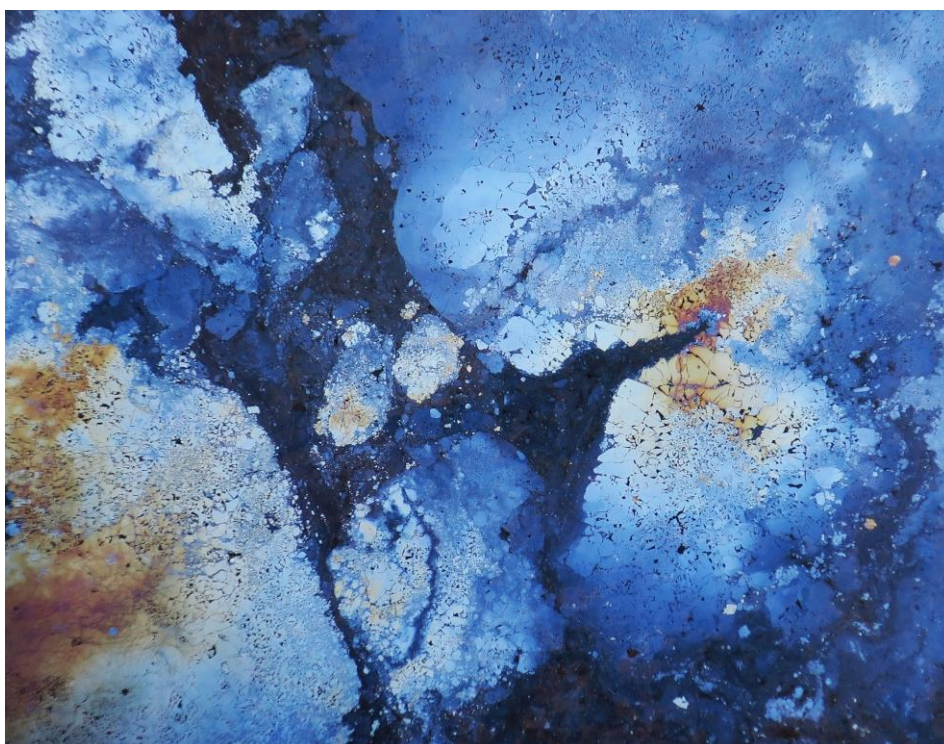


**Energimetabolisme i skjelettmuskelceller fra
smertepasienter – myokiner, smerteopplevelse og effekt
av trimetylamin N-oksid**

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Vegard Bergheim

Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer

Fakultet for medisin og helsevitenskap

Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet

Desember 2016

Veileder: Professor Vigdis Aas

Forord

Oppgaven ble utført i perioden fra august 2015 til november 2016 både ved Institutt for farmasi og bioingeniørfag ved Fakultet for helsefag, Høgskolen i Oslo og Akershus, og på seksjon for farmasøytisk biovitenskap i gydas vei 8, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke min veileder, den alltid tilgjengelige professor Vigdis Aas som har klart å motivere, inspirere til nysgjerrighet og alltid hatt tro på meg, selv når det har gått sakte med skivinga. Råd, tilbakemeldinger og ideer har vært til stor hjelp gjennom hele masterperioden.

En takk skal også rettes til dere i «Muskelbunten» ved FI i gydas vei for råd, tilbakemeldinger og lån av utstyr. Takk til Nataša Nikolić som har hjulpet meg med gjennomføringen av PCR-forsøk, og Susanna Honkanen som lot meg snike med prøver til multipleks-forsøk.

Jeg vil også takke farmasistaben i 4. etasje ved HiOA. Det er mye trygghet i å ha et så inkluderende miljø, og jeg synes det har vært fint å få delta i sammenkomstene som har vært i løpet av året her i Oslo.

I løpet av studentperioden ved NTNU i Trondheim har jeg opplevd å ha en liten, men kjempeflott gjeng i kull'14! Masse moro i skolesammenheng, men også som student generelt. Takk for en flott tid sammen; også til dere som også skrev oppgave i Oslo, med møter som innebar både mer og mindre eksklusive restaurant-besøk.

Til slutt vil jeg takke min kjære familie. Mine foreldre Synnøve og Olav har stilt opp med både motivasjon og omsorg når det trengtes, og besteforeldre har vært ivrige lyttere som har gjort det morsomt å forklare masterprosjektet.

Pilestredet, november 2016

Vegard Bergheim

Innholdsfortegnelse

Forord	III
Abstract	VI
Forkortelser	VIII
1 Innledning	1
1.1 Skjelettmuskulaturens oppbygning	1
1.2 Satellittceller.....	3
1.3 Energiomsetning i skjelettmuskel	4
1.3.1 Glukoseomsetning i skjelettmuskel.....	5
1.3.2 Lipidomsetning i skjelettmuskelceller.....	8
1.4 Metabolsk fleksibilitet.....	10
1.5 Tilstander med forstyrret energimetabolisme.....	11
1.6 Trimetylamin N-oksid (TMAO).....	12
1.7 Myokiner	12
1.7.1 IL-6.....	13
1.7.2 IL-8.....	13
1.7.3 Fraktalkin.....	14
1.7.4 MCP-1	15
1.7.5 GRO α	15
1.7.6 SDF1.....	15
1.8 Ryggsmerter	16
1.9 Hensikt med oppgaven	17
2 Materialer og metoder	18
2.1 Materialer	18
2.1.1 Kjemikalier og reagenser.....	18
2.1.2 Utstyr.....	20
2.2 Celler og donorkarakteristika	21
2.3 Opplysninger om smerte brukt i korrelasjonsanalyser	23
2.4 Etablering av cellebank	24
2.4.1 Oppskalering av celler.....	24
2.4.2 Nedfrysing av celler	25
2.5 Celledyrking	26
2.5.1 Utsåing av celler.....	26
2.5.2 Proliferasjon og differensiering.....	27
2.5.3 Forbehandling av myotuber før forsøk.....	27
2.6 Substratoksidasjonsmetoden	28
2.6.1 ¹⁴ CO ₂ trapping	28
2.6.2 Celleassosiert radioaktivitet	29
2.6.3 Radioaktive medier brukt i utførelse av metoden	30
2.7 Formler brukt til beregning av metabolske parametere.....	31
2.8 Bradfords metode for å måle proteinkonsentrasjon	31
2.9 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon	32
2.9.1 Høsting av celler.....	32
2.9.2 Isolering av RNA.....	33

