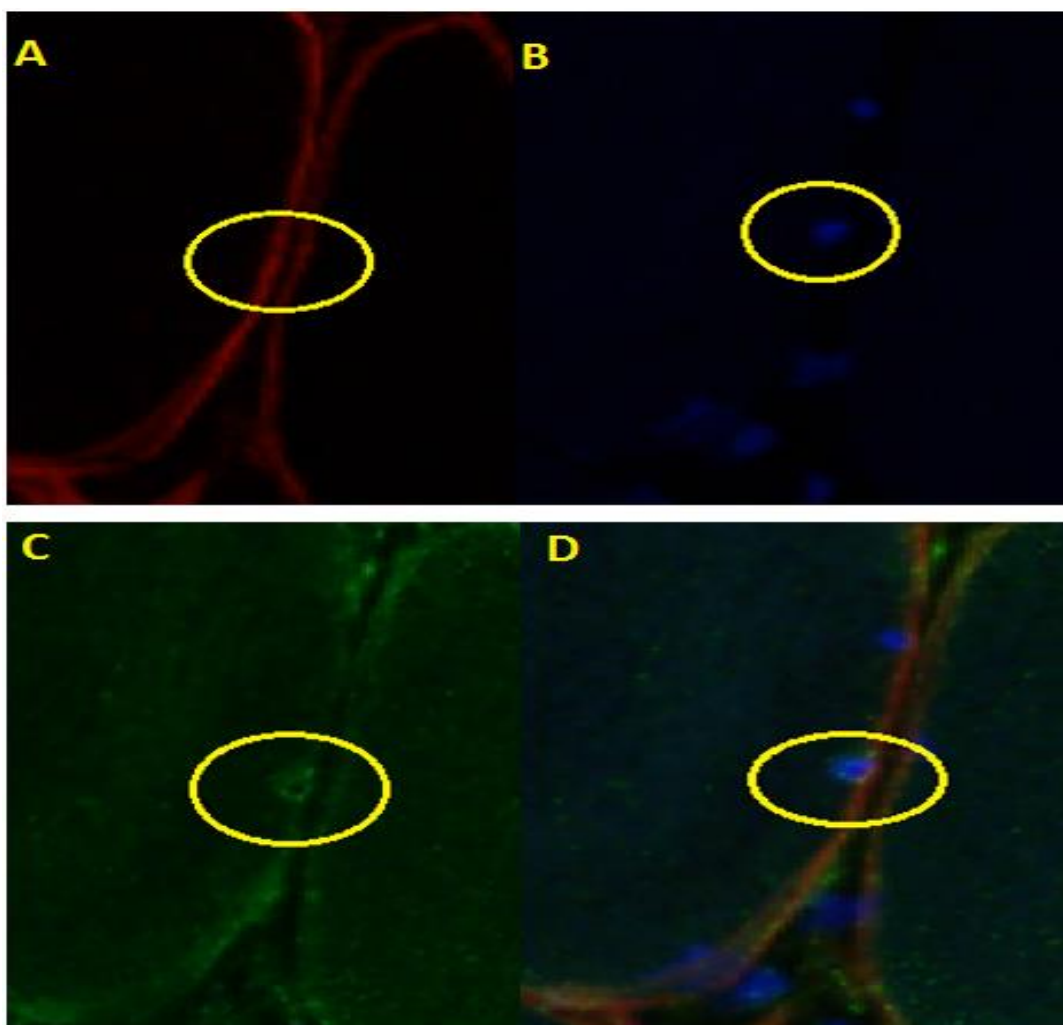
NCAM-merkingen er sentrert innenfor lamininmerket membran

DAPI-merkingen ligger rundt- og fyller NCAM-merkingen

---



Figur 7. Oversiktsbilde over snitt merket med laminin (Venstre) og del av et snitt merket mot MHC hvor totalt antall type I og type II fiber blir kvantifisert (Høyre). Lilla farge markerer type I fibre og gul farge indikerer type II fibre.



Figur 8. Lokalisering av satellittcelle. De fire bildene viser: (A) laminin (membran), (B) cellekjerne (DAPI), (C) satellittcelle (NCAM) og (D) et sammensatt bilde av de tre filtrene. Satellittcellen er akseptabelt markert med NCAM (C), inneholder cellekjerne (B) og er lokalisert på innsiden av membranen (A).

### 3.9 Statistikk

I studien ble det undersøkt pre til post endringer i to uavhengige grupper. Normalitet ble undersøkt med Shapiro-Wilks test. For å finne signifikante forskjeller innad i gruppene (pre til post) i normalfordelt data ble det benyttet parett t-test, mens det ble brukt uparett t-test for å finne signifikante forskjeller mellom gruppene. For å finne signifikante forskjeller innad i gruppene i data som ikke var normalfordelt, ble det brukt Wilcoxon og Wilcoxon-test, mens Mann-Whitney testen ble brukt for å finne signifikante forskjeller mellom gruppene. Beinpress, type II fiberareal og antall satellittceller i type II fibre, alle i PAS, var ikke normalfordelt. En effekt av intervensjonen har forekommet dersom det er forskjeller i endring fra pre til post (deltaverdi) mellom gruppene. Signifikante forskjeller defineres i oppgaven som  $p < 0,05$  og tendens som  $p < 0,1$ . Alle resultater presenteres som gjennomsnitt  $\pm$

Standardavvik (SD). Analyser er gjennomført i Microsoft Excel 2016 (Microsoft Excel [computer software], Remond, WA, USA) og Prism 6 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

## 4.0 Resultater

### 4.1 Baseline

Før treningsperioden var det ingen forskjeller mellom de to gruppene i styrke, muskelmasse (tabell 11) eller for immunhistokjemivariablene (tabell 12). Kun PAS økte sin kroppsvekt signifikant gjennom treningsperioden, men det var ingen forskjell mellom gruppene på endring i kroppsvekt (tabell 13).

Tabell 11. Oversikt over deltakernes baselineverdier og signifikansnivå i målinger av styrke og muskelmasse, før treningsperioden.

Baseline tabell	PAS	HWI	p-verdi
1 RM – KE (kg)	94 ± 29	107 ± 32	0,39
1 RM – Beinpress (kg)	236 ± 78	223 ± 79	0,74
LBM bein (kg)	21,655 ± 4,411	22,962 ± 3,708	0,54
MR (kg)	2,65 ± 0,59	2,81 ± 0,54	0,59

1 RM = 1 repetisjon maks, KE = Kne-ekstensjon, LBM = lean body mass, MR = Magnetresonanstomografi. PAS = passiv gruppe, HWI = Intervensjonsgruppe.

Tabell 12. Oversikt over deltakernes baselineverdier og signifikansnivå i intramuskulære målinger, før treningsperioden.

Baseline tabell	PAS	HWI	p-verdi
<b>Fiberareal (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>			
Type I	4584 ± 1059	5390 ± 1178	0,13
Type II	6366 ± 1883	5817 ± 939	0,67
<b>Cellekjerner per fiber (antall)</b>			
Type I	1,73 ± 0,41	1,80 ± 0,41	0,76
Type II	2,34 ± 0,49	2,03 ± 0,35	0,18
<b>Kjerneromene (<math>\mu\text{m}^2</math>/cellekjerner)</b>			
Type I	2744 ± 994	3068 ± 663	0,47
Type II	2748 ± 1018	2908 ± 461	0,71
<b>Fibertype (%)</b>			
Type I	39 ± 10	38 ± 12	0,81
Type II	61 ± 10	61 ± 11	0,81
<b>Satellitceller (antall/100 muskelfiber)</b>			
Type I	4,4 ± 2,8	4,8 ± 4,0	0,82
Type II	6,4 ± 4,9	7,3 ± 3,8	0,83

PAS = passiv gruppe, HWI = Intervensjonsgruppe.

Tabell 13. Kroppsvekten før og etter treningsperioden

	Pre (kg)	Post (kg)	Prosent (%) endring	p-verdi
PAS	83,4 ± 15,3	85,5 ± 14,6	2,5 ± 2,31	p<0,01*
HWI	83,6 ± 8,8	84,7 ± 10,0	1,3 ± 2,77	p=0,32

\*Signifikant forskjellig fra pre verdien (p<0,01)

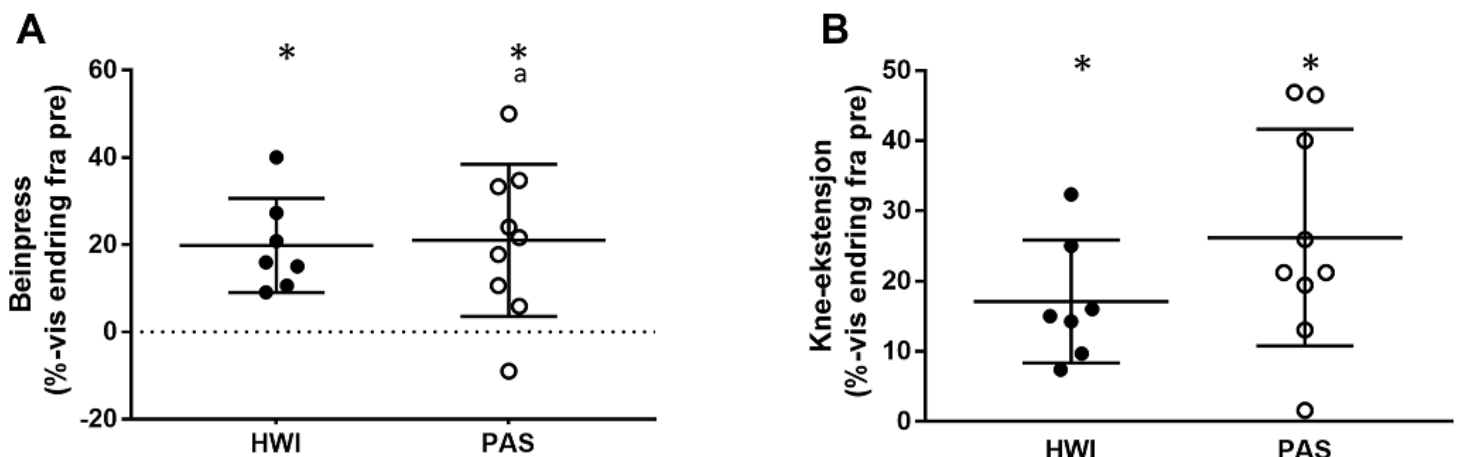
## 4.2 Endring i muskelstyrke gjennom treningsperioden

Både PAS- og HWI-gruppen hadde signifikant styrkefremgang i både benpress og kne-ekstensjon fra pre til post tester (tabell 14). HWI-gruppen økte sin styrke i beinpress og kne-ekstensjon med 39 ± 12 kg og 17 ± 9 kg, noe som tilsvarer en økning på henholdsvis 20 ± 11 % (p<0,01) og 17 ± 6 % (p<0,01) (figur 9). Kontrollgruppen oppnådde en økning på 21 ± 17 % (p=0,04) og 26 ± 15 % (p<0,01), etter 47 ± 56 kg og 22 ± 14 kg økning i beinpress og kne-ekstensjon. Det var ingen forskjell i endring mellom gruppene i styrkefremgang for hverken beinpress (p=0,7), eller KE (p=0,35).

Tabell 14. Absolutte verdier og signifikansnivå for muskelstyrke i beinpress og kne-ekstensjon.

Måling/Gruppe	Pre	Post	p-verdi <sup>1</sup>	p-verdi <sup>2</sup>
<b>1 RM –BP (kg)</b>				
PAS	236 ± 78	283 ± 107	<0,01 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>
HWI	223 ± 79	261 ± 82	<0,01	
<b>1 RM –KE (kg)</b>				
PAS	94 ± 29	116 ± 27	<0,01	0,35
HWI	107 ± 32	124 ± 31	<0,01	

<sup>1</sup> p-verdi for pre til post endring. <sup>2</sup> p-verdi for forskjell i endring mellom gruppene. BP = beinpress, KE = kne-ekstensjon, PAS = passiv gruppe, HWI = Intervensjonsgruppe.



Figur 9. Prosentvis endring i muskelstyrke i beinpress (A) og knee-ekstensjon (B). \*, signifikant forskjellig pre til post  $p < 0.05$ . a, statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test.

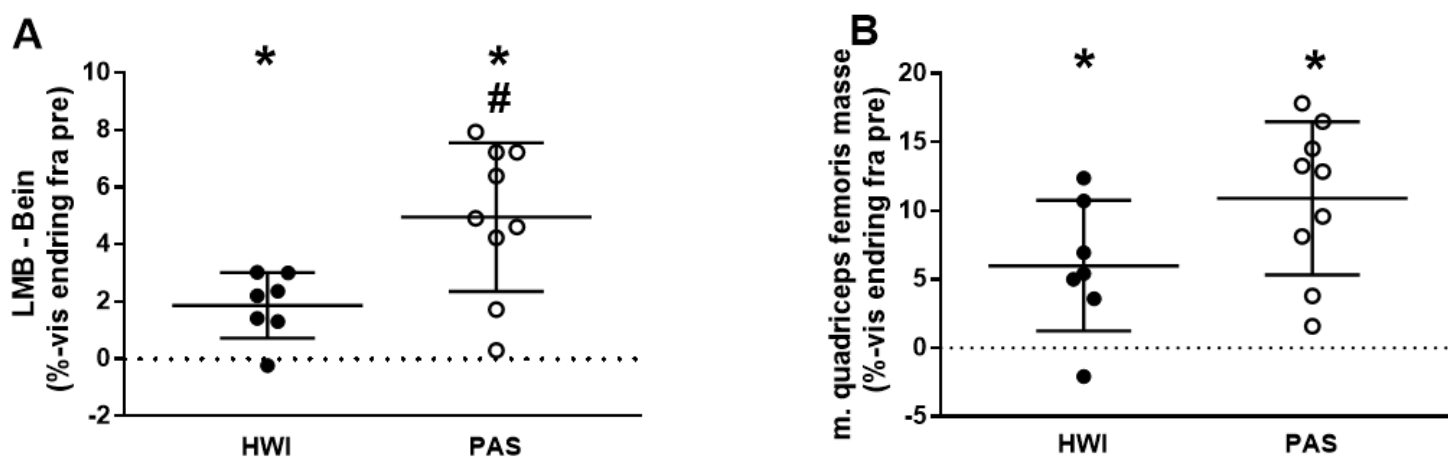
### 4.3 Endring i muskelmasse gjennom treningsperioden

Både HWI- og PAS-gruppen økte muskelmassen signifikant ved både DEXA- og MR-målinger, gjennom treningsperioden (tabell 15). Økningen av masse i HWI gruppen var  $2 \pm 1$  % ( $p = 0,003$ ) (DEXA) og  $6 \pm 5$  % ( $p = 0,01$ ) (MR) (figur 10). Den absolutte økningen var for DEXA  $410 \pm 221$  g og  $170 \pm 130$  g for MR-målingen. PAS opplevde en større absolutt økning i muskelmasse enn HWI, hvor DEXA økte med  $997 \pm 491$  g og MR med  $0,27 \pm 0,13$  kg muskelmasse, noe som resulterte i en økning på  $5 \pm 3$  % (DEXA) og  $11 \pm 6$  % (MR). På tross av at PAS signifikant hadde større absolutte (DEXA; 587 g, MR; 90 g) og relative økninger (DEXA; 3%, MR; 5%) i muskelmasse i beina målt med DEXA, var det ingen signifikante forskjeller i endringer mellom gruppene for MR-målingen ( $p = 0,18$ ), selv om tendensene i målingene var de samme.

Tabell 15. Absolutte verdier i de to gruppene for lean body mass bein (LBM bein) og estimert masse av m. quadriceps før (Pre) og etter (Post) treningsperioden.

Måling/Gruppe	Pre	Post	p-verdi <sup>1</sup>	p-verdi <sup>2</sup>
<b>LBM bein (kg)</b>				
PAS	21,655 ± 4,411	22,652 ± 4,173	<0,01	0,01*
HWI	22,962 ± 3,708	23,372 ± 3,658	<0,01	
<b>m. quadriceps masse (kg) (kg)</b>				
PAS	2,65 ± 0,59	2,91 ± 0,53	<0,01	0,18
HWI	2,81 ± 0,54	2,98 ± 0,61	0,01	

<sup>1</sup> p-verdi for pre til post endring. <sup>2</sup> p-verdi for forskjell i endring mellom gruppene. \* signifikant forskjell.



Figur 10. Prosentvise endringer i DEXA (A) og MR (B). \*, signifikant forskjellig pre til post  $p < 0.05$ . #, signifikant forskjell i endring mellom grupper  $p < 0.05$ .

## 4.4 Endring i immunhistokjemiske variabler gjennom treningsperioden

### Cellekjerner

Den absolutte endringen av antall cellekjerner per fiber gjennom treningsperioden utgjorde en tendens til signifikant økning i type II fibre i HWI-gruppen (0,65,  $p=0,06$ ), men ikke for type I HWI, type I PAS og type II PAS (0,29,  $p=0,16$ ; 0,03,  $p=0,73$ ; 0,13,  $p=0,47$ ) (tabell 16). Det var ingen forskjell mellom gruppene i endring i antall cellekjerner verken for type I- ( $p=0,76$ ) eller for type II fibre ( $p=0,18$ ) (figur 11).



### ***Fiberareal***

Det ble ikke registrert statistisk signifikante endringer i fiberareal for HWI-gruppen, til tross for en økning på 15 % ( $p=0,21$ ) i type I fibre og 20 % ( $p=0,14$ ) i type II fibre. Liknende resultater ble funnet hos PAS-gruppen i begge fibertyper (type I fibre; 10 %,  $p=0,39$ , Type II fibre; 12 %,  $p=0,29$ ). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for endring av fiberareal (tabell 16; figur 11).

### ***Kjernedomene***

Gjennomsnittlig størrelse på kjernedomener ble ikke endret gjennom treningsperioden, hverken for type I- og type II fiber, i HWI og PAS (tabell 16). Mellom HWI og PAS ble det heller ikke funnet forskjeller i endring, for hverken type I-, eller type II fiber ( $p=0,55$ ,  $p=0,47$ ).

### ***Satellittceller***

Det var ingen signifikante endringer i antall satellittceller gjennom treningsperioden for hverken HWI eller PAS, både i type I- og type II fiber. Det var stor individuell variasjon fra pre til post, spesielt i type I fibre i HWI gruppen, men dette medførte ikke forskjeller i endring mellom de to gruppene (tabell 17; figur 11). Hverken i type I- eller type II fiber ( $p=0,30$ ,  $p=0,37$ ).

### ***Fibertyper***

Fibertypefordelingen ble ikke endret gjennom treningsperioden for hverken type I eller type II fiber, både i HWI og PAS. Det var følgelig heller ingen forskjeller i endring mellom de to gruppene (tabell 18), hverken for type I- eller type II fiber ( $p=0,49$ ,  $p=0,40$ ).

Tabell 16 Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for antall cellekjerner per fiber, fiberareal og kjernedomene.

Måling/Gruppe	Pre	Post	p-verdi <sup>1</sup>	p-verdi <sup>2</sup>
<b>Cellekjerner per fiber – type-I (antall)</b>				
PAS	1,73 ± 0,41	1,70 ± 0,34	0,73	0,76
HWI	1,80 ± 0,41	2,09 ± 0,51	0,16	
<b>Cellekjerner per fiber– type-II (antall)</b>				
PAS	2,34 ± 0,49	2,47 ± 0,39	0,47	0,18
HWI	2,03 ± 0,35	2,67 ± 0,79	0,06	
<b>Fiberareal - type I (um<sup>2</sup>)</b>				
PAS	4584 ± 1059	4881 ± 948	0,39	0,49
HWI	5390 ± 1178	6153 ± 1881	0,21	
<b>Fiberareal - type-II (um<sup>2</sup>)</b>				
PAS	6366 ± 1883	6870 ± 1490	0,42	0,62
HWI	5817 ± 939	7010 ± 2272	0,14	
<b>Kjernedomene – type-I (cellekjerne/um<sup>2</sup>)</b>				
PAS	2744 ± 994	2945 ± 862	0,47 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>
HWI	3068 ± 663	3007 ± 836	0,87	
<b>Kjernedomene – type-II (cellekjerne/um<sup>2</sup>)</b>				
PAS	2748 ± 1018	2731 ± 559	0,95	0,47
HWI	2908 ± 461	2650 ± 525	0,24	

<sup>1</sup> p-verdi for pre til post endring. <sup>2</sup> p-verdi for forskjell i endring mellom gruppene. <sup>a</sup> Statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test.

Tabell 17. Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for satellittceller

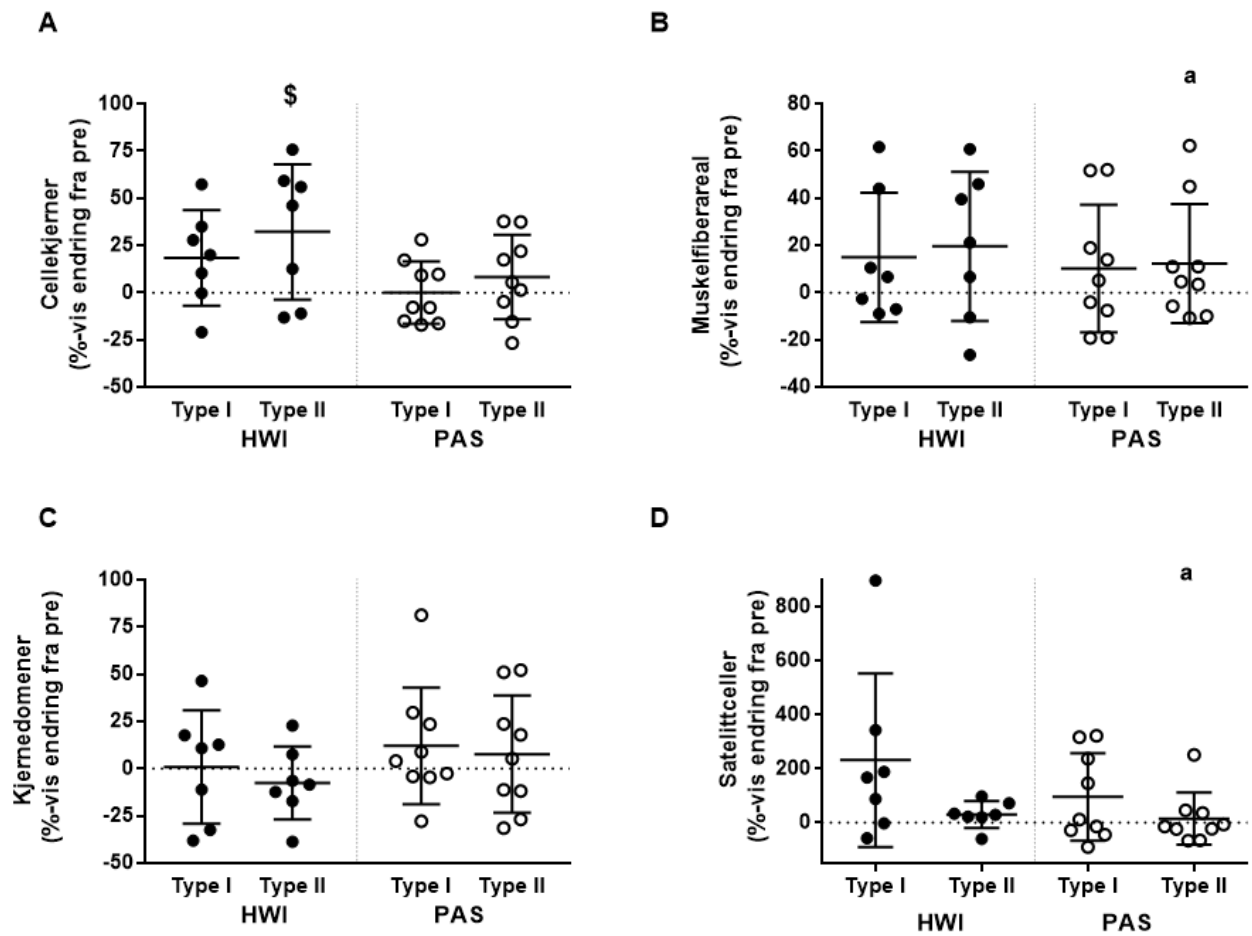
Måling/Gruppe	Pre	Post	p-verdi <sup>1</sup>	p-verdi <sup>2</sup>
<b>Satellittceller – type-I (antall/100 muskelfiber)</b>				
PAS	4,4 ± 2,8	5,0 ± 3,5	0,69	0,30
HWI	4,8 ± 4,0	8,2 ± 4,5	0,16	
<b>Satellittceller – type-II (antall/100 muskelfiber)</b>				
PAS	6,4 ± 4,9	5,4 ± 3,1	0,62 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>
HWI	7,3 ± 3,8	7,3 ± 3,8	0,25	

<sup>1</sup> p-verdi for pre til post endring. <sup>2</sup> p-verdi for forskjell i endring mellom gruppene. <sup>a</sup> Statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test.

Tabell 18. Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for fibertyper.

Måling/Gruppe	Pre	Post	p-verdi <sup>1</sup>	p-verdi <sup>2</sup>
<b>Fibertype I (%-vis antall)</b>				
PAS	38 ± 12	38 ± 16	0,63	0,49
HWI	39 ± 10	46 ± 16	0,21	
<b>Fibertype II (%-vis antall)</b>				
PAS	62 ± 11	62 ± 15	0,63	0,40
HWI	61 ± 19	54 ± 16	0,21	

<sup>1</sup> p-verdi for pre til post endring. <sup>2</sup> p-verdi for forskjell i endring mellom gruppene.



Figur 11. Prosentvise endringer i antall cellekjerner per fiber (A), muskelfiberareal (B), kjernedomene (C) og NCAM positive satellittceller (D). \$, tendens til forskjell fra pre til post p=0.05-0.1. a, statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test.



## 5.0 Diskusjon

Målet med denne studien var å undersøke om varme bad (HWI) tatt umiddelbart etter hver treningsøkt påvirket økningen av muskelstyrke, muskelmasse, fiberareal, satellittcelle- og cellekjerneantall hos styrketrente unge mosjonister, sammenliknet med en kontrollgruppe som ikke fikk varmebehandling (PAS), gjennom 10 uker med tung styrketrening. Hovedfunnet fra denne studien er at HWI hemmet tilveksten av muskelmasse i beina sammenliknet med PAS, målt med DEXA. I tillegg tenderte økningen av antall cellekjerne i type II-fiber mot signifikant økning kun for HWI. Intervensjonen hadde ingen effekt for noen av de andre målingene.

### 5.1 Muskelmasse og muskelstyrke

#### *Oppsummering mot tidligere studier*

Sammenliknet med den eneste menneskestudien som har sammenliknet kombinert varmestimulus og styrketrening (Goto et al., 2007) (tabell 1) viser vår studie motsatt effekt av varmebehandlingen. I studien til Goto et al. (2007) økte tverrsnittsarealet i *m. biceps brachii* signifikant kun for armen som kombinerte trening med varme, og ikke for armen som kun trente styrke. I vår studie fant vi at varmestimulus hemmet tilvekst av muskelmasse i beina målt ved DEXA, mens utvikling av muskelvolumet til *m. quadriceps femoris*, målt ved MR ikke viste en signifikant forskjell mellom gruppene. Studien av Goto et al. (2011) indikerer at varme alene kan ha en muskelbyggende effekt. I studien ble det til sammen utført 40 oppvarminger ved bruk av varme- og dampgenererende matter, noe som førte til en signifikant økning i tverrsnittsarealet på 6,1 % i *m. rectus femoris*, 2,7 % i *m. vastus lateralis* og 1,5 % i *m. quadriceps femoris*. Studien sammenliknet ikke intervensjonsgruppen og kontrollgruppen, men visuell observasjon av figurene i studien Goto et al. (2011) viser at også kontrollgruppen øker noe i muskelmasse. Trolig er det ikke en forskjell mellom intervensjon- og kontrollgruppen i Goto et al. (2011) sin studie, da det ikke er omtalt i deres forskningsartikkel.

Det er svært interessant at Goto et al. (2007) fant positive muskulære effekter av muskeloppvarming når våre resultater, om noe, peker i motsatt retning. En mulighet kan være at varme har fasilerende effekt på muskulatur, men at når et varmestimulus blir kombinert

med et svært stort treningsstimulus, blir det totale stimuliet (varme + trening) for høyt for deltakerne i vår studie, men ikke i Goto et al. (2007) sin studie, da deres treningsprotokoll bestod av submaksimale kontraksjoner med lett motstand (30 repetisjoner). Med tanke på at det benyttede treningsprogrammet var svært belastende med totalt 18 sett på beinmuskulaturen, er det ikke utenkelig at flere av deltakerne enten var nære eller over sin mest hensiktsmessige treningsbelastning med tanke på å oppnå størst mulig muskelvekst. En ekstra belastning; i dette tilfellet varme, kan således tenkes å redusere muligheten for maksimal muskelvekst.

Våre funn skiller seg også fra flere dyrestudier som har kombinert varme og trening. Studier av Naito et al. (2000), Selsby & Dodd (2005), Touchberry et al. (2012) og Takeuchi et al. (2014) fant i motsetning til oss at varmestimulus økte tilveksten av muskelmasse, mens Frier & Locke (2007), Goto et al. (2004), Kojima et al. (2007) og Oishi et al. (2009) hovedsakelig fant at varme ikke har noen effekt på utvikling av muskelmasse. Blant dyrestudier som har undersøkt effekten av varmestimulus alene, samsvarer våre resultater fra MR-målingen med studiene til Naito et al. (2000), Goto et al. (2004), Uehara et al. (2004), Kobayashi et al. (2005), Frier and Locke (2007), Kojima et al. (2007) og Oishi et al. (2009), som alle hovedsakelig viser at varmestimulus ikke påvirker tilvekst av muskelmasse. Studien av Halevy et al. (2001) fant muskelvekst 42 dager etter varmestimulus og peker derfor i motsatt retning av våre muskelmassemålinger. Forfatterne hevder i denne sammenheng at IGF-I kan spille en viktig rolle for SC proliferasjon, og at dette senere kan gi utslag i økt hypertrofi. Det faktum at vi fant en tendens til økning av antall cellekjerner i type II fibre i HWI, kan til en viss grad styrke tanker om at IGF-1 kan påvirkes av varme, da en økt forekomst av muskulær IGF-1 er satt i sammenheng med å regulere mekanismer for muskelvekst (Halevy et al., 2001). Men siden vi ikke har funnet forskjell i endring mellom gruppene i favør HWI for styrke, muskelmasse, fiberareal eller aktiverte satellittceller, blir slike antakelser svært tynne.