2.9.3	Kvantifisering og renhetstesting av RNA med NanoDrop.....	33
2.9.4	cDNA-syntese	34
2.9.5	qPCR-kjøring.....	34
2.9.6	Kvalitetssikring av gendata	36
2.10	Kvantifisering av cytokiner med Luminex MAGPIX®	36
2.11	Statistikk	38
3	Resultater	39
3.1	Dose-respons av TMAO på energimetabolisme	39
3.2	Tidsavhengig effekt av TMAO på energimetabolisme	42
3.3	Toksiske effekter av TMAO.....	44
3.4	Karakterisering av energimetabolisme i muskelceller fra ryggopererte smertepasienter ...	45
3.5	Effekt av TMAO på muskelceller fra ryggopererte smertepasienter	47
3.6	Metabolske egenskaper og smerteopplevelse.....	48
3.7	Ekspresjon av myokiner i muskelceller fra ryggopererte smertepasienter.....	50
3.8	Korrelasjoner for cytokinene seg imellom	55
3.9	Oppsummering av korrelasjonsanalysene	56
4	Diskusjon.....	57
4.1	Vurdering av metodikken.....	57
4.1.1	Donorkarakteristika og utvalg	57
4.1.2	Smerteopplevelse og tolkning	58
4.1.3	Oppdyrking og differensiering av skjelettmuskelceller (myotuber)	58
4.1.4	Metodene brukt for å måle energimetabolisme, cytokinkonsentrasjon og genekspressjon..	59
4.1.5	Analyse av data og statistikk	60
4.2	Energimetabolisme og TMAO-effekter	61
4.3	Energimetabolisme og metabolsk fleksibilitet i ryggopererte pasienter	62
4.4	Korrelasjonsvurderinger i ryggopererte pasienter	64
4.5	Myokiner	65
4.6	Veien videre	67
5	Konklusjon.....	68
6	Referanser.....	69
	Appendikser.....	80

Abstract

Background: Dysfunctional energy metabolism in skeletal muscle is associated with obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes (T2DM) and cardiovascular diseases (CVD). Detrimental changes in energy metabolism are result of a holistic and multi-factorial cause including, but not limited to physical inactivity and composition of food intake and its impact on the microbiota. Trimethylamine N-oxide (TMAO) is a product of dietary choices, intestinal microbiota and liver capacity. TMAO has been shown to predict CVD's like heart attack and stroke by a suspected proatherogenic activity, but is also associated with T2DM. Low back pain (LBP) is also a widespread problem related to a modern lifestyle. Some cytokines hypothesized to be involved in mediating the inflammatory state that leads to pain, can also be defined as myokines regarding their secretion from skeletal muscle where many are known to have impact on energy metabolism. Based on this, relations between energy metabolism, myokine expression, experience of pain and effects of TMAO were examined in skeletal muscle cells from patients suffering from low back pain.

Methods: Satellite cells were isolated from biopsies of two groups, *musculus spinae erector* (LBP-group) and *m. obliquus internus abdominis* (healthy individuals). The cells were cultured, proliferated and differentiated into multinuclear myotubes. During differentiation, the cells were pretreated with [TMAO] in the range of 1 μ M – 100 mM over 0-96 hours. Glucose and lipid metabolism were studied using radiolabeled D-[14 C(U)]glucose and [1- 14 C]oleic acid, respectively. Data on self-reported experience of pain were gathered from a questionnaire answered by patients in prior to surgical intervention for treatment of LBP. Relations between myokine secretion, energy metabolism, self-reported experience of pain, and patient data was studied in the group of LBP. Myokine secretion of fractalkine (CX3CL1), interleukine-6 (IL-6), IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), SDF-1 (CXCL12) and GRO α (CXCL1) were measured with multiplexed immunoassay, while gene expression of IL-6 and IL-8 were studied using quantitative polymerase chain reaction.

Results/conclusion: TMAO had minimal effects on glucose and lipid metabolism, and no differences by TMAO-effects were found between the groups of LBP and healthy individuals. The degree of experienced LBP correlated with suppressibility, a parameter describing metabolic flexibility. Higher degrees of pain were found to have negative impact on the uptake and oxidation of glucose, and uptake of oleic acid was increased in the LBP group in comparison to the group of healthy individuals. Skeletal muscle cells from the group of LBP secreted all the tested myokines, but none correlated with degree of experienced LBP. However, fractalkine (CX3CL1) correlated to body mass index (BMI) in the group of LBP, where higher BMI correlated with lower levels of fractalkine.

Sammendrag

Bakgrunn: Dysfunksjonell energimetabolisme i skjelettmuskel er assosiert med fedme, metabolsk syndrom, type 2-diabetes (T2DM) og hjerte- og karsykdommer (HKS). Fysisk inaktivitet, sammensetningen av kosthold og kostholdets virkning på tarmfloraen er blant flere faktorer med en sammensatt natur som kan ha skadelig virkning på energimetabolismen. Det er blitt vist at trimetylamin N-oksid (TMAO) predikerer forekomst av HKS, og at det muligvis kan ha en aterogen effekt. TMAO er også assosiert med T2DM. Mengden TMAO som dannes i kroppen er avhengig av kostholdsvalg, tarmflora og leverkapasitet. Langvarige korsryggsmerter (low back pain, LBP) er også et omfattende problem relatert til vår moderne livsstil. Cytokiner kan være inflammasjonsmediatorer der noen er antatt å spille en viktig rolle i å påvirke nocisepsjon, men flere av disse skilles også ut fra skjelettmuskel der de bidrar i regulering av energimetabolisme. Med bakgrunn i dette ble sammenhenger mellom energimetabolisme, myokinuttrykk, smerteopplevelse og effekt av TMAO studert i skjelettmuskelceller fra smertepasienter med langvarige korsryggsmerter.

Metode: Satellittceller ble isolert fra biopsier fra *musculus spinae erector* i ryggopererte pasienter, og *m. obliquus internus abdominis* i friske frivillige. Muskelcellene ble dyrket opp og differensiert til myotuber. I løpet av differensieringsperioden ble cellene forbehandlet med TMAO i konsentrasjoner fra 1 μ M til 100 mM i 0 til 96 timer. Glukose og lipidmetabolisme ble undersøkt ved å benytte radiomerket D-[14 C(U)]glukose og [$1-^{14}$ C]oljesyre. Et spørreskjema ble fylt ut av de ryggopererte pasientene før operasjon, og forhold mellom myokinuttrykk, energimetabolisme og data på selvrapportert smerteopplevelse ble undersøkt. Utskillelse av fraktalkin (CX3CL1), interleukin-6 (IL-6), IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2), SDF-1 (CXCL12) og GRO α (CXCL1) ble undersøkt med multiplex immunoassay, mens genuttrykk av IL-6 og IL-8 ble undersøkt ved å benytte kvantitativ polymerase-kjedereaskjon.