Denne studien fant ingen ekstern effekt av muskeloppvarming på utviklingen av muskelstyrke, da det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller mellom de to gruppene for hverken beinpress eller kne-ekstensjon. Dette er i samsvar med tidligere studier som har kombinert varme med ulike treningsprotokoller (Goto et al., 2007; Kuligowski et al., 1998; Nosaka et al., 2004; Saga et al., 2008; Viitasalo et al., 1995), men motstridende med funn gjort av Nosaka et al. (2007), Vaile et al. (2008) og (Skurvydas et al., 2008), som alle fant at oppvarming økte muskelstyrken. De tre sistnevnte studiene er dog ikke direkte

sammenliknbare med vår studie, da de alle har funnet at fasilerende effekt av varme for måling av muskelstyrke, kort tid etter harde treningsøkter.

Det skal nevnes at brorparten av studiene i tabell 1-3 er studier med kort varighet. Trolig vil det være vanskeligere å måle endringer i muskelstyrke og muskelmasse i slike studier, enn i treningstudier med lengere varighet, slik som i vår studie.

Oppsummert viser kun 1 av 4 målinger av styrke og muskelmasse i vår studie signifikant negativ effekt av varme. Likevel viser visuel observasjon av to av figurene (figur 9B og figur 10B) at varme virker å kunne ha en negativ effekt, selv om forskjellen mellom gruppene ikke er statistisk signifikant. Samlet sett virker det derfor rimelig å anslå at de varme badene utført rette etter trening i vår studie, kan ha en mulig negativ effekt på de muskulære tilpasningene til styrketrening.

### ***Forskjell mellom DEXA- og MR-måling***

Da det ikke var noen forskjeller mellom gruppene ved hverken DEXA ( $p=0,54$ ) eller MR ( $p=0,59$ ) ved baseline, er det overaskende at varme kun hemmer utvikling av muskelmasse når muskelmasse er målt ved DEXA. Dette fordi MR er regnet som gullstandarden for måling av regional kroppskomposisjon (Andreoli et al., 2009), mens DEXA er vist å ha svært høy reliabilitet (Hind et al., 2011). Både i DEXA- og MR-målingen hadde PAS en større prosentvis vekst enn HWI (figur 10). Dette kan indikere en tilstedeværelse av type II feil i MR målingen. At studien kun inkluderer 16 forsøkspersoner øker sannsynligheten for dette. Også den prosentvise variasjonen er større i MR- enn DEXA-målingen, også dette kan trolig bidra til forekomst at type II feil. På den andre siden vil en større gjennomsnittlig vekst også bidra til større variasjon i MR- enn i DEXA-målingen. Det lave signifikansnivået ( $p=0,18$ ) for forskjell i endring mellom gruppene, i MR-målingen, kan antyde at vi kunne funnet en signifikant forskjell, dersom studien inkluderte flere forsøkspersoner. Selv om den prosentvise veksten i MR-målingen var 9 % lavere for HWI enn PAS, ga ikke dette signifikante utslag. Likevel kan denne forskjellen muligens også styrke sansynligheten for en type II feil i MR-målingen. Dette fordi kne-ekstensjon er svært representativt for styrken i *m. rectus femoris*, MR måler samme muskels volum, og fordi kraft er proporsjonal med tverrsnittsareal (Egner et al., 2016).

Fem av seks treningsøvelser belastet *m. quadriceps femoris*, mens legg- og dorsal lårmuskulatur (hamstrings) fikk mindre treningsstimuli gjennom treningsperioden. Dette kan

muligens også forklare hvorfor den prosentvise veksten samlet sett er større i MR- enn i DEXA-målingen. Dette fordi DEXA kartlegger all muskelmasse i beina og noe setemuskulatur, mens MR som nevnt over kun måler massen av *m. quadriceps femoris*.

I HWI-gruppen opplevde en deltaker negativ utvikling i MR-målingen, mens en deltaker fikk redusert muskelmasse målt ved DEXA. Dersom vi fjerner disse deltakerne fra målingene, endres signifikansnivået for effekten varme har på utvikling av muskelmasse i DEXA- ( $p=0,05$ ), men ikke MR-målingen ( $p=0,39$ ).

### ***Hvorfor har disse to deltakerne redusert muskelmassen gjennom treningsperioden?***

Den ene deltakeren som opplevde 3,6 % nedgang i MR var blant de siste som ble inkludert til studien og var noe mindre kjent med styrketrening enn flere av de andre deltakerne. Gjennom treningsprogrammet fikk deltakeren en belastningsskade i kneet. Treningsmotstanden ble ikke redusert, men motstanden ble de siste fem ukene økt mindre enn planlagt. Skaden kan tenkes å ha ført til at deltakeren endret teknikken eller reduserte muskelaktivering på fremsiden av låret, slik at andre muskler overtok en del av arbeidet som vanligvis utføres av *m. quadriceps femoris*. *m. quadriceps femoris* kan derfor tenkes å ha fått redusert belastning og påfølgende nedgang av muskelmasse. En annen mulighet er at treningsprogrammet var for hardt til at deltakeren klarte å restituere muskulaturen i *m. quadriceps femoris*, men mer optimal for resterende beinmuskulatur. Den andre deltakeren gikk ned 52 g i DEXA, og har i etterkant av studiet fortalt at han trente svært tung styrketrening på bein opp mot 3 ganger per uke i månedene før studien. Det virker derfor sannsynlig at denne deltakeren allerede hadde hentet ut en stor del av sitt muskelvekstpotensiale, og at treningsdosen i studiet var mindre enn deltakeren tidligere hadde utført. En lavere treningsmengde i forsøksperioden, enn i perioden før studiet har derfor trolig ført til muskelsvinn.

### ***Signalering***

Selv om det er interessant å undersøke muskulære endringer i tidsrommet kort tid etter treningsstimuli, er det ofte mer interessant å undersøke studier med lengere varighet, da disse gir et bedre innblikk over langtidsadaptasjonene en er interessert i ved langvarig styrketrening. I denne sammenheng har Roberts et al. (2015) gjennomførte en 12 ukers studie med nær identisk treningsprotokoll som vår studie, men med postimmersjon i kaldt vann.



Roberts et al. (2015) fant en sammenheng mellom 1) akutt redusert aktivering av proteiner i mTOR-signalveien og, 2) hemmet muskelvekst og styrkeøkning målt etter 12 uker.

Når kulde virker å hemme muskelvekst, styrke og signalering over 12 uker, er en logisk tanke at varme kunne hatt motsatt effekt, noe bl.a. studiene til Goto et al. (2007) og Goto et al. (2011) støtter. Våre funn støtter imidlertid ikke denne ideen. Basert på tidligere studier (Roberts et al., 2015; Touchberry et al., 2012) som viser sammenheng mellom muskelvekst og endret fosforylering av signalprotein er det på bakgrunn av mine funn grunn til å tro at varme enten ikke endrer signaleringen av viktige signalprotein i Akt/mTOR signalveien, eller at fosforyleringen eller hastigheten på fosforyleringen kan ha blitt redusert. Det er også mulig at det totale stresset har vært for stort, slik at nedbrytningshastigheten økte mer enn syntesehastigheten. Dessverre har vi (ennå) ikke har målt signalering i vår studie, noe som gjør det vanskelig å diskutere videre hvordan ulike signalprotein påvirkes av varmestimulus etter styrketrening.

### ***Oppsummering***

Oppsummert støtter ikke våre funn tidligere studier som viser at varmestimulus kan føre til muskelvekst og økt muskelstyrke. Denne studien styrker heller ikke teorier om at varme fører til økt transport av IGF-1 til muskelvev (Halevy et al., 2001), redusert oksidativt stress (Selsby & Dodd, 2005; Selsby et al., 2007), økt ekspresjon av CaN (Kobayashi et al., 2005) og endret fosforylering av Akt (Bijur & Jope, 2000; Kakigi et al., 2011; Oehler-Janne et al., 2008; Wei & Vander Heide, 2008; Yoshihara et al., 2013) og dens nedstrøms proteiner p70S6K (Uehara et al., 2004; Yoshihara et al., 2013), mTOR (Kakigi et al., 2011) og ERK 1/2 (Bijur & Jope, 2000), som alle er satt i sammenheng med fasilitering av muskelvekst. Fordi vi ikke har målt hverken IGF-1, oksidativt stress, CaN eller fosforylering av signaleringsproteiner, kan vi ikke utelukke at enkelte av disse systemene kan bli påvirket på en muskelmassefasiliterende måte. Den totale effekten disse systemene har på både syntese og nedbrytning, i sammenheng med varmestimulus, har trolig vært negativ.



## 5.2 Satellittceller, Cellekjerner og Fiberareal

Våre funn viser at antall SC per fiber forble uforandret gjennom treningsperioden. Dette støttes av Oishi et al. (2009), og delvis av Kojima et al. (2007), Halevy et al. (2001), Takeuchi et al. (2014) og Uehara et al. (2004), som alle fant økning av SC ved enkelte tidspunkt, mens det ved de fleste måletidspunkt ikke ble funnet noen forskjell. Tabell 17 indikerer 1) at antall SC ikke er økt fra starten til slutten av treningsperioden og 2) at varme ikke påvirket aktiveringen av SC. Studiene til Halevy et al. (2001), Uehara et al. (2004) og Kojima et al. (2007) indikerer at varmeindusert SC-aktivering når et toppunkt etter 1-3, jf.dager. Det kan derfor nevnes som en mulighet at en forhøyning av SC-aktivering har forekommet underveis i treningsperioden, men at forhøyningen ikke har blitt registrert, da vi kun har målt SC før og etter treningsperioden. Trolig ville en forhøyet aktivering av SC også ført til en økning i antall cellekjerner. Dette fordi aktiverte SC kan tre inn i cellyklus hvor de prolifererer og deretter kan tilføre fiberen flere cellekjerner (Dumont et al., 2015; Schmalbruch, 1976; Snijders et al., 2015). Dersom varme hadde hatt en forhøyende effekt på aktivering av SC underveis i treningsperioden, burde dette også gitt utslag på antall cellekjerner.

På bakgrunn av mine funn virker ikke varme å påvirke aktivering av SC, proliferasjon, differensiering eller sammensmelting av SC. Ei heller styrkes teorier om at MEF-2, Myogenin og muskulær IGF-1 (Halevy et al., 2001; Uehara et al., 2004) og aktivering av SC-regulatoren pax7 (Kojima et al., 2007; Takeuchi et al., 2014), kan fasilitere noen av disse prosessene etter varmestimulus.

### *Antall cellekjerner i type II-fiber*

Hvorfor var det kun antall cellekjerner i type II-fiber i HWI som tenderte mot signifikant økning gjennom treningsperioden? Av de tidligere studiene (tabell 1-3) er det kun Oishi et al. (2009) som har målt effekten varme har på tilførsel av cellekjerner. Dette gir oss et lite sammenligningsgrunnlag. Når utviklingen av muskelmasse ble negativt påvirket av varme, er det overaskende at antall cellekjerner i type II fibre øker av samme stimuli. Dette er heller ikke i samsvar med Oishi et al. (2009) som fant at varme (i kombinasjon med muskeldegenererende gift) førte til mindre reduksjon av kjerneantallet. Heller ikke mine funn om at muskelfiberareal og antall SC i type II-fibre forblir uendret gjennom treningsperioden, i HWI-gruppen, kan forklare resultatet, da aktiverte SC som nevnt kan

inkorporeres som cellekjerner, og det er sammenheng mellom fiberstørrelse og tilvekst av cellekjerner (Blaauw & Reggiani, 2014; Petrella et al., 2008). Muligens kan tendensen forklares av biopsitakningen, da det kun ble tatt en biopsi og det ifølge Lexell, Taylor & Sjoström (1985) og Lexell & Taylor (1989) er knyttet usikkerhet til hvor representativ denne biopsien er for hele muskelen. På den andre siden er biopsiene i de fleste liknende studier også tatt med den godt innarbeidede Bergström-metoden.

### ***Forskjeller i måling av muskelmasse og immunhistokjemiske målinger***

Hvorfor det forekom en økning av muskelmasse og muskelstyrke i både HWI- og PAS-gruppen, for begge fibertyper gjennom treningsperioden, uten at dette kan forklares med økning av hverken SC, cellekjerner eller fiberareal, bør diskuteres nærmere. Tidligere studier (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006) har hevdet at en økning i antall cellekjerner først forekommer ved en vekst i fiberstørrelsen på over 25 %. Mens vekst i fiberstørrelse uten samtidig inkorporering av cellekjerner trolig kun er mulig i fiber med myonukleært domene på under 2,000 - 2,250  $\mu\text{m}^2$  (Petrella et al., 2006; Petrella et al., 2008). Våre deltakere hadde ved studiets start et myonukleært domene på mellom 2744  $\mu\text{m}^2$  og 3068  $\mu\text{m}^2$  (tabell 12). Veksten i muskelmasse (og styrke) som forekom gjennom vår studie, burde på dette grunnlag ha forekommet med en samtidig økt aktivering av SC og påfølgende inkorporering av cellekjerner, noe mine målinger ikke støtter at har skjedd. Da antall cellekjerner virker å dikterer den største størrelsen en muskelfiber noen gang har hatt (Egner, Bruusgaard, Eftestøl, & Gundersen, 2013) lanseres muligheten for at deltakerne tidligere har hatt større muskelmasse, og at dette er grunnen til at vi ikke fant en økning av aktiverte SC eller inkorporering av cellekjerner gjennom treningsperioden. Denne muligheten virker dog svært lite sannsynlig da ingen av deltakerne hadde tidligere gjennomført et så omfattende styrketreningsprogram. Ei heller det ble funnet en signifikant økning av fiberarealet for noen av gruppene eller fibertyper.

I kvantifisering av det myonukleære domene, er snittets tykkelse trolig av vesentlig betydning. Grunnet cellekjernens tredimensjonale plassering i muskelceller, vil et tykkere snitt fange opp flere cellekjerner, enn et tynnere snitt. Dette er trolig grunnen til at Hanssen et al. (2013) som brukte 5  $\mu\text{m}$  tykke snitt fant et høyere kjernedomene (3281  $\mu\text{m}^2$ ) enn Petrella et al. (2006) og Petrella et al. (2008) fant i deres studier, hvor de benyttet 6  $\mu\text{m}$  tykke snitt. Vi benyttet snitt på åtte  $\mu\text{m}$ , og hadde bedre styrketrente deltakerne i vår studie, enn deltakerne i studiene til Petrella et al. (2006), Petrella et al. (2008) og Hanssen et al. (2013). Fordi det også

virker å være en sammenheng mellom muskelmasse og antall cellekjerner, virker det om noe, som at det myonukleære domene vi har funnet, er noe lavt.