Resultater/konklusjon: TMAO hadde minimale effekter på glukose og lipidmetabolisme, og det var ingen forskjeller på gruppen av friske frivillige og ryggopererte pasienter. Grad av smerteopplevelse korrelerte med suppressibilitet, en parameter som beskriver muskelens grad av metabolsk fleksibilitet. Høyere grad av opplevde ryggsmerter var forbundet med redusert glukoseopptak og -oksidasjon, men opptak av oljesyreoksidasjon var høyere i gruppen bestående av ryggopererte pasienter. Skjelettmuskelceller fra ryggopererte pasienter skiller ut alle myokinene det ble testet for, men ingen korrelerte med smerteopplevelse. Høyere BMI korrelerte med lavere utskillelse av fraktalkin.

Forkortelser

36B4	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
β -HAD	β -hydroxy acyl CoA dehydrogenase
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ACS	Acyl-CoA-syntase
ADP	Adenosin difosfat
AMP	Adenosin monofosfat
AMPK	5'-AMP-aktivert proteinkinase
AS160/TBC1D4	"akt-substrate of 160kDA"
ATP	Adenosin-5'-trifosfat
ATGL	Fettvevs triglyserid lipase
BMI	Kroppsmasseindeks
BSA	Bovint serumalbumin
C2C12	Cellelinje fra mus
CA	Celleassosiert radioaktivitet
CACT	Karnitin:acylkarnitin-translokase
CD36/FAT	"Cluster of differentiation 36"/Fettsyretranslokase
CPT1	Karnitin palmitoyltransferase-1
Ct	Syklusenes terskelverdi
DAG	Diacylglyserol
DEPC	Dietyldikarbonat
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle medium"
DMSO	Dimetylsulfoksid
ETK	Elektrontransportkjeden
FA	Fettsyre
FABP	Fettsyrebindende protein
FADH ₂	Redusert form av flavin-adenin-dinukleotid (FAD)
FATP	Fettsyre-transportprotein
FBS	Føtalt bovint serum
FCS	Føtalt kalveserum
FMO3	Flavin monooxygenase-isoform 3
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase
Glu	Glukose

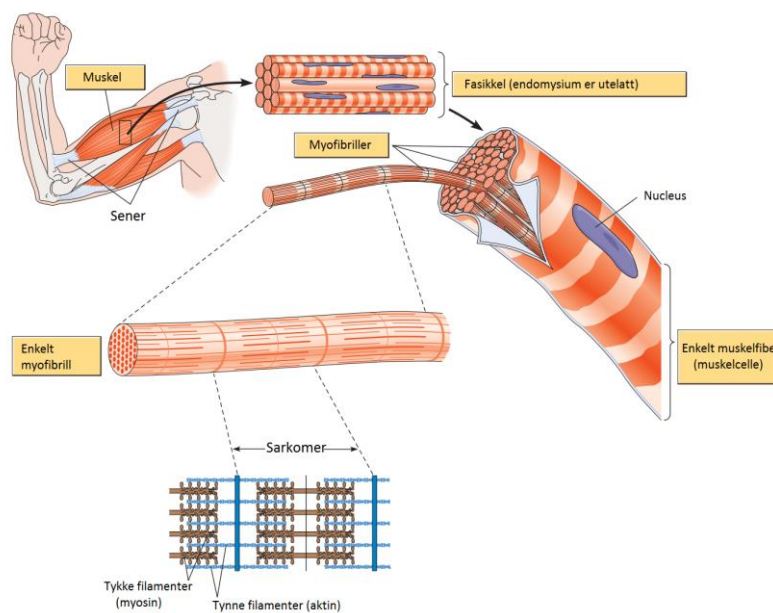
G6P	Glukose-6-fosfat
GLUT	Glukosetransportør
HBSS	Hanks bufrede saltløsning
HK	Heksokinase
HKS	Hjerte- og karsykdom
HSL	Hormonsensitiv lipase
IL	Interleukin
IMTG	Intramuskulært triacylglycerol
IR	Insulinresistens
IRS	Insulinreseptorsubstrat
IVD	Intervertebral disk
L6	Cellelinje fra rotte
LAF	Laminær luftstrøm
LBP	”Low back pain”
LCFA	Langkjedete fettsyrer
LD	Lipiddråper
LPS	Lipopolysakkarid
MAG	Monoacylglyserol
MAPK/ERK	Mitogen aktivert proteinkinase/Ekstracellulær signalregulert-kinase
MBAA	”Multiplex bead array assays”
MetS	Metabolsk syndrom
MHC	Myosinets tunge kjede
MO	Monocytt
M ϕ	Makrofag
NADH	Redusert form av nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD ⁺)
NF κ B	Kjernefaktor kappa B
Numeric	”numeric rating scale”
OA	Oljesyre
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PBS	Fosfatbufret saltvann
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFK-1	Fosfofrukto-1-kinase
PI3K	Fosfoinositid 3-kinase
P _i	Inorganisk fosfor

PKB/Akt	Proteinkinase B
qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
SkGM	Skjelettmuskelcelle-vekstmedium
SC	Satellittcelle
T2DM	Type 2-diabetes
TAG	Triacylglyserol
TCA	Sitronsyresyklus
TMA	Trimetylamin
TMAO	Trimetylamin N-oxid
TNF α	Tumor nekrose faktor α
VAS	Visuell analog skala

1 Innledning

1.1 Skjelettmuskulaturens oppbygning

Skjelettmuskulaturen er den viljestyrte muskeltypen som utfører motorarbeidet i bevegelsesapparatet vårt. Det er over 600 separate muskler som alle er bygd opp av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Hver muskel er bygd opp av flere mindre enheter og underenheter i et tettpakket system som muliggjør gjennomgående innervering og blodsirkulasjon. Fasikler er bunter av muskelfibre (omsluttet av endomysium) som igjen utgjøres av myofibriller (Figur 1.1). Myofibrillene er repeterende serier av sarkomere som er den minste enheten og gir muskelen dens tverrstripede mønster. Hver muskel og dens fasikler er omsluttet av en bindevevshinne (muskelfacie) for å tillate friksjonsfri bevegelse under kontraksjon (Figur 1.1) [1, 2].

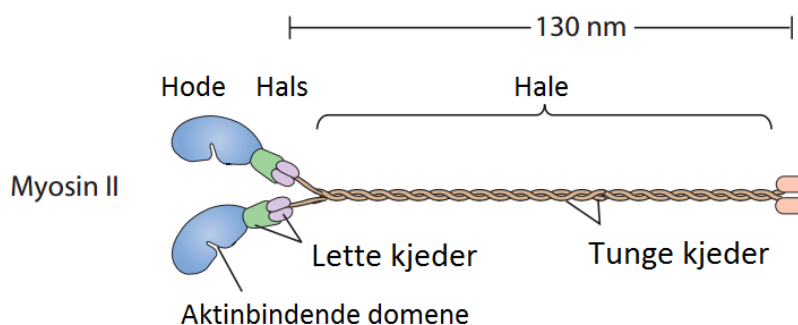


Figur 1.1: Oppbygning av skjelettmuskulatur fra den minste funksjonelle enhet av sarkomer til myofibrill, muskelfiber, muskelceller og hel muskel. Modifisert fra [2].