Heller ikke deltakernes fiberstørrelse ble endret gjennom treningsperioden, hverken for fibertype- I eller II, i både PAS- og HWI-gruppen. Også i denne målingen virker det rimelig å peke mot at en type II feil, kan være årsaken til fravær av signifikant økning, da den prosentvise veksten fra pre til post varierte fra 10 – 20 % i de ulike gruppene. Som tidligere nevnt kan det være grunn til å tro at dersom studiet hadde bestått av flere deltakere, kunne dette medført signifikante forskjeller i hvert fall for type II-fibrene i HWI-gruppen, som hadde prosentvis størst økning. Dersom det ikke er forekommet en type II feil, kan fravær av signifikant vekst muligens relateres til deltakernes relativt store erfaring med styrketrening, og store fiberareal ved studiets start. Dersom den uendrede responsen i aktivering av SC og antall cellekjerner hadde blitt “etterfulgt“ av en økning i fiberareal, kunne dette tydet på at Petrella et al. (2006, 2008) sin “grense“ på 2000 – 2250  $\mu\text{m}^2$  kan være for lav. Siden vår undersøkelse ikke har funnet vekst for hverken SC, cellekjerner eller fiberareal, kan dette indikere at 1) muskelveksten har skjedd gjennom andre mekanismer, eller 2) de brukte metoder, målinger eller analyser har vært mangelfulle. Dersom muskelveksten har skjedd gjennom andre mekanismer enn økt aktivering av SC, inkorporering av cellekjerner eller økt fiberareal, kan muskelvekst gjennom økning av fiberantall (hyperplasi), være en mulighet. Faktisk er det i in vitro studier på myostatin-manglende mus vist at hyperplasi kan forekomme uten inkorporering av SC (Amthor et al., 2009; Sartori et al., 2009). På den andre siden viste en studie (McCarthy et al., 2011) av synergist ablaterte transgene mus med 90 % ablasjon av SC og påfølgende overbelastning, at hyperplasien som vanligvis forekommer etter ablasjon i en påfølgende “reloadperiode“, ble sterkt redusert. Dette indikerer at SC trengs for å danne nye muskelfibere. Muligens kan det i denne sammenheng tenkes at andre stamceller enn SC, kan ha bidratt til hypertrofien vi fant i vår studie. I studiet til McCarthy et al. (2011) viste 6 % av de hypertrofierte fibrene BrdU-positive cellekjerner. Dette målet for proliferasjon kan trolig ikke forklares med inkorporering av SC til cellekjerner, da nesten alle SC ble ablatert. Det er i denne sammenheng ifølge Losick, Morris, Fox & Spradling (2011) ikke utenkelig at bidrag fra andre stamceller enn SC, kan ha bidratt til muskelhypertrofien i vår studie. For å begrense oppgaven vil det ikke diskuteres hvilke stamceller dette kan være.

### 5.3 Tidspunkt for varme bad; før eller etter styrketrening?

Hvorvidt en oppvarming blir utført før eller etter en styrketreningsøkt, kan tenkes å aktivere fysiologiske mekanismer for hypertrofi og restitusjon under og etter styrketreningsøkter, i ulik grad.

Selsby et al. (2007) har i denne sammenheng hevdet at en økning av HSP før trening kan ha en positiv innflytelse på muskeladaptasjoner. Bl.a. er HSP 72 foreslått å ha en beskyttende rolle mot cellulært stress, samt kunne motvirke degradering av protein, noe vi bl.a. kan se etter svært harde treningsprotokoller (Kobayashi et al., 2005). Videre hevder Koren et al. (2010) at HSP 72 kan regulere den treningsinduserte signalresponsen av Akt etter trening. Studien av Kojima et al. (2007) undersøkte både pre og post oppvarming før injisering av den muskeldegenererende slangegiften cardiotoxin. Forskergruppen fant i denne sammenheng ingen forskjell i utvikling av muskelmasse, men dag 3 var det kun gruppen som mottok varmestimulus etter injiseringen som hadde signifikant større aktivering av SC enn kontrollgruppen. Denne studien kan til en viss grad peke mot at varmestimulus bør mottas etter et treningstimulus, men studien må likevel ses på med forsiktighet, da det ikke er gitt at samme mekanismer virker ved injisering av gift som ved trening. Fra tabell 2 og 3 kan vi lese at totalt 11 studier, 6 på dyr og 5 på mennesker, har utført et varmestress før et treningsstimuli. Totalt 7 studier undersøkte effekten av HWI-postimmersion etter et treningsstimuli. Tre av studiene ble utført på mennesker og de resterende på dyr. Samlet sett for alle studiene er det ingen tydelig forskjell for hverken addering av muskelmasse, endringer i muskelstyrke eller aktivering av SC. Dette forekommer til tross for at varme før et treningsstimuli er vist å nedjustere fosforylering av ERK 1/2, 2 timer etter trening av rotter (Touchberry et al., 2012), og at varme etter treningsstimulus fører til økt fosforylering av Akt mTOR, og ribosomalt protein S6 (Kakigi et al., 2011), hos unge menn, etter styrketrening. Jeg mener at det utfra foreliggende studier kan tolkes dit hen at varme kan ha en effekt på signalering, ekspresjon av HSP og muligens også andre muskelregulerende mekanismer, men at: 1) disse mekanismene ikke er entydig bevist å påvirke muskel(masse)endringer, og 2) at en eventuell effekt over tid trolig vil stimulere muskelregulerende mekanismer i samme grad, enten man utfører varmebehandling før eller etter trening. Likevel hadde det vært et interessant tilskudd til dette interessefeltet om fremtidige studier undersøker både pre- og post-oppvarming i samme studie. Selv om ekspresjonen av enkelte HSP trolig har økt på grunn av varmestimulus i vår studie, kan vi ikke på bakgrunn av våre funn relatere en slik økning til at HSP har en

beskyttende rolle ved styrketrening, endrer signalresponsen etter trening, eller har positiv innflytelse på utvikling av muskelmasse.

## 5.4 Metodekritikk

### *Styrketester*

Selv om det ble gjennomført en tilvenningsøkt, var det for enkelte deltakere 30 kilo forskjell i 1 RM i beinpress mellom tilvenningsøkten og selve styrketesten. Dette resulterte i at enkelte deltakere utførte to løft, mens andre utførte >10 løft, før vi fant deres 1 RM på pre-testen. Denne ulikheten vil trolig føre til muskulær trøtthet, og kan derfor tenkes å ha påvirket resultatet i beinpress eller påfølgende målinger av 1RM i kne-ekstensjon og kne-fleksjon. En testprotokoll med flere tilvenningsøkter før 1RM-testing kan derfor vurderes som et alternativ i fremtidige studier. I beinpress var også bevegeligheten et problem for flere deltakere. Nye studier bør derfor benytte kriterier som setter mindre krav til bevegelighet i underekstremiteten. Dette kan enkelt gjøres ved å minske løftedybden. Siden vi opplevde vanskeligheter med å rekruttere nok forsøkspersoner ble det etterhvert inkludert deltakere som ikke hadde langvarig erfaring med styrketrening, samt fire kvinner. Det kan derfor tenkes at enkelte deltakere allerede hadde "tatt ut" mer av sitt genetiske potensial for muskelvekst enn andre deltakere, og at like sterke deltakere derfor hadde ulikt potensial for hypertrofi ved studiets start. Selv om det var to kvinner i hver gruppe var den totale prosentandelen ulik mellom de to gruppene. Det er kjent at svingninger i kjønnshormoner kan endre fysiologisk respons til trening (Nicklas, Hackney, & Sharp, 1989). Hvorvidt disse svingningene har påvirket resultatene av intervensjonen i den ene eller andre retningen er vanskelig å være bastant om, men det kan ha ført til større tilfeldig variasjon i datamaterialet, og redusert muligheten til å påvise små endringer.

### *Immunhistokjemi*

De immunhistokjemiske analysene ble i utgangspunktet gjennomført uten blinding. Undertegnede kan derfor ubevist ha blitt påvirket i analysearbeidet, da enkelte av analysene bestod av til dels skjønsmessige vurderinger. Selv om undertegnede var klar over forsøkspersonnummer og tidspunkt snittet ble tatt på, var jeg ikke klar over hvilken gruppe de ulike forsøkspersonene var i da analysene ble gjennomført, med unntak av de to forsøkspersonene som måtte kuttes på nytt. Fordi kun 2 av 16 forsøkspersoner var kjent, har

trolig en eventuell påvirkning vært relativt lik i begge grupper, og vil således trolig ikke ha påvirket analysene i særlig grad. Siden det kun ble tatt én biopsi ved hvert tidspunkt av hver FP, kan det som tidligere nevnt knyttes usikkerhet til hvor representativ biopsien er for hele muskelen (Lexell et al., 1985; Lexell & Taylor, 1989). Inkludering av flere biopsier ved hvert tidspunkt kunne derfor ha økt målesikkerheten i de immunhistokjemiske analysene. På den andre siden er det i denne oppgaven gjennomført svært mye og tidkrevende analyser, og inkludering av flere snitt hadde blitt for tidkrevende. Også kvaliteten på selve merkingen, antall totalt inkluderte fiber og selve kvaliteten på snittet har kunne påvirke analysene. Dette er tydeligere forklart nedenfor.

I utregning av fiberareal var det noen praktiske utfordringer. Snittene bestod av svært ulikt antall fiber, og i tillegg ble flere områder på enkelte snitt "brettet", "trykket" eller "dratt" da de ble kuttet eller lagt på glass. Disse områdene måtte derfor ekskluderes på noen snitt, mens andre snitt omtrent ikke hadde områder som måtte ekskluderes. Jeg mener ekskluderingen av enkelte fiberområder samlet sett styrker målesikkerheten fordi sjanse for å inkludere fiber med uriktig størrelse i analysene, er redusert. Samtidig er det på det laveste telt 148 fiber i et snitt, noe som i utgangspunktet burde være nok til å oppnå høy målesikkerhet. Ved snitting av biopsiene er det avgjørende at snittet blir tatt vinkelrett på muskelfibrene. Dersom snittet er skjevt vil fiberarealet bli målt som større enn det faktisk er. Det kan ikke utelukkes at enkelte av snittene kan ha blitt kuttet noe skjevt, uten at dette har blitt fanget opp. For å øke reliabiliteten ble to pre-snitt i PAS-gruppen kuttet på nytt, etter det jeg antok var skjev snitting.

I kvantifiseringen av antall cellekjerner var det i enkelte snitt noen få mindre områder med "sprengte" kjerner. Kjerner i disse områdene fremstod større enn kjerner som ikke var "sprengt". Dette kompliserte bestemmelse om hvorvidt enkelte kjernen oppfylte inklusjonskriteriene i tabell 9. Muligens kan "sprengte" kjerner i snittene i noe mindre grad blitt inkludert, og selv om det totale antallet inkluderte cellekjerner var høyt, kan det ikke utelukkes at dette kan ha hatt betydning for de statistiske beregningene. Videre medførte ulik eksponeringstid at membranen fremstod med ulik tykkelse. Dette kan påvirke bestemmelsen av om en cellekerne ligger "oppå" (inkluderes ikke), eller like innenfor membranen (inkluderes), fordi en for en "tykk" membran kan medføre at cellekjerner ikke blir inkludert,



jf. tabell 9. I senere studier bør derfor eksponeringstiden ved bildetaking av dystrofin (membran) standardiseres.

Denne studien inkluderte 200 fiber i cellekjerneanalysene. Ifølge Mackey et al. (2009) er inkludering av 50 type I fiber og 75 type II fiber tilstrekkelig for å oppnå høy korrelasjon. Totalt ble det telt MCK på 63 % flere fibere enn dette. Antall inkluderte MCK virker således ikke å være hemmende for å finne eventuelle statistiske forskjeller.

Det faktum at det først ble tatt bilder før det ble telt SC av bildene, er en styrke i forhold til tidligere metoder der en har telt SC direkte i mikroskopet. Dette fordi snittene unngår slitasjen fra bl.a. gjentatt lyseksponering som forekommer ved telling direkte på snittet. I tillegg tillater denne metoden at en i etterkant kan kontrollere SC-tellingen, noe som ble gjort i tvilstilfeller. I tillegg til meg ble halvparten av SC telt av en ekstern person. Dette kan i utgangspunktet virke som en svakhet. Men med tanke på at denne eksterne personen nylig har gjennomført telling av SC i et annet prosjekt, hvor samme merking, bilder og metoder er brukt, og når snittene fra de to gruppene ble jevnt fordelt, vil jeg anta at målingene allikevel kan ansees som reliable. Pre- og post-snitt ble alltid telt av samme person.

Grunnet skjev snitting ble to forsøkspersoners post-test merket om igjen på eget glass. Optimalt sett burde pre- og postprøver merkes på samme glass, da merking ved ulike dager kan resultere i ulik kvalitet på NCAM-merkingen. Men fordi vi leter etter cellestrukturer og ikke f.eks. måler merkeintensitet, vil trolig dette ikke ha påvirket resultatene i særlig grad, da de to ulike behandlingsrundene visuelt sett ikke hadde noen merkbare forskjeller i intensiteten på NCAM-merkingen.

## **5.5 Praktiske implikasjoner**

Selv om flere dyrestudier har funnet gunstige effekter av muskeloppvarming på utvikling eller gjenoppbygging av muskelmasse, er trenden ikke like tydelig på utvikling av muskelstyrke og muskelmasse hos mennesker, og spesielt når varmebehandlingen kombineres med tung styrketrening. Vi har i vår studie funnet at varmestimulus kan ha negativ effekt på utvikling av muskelmasse i en periode med tung styrketrening, noe som skiller seg fra tidligere studier. Muskeloppvarming ved immersjon i varmt vann er kostbart, krever vedlikehold av basseng og har på mennesker ikke vist noen tydelig effekt. Basert på denne og tidligere studier kan det per nå ikke anbefales å ta varmebad etter styrketrening, for å oppnå ytterlig adaptasjon eller

bedret restitusjon. Gjennomføring av flere studier som inkluderer måling av både akutt og langtidseffekter vil kunne være nyttig for videre kunnskap om styrketrening og varme som evidensfelt. Disse studiene bør trolig inkludere høy temperatur og muligens også ha lengere immersjon enn 10 minutter, gitt at det totale stresset av trening og varmestimulus på muskulaturen ikke blir for stort.

## 6.0 Konklusjon

Tung styrketrening over 12 uker førte til økning av muskelstyrke og muskelmasse for både HWI og PAS. I kontrast til vår opprinnelige hypotese fant vi at varme bad gjennomført umiddelbart etter hver treningsøkt hemmet økning av muskelmasse målt med DEXA. Videre fant vi at antall cellekjerne i type II-fiber tenderte mot signifikant økning for HWI, men ikke for PAS. Det var imidlertid ingen forskjell mellom gruppene i økning av muskelstyrke, fiberareal eller satellittcelle- og cellekjerneantall. Implementering av HWI sammen med tung styrketrening virker ikke å kunne fasilitere økning av muskelmasse eller muskelstyrke.

## Referanser

- Abbott, K. L., Friday, B. B., Thaloor, D., Murphy, T. J., & Pavlath, G. K. (1998). Activation and cellular localization of the cyclosporine A-sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell*, 9(10), 2905-2916.
- Almeida, C. F., Fernandes, S. A., Ribeiro Junior, A. F., Keith Okamoto, O., & Vainzof, M. (2016). Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them. *Stem Cells Int*, 2016, 1078686. doi: 10.1155/2016/1078686
- Amthor, H., Otto, A., Vulin, A., Rochat, A., Dumonceaux, J., Garcia, L., . . . Partridge, T. (2009). Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7479-7484. doi: 10.1073/pnas.0811129106

- Anderson, J. E. (2000). A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell*, *11*(5), 1859-1874.
- Andreoli, A., Scalzo, G., Masala, S., Tarantino, U., & Guglielmi, G. (2009). Body composition assessment by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Radiol Med*, *114*(2), 286-300. doi: 10.1007/s11547-009-0369-7
- Bijur, G. N., & Jope, R. S. (2000). Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem*, *75*(6), 2401-2408.
- Blaauw, B., & Reggiani, C. (2014). The role of satellite cells in muscle hypertrophy. *J Muscle Res Cell Motil*, *35*(1), 3-10. doi: 10.1007/s10974-014-9376-y
- Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., . . . Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, *3*(11), 1014-1019. doi: 10.1038/ncb1101-1014
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(34), 15111-15116. doi: 10.1073/pnas.0913935107
- Calderwood, S. K., Mambula, S. S., Gray, P. J., Jr., & Theriault, J. R. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett*, *581*(19), 3689-3694. doi: 10.1016/j.febslet.2007.04.044
- Cantini, M., Giurisato, E., Radu, C., Tiozzo, S., Pampinella, F., Senigaglia, D., . . . Vitiello, L. (2002). Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci*, *23*(4), 189-194. doi: 10.1007/s100720200060

- Cermak, N. M., Snijders, T., McKay, B. R., Parise, G., Verdijk, L. B., Tarnopolsky, M. A., . . . Van Loon, L. J. (2013). Eccentric exercise increases satellite cell content in type II muscle fibers. *Med Sci Sports Exerc*, 45(2), 230-237. doi: 10.1249/MSS.0b013e318272cf47
- Chakravarthy, M. V., Abraha, T. W., Schwartz, R. J., Fiorotto, M. L., & Booth, F. W. (2000). Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem*, 275(46), 35942-35952. doi: 10.1074/jbc.M005832200
- Chen, Y., Voegeli, T. S., Liu, P. P., Noble, E. G., & Currie, R. W. (2007). Heat shock paradox and a new role of heat shock proteins and their receptors as anti-inflammation targets. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 6(2), 91-100.
- Cheung, T. H., Quach, N. L., Charville, G. W., Liu, L., Park, L., Edalati, A., . . . Rando, T. A. (2012). Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*, 482(7386), 524-528. doi: 10.1038/nature10834
- 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. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 17), 2895-2901.
- Cornelison, D. D., Olwin, B. B., Rudnicki, M. A., & Wold, B. J. (2000). MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*, 224(2), 122-137. doi: 10.1006/dbio.2000.9682
- Cornelison, D. D., & Wold, B. J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 191(2), 270-283. doi: 10.1006/dbio.1997.8721

- Crabtree, G. R. (1999). Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell*, *96*(5), 611-614.
- Crist, C. G., Montarras, D., & Buckingham, M. (2012). Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell*, *11*(1), 118-126. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.011
- Cross, M. C., Radomski, M. W., VanHelder, W. P., Rhind, S. G., & Shephard, R. J. (1996). Endurance exercise with and without a thermal clamp: effects on leukocytes and leukocyte subsets. *J Appl Physiol* (1985), *81*(2), 822-829.
- Csermely, P., Soti, C., & Blatch, G. L. (2007). Chaperones as parts of cellular networks. *Adv Exp Med Biol*, *594*, 55-63. doi: 10.1007/978-0-387-39975-1\_6
- Cumming, K. T. (2009). *Effekten av to ulike styrketreningsmetoder på satellittceller, cellekjerner, muskelfiberareal og muskelstyrke i knestrekkerne hos eldre*. (Master Master), Norges idrettshøgskole, Oslo.
- Delling, U., Tureckova, J., Lim, H. W., De Windt, L. J., Rotwein, P., & Molkentin, J. D. (2000). A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Mol Cell Biol*, *20*(17), 6600-6611.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, *52*, 794-804.
- Drenning, J. A., Lira, V. A., Soltow, Q. A., Canon, C. N., Valera, L. M., Brown, D. L., & Criswell, D. S. (2009). Endothelial nitric oxide synthase is involved in calcium-induced Akt signaling in mouse skeletal muscle. *Nitric Oxide*, *21*(3-4), 192-200. doi: 10.1016/j.niox.2009.08.001

- Dumont, N. A., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*, *142*(9), 1572-1581. doi: 10.1242/dev.114223
- Egner, I. M., Bruusgaard, J. C., Eftestol, E., & Gundersen, K. (2013). A cellular memory mechanism aids overload hypertrophy in muscle long after an episodic exposure to anabolic steroids. *J Physiol*, *591*(24), 6221-6230. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264457
- Egner, I. M., Bruusgaard, J. C., & Gundersen, K. (2016). Satellite cell depletion prevents fiber hypertrophy in skeletal muscle. *Development*, *143*(16), 2898-2906. doi: 10.1242/dev.134411
- Elliott, B., Renshaw, D., Getting, S., & Mackenzie, R. (2012). The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*, *205*(3), 324-340. doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02423.x
- Engert, J. C., Berglund, E. B., & Rosenthal, N. (1996). Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*, *135*(2), 431-440.
- Farup, J., Rahbek, S. K., Knudsen, I. S., de Paoli, F., Mackey, A. L., & Vissing, K. (2014). Whey protein supplementation accelerates satellite cell proliferation during recovery from eccentric exercise. *Amino Acids*, *46*(11), 2503-2516. doi: 10.1007/s00726-014-1810-3
- Fisker, S., Jorgensen, J. O., & Christiansen, J. S. (1998). Variability in growth hormone stimulation tests. *Growth Horm IGF Res*, *8 Suppl A*, 31-35.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z., & Coolican, S. A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, *17*(5), 481-517. doi: 10.1210/edrv-17-5-481
- Folland, J. P., & Williams, A. G. (2007). The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Med*, *37*(2), 145-168.

- Friday, B. B., Horsley, V., & Pavlath, G. K. (2000). Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *J Cell Biol*, *149*(3), 657-666.
- Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M., & Pavlath, G. K. (2003). Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation*, *71*(3), 217-227. doi: 10.1046/j.1432-0436.2003.710303.x
- Frier, B. C., & Locke, M. (2007). Heat stress inhibits skeletal muscle hypertrophy. *Cell Stress Chaperones*, *12*(2), 132-141.
- Glass, D. J. (2003). Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*, *5*(2), 87-90. doi: 10.1038/ncb0203-87
- Goetsch, S. C., Hawke, T. J., Gallardo, T. D., Richardson, J. A., & Garry, D. J. (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics*, *14*(3), 261-271. doi: 10.1152/physiolgenomics.00056.2003
- Gopinath, S. D., Webb, A. E., Brunet, A., & Rando, T. A. (2014). FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. *Stem Cell Reports*, *2*(4), 414-426. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.02.002
- Goto, K., Honda, M., Kobayashi, T., Uehara, K., Kojima, A., Akema, T., . . . Yoshioka, T. (2004). Heat stress facilitates the recovery of atrophied soleus muscle in rat. *Jpn J Physiol*, *54*(3), 285-293.
- Goto, K., Oda, H., Kondo, H., Igaki, M., Suzuki, A., Tsuchiya, S., . . . Yoshioka, T. (2011). Responses of muscle mass, strength and gene transcripts to long-term heat stress in healthy human subjects. *Eur J Appl Physiol*, *111*(1), 17-27. doi: 10.1007/s00421-010-1617-1

- Goto, K., Oda, H., Morioka, S., Naito, H., Akema, T., Kato, H., . . . Yoshioka, T. (2007). Skeletal Muscle Hypertrophy Induced by Low-Intensity Exercise with Heat-Stress in Healthy Human Subjects. *Aerospace and Environmental Medicine*, 44(1), 13-18.
- Grounds, M. D., Garrett, K. L., Lai, M. C., Wright, W. E., & Beilharz, M. W. (1992). Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res*, 267(1), 99-104.
- Gundersen, K., & Bruusgaard, J. C. (2008). Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J Physiol*, 586(11), 2675-2681. doi: 10.1113/jphysiol.2008.154369
- Gupte, A. A., Bomhoff, G. L., Touchberry, C. D., & Geiger, P. C. (2011). Acute heat treatment improves insulin-stimulated glucose uptake in aged skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*, 110(2), 451-457. doi: 10.1152/jappphysiol.00849.2010
- Halevy, O., Krispin, A., Leshem, Y., McMurtry, J. P., & Yahav, S. (2001). Early-age heat exposure affects skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation in chicks. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(1), R302-309.
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 10, 5-12.
- Hanssen, K. E., Kvamme, N. H., Nilsen, T. S., Ronnestad, B., Ambjornsen, I. K., Norheim, F., . . . Raastad, T. (2013). The effect of strength training volume on satellite cells, myogenic regulatory factors, and growth factors. *Scand J Med Sci Sports*, 23(6), 728-739. doi: 10.1111/j.1600-0838.2012.01452.x
- Harris, M. B., & Starnes, J. W. (2001). Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(5), H2271-2280.
- Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol (1985)*, 91(2), 534-551.



- Hill, M., Wernig, A., & Goldspink, G. (2003). Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat*, 203(1), 89-99.
- Hind, K., Oldroyd, B., & Truscott, J. G. (2011). In vivo precision of the GE Lunar iDXA densitometer for the measurement of total body composition and fat distribution in adults. *Eur J Clin Nutr*, 65(1), 140-142. doi: 10.1038/ejcn.2010.190
- Hornberger, T. A., Stuppard, R., Conley, K. E., Fedele, M. J., Fiorotto, M. L., Chin, E. R., & Esser, K. A. (2004). Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *Biochem J*, 380(Pt 3), 795-804. doi: 10.1042/bj20040274
- Husmann, I., Soulet, L., Gautron, J., Martelly, I., & Barritault, D. (1996). Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7(3), 249-258.
- Imai, J., & Yahara, I. (2000). Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. *Mol Cell Biol*, 20(24), 9262-9270.
- Jackson, J. R., Mula, J., Kirby, T. J., Fry, C. S., Lee, J. D., Ubele, M. F., . . . Dupont-Versteegden, E. E. (2012). Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(8), C854-861. doi: 10.1152/ajpcell.00207.2012
- Johnson, J. D., & Fleshner, M. (2006). Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol*, 79(3), 425-434. doi: 10.1189/jlb.0905523
- Jones, A. E., Price, F. D., Le Grand, F., Soleimani, V. D., Dick, S. A., Megeney, L. A., & Rudnicki, M. A. (2015). Wnt/beta-catenin controls follistatin signalling to regulate satellite cell myogenic potential. *Skelet Muscle*, 5, 14. doi: 10.1186/s13395-015-0038-

- Jones, N. C., Tyner, K. J., Nibarger, L., Stanley, H. M., Cornelison, D. D., Fedorov, Y. V., & Olwin, B. B. (2005). The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol*, *169*(1), 105-116. doi: 10.1083/jcb.200408066
- 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. *J Physiol*, *558*(Pt 3), 1005-1012. doi: 10.1113/jphysiol.2004.065904
- Kakigi, R., Naito, H., Ogura, Y., Kobayashi, H., Saga, N., Ichinoseki-Sekine, N., . . . Katamoto, S. (2011). Heat stress enhances mTOR signaling after resistance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol Sci*, *61*(2), 131-140. doi: 10.1007/s12576-010-0130-y
- Kobayashi, T., Goto, K., Kojima, A., Akema, T., Uehara, K., Aoki, H., . . . Yoshioka, T. (2005). Possible role of calcineurin in heating-related increase of rat muscle mass. *Biochem Biophys Res Commun*, *331*(4), 1301-1309. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.04.096
- Koh, T. J. (2002). Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exerc Sport Sci Rev*, *30*(3), 117-121.
- Kojima, A., Goto, K., Morioka, S., Naito, T., Akema, T., Fujiya, H., . . . Yoshioka, T. (2007). Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci*, *12*(1), 74-82. doi: 10.1007/s00776-006-1083-0
- Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, *351 Pt 2*, 289-305.
- Koren, J., 3rd, Jinwal, U. K., Jin, Y., O'Leary, J., Jones, J. R., Johnson, A. G., . . . Dickey, C. A. (2010). Facilitating Akt clearance via manipulation of Hsp70 activity and levels. *J Biol Chem*, *285*(4), 2498-2505. doi: 10.1074/jbc.M109.057208

- Kuligowski, L. A., Lephart, S. M., Giannantonio, F. P., & Blanc, R. O. (1998). Effect of whirlpool therapy on the signs and symptoms of delayed-onset muscle soreness. *J Athl Train*, 33(3), 222-228.
- Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., & Sharma, R. K. (2006). Interaction between heat shock protein 70 kDa and calcineurin in cardiovascular systems (Review). *Int J Mol Med*, 17(3), 419-423.
- Lancaster, G. I., & Febbraio, M. A. (2005). Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. *Exerc Immunol Rev*, 11, 46-52.
- Lau, M. T., & Leung, P. C. (2012). The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway mediates insulin-like growth factor 1-induced E-cadherin down-regulation and cell proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 326(2), 191-198. doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.016
- Lepper, C., Partridge, T. A., & Fan, C. M. (2011). An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*, 138(17), 3639-3646. doi: 10.1242/dev.067595
- Lexell, J., Taylor, C., & Sjostrom, M. (1985). Analysis of sampling errors in biopsy techniques using data from whole muscle cross sections. *J Appl Physiol* (1985), 59(4), 1228-1235.
- Lexell, J., & Taylor, C. C. (1989). Variability in muscle fibre areas in whole human quadriceps muscle: how to reduce sampling errors in biopsy techniques. *Clin Physiol*, 9(4), 333-343.
- Losick, V. P., Morris, L. X., Fox, D. T., & Spradling, A. (2011). Drosophila stem cell niches: a decade of discovery suggests a unified view of stem cell regulation. *Dev Cell*, 21(1), 159-171. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.018

- Ma, K., Chan, J. K., Zhu, G., & Wu, Z. (2005). Myocyte enhancer factor 2 acetylation by p300 enhances its DNA binding activity, transcriptional activity, and myogenic differentiation. *Mol Cell Biol*, 25(9), 3575-3582. doi: 10.1128/MCB.25.9.3575-3582.2005
- 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), 455-465. doi: 10.1002/mus.21369
- Mackey, A. L., Kjaer, M., Dandanell, S., Mikkelsen, K. H., Holm, L., Dossing, S., . . . Langberg, H. (2007). The influence of anti-inflammatory medication on exercise-induced myogenic precursor cell responses in humans. *J Appl Physiol (1985)*, 103(2), 425-431. doi: 10.1152/jappphysiol.00157.2007
- 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*, 138(17), 3657-3666. doi: 10.1242/dev.068858
- McKay, B. R., De Lisio, M., Johnston, A. P., O'Reilly, C. E., Phillips, S. M., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2009). Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PLoS One*, 4(6), e6027. doi: 10.1371/journal.pone.0006027
- McKay, B. R., O'Reilly, C. E., Phillips, S. M., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2008). Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J Physiol*, 586(22), 5549-5560. doi: 10.1113/jphysiol.2008.160176
- McKay, B. R., Ogborn, D. I., Baker, J. M., Toth, K. G., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2013). Elevated SOCS3 and altered IL-6 signaling is associated with age-related