Sarkomeren er den funksjonelle grunnenheten der to typer filamenter i interaksjon med hverandre vil føre til en sammentrekning som følge av et stimuli fra det somatisk-motoriske nervesystemet. De to filamenttypene har ulike oppgaver i sarkomeren og deles grovt inn i tykke (myosin) og tynne (aktin) filamenter. Ved nervestimulering vil aksjonspotensialet føre til at sarkoplasmatiske retikulum som omslutter myofibrillene frigjør kalsiumioner (Ca^{2+}) til cytosol. Høy nok konsentrasjon av Ca^{2+} eksponerer bindingssetene på aktin for myosinhodene på de tykke filamentene. Prosessen som fører til kontraksjon består av gjentatte sykluser med myosinhoder som vandrer langs aktin, og hver

syklus krever energi som skaffes til veie ved at myosinhodene hydrolyserer ATP til ADP og P_i . Etter et visst antall sykler vil de overlappende filamentene ha samme lengde som før, men overlappingen utgjør en sammentrukket sarkomer som tar mindre plass. Ved hvile vil Ca^{2+} pumpes ut av cytosol, og bindingssetene i aktin skjules for myosinhodene som mister kontakt med disse, og muskelen kan strekkes ut igjen [1].

Skjelettmuskulaturen er en sammensetning av ulike fibertyper som er med å bestemme muskelens fysiologiske egenskaper. For å skille ulike fibertyper fra hverandre ble et klassifiseringssystem basert på tre ulike isoformer av myosinets tunge kjede (Figur 1.2) tatt i bruk, et system introdusert av Brook og Kaiser i 1970 [3]. Per i dag er det identifisert flere enn disse tre muskelfibertypene, men de kan grovt deles inn i type 1 og type 2 som begge forekommer i human skjelettmuskulatur [4]. Forskjellene ligger i kontraksjonshastighet, utholdenhet og energiomsetning, som naturlig nok har sammenheng med hverandre. Type 1-fibre kontraherer langsomt og type 2 raskt. Type 1-fibre har høyest oksidativ kapasitet som følge av høyt innhold av mitokondrier, med preferanse for lipider som energikilde ved hvile og moderat arbeid. Type 2-fibre er mer glykolytiske, men er igjen inndelt med tanke på oksidativ kapasitet der type 2B-fibre (finnes i gnagere) har lavest mitokondrienivå. De henter derfor mest energi fra glykolysen, noe som gjør dem mest utsatt for utmattelse [1]. Fibre av type 2A og den nært beslektede (og mindre uttrykte) type 2X er raske-oksidative, og forekommer begge i human skjelettmuskulatur. Disse ligger et sted imellom type 1- og 2B-fibre med tanke på mitokondrienivå og oksidativ kapasitet, der type 2X er mindre oksidativ enn type 2A [5].



Figur 1.2: Myosin består av tung kjede, lett kjede og myosinhode med aktinbindende domene. Myosin opptrer i ulike isoformer med forskjellig ATPase-aktivitet i de tunge kjedene. Denne aktiviteten sammenfaller med fiberets kontraksjonshastighet og vil sammen med flere andre forhold bestemme muskelens egenskaper. Modifisert fra [2].

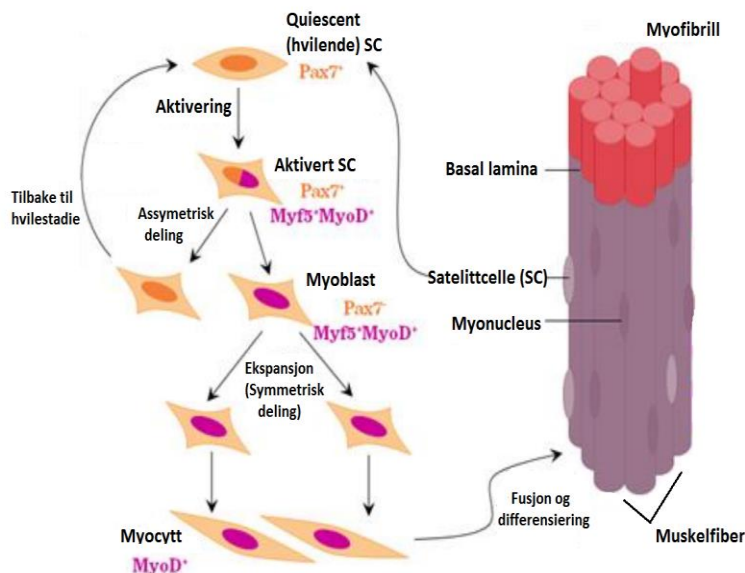
Fibertypesammensetningen er vist å være forskjellig mellom menn og kvinner. Human muskulatur består hovedsakelig av en blanding av type 1 og type 2A med en mindre andel 2X-fibre.

Undersøkelse av vev tatt fra den ytre brede lårmuskelen (*m. vastus lateralis*) har vist at menn har

mer av type 2A i forhold til type 1, mens kvinnene har mest av type 1 i forhold til type 2A [6]. Utover den genetiske bakgrunnen har skjelettmuskulaturen i friske individer god evne til å tilpasse seg miljørelaterte endringer. Plastisitet innebærer at både fibervolum og fibertypesammensetningen kan forandre seg for å kompensere for endringer i funksjonelle krav til kontraktilitet [4], men som det blir nevnt senere, så vil det også medføre endringer i metabolske egenskaper.

1.2 Satellittceller

Myotuber i kultur er en etablert *in vitro*-modell brukt i studier av skjelettmuskelceller (nylig oppsummert av Aas et al. [7]). Isolerte satellittceller (SC) kan aktiveres til prolifererende myoblaster, som videre differensieres til flerkjernede myotuber (Figur 1.3).



Figur 1.3: Plassering og aktivering av satellittceller i en myofibrill. Satellittceller gjennomgår assymetrisk deling og uttrykker ulike markører (Pax7, Myf5, MyoD) på forskjellige nivåer i utviklingen mot myocyt som fusjonerer med eksisterende myofibriller. Modifisert fra [8].

Satellittceller har navnet sitt fra posisjonen i den basale lamina som omslutter myofibrillet. Deres biologiske funksjon er å delta i myogenesen under fosterlivet og videre muskelvekst, eller regenerere muskelvev som følge av sykdom, skade eller trening (Figur 1.3) [9]. Satellittcellene gjennomgår assymetrisk deling der den ene dattercellen forblir en hvilende (quiescent) satellittcelle, mens den andre aktiveres til en prolifererende myoblast. Denne kan fusjonere med andre myoblaster og danne flerkjernede myotuber, men også fusjonere med preeksisterende muskelfibre [10]. I voksen skjelettmuskulatur er antallet av satellittceller derfor tilnærmet konstant gjennom sykler med degenerering og regenerering av muskulaturen, men i rotter er det observert at antallet satellittceller reduseres med økende alder [11].