- human muscle stem cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304(8), C717-728.  
doi: 10.1152/ajpcell.00305.2012
- McKay, B. R., Ogborn, D. I., Bellamy, L. M., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2012).  
Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. *Faseb j*,  
26(6), 2509-2521. doi: 10.1096/fj.11-198663
- Mijnarends, D. M., Meijers, J. M., Halfens, R. J., ter Borg, S., Luiking, Y. C., Verlaan, S., . . .  
Schols, J. M. (2013). Validity and reliability of tools to measure muscle mass,  
strength, and physical performance in community-dwelling older people: a systematic  
review. *J Am Med Dir Assoc*, 14(3), 170-178. doi: 10.1016/j.jamda.2012.10.009
- Mikkelsen, U. R., Langberg, H., Helmark, I. C., Skovgaard, D., Andersen, L. L., Kjaer, M., &  
Mackey, A. L. (2009). Local NSAID infusion inhibits satellite cell proliferation in  
human skeletal muscle after eccentric exercise. *J Appl Physiol (1985)*, 107(5), 1600-  
1611. doi: 10.1152/jappphysiol.00707.2009
- Miyazaki, M., McCarthy, J. J., Fedele, M. J., & Esser, K. A. (2011). Early activation of  
mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of  
phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol*, 589(Pt 7), 1831-1846. doi:  
10.1113/jphysiol.2011.205658
- Mokalled, M. H., Johnson, A. N., Creemers, E. E., & Olson, E. N. (2012). MASTR directs  
MyoD-dependent satellite cell differentiation during skeletal muscle regeneration.  
*Genes Dev*, 26(2), 190-202. doi: 10.1101/gad.179663.111
- Montarras, D., L'Honore, A., & Buckingham, M. (2013). Lying low but ready for action: the  
quiescent muscle satellite cell. *Febs j*, 280(17), 4036-4050. doi: 10.1111/febs.12372
- Morton, J. P., Kayani, A. C., McArdle, A., & Drust, B. (2009). The exercise-induced stress  
response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Med*, 39(8),  
643-662. doi: 10.2165/00007256-200939080-00003

- Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., & Tajbakhsh, S. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells*, *30*(2), 243-252. doi: 10.1002/stem.775
- Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A., & Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*, *138*(17), 3625-3637. doi: 10.1242/dev.064162
- Musaro, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., & Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*, *400*(6744), 581-585. doi: 10.1038/23060
- Nader, G. A., McLoughlin, T. J., & Esser, K. A. (2005). mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *Am J Physiol Cell Physiol*, *289*(6), C1457-1465. doi: 10.1152/ajpcell.00165.2005
- Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., Sugiura, T., Dodd, S. L., & Aoki, J. (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. *J Appl Physiol* (1985), *88*(1), 359-363.
- Naya, F. J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J. A., Williams, R. S., & Olson, E. N. (2000). Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem*, *275*(7), 4545-4548.
- Nicklas, B. J., Hackney, A. C., & Sharp, R. L. (1989). The menstrual cycle and exercise: performance, muscle glycogen, and substrate responses. *Int J Sports Med*, *10*(4), 264-269. doi: 10.1055/s-2007-1024913
- Noble, E. G., Milne, K. J., & Melling, C. W. (2008). Heat shock proteins and exercise: a primer. *Appl Physiol Nutr Metab*, *33*(5), 1050-1065. doi: 10.1139/h08-069
- Nollen, E. A., & Morimoto, R. I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci*, *115*(Pt 14), 2809-2816.

- Nosaka, K. (1996). Changes in serum enzyme activities after injection of bupivacaine into rat tibialis anterior. *J Appl Physiol* (1985), *81*(2), 876-884.
- Nosaka, K., Muthalib, M., Lavender, A., & Laursen, P. B. (2007). Attenuation of muscle damage by preconditioning with muscle hyperthermia 1-day prior to eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol*, *99*(2), 183-192. doi: 10.1007/s00421-006-0331-5
- Nosaka, K., Sakamoto, K., Newton, M., & Sacco, P. (2004). Influence of Pre-Exercise Muscle Temperature on Responses to Eccentric Exercise. *J Athl Train*, *39*(2), 132-137.
- O'Reilly, C., McKay, B., Phillips, S., Tarnopolsky, M., & Parise, G. (2008). Hepatocyte growth factor (HGF) and the satellite cell response following muscle lengthening contractions in humans. *Muscle Nerve*, *38*(5), 1434-1442. doi: 10.1002/mus.21146
- Oehler-Janne, C., von Bueren, A. O., Vuong, V., Hollenstein, A., Grotzer, M. A., & Pruschy, M. (2008). Temperature sensitivity of phospho-Ser(473)-PKB/AKT. *Biochem Biophys Res Commun*, *375*(3), 399-404. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.035
- Ogura, Y., Naito, H., Tsurukawa, T., Ichinoseki-Sekine, N., Saga, N., Sugiura, T., & Katamoto, S. (2007). Microwave hyperthermia treatment increases heat shock proteins in human skeletal muscle. *Br J Sports Med*, *41*(7), 453-455; discussion 455. doi: 10.1136/bjsem.2006.032938
- Ohnishi, T., Kakimoto, K., Bandow, K., Lowenstein, C. J., Daikuhara, Y., & Matsuguchi, T. (2006). Mature hepatocyte growth factor/scatter factor on the surface of human granulocytes is released by a mechanism involving activated factor Xa. *J Immunol*, *176*(11), 6945-6953.
- Oishi, Y., Hayashida, M., Tsukiashi, S., Taniguchi, K., Kami, K., Roy, R. R., & Ohira, Y. (2009). Heat stress increases myonuclear number and fiber size via satellite cell

- activation in rat regenerating soleus fibers. *J Appl Physiol* (1985), 107(5), 1612-1621.  
doi: 10.1152/jappphysiol.91651.2008
- Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Ishihara, A., Ohira, Y., & Roy, R. R. (2002). Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature. *J Appl Physiol* (1985), 92(3), 1097-1103. doi: 10.1152/jappphysiol.00739.2001
- Olguin, H. C., & Olwin, B. B. (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol*, 275(2), 375-388. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.08.015
- Olguin, H. C., Yang, Z., Tapscott, S. J., & Olwin, B. B. (2007). Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol*, 177(5), 769-779. doi: 10.1083/jcb.200608122
- Olson, E. N., & Williams, R. S. (2000). Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell*, 101(7), 689-692.
- Pattwell, 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 Radic Biol Med*, 37(7), 1064-1072. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.026
- Pearson, S. J., & Hussain, S. R. (2015). A review on the mechanisms of blood-flow restriction resistance training-induced muscle hypertrophy. *Sports Med*, 45(2), 187-200. doi: 10.1007/s40279-014-0264-9
- Petrella, J. K., Kim, J. S., 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. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(5), E937-946. doi: 10.1152/ajpendo.00190.2006



- Petrella, J. K., Kim, J. S., Mayhew, D. L., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol* (1985), 104(6), 1736-1742. doi: 10.1152/jappphysiol.01215.2007
- Plant, D. R., Beitzel, F., & Lynch, G. S. (2005). Length-tension relationships are altered in regenerating muscles of the rat after bupivacaine injection. *J Appl Physiol* (1985), 98(6), 1998-2003. doi: 10.1152/jappphysiol.01381.2004
- Raastad, T., Paulsen, G., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R., & Wisnes, A. (2010). *Styrketrening: i teori og praksis*. Oslo: Gyldendal undervisning.
- Roberts, L. A., Raastad, T., Markworth, J. F., Figueiredo, V. C., Egner, I. M., Shield, A., . . . Peake, J. M. (2015). Post-exercise cold water immersion attenuates acute anabolic signalling and long-term adaptations in muscle to strength training. *J Physiol*, 593(18), 4285-4301. doi: 10.1113/JP270570
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., . . . Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, 3(11), 1009-1013. doi: 10.1038/ncb1101-1009
- Saga, N., Katamoto, S., & Naito, H. (2008). Effect of heat preconditioning by microwave hyperthermia on human skeletal muscle after eccentric exercise. *J Sports Sci Med*, 7(1), 176-183.
- Sakuma, K., Nishikawa, J., Nakao, R., Watanabe, K., Totsuka, T., Nakano, H., . . . Yasuhara, M. (2003). Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2. *Acta Neuropathol*, 105(3), 271-280. doi: 10.1007/s00401-002-0647-0

- Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., . . . Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development*, *138*(17), 3647-3656. doi: 10.1242/dev.067587
- Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., & Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol*, *296*(6), C1248-1257. doi: 10.1152/ajpcell.00104.2009
- Sasai, N., Agata, N., Inoue-Miyazu, M., Kawakami, K., Kobayashi, K., Sokabe, M., & Hayakawa, K. (2010). Involvement of PI3K/Akt/TOR pathway in stretch-induced hypertrophy of myotubes. *Muscle Nerve*, *41*(1), 100-106. doi: 10.1002/mus.21473
- Sato, S., Fujita, N., & Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(20), 10832-10837. doi: 10.1073/pnas.170276797
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle*, *1*(1), 4. doi: 10.1186/2044-5040-1-4
- Schmalbruch, H. (1976). The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue Cell*, *8*(4), 673-692.
- Schultz, E. (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol*, *175*(1), 84-94. doi: 10.1006/dbio.1996.0097
- Selsby, J. T., & Dodd, S. L. (2005). Heat treatment reduces oxidative stress and protects muscle mass during immobilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *289*(1), R134-139. doi: 10.1152/ajpregu.00497.2004
- Selsby, J. T., Rother, S., Tsuda, S., Prakash, O., Quindry, J., & Dodd, S. L. (2007). Intermittent hyperthermia enhances skeletal muscle regrowth and attenuates oxidative

- damage following reloading. *J Appl Physiol* (1985), 102(4), 1702-1707. doi: 10.1152/jappphysiol.00722.2006
- Semsarian, C., Wu, M. J., Ju, Y. K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D. G., . . . Graham, R. M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*, 400(6744), 576-581. doi: 10.1038/23054
- Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M., & Muñoz-Canoves, P. (2008). Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*, 7(1), 33-44. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.011
- Shao, Z. H., Sharp, W. W., Wojcik, K. R., Li, C. Q., Han, M., Chang, W. T., . . . Vanden Hoek, T. L. (2010). Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(6), H2164-2173. doi: 10.1152/ajpheart.00994.2009
- Shi, H., Scheffler, J. M., Zeng, C., Pleitner, J. M., Hannon, K. M., Grant, A. L., & Gerrard, D. E. (2009). Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C1040-1048. doi: 10.1152/ajpcell.00475.2008
- Shortreed, Johnston, A., & J., H. T. (2008). *Satellite Cells and Muscle Repair: Human Kinetics*.
- Skurvydas, A., Kamandulis, S., Stanislovaitis, A., Streckis, V., Mamkus, G., & Drazdauskas, A. (2008). Leg immersion in warm water, stretch-shortening exercise, and exercise-induced muscle damage. *J Athl Train*, 43(6), 592-599. doi: 10.4085/1062-6050-43.6.592
- Smith, C. K., 2nd, Janney, M. J., & Allen, R. E. (1994). Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*, 159(2), 379-385. doi: 10.1002/jcp.1041590222

- Snijders, T., Nederveen, J. P., McKay, B. R., Joannis, S., Verdijk, L. B., van Loon, L. J., & Parise, G. (2015). Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol*, *6*, 283. doi: 10.3389/fphys.2015.00283
- Snijders, T., Verdijk, L. B., Smeets, J. S., McKay, B. R., Senden, J. M., Hartgens, F., . . . van Loon, L. J. (2014). The skeletal muscle satellite cell response to a single bout of resistance-type exercise is delayed with aging in men. *Age (Dordr)*, *36*(4), 9699. doi: 10.1007/s11357-014-9699-z
- Someren, J. S., Faber, L. E., Klein, J. D., & Tumlin, J. A. (1999). Heat shock proteins 70 and 90 increase calcineurin activity in vitro through calmodulin-dependent and independent mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, *260*(3), 619-625. doi: 10.1006/bbrc.1999.0800
- Song, J., Takeda, M., & Morimoto, R. I. (2001). Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol*, *3*(3), 276-282. doi: 10.1038/35060068
- Srikuea, R., Pholpramool, C., Kitiyanant, Y., & Yimlamai, T. (2010). Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *37*(11), 1078-1086. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05439.x
- Stupka, N., Schertzer, J. D., Bassel-Duby, R., Olson, E. N., & Lynch, G. S. (2007). Calcineurin-A alpha activation enhances the structure and function of regenerating muscles after myotoxic injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *293*(2), R686-694. doi: 10.1152/ajpregu.00612.2006
- Takagi, R., Fujita, N., Arakawa, T., Kawada, S., Ishii, N., & Miki, A. (2011). Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol (1985)*, *110*(2), 382-388. doi: 10.1152/jappphysiol.01187.2010

- Takeuchi, K., Hatade, T., Wakamiya, S., Fujita, N., Arakawa, T., & Miki, A. (2014). Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta Histochem*, *116*(2), 327-334. doi: 10.1016/j.acthis.2013.08.010
- Tatsumi, R. (2010). Mechano-biology of skeletal muscle hypertrophy and regeneration: possible mechanism of stretch-induced activation of resident myogenic stem cells. *Anim Sci J*, *81*(1), 11-20. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00712.x
- 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. *Dev Biol*, *194*(1), 114-128. doi: 10.1006/dbio.1997.8803
- Tjin, E. P., Derksen, P. W., Kataoka, H., Spaargaren, M., & Pals, S. T. (2004). Multiple myeloma cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation by secreting the serine protease HGF-activator. *Blood*, *104*(7), 2172-2175. doi: 10.1182/blood-2003-12-4386
- Toth, K. G., McKay, B. R., De Lisio, M., Little, J. P., Tarnopolsky, M. A., & Parise, G. (2011). IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS One*, *6*(3), e17392. doi: 10.1371/journal.pone.0017392
- Touchberry, C. D., Gupte, A. A., Bomhoff, G. L., Graham, Z. A., Geiger, P. C., & Gallagher, P. M. (2012). Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell Stress Chaperones*, *17*(6), 693-705. doi: 10.1007/s12192-012-0343-5
- Uehara, K., Goto, K., Kobayashi, T., Kojima, A., Akema, T., Sugiura, T., . . . Aoki, H. (2004). Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol*, *54*(3), 263-271.

- Vaile, J., Halson, S., Gill, N., & Dawson, B. (2008). Effect of hydrotherapy on the signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. *Eur J Appl Physiol*, *102*(4), 447-455. doi: 10.1007/s00421-007-0605-6
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, *160*(1), 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Versey, N. G., Halson, S. L., & Dawson, B. T. (2013). Water immersion recovery for athletes: effect on exercise performance and practical recommendations. *Sports Med*, *43*(11), 1101-1130. doi: 10.1007/s40279-013-0063-8
- Vierdort, H. (1906). Anatomische, physiologische und physikalische daten und tabellen. *Gustav Fisscher, Jena, Germany*.
- Viitasalo, J. T., Niemela, K., Kaappola, R., Korjus, T., Levola, M., Mononen, H. V., . . . Takala, T. E. (1995). Warm underwater water-jet massage improves recovery from intense physical exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, *71*(5), 431-438.
- Walker, D. K., Fry, C. S., Drummond, M. J., Dickinson, J. M., Timmerman, K. L., Gundermann, D. M., . . . Rasmussen, B. B. (2012). PAX7+ satellite cells in young and older adults following resistance exercise. *Muscle Nerve*, *46*(1), 51-59. doi: 10.1002/mus.23266
- Wang, X., Grammatikakis, N., Siganou, A., Stevenson, M. A., & Calderwood, S. K. (2004). Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress. *J Biol Chem*, *279*(47), 49460-49469. doi: 10.1074/jbc.M406059200
- Washington, T. A., White, J. P., Davis, J. M., Wilson, L. B., Lowe, L. L., Sato, S., & Carson, J. A. (2011). Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta Physiol (Oxf)*, *202*(4), 657-669. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02281.x

- Wei, H., & Vander Heide, R. S. (2008). Heat stress activates AKT via focal adhesion kinase-mediated pathway in neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295(2), H561-568. doi: 10.1152/ajpheart.00401.2008
- Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, 72(4), 1063-1081.
- Wernbom, M., Apro, W., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Blomstrand, E., & Raastad, T. (2013). Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 113(12), 2953-2965. doi: 10.1007/s00421-013-2733-5
- White, R. B., Bierinx, A. S., Gnocchi, V. F., & Zammit, P. S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol*, 10, 21. doi: 10.1186/1471-213x-10-21
- Yablonka-Reuveni, Z., & Rivera, A. J. (1994). Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol*, 164(2), 588-603. doi: 10.1006/dbio.1994.1226
- Yamada, M., Tatsumi, R., Yamanouchi, K., Hosoyama, T., Shiratsuchi, S., Sato, A., . . . Allen, R. E. (2010). High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(3), C465-476. doi: 10.1152/ajpcell.00449.2009
- 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 Lett*, 522(1-3), 156-160.