Satellittceller er vist å være velegnede til eksperimentell bruk siden de kan differensieres *in vitro* til myotuber som har liknende egenskaper som muskler *in vivo* [12]. Myotuber innehar store likheter med ferdig utviklede skjelettmuskelfibre, og uttrykker viktige proteiner involvert i energiomsetning i større grad enn myoblaste [13]. Det er også vist at sammensetningen av isoformene til de tunge myosinkjedene (MHC) i differensierte myotuber fra mus var identiske med sammensetningen i den voksne skjelettmuskulaturen som satellittcellene ble tatt fra [5]. Myotuber i kultur viste også evne til å respondere på miljøforandringer introdusert *in vitro*, og viser dermed å inneha plastisitetspotensiale [14, 15].

Satellittcellene som ble brukt i denne masteroppgaven var av humant opphav der biopsier ble tatt fra mage- eller ryggmuskulatur. Disse ble isolert og dyrket opp etter en modifisert protokoll etablert av Gaster et al. (se appendiks) [12]. Satellittcellene er, som allerede nevnt, det nærmeste man kommer en modell for skjelettmuskulatur *in vitro*. Det genetiske grunnlaget er ivaretatt, og flere studier har vist at satellittcellene trolig bevarer fenotypiske modifikasjoner vertikalt mellom cellegenerasjoner fra vev til kultiverte celler [16, 17], hvor effekten på genregulering trolig kan tilskrives epigenetikk [18,19]. Slik kan muligens både biopsidonorens genetiske bakgrunn og virkningen av relevante miljøbetingelser som kosthold og aktivitetsnivå studeres i cellekulturer.

Ved bruk av myotubmodellen er det likevel en rekke begrensede aspekter som bør trekkes inn til tross for velegnet genotypisk utgangspunkt. Celler i kultur er i fravær av sitt normale mikromiljø, der samspill og ekstern signalering med annet vev spiller en viktig rolle. Cellene mangler innervasjon, blodforsyning og dermed hormonell påvirkning. Primære humane myotuber er generelt karakterisert ved at de foretrekker karbohydrater fremfor lipider som energikilde, og virker å være mindre insulinsensitive som følge av de hovedsakelig differensieres til de glykolytiske type 2-fibrene [7, 20]. Uansett er det viktig å trekke frem at modellen er mer relevant ved studier av menneskelige sykdomstilstander enn med celler tatt fra dyr, som L6 fra rotte og C2C12 fra mus.

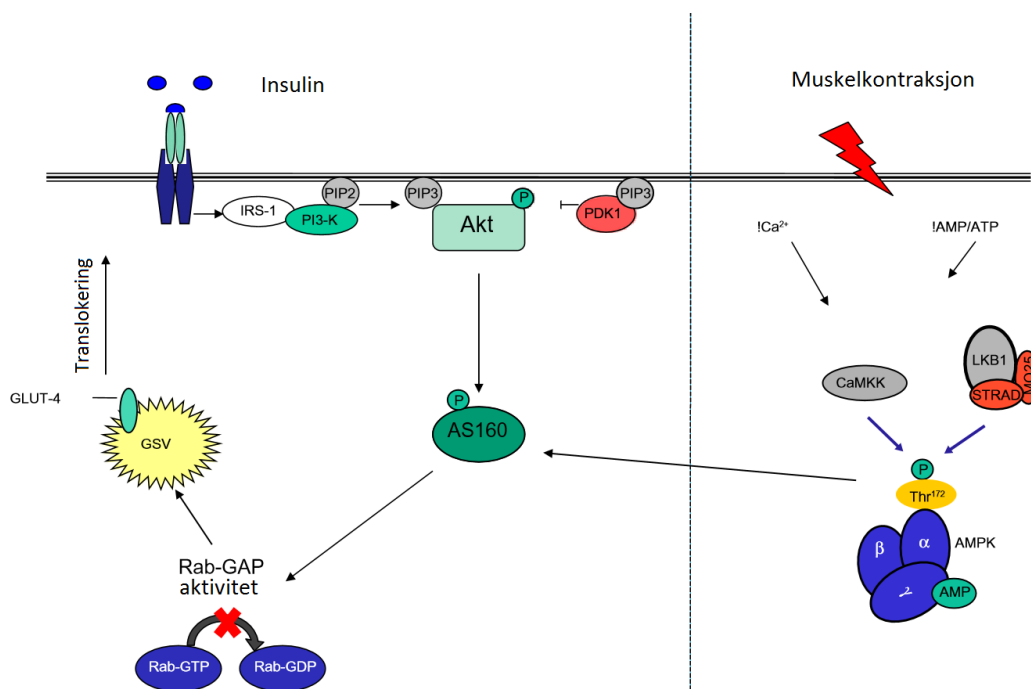
1.3 Energiomsetning i skjelettmuskel

Når skjelettmuskulaturen utfører arbeid omdannes kjemisk lagret energi til varme og mekanisk energi. Varmeutviklingen kan enten være hensiktsmessig som del av termoreguleringen, eller et overskudd som må ledes bort. Skjelettmuskulaturen er det vevet som er mest involvert i oksidasjon av glukose og fettsyrer, og det stilles kontinuerlige krav fra omgivelsene der skjelettmuskulaturen må respondere på miljøforandringer som påvirker varmebehov, energiforbruk og energitilgang. Av

den totale kroppsmassen utgjør skjelettmuskulaturen ca. 40% i en normalvektig, voksen person, og den står for ca. 30% av kroppens totale energiforbruk ved hvile, og ca. 70% under fysisk aktivitet [21, 22]. Med denne evnen til å i tillegg øke energiforbruket under trening har skjelettmuskel derfor potensielt stor innvirkning på total energiomsetning i kroppen, og er følgelig blant hovedaktørene i å opprettholde normal glukosehomeostase *in vivo*.

1.3.1 Glukoseomsetning i skjelettmuskel

Det insulinstimulerte glukoseopptaket i skjelettmuskulatur er en viktig del av kroppens evne til å opprettholde glukosebalansen etter måltid, samt ved økt energibehov i forbindelse med fysisk aktivitet. Glukosetransport gjennom cellemembranen er det hastighetsbestemmende trinnet i glukosemetabolismen i skjelettmuskel, og det skjer ved fasilitert diffusjon ned en konsentrasjonsgradient gjennom bestemte glukosetransportører (GLUT) [23]. Til nå er det identifisert 15 ulike isoformer av GLUT og minst fem er uttrykt i skjelettmuskel (GLUT1, 4, 5, 8 og 11), der GLUT1 og GLUT4 er vist å ha størst betydning for glukosetransporten inn i skjelettmuskelceller [24]. GLUT1 er relativt lavt uttrykt, men det er antatt at denne isoformen er ansvarlig for basalopptaket av glukose under faste og hvile [25], mens det ved tilsvarende basaltilstand bare er 3-10% av GLUT4 som er lokalisert i plasmamembranen. Mer enn 90% av GLUT4 er lokalisert i intracellulære vesikler og utilgjengelig for glukosetransport, men som følge av insulinstimulering og/eller muskelkontraksjoner vil GLUT4 translokere til cellemembranen, og sådan bli den dominerende glukosetransportøren (Figur 1.4) [26, 27]. Glukoseopptaket kan grovt sett deles inn i insulinavhengig og insulinuavhengig der glukosetransporten inn i cellene hovedsakelig er insulinavhengig ved at GLUT4 translokere til cellemembranen gjennom en kompleks signaleringskaskade (Figur 1.4) [28]. Det insulinuavhengige glukoseopptaket forutsetter muskelkontraksjon som innebærer kalsiumfrigjøring og hydrolyse av ATP. Ved høyt energiforbruk, som ved trening, øker nivået av AMP (og ADP) i større grad enn ATP i cellen og fører til aktivering av 5'-AMP-aktivert proteinkinase (AMPK), som blant flere oppgaver fungerer som energisensor i cellen [29]. En av effektene av AMPK-aktivering er direkte fosforylering av «akt-substrate of 160kDa» (AS160/TBC1D4), et protein som også er sentralt i den insulinstimulerte signaleringskaskaden [30].

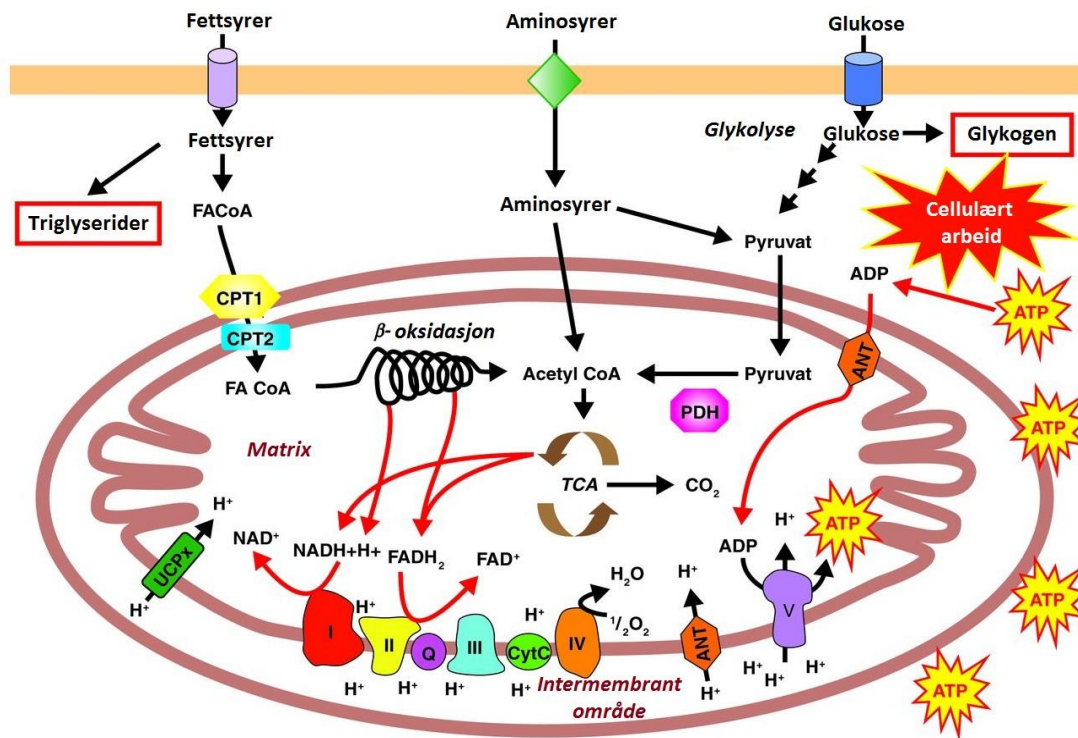


Figur 1.4: Vesikler med GLUT4 rekrutteres og translokeres til cellemembranen ved insulinsignalering, og ved muskelkontraksjon som medfører aktivering av AMPK og fosforylering av AS160. IRS, insulin reseptor substrate; PI3-K, fosfatidylinositol 3-kinase; PIP2, fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat; PIP3, fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfate; PDK1, fosfoinositid-avhengig protein kinase-1; Akt/PKB, serin/threonin protein kinase; AS160, 160 kDa Akt substrat; GLUT4, glukose transportør 4; GSV, GLUT4-lagrende vesikkel; Rab-GAP, Rab-GTPase-aktiverende protein; Rab-GDP, guanosin-50-difosfat-bundet Rab; Rab-GTP, guanosin-50-trifosfat-bundet Rab; CaMKK, Ca²⁺/calmodulin-avhengig protein kinase kinase; LKB1, Serin/threonin kinase 11; STRAD, «putative» kinase; MO25, mouse protein 25/scaffold protein; AMPK, 5'-monophosphate-aktivert protein kinase; Thr172, fosforylert AMPK α på threonin 172; AMP, adenosinmonofosfat; ATP, adenosintrifosfat; P, fosforylert sted. Modifisert fra [28].

Insulin utøver sin funksjon ved å binde seg til α -subenheten på insulinreseptoren (IR), som fører til en konformasjonsendring i reseptorens intracellulære β -subenhet. Dette øker tyrosin-kinaseaktiviteten på intracellulær side, noe som vil fosforylere insulinreseptorsubstrater (IRS), der IRS-1 har vist seg å være viktigst ved translokering av GLUT4 i skjelettmuskel [31]. Fosforylert IRS fungerer som en sekundær budbringer, og aktiverer fosfoinositid 3-kinase (PI3K) blant flere nedstrøms signalveier som RAS-MAPK. PI3K er blant signalveiene som er hovedansvarlig for insulineffekter på glukose-, lipid- og proteinmetabolisme og fosforylerer fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat (PIP₂) til fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat (PIP₃). Fosfoinositidavhengige kinaser (PDK) blir aktivert av PIP₃ som igjen fosforylerer og aktiverer Akt, også kjent som proteinkinase B (PKB). Aktivert Akt fosforylerer AS160 som da blir inaktivert. Aktivt AS160 er vist å inaktivere Rab-

proteiner som tillater vesikkeltransport langs mikrotubuli, og en inaktivering av AS160 vil tillate translokering av GLUT4 til cellemembranen [30].