- Yang, Y., Xu, Y., Li, W., Wang, G., Song, Y., Yang, G., . . . Ma, K. (2009). STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD. *Cytokine*, *46*(1), 137-141. doi: 10.1016/j.cyto.2008.12.015
- Yin, H., Price, F., & Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev*, *93*(1), 23-67. doi: 10.1152/physrev.00043.2011
- Yoshihara, T., Naito, H., Kakigi, R., Ichinoseki-Sekine, N., Ogura, Y., Sugiura, T., & Katamoto, S. (2013). Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, *207*(2), 416-426. doi: 10.1111/apha.12040
- Yushkevich, P. A., Piven, J., Hazlett, H. C., Smith, R. G., Ho, S., Gee, J. C., & Gerig, G. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*, *31*(3), 1116-1128. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.01.015
- Zarogoulidis, P., Lampaki, S., Turner, J. F., Huang, H., Kakolyris, S., Syrigos, K., & Zarogoulidis, K. (2014). mTOR pathway: A current, up-to-date mini-review (Review). *Oncol Lett*, *8*(6), 2367-2370. doi: 10.3892/ol.2014.2608
- Zhang, J. M., Wei, Q., Zhao, X., & Paterson, B. M. (1999). Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *EMBO J*, *18*(4), 926-933. doi: 10.1093/emboj/18.4.926



# Tabelloversikt

Tabell 1. Oversiktstabell over studier som har undersøkt effekten av varmpåvirkning på endringer i muskelmasse, muskelstyrke og satellittceller, hos dyr og mennesker. VV; Immersjon i varmtvann. VK; varmekammer. VD; varme og dampgenererende matter, VP; varmepute. KSD; Kvinnelige Spraugue-dawley. MSD; Mannlige Spraugue- dawley. MW; mannlige wistar. Kolonene "muskelstyrke" og "satellittceller" viser til antall dager etter avsluttet treningsperiode, avsluttet invensjon eller etter klekking funnet ble gjort. Relative målinger/ ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter varmeeksponering. *; Rektumtemperatur.....	12
Tabell 2. Oversiktstabell over studier som har undersøkt effekten av trening og varmpåvirkning på endringer i muskelmasse, muskelstyrke og satellittceller hos mennesker. VV; Immersjon i varmtvann. VS; varmestråling. VD; varme og dampgenererende matter. I kolonene "muskelmasse" og "muskelstyrke" viser tallene antall dager etter avsluttet treningsperiode eller invensjon. Relative målinger/ ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tidspunkt for varme er i.f.t. treningsøkt. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter varmeeksponering. *; Rektumtemperatur, **; muskeltemp funnet i pilotstudie. T=timer. ....	15
Tabell 3. Oversiktstabell over dyrestudier som har undersøkt effekten av trening og varmpåvirkning på endringer i muskelmasse og satellittceller. VV; Immersjon i varmtvann. VK; varmekammer. VD; varme og dampgenererende matter, VP; varmepute. VVP; varmtvannspakke VT; varmeteppe. KSD; Kvinnelige Spraugue-dawley. MSD; Mannlige Spraugue- dawley. MW; mannlige wistar. I kolonnene "muskelmasse" og "satellittceller" viser tallene antall dager etter avsluttet treningsperiode, avsluttet invensjon eller etter klekking. Relative målinger/ ratiomålinger fra de ulike studiene er ikke inkludert i tabellene. Tabellen inkluderer heller ikke resultater/studier der målinger er gjort direkte (minutter) etter varmeeksponering. Tidspunkt for varme er i.f.t. treningsøkt. T=timer.....	19
Tabell 4. Studiens forløp og timingen til de ulike testene og treningen. ....	34
Tabell 5. Oversikt over forsøkspersonenes høyde og vekt ved studiets start. ....	35
Tabell 6. Viser de ulike øvelsene, antall sett og antall repetisjoner som ble brukt under treningsøktene. ....	41
Tabell 7. Oversikt over antistoff og cellekjernemarkør brukt i studien, deres bindingsegenskaper, lot nr., produsent og fortyning. ....	45
Tabell 8. Kriterier for eksklusjon av muskelfibre.....	46
Tabell 9. Inklusjonskriterier for muskelcellekjerner.....	47
Tabell 10. Inklusjonskriterier for NCAM. ....	49
Tabell 11. Oversikt over deltakernes baselineverdier og signifikansnivå i målinger av styrke og muskelmasse, før treningsperioden.....	52
Tabell 12. Oversikt over deltakernes baselineverdier og signifikansnivå i intramuskulære målinger, før treningsperioden.....	52
Tabell 13. Kroppsvekten før og etter treningsperioden.....	53
Tabell 14. Absolutte verdier og signifikansnivå for muskelstyrke i beinpress og kne-ekstensjon. ....	53
Tabell 15. Absolutte verdier i de to gruppene for lean body mass bein (LBM bein) og estimert masseav m. quadriceps før (Pre) og etter (Post) treningsperioden.....	55
Tabell 16 Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for antall cellekjerner per fiber, fiberareal og kjernedomene.....	57
Tabell 17. Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for satellittceller ....	57
Tabell 18. Absolutte verdier før og etter treningsperioden, samt signifikansnivå for fibertyper.....	58

# Figuroversikt

Figur 1. MR bilde av høyre og venstre lår. M. Quadriseps femoris er tydeligjort. Muskler har grå farge, fett- og beinvev lys farge.....	38
Figur 2. Eksempel på forsøksperson under DEXA måling (venstre) og muskulatur som inkluderes i DEXA-bein (høyre). Muskelmasse distalt (venstre) for rød markeringen ble inkludert i analysene.....	39
Figur 3. Forsøksperson utfører treningsøvelsene beinpress (A), kne-ekstensjon (B), kne-fleksjon (C) og gående utfall (D).....	40
Figur 4. Forsøksperson bader i det oppblåsbare bassenget..	43
Figur 5. Utregning av fiberareal (venstre) og klassifisering av fibertype (høyre). Skjermdump er hentet fra analyser i TEMA.....	46
Figur 6. Bilde av merking mot cellekjerne, dystrofin og MHC II. Cellekjerne vises med blå farge, dystrofin med rød. Grønn farge markerer merking mot MHC II, mens muskelceller med svart farge viser fravær av merking mot MHC II og indikerer type I fiber. ....	48
Figur 7. Oversiktsbilde over snitt merket med laminin (Venstre) og del av et snitt merket mot MHC hvor totalt antall type I og type II fiber blir kvantifisert (Høyre). Lilla farge markerer type I fibre og gul farge indikerer type II fibre. ....	49
Figur 8. Lokalisering av satellittcelle. De fire bildene viser: (A) laminin (membran), (B) cellekjerne (DAPI), (C) satellittcelle (NCAM) og (D) et sammensatt bilde av de tre filtrerene. Satellittcellen er akseptabelt markert med NCAM (C), inneholder cellekjerne (B) og er lokalisert på innsiden av membranen (A). ....	50
Figur 9. Prosentvis endring i muskelstyrke i benpress (A) og kne-ekstensjon (B). *, signifikant forskjellig pre til post $p < 0.05$ . a, statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test. ....	54
Figur 10. Prosentvise endringer i DEXA (A) og MR (B). *, signifikant forskjellig pre til post $p < 0.05$ . #, signifikant forskjell i endring mellom grupper $p < 0.05$ . ....	55
Figur 11. Prosentvise endringer i antall cellekjerne per fiber (A), muskelfiberareal (B), kjernedomene (C) og NCAM positive satellittceller (D). \$, tendens til forskjell fra pre til post $p = 0.05 - 0.1$ . <sup>a</sup> , statistikk mellom gruppene gjennomført med ikke-parametrisk test. ....	58

# Vedlegg

## Vedlegg 1: Rekruteringsposter



Har du lyst til å delta på årets kuleste studie? Les dette.

Prosjektet "Kan varme bad bedre effekten av styrketrening?" har til hensikt å undersøke om varme bad etter styrketrening, kan ha en positiv effekt på muskelvekst og muskelstyrke over en 12 uker lang treningsperiode.

Er du en mann mellom 18 og 30 år, og har trent styrke regelmessig på bein (1 økt eller mer per uke) de siste 6 mnd, kan du delta som forsøksperson i denne studien.

Studien vil foregå i perioden september-desember 2015 og innebærer 4-6 oppmøter ved Norges idrettshøgskole før og etter treningsperioden for ulike tester. I treningsperioden vil det gjennomføres to styrkeøkter per uke i NIHs treningsrom. Disse vil gjennomføres på i underkant av 1 time.

Fordeler ved å delta:

- Du vil få målt din kroppsammensetning, muskelstyrke og muskulatur med markedets beste utstyr og oppfølging
- Du får oppfølging og motivasjon fra fagpersonell over 12 uker.
- Du får innblikk/råd vedrørende eget kosthold.
- Du får innsyn i forskning og forskningsprosessen, samt økt treningsfaglig kompetanse.
- Du vil motta kosttilskudd før og etter hver treningsøkt.

Er du interessert, ta kontakt med: Hamish McGorm (Tlf: 406 11 363) (h.mcgorm@uq.edu.au), Sven Anders Sødal (Tlf: 911 46 719) (sadal77@hotmail.com) (facebook), eller Truls Raastad (truls.raastad@nih.no).

Varme bad innebærer 10 min i 45° i dette varmebadet:





## Vedlegg 2: Forespørsel om deltakelse



# Forespørsel om deltakelse som forsøksperson

## Kan varme bad bedre effekten av styrketrening?

Dette skrivet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltakelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene: Du må være i alderen 18-30 år, du skal ha drevet regelmessig styrketrening på beinmuskulatur de siste 12 mnd (minst 1 gang per uke), og ellers være frisk og uten skader i muskelskjelettsapparatet. Du kan ikke bruke noen form for kosttilskudd som påvirker effekten av styrketreningen under prosjektet (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende); hvis du bruker slike tilskudd nå kan du likevel delta som forsøksperson ved at du slutter med tilskuddet senest én uke før prosjektstart.

### Bakgrunn og hensikt med forsøket

Økt muskeltemperatur ser ut til å være en av flere stimuli som bidrar til at den trente muskulaturen blir større og sterkere over en periode med styrketrening. I et nylig avsluttet prosjekt observerte vi at effekten av styrketrening ble redusert om man umiddelbart etter hver treningsøkt reduserte muskeltemperaturen ved å sette seg i et kaldt bad (10°C) i 10 minutter. I enkelte studier på dyr og mennesker har man observert at økt muskeltemperatur, blant annet som følge av varme bad, kan øke muskelmasse og muskelstyrke. Det er imidlertid ikke undersøkt om kombinasjonen av styrketrening og varme bad kan gi en ekstra effekt utover det styrketreningen alene gir. Ny kunnskap om effekten av varme bad på muskulære tilpasninger til styrketrening kan gi oss bedre forståelse av hvilke faktorer som regulerer muskelmasse. Denne kunnskapen kan brukes til å optimalisere utbyttet av treningen og utvikle andre tiltak for å bedre muskelmasse og muskelfunksjon hos grupper som av ulike grunner ikke kan gjennomføre tung styrketrening. Dette vil være av stor interesse for både mosjonister, idrettsutøvere og eldre med tanke på prestasjon i idrett og funksjon i hverdagen.

I denne studien ønsker vi å undersøke om varme bad rett etter hver treningsøkt øker effekten av styrketreningen målt som endring i muskelstørrelse og muskelstyrke.

Dette er en randomisert, kontrollert studie slik at alle forsøkspersoner vil gjennomføre den samme styrketreningen, men halvparten av forsøkspersonene vil ta et varmt bad etter hver treningsøkt (45°C i 10 minutter) og den andre halvparten vil sitte og hvile 10 min etter hver treningsøkt (kontrollgruppe).

### **Gjennomføringen av forsøket**

Forsøket går kort fortalt ut på å gjennomføre en treningsperiode på 12 uker med styrketrening to ganger i uken. Gjennom denne perioden tar halvparten av forsøkspersonene varme bad etter hver treningsøkt, mens den andre halvparten sitter og hviler i 10 min. Du vil bli tilfeldig trukket (randomiseres) til én av gruppene. Før og etter treningsperioden vil det gjennomføres en rekke tester (se senere) for å se på effekten av de forskjellige drikkene.

### **Før treningsperioden**

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 3-4 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, måling av kroppssammensetning (DXA), en legesjekk og biopsier i ukene før forsøket. Hver seanse unntatt biopsiene varer i ca. 2 timer. I tillegg må du møte for en MR-analyse hos Curato røntgen, som vil ta ca. 30 minutter. Tidspunkter for de ulike oppmøtene avtales individuelt. Før treningsstudien må du også gjennomføre en firedagers kostregistrering, en tilsvarende kostregistrering vil gjentas mot slutten av treningsperioden. **I de to siste dagene før tester og biopsi(er) må du avstå fra all krevende fysisk aktivitet (trening).** Fra dagen før biopsiene til dagen etter biopsiene skal du følge en standardisert diett laget av en ernæringsfysiolog.

### **Treningsperioden**

Treningsperioden starter når man har gjennomført alle testene, og den varer i 12 uker. I disse 12 ukene skal det trenes styrke to ganger i uken (mandag-onsdag eller tirsdag –torsdag, alternativt fredag hvis tidene ikke passer) i grupper på to deltakere med oppfølging av en personlig trener på alle økter. De varme badene (eller 10 min hvile) gjennomføres rett etter hver styrketreningsøkt. Etter

treningsperioden gjennomføres alle testene på nytt for å måle endringer.

### **Akutforsøk**

I forbindelse med den siste treningsøkten i treningsperioden gjennomføres et akutforsøk. Dette innebærer én biopsi rett før den siste treningsøkten og 3 biopsier i de påfølgende to dagene. Oppstart den første dagen vil være mellom kl. 0800 og 1000, og du er ferdig mellom kl. 1330 og 1530. Før vi gjennomfører treningsøkten vil vi ta en biopsi og gjennomføre en styrketest i et kneekstensjonsapparat. Treningsøkten vil være identisk med noen av øktene som gjennomføres i treningsperioden og du vil gjennomføre 10 min i varmt bad eller 10 min hvile rett etter treningen slik du har gjort gjennom hele treningsperioden. Etter treningsøkten vil du innta et standardisert måltid, og det vil bli tatt biopsier 2 timer etter økten. Det vil også bli tatt blodprøver gjennom dagen og gjennomført styrketester rett etter økten og 3 timer etter økten. Dermed vil du måtte sette av ca. 5 timer til denne testdagen. Dagen etter og to dager etter kommer du inn for en ny biopsi og styrketest. Det vil ta ca. 60 min å gjennomføre disse testene. Hensikten med akutforsøket er å måle hvordan signalene for muskelvekst påvirkes av de varme badene.

### **Varme bad**

De varme badene gjennomføres i en kommersielt tilgjengelig enhet utviklet for av underekstremitetene (iCoolsport.com, se Den tilhørende temperaturregulatoren på 45°C og sirkulerer vannet slik at det er en temperatur. Vannet vil nå deg til navlen når du sitter i enheten som vist på bildet.



nedkjøling  
bildet).  
innstilles  
stabil

### **Tester**

*DXA*: ved et av oppmøtene før testingen gjøres en DXA-analyse for å måle kroppssammensetningen som vil danne grunnlaget for de standardiserte måltidene ved testgjennomføringen. Denne testen innebærer at deltakerne ligger stille i ca. 10 minutter.

*MR*: for å måle muskelvekst i lårmuskulaturen benyttes en MR-analyse. Denne testen innebærer at deltakerne ligger stille i ca. 15 minutter.

*1RM tester:* for å måle styrke vil det testes hvor mye man kan løfte maksimalt en gang i to øvelser som heter beinpress og brystpress.

*Muskelfunksjonstest:* testingen av muskelfunksjonen gjøres i et kneekstensjonsapparat som er låst ved 90° i kneleddet.

*Blodprøver:* blodprøvene vil tas i sammenheng med biopsiene og vil gjøres gjennom venekatetrene slik at det ikke blir noen ekstra stikk for blodprøver.

*Biopsier:*

Biopsiene tas ut på følgende måte:

- Huden og bindevevet bedøves der vevsprøven skal tas.
- Et snitt på ca. 1-2 cm gjøres gjennom hud og muskelfascien.
- En nål med diameter på 6 mm føres inn (2-3 cm) og 1-3 små biter av muskulaturen tas ut (total 2-300 mg).
- Snittet lukkes med tape (strips).

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

Deltakelse i prosjektet vil kreve en del tid og oppmerksomhet. Det blir 3-4 oppmøter på Norges idrettshøgskole og ett på Curato røntgen i forkant og etterkant av treningsperioden, samt oppmøte to ganger i uken gjennom treningsperioden.

Trening skal gjennomføres med stor belastning, og vil medføre en viss risiko for skade og følelse av sårhet/stølhhet i muskulaturen.

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.

### **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. 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). Prøver vil bli analysert ved NIH (biopsier), og Universitetet i Queensland, USA (biopsier og blod).

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 (vurdert av Regional Etisk Komite). 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 Dr. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved NIH. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til University of Queensland.

### **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**

Deltakere i prosjektet er forsikret dersom det skulle oppstå skade eller komplikasjoner som følge av deltakelse i forskningsprosjektet. NIH er en statlig institusjon og er således selvassurandør. Dette innebærer at det er NIH som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringselskap.

## **Finansiering**

Prosjektet er fullfinansiert av Norges idrettshøgskole og Exercise & Sports Science Australia.

## **Publisering**

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfelleverderte, 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 avidentifisert før de blir lagt inn i en database, og senere anonymisert.

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med Sven Sødal på tlf: 911 46 719, eller Hamish McGorm på tlf: 406 11 363

Vennlig hilsen

Hamish McGorm (Stipendiat) ([h.mcgorm@uq.edu.au](mailto:h.mcgorm@uq.edu.au))

Sven Sødal (masterstudent) ([sadal77@hotmail.com](mailto:sadal77@hotmail.com))

Truls Raastad (Professor) ([truls.raastad@nih.no](mailto:truls.raastad@nih.no))

# Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

-----  
(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

-----  
(Signert, rolle i studien, dato)

### **Vedlegg 3: Testprotokoll for 1 RM målinger.**

Oppvarming: 10 min lett sykling.

Benpress:                    10 repetisjon – 50 %  
                                      6 repetisjoner – 70 %  
                                      3 repetisjoner – 80 %  
                                      Maksforsøk∞ (90/180 sekund pause)

Kne ekstensjon:            10 repetisjon – 50 %  
                                      6 repetisjoner – 70 %  
                                      3 repetisjoner – 80 %  
                                      Maksforsøk∞ (90/180 sekund pause)

Kne fleksjon:              10 repetisjon – 50 %  
                                      6 repetisjoner – 70 %  
                                      3 repetisjoner – 80 %  
                                      Maksforsøk∞ (90/180 sekund pause)

NB! Ved to døde løft, avsluttes testen.

## Vedlegg 4: Treningsprogram

**Name:**

**Subject Number:**

**Group:**

### Week 1 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40%	
Countermovement Drop Jumps	3	12	Body weight	

### Week 1 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40%	
Countermovement Drop Jumps	3	12	Body weight	

## Week 2 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40 %	
Countermovement Drop Jumps	3	12	Body weight	

## Week 2 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40%	
Countermovement Drop Jumps	3	12	Body weight	

### Week 3 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 4 kg	
Slow Eccentric Squat Jumps	3	12	Body weight	

### Week 3 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 4 kg	
Slow Eccentric Squat Jumps	3	12	50% lunge load	



### Week 4 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8,	8, 10, 12 RM	
		10, 12,		
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 4 kg	
Slow Eccentric Squat Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 4 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8,	8, 10, 12 RM	
		10, 12,		
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 4 kg	
Slow Eccentric Squat Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 5 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8,	8, 10, 12 RM	
		10, 12,		
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 8 kg	
Split Lunge Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 5 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8,	8, 10, 12 RM	
		10, 12,		
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 8 kg	
Split Lunge Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 6 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 8 kg	
Split Lunge Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 6 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 8 kg	
Split Lunge Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 7 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 12 kg	
Countermovement Dumbbell Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 7 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 12 kg	
Countermovement Dumbbell Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 8 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 12 kg	
Countermovement Dumbbell Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 8 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 12 kg	
Countermovement Dumbbell Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 9 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 16 kg	
Countermovement Box Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 9 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	10, 12, 14	40% BW + 16 kg	
Countermovement Box Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 10 session 1

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW+ 16 kg	
Countermovement Box Jumps	3	12	50% lunge load	

### Week 10 session 2

Exercise	Sets	Reps per set	Weight %/Kg	Notes
Leg press	6	8, 8, 10, 12, 10, 10	8, 10, 12 RM	
Extensions	3	12	12RM	
Curls	3	12	12RM	
Lunges	3	12, 14, 16	40% BW + 16 kg	
Countermovement Box Jumps	3	12	50% lunge load	





## Vedlegg 6: Matregistrering

### Diet Logs

Please provide as detailed as information as possible when describing food and drink intake. Where possible, provide precise weights of foods / volumes of fluids (if not appropriate, describe the amount according to plate, portion, glass and cup size etc). If known, please also record the 'brand' of food and fluid consumed (e.g. Coles, Weetbix etc). The more detailed information you provide, the more detailed the analysis that can be undertaken. **It is extremely important to be completely HONEST when recording your food and drink intake!** Examples are provided in the grey boxes in the table provided overleaf.

### Contact

If you unsure how to complete this booklet and require further information at any time, please feel free to contact:

Hamish McGorm

Email: [hamish.mcgorm@uqconnect.edu.au](mailto:hamish.mcgorm@uqconnect.edu.au)

Mobile: 4760 1363

Day: **Monday**

Date:

TIME	FOOD / BRAND	COOKING METHOD	QUANTITY
<u>Example</u> 7.00 am	Weetbix Whole milk Brown toast with butter Eggs Tea with 2 sugars	Boiled	4 500 ml 2 slices 1 large 1 cup

## Vedlegg 7: Antistoffer

	Antistoff	Vertsdyr	Bindes til	Lot nr.	Produsent	Fortynning
Primærantistoff	Anti-NCAM	Mus, monoklonal	NCAM	GR236708-1	abcam	1:400
Primærantistoff	SC-71	Mus, monoklonal	MHC II		DSHB	1:1000
Primærantistoff	Anti-laminin	Kanin, polyklonal	Laminin	00051761	DAKO	1:500
Primærantistoff	Anti-dystrofin	Kanin, polyklonal	Dystrofin	GR226781-5	Abcam	1:1000
Sekundærantistoff	488	Geit	Anti-mus	14C1013	Biotium	1:200
	CF-594	Geit	Anti-kanin	14C0916	Biotium	1:200
Cellekjernemarkør	DAPI		DNA			

## Vedlegg 8A: Merkeprotokoll A: SC71, anti-dystrofin og DAPI

### Merkeprotokoll A: SC71, anti-dystrofin og DAPI

1. Objektivglass med snitt tas ut av ultrafryser
  - a. Aluminiumsfolie og linsepapir rundt snitt fjernes.
  - b. Objektivglass legges i avtrekkskap hvor de tines og tørkes i **10 min**.
  
2. Lipidpenn benyttes for å tegne en lipidring rundt snittene. Ha god avstand fra snittene.
  - a. La tørke i **5 min**
  
3. Tilsett 0,05 %? BSA-t på snittene i **30 min**
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Miks BSA-t før inkubering
  
4. BSA ristes og tørkes av objektivglasset.
  - a. Tørkes av med lofritt papir
  
5. Primærantistoff tilsettes og inkuber **over natt** i kjøleskap (4°C)
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. SC71: Mus, monoklonal, 1:1000
  - c. Dystrofin: Kanin, polyklonal, 1:1000
  - d. Ca XXX µl per glass
  - e. Primærantistoffene blandes i eppendorfrør sammen med BSA-t, tilsett BSA-t først.
  - f. Antistoff sentrifugeres og mikses før pipetering i eppendorfrøret, BSA-t mikses.
  - g. Eppendorfrøret mikses godt før blandingen tilsettes over snittene.
  - h. Pipettespiss byttes mellom pipettering av antistoffene for å unngå kontaminering

**Neste dag:**

6. Primærantistoff ristes og tørkes av objektivglasset.

- a. Tørkes av med lofritt papir

7. Vask snitt 3x10 min i PBS-t

- a. Objektivglass plasseres i glasskuber, som igjen plasseres på ristebrett.
- b. PBS-t byttes mellom hver vask
- c. Før første vask skylles objektivglassene i egen glasskube for å unngå kontaminering

8. PBS-t ristes og tørkes av objektivglasset.

- a. Tørkes av med lofritt papir

9. Primærantistoff tilsettes og inkuberes i romtemperatur i 60 min

- a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
- b. Alexa-488 Goat-Anti Mouse (Grønn); 1:200
- c. CF-594 Goat-Anti Rabbit (Rød); 1:200
- d. Ca XXX µl per glass
- e. Primærantistoffene blandes i eppendorfrør sammen med BSA-t, tilsett BSA-t først.
- f. Antistoff sentrifugeres og mikses før pipetering i eppendorfrøret, BSA-t mikses.
- g. Eppendorfrøret mikses godt før blandingen tilsettes over snittene.
- h. Pipettespiss byttes mellom pipettering av antistoffene for å unngå kontaminering
- i. Ikke pipeter fra bunnen av sekundærstoffrøret?

10. Sekundærantistoff ristes og tørkes av objektivglasset.

- a. Tørkes av med lofritt papir

11. Vask snitt 3x10 min i PBS-t

- a. Objektivglass plasseres i glasskuber, som igjen plasseres på ristebrett.
- b. PBS-t byttes mellom hver vask
- c. Før første vask skylles objektivglassene i egen glasskube for å unngå kontaminering

12. PBS-t ristes og tørkes av objektivglasset.

a. Tørkes av med lofritt papir

13. Monter dekkglass over snittene

a. Unngå luftbobler

b. Bruk lim som inneholder DAPI.

c. Tørkes i avtrekkskap over natt.

OBS: Sekundære antistoff beskyttes mot lys for å unngå blekning av fluorokromene. Dette gjøres ved generell forsiktighet mot lyseksponering og ved at en eske plasseres over objektivglassene under vasking, samt ved lagring i avtrekkskap.

## Vedlegg 8B: Merkeprotokoll B: Anti-NCAM, Anti-laminin og DAPI

### Merkeprotokoll B: Anti-NCAM, Anti-laminin og DAPI

1. Objektivglass med snitt tas ut av ultrafryser
  - a. Aluminiumsfolie og linsepapir rundt snitt fjernes.
  - b. Objektivglass legges i avtrekkskap hvor de tines og tørkes i **10 min**.
  
2. Lipidpenn (PAPPenn. OmmEdg PEN. Vektor Laboratories, Inc.) benyttes for å tegne en lipidring rundt snittene. Ha god avstand fra snittene.
  - a. La tørke i **5 min**
  
3. Tilsett 0,05 % BSA-t på snittene i **45 min**
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Miks BSA-t før inkubering
  
4. BSA ristes og tørkes av objektivglasset.
  - a. Tørkes av med lofritt papir (Kimtect Science, Precision Wipes Tissue Wipers)
  
5. Primærantistoff tilsettes og inkuber **over natt** i kjøleskap (4°C)
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Anti-NCAM: Mus, monoklonal, 1:400
  - c. Anti-laminin: Kanin, polyklonal, 1:500
  - d. Ca 270 µl per glass
  - e. Primærantistoffene blandes i eppendorfrør sammen med BSA-t, tilsett BSA-t først.
  - f. Antistoff sentrifugeres og mikses før pipettering i eppendorfrøret, BSA-t mikses.
  - g. Eppendorfrøret mikses godt før blandingen tilsettes over snittene.
  - h. Pipettespiss byttes mellom pipettering av antistoffene for å unngå kontaminering

**Neste dag:**

6. Primærantistoff ristes og tørkes av objektivglasset.
  - a. Tørkes av med lofritt papir
  
7. Vask snitt 3x10 min i PBS-t
  - a. Objektivglass plasseres i glasskuber, som igjen plasseres på ristebrett.
  - b. PBS-t byttes mellom hver vask
  - c. Før første vask skylles objektivglassene i egen glasskube for å unngå kontaminering
  
8. PBS-t ristes og tørkes av objektivglasset.
  - a. Tørkes av med lofritt papir
  
9. Primærantistoff tilsettes og inkuberes i romtemperatur i 60 min
  - a. Objektivglassene plasseres i fuktkammer
  - b. Alexa-488 Goat-Anti Mouse (Grønn); 1:200
  - c. CF-594 Goat-Anti Rabbit (Rød); 1:200
  - d. Ca 270 µl per glass
  - e. Primærantistoffene blandes i eppendorfrør sammen med BSA-t, tilsett BSA-t først.
  - f. Antistoff sentrifugeres og mikses før pipetering i eppendorfrøret, BSA-t mikses.
  - g. Eppendorfrøret mikses godt før blandingen tilsettes over snittene.
  - h. Pipettespiss byttes mellom pipettering av antistoffene for å unngå kontaminering
  - i. Ikke pipeter fra bunnen av sekundærstoffrøret
  
10. Sekundærantistoff ristes og tørkes av objektivglasset.
  - a. Tørkes av med lofritt papir
  
11. Vask snitt 3x10 min i PBS-t
  - a. Objektivglass plasseres i glasskuber, som igjen plasseres på ristebrett.
  - b. PBS-t byttes mellom hver vask
  - c. Før første vask skylles objektivglassene i egen glasskube for å unngå kontaminering



12. PBS-t ristes og tørkes av objektivglasset.

a. Tørkes av med lofritt papir

13. Monter dekkglass over snittene

a. Unngå luftbobler

b. Bruk lim som inneholder DAPI.

c. Tørkes i avtrekkskap over natt.

OBS: Sekundære antistoff beskyttes mot lys for å unngå blekning av fluorokromene. Dette gjøres ved generell forsiktighet mot lyseksponering og ved at en eske plasseres over objektivglassene under vasking, samt ved lagring i avtrekkskap.