I cytosol kan glukose ta ulike veier avhengig av energietterspørsel og oksygentilgang [32]. Først fosforyleres glukose av heksokinase til glukose 6-fosfat (G6P), og kan enten omdannes til to pyruvatmolekyler gjennom glykolysen eller bli lagret i muskel og lever som glykogen ved glykogensyntesen (Figur 1.5). Ved energiforbruk og utilstrekkelig tilgang på oksygen kan pyruvat omdannes anaerobt til laktat i cytoplasma mot et lite ATP-overskudd, hvor laktat deretter må transporteres ut av muskelcellene for bruk som substrat i glukoneogenese i leveren. Ved god tilgang på oksygen tas pyruvat opp i mitokondriene der det omdannes til acetyl-CoA og NADH₂, der NADH₂ senere oksideres i elektrontransportkjeden (ETK) ved oksidativ fosforylering (OXPHOS). Acetyl-CoA kan herfra enten omdannes til citrat og utnyttes i lipogenesisen til biosyntese av fettsyrer og triacylglycerol (TAG), eller at acetyl-CoA går inn i sitronsyresyklusen (TCA) der CO₂ avgis som avfallsprodukt. Utbyttet fra TCA er reduksjonsreaksjoner av energibærende molekyler til ATP-dannelse, NADH₂, FADH₂ og karbonforbindelser som er viktig utgangspunkt for anabole cellulære prosesser. OXPHOS er det siste trinnet i metabolismen av glukose og fettsyrer, og prosessen er regulert av energietterspørsel avhengig av ADP-nivå. Som tidligere nevnt mottar ETK elektroner fra NADH₂ og FADH₂ for å kunne frakte protoner fra matrix til det intermembrane området i mitokondriene (Figur 1.5) med samtidig varmeutvikling. Denne protongradienten driver ATPase til omdanning av ADP og Pi til en mengde ATP som dekker rundt 70-90% av cellens energietterspørsel [33]. Elektrontransportkjeden består av fire komplekser (I-IV), der kompleks IV til slutt bruker elektronene sammen med protonene fra ATP-syntesen til reduksjonen av molekylært oksygen til vann som sammen med det tidligere frigjorte CO₂ er de endelige sluttproduktene fra aerob celleånding [32].

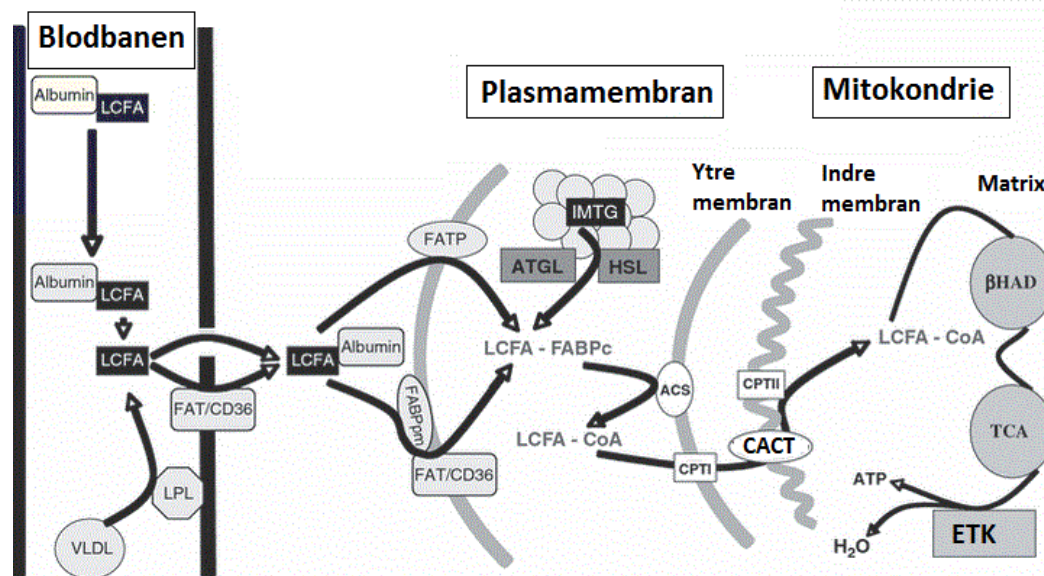


Figur 1.5: Forenklet oversikt over opptak og omsetning av glukose, fett og aminosyrer i muskel. Fett og glukose kan lagres, eller inngå i ATP-dannende prosesser avhengig av forhold i energitilgang og -etterspørsel. I-IV, kompleks I-IV i ETK; ANT, Adenin nukleotid reseptor; ADP, adenosindifosfat; ATP; adenosintrifosfat; CPT, karnitin-palmitoyltransferase; CYC1, cytokrom c-1; DAG, diasylglyserol; ETK, elektrontransportkjeden; FA CoA, fettsyre koenzym A; FAD⁺, flavinadenindinukleotid - oksidert; FADH₂, flavinadenindinukleotid - redusert; H⁺, proton; MAG, monoasylglyserol; NAD⁺, nikotinamid-adenin-dinukleotid - oksidert; NADH₂, nikotinamid-adenin-dinukleotid - redusert; OXPHOS, oksidativ fosforylering; PDH, pyruvat dehydrogenase; TAG, triasylglyserol; TCA, trikarboksylsyresyklus; UCPx, frikoblerproteiner. Modifisert fra [33].

1.3.2 Lipidomsetning i skjelettmuskelceller

Fettsyrer (FA) er mer kjemisk redusert enn karbohydrater molekylært sett, og vil i teorien frigjøre mer energi ved fullstendig oksidasjon [33]. Energien lagret i FA er ikke like raskt tilgjengelig som i karbohydrater som kan delta mer direkte i anaerob ATP-dannende glykolyse, og hovedoppgavene til fett i skjelettmuskel er å tjene som energikilde ved hvile og moderat muskelarbeid [34]. Fett kan lagres i skjelettmuskel som intramuskulært triacylglycerol (IMTG), og utgjør 1-2% av kroppens samlede fettlagre [35, 36]. Til tross for dette er fettsyremetabolisme i muskel gjenstand for mye forskning siden dysregulering i skjelettmuskulatur er knyttet til metabolske forstyrrelser som følge av insulinresistens [33, 35]. I motsetning til glukose som kan omdannes til FA, skjer ikke det omvendte i en grad som er relevant for energiomsetningen, og et vedvarende energioverskudd fra karbohydrat- og fettinntak kan føre til akkumulering av intracellulære lipidmetabolitter utover det

som er hensiktsmessig i muskelvev, noe som er vist å redusere mitokondrienes oksidasjonsevne [33]. Økte mengder frie fettsyrer (FFA) i plasma er en følge av overskredet lagringskapasitet i fettvev, lever og muskel, og er assosiert med lipotoksisk insulinresistens og aktivering av inflammatoriske cytokiner [37].



Figur 1.6: Lipidtransport og metabolisme i skjelettmuskel. Fettsyrer kan lagres intracellulært som energireservoar i muskel, og blir lagret som lipiddråper (LD) av IMTG. Videre transport inn i mitokondriene er avhengig av transportproteiner. ATGL, fettvevs triglyserid lipase; HSL, hormon sensitiv lipase; TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; LCFA, langkjedet fettsyre; FATP, fettsyre transportprotein; FABPpm, plasmamembranassosiert fettsyrebindende protein; FAT/CD36, fettsyre translokase; FABPc, cytosolisk fettsyrebindende protein; VLDL, very low-density lipoprotein; LPL, lipoprotein lipase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; CACT, karnitin:acylkarnitin-translokase; ETK, elektrontransportkjeden; TCA, trikarboksylsyresyklus; β -HAD, β-hydroxy acyl CoA dehydrogenase; ATP, adenosintrifosfat. Modifisert fra [38].

Fettvevets triglyserid lipase (ATGL), og hormonsensitiv lipase (HSL) er begge nøkkelenzymer involvert i nedbrytning og mobilisering av intracellulært TAG i både muskel (som IMTG) og fettvev. HSL medierer i større grad nedbrytning til FA og diacylglycerol (DAG) i myocytter, mens ATGL tar del i mobiliseringen av TAG fra fettvev til blodet i form av frie fettsyrer (FFA) [39]. Fettsyrer kan transporteres inn i cytosol via passiv diffusjon eller ved hjelp av aktiv transport ved proteiner som membranbundet «fatty acid binding protein» (FABPpm) og «cluster of differentiation 36»/fettsyretranslokase (CD36/FAT), eller «fatty acid transporting protein» (FATP) (Figur 1.6). De langkjedete fettsyrene (LCFA) er imidlertid avhengig av aktiv transport. I cytosol blir FA transportert av FABPc før det omdannes til acyl-CoA av acyl-CoA-syntase (ACS) som befinner seg i mitokondrienes yttermembran. Avhengig av energibehovet kan acyl-CoA transporteres inn i

mitokondriene for beta-oksidasjon, eller til endoplasmatisk retikulum for reforestring og lagring i LD [40]. For å kunne transporteres inn i mitokondrien må acyl-CoA først omdannes til langkjedet acylkarnitin. Dette gjøres av karnitin palmitoyltransferase (CPT1) i mitokondriens yttermembran, som er det hastighetsbestemmende trinnet i betaoksidasjon av FA [41]. Acylkarnitin kan så passere mitokondriens innermembran gjennom antiporten karnitin:acylkarnitin-translokase (CACT) i bytte mot fritt karnitin. Inne i mitokondriematriksen blir acylkarnitin så spaltet tilbake til karnitin og acyl-CoA av enzymet karnitin palmitoyltransferase 2 (CPT2), der karnitinet tar ovennevnte vei gjennom CACT, mens acyl-CoA blir oksidert til acetyl-CoA. Oksidasjonen av acyl-CoA skjer ved Acyl-CoA dehydrogenaser (ACADs), hvor spesielt β -hydroxy acyl CoA dehydrogenase (β -HAD) spiller en nøkkelrolle. Disse bruker energibæremolekylene NAD⁺ og FAD som elektronakseptorer hvor utbyttet av NADH₂ og FADH₂ går direkte inn i ETK, og acetyl-CoA går gjennom TCA-syklusen som beskrevet for glukosemetabolisme [38].

1.4 Metabolsk fleksibilitet

Skjelettmuskulatur regulerer energiforbruk og -kilde i henhold til muskelaktivitet og energitilgjengelighet. Ved faste er energiinntaket redusert, og skjelettmuskelen benytter da hovedsakelig fettsyrer som energikilde. Glukseoksidasjonen økes, og lipidoksidasjonen reduseres som respons på økt insulinstimulering ved blodglukoseøkning postprandialt. Metabolsk fleksibilitet er skjelettmuskels evne til å bytte mellom substrat avhengig av forholdene. Ukropcova et al. har definert parametere som forsøker å beskrive aspekter ved metabolsk «switching» i studier på humane myotuber *in vitro*. Suppressibilitet ble definert som cellens evne til å undertrykke fettsyreoksidasjon ved akutt tilsetning av glukose, mens adapterbarhet ble definert som cellens evne til å øke fettsyreoksidasjon med økt fettsyretilgjengelighet [15]. Et tredje korrelat, substratregulert fleksibilitet beskriver skjelettmuskelcellens evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved skifte fra næringstilstand (liten tilgang på FA, mye glukose) til faste (god tilgang på FA, lite glukose) [42]. I denne oppgaven vil suppressibilitet- og adapterbarhetskorrelatene bli brukt for å beskrive egenskaper knyttet til metabolsk fleksibilitet.

Studier har vist at individuelle forskjeller i metabolsk fleksibilitet både kan tilskrives genetiske og livsstilsrelaterte årsaker [43, 44]. Eventuell sammenheng mellom *in vivo* muskelfunksjon og parametere for metabolsk fleksibilitet *in vitro* kan være nyttige for å studere tilstander som kjennetegnes av forstyrret metabolisme som fedme, metabolsk syndrom (MetS), insulinresistens (IR) og type 2-diabetes (T2DM) når det er vist at frisk skjelettmuskel kjennetegnes ved å være

metabolsk fleksibel [45, 46]. Studier har vist at *in vitro* suppressibilitet er motsatt korrelert med insulinsensitivitet og metabolsk fleksibilitet *in vivo*, mens adapterbarhet var positivt korrelert [15].

Randle et al. presenterte i 1963 en hypotese kalt glukose-fettsyresyklusen. Hypotesen forsøker å forklare muskelvevs preferanse for glukose eller fettsyrer der det ene undertrykker det andre avhengig av det respektive substrats tilgjengelighet [47]. Fettsyreoksidasjonen i muskel er vist å være avhengig av tilgjengelighet på frie fettsyrer, der økt tilgjengelighet fører til en økt fettsyreoksidasjon som videre undertrykker glukosemetabolismen. Det omvendte, omtalt som en reversering av glukose-fettsyresyklusen forekommer også, der en økning i glukosetilgjengeligheten undertrykker fettsyremetabolismen. Det er flere teorier som presenterer mekanistiske forklaringer på hvordan en slik regulering kan foregå, og flere studier tyder på at dette forekommer i mennesket [48, 49, 50].

I tillegg til at en økning i FFA hemmer pyruvat dehydrogenase (PDH), det hastighetsbestemmende trinnet i glykolysen, kan blant annet citrat fra mitokondriell nedbrytning av FA unngå oksidering og transporteres ut i cytosol hvor det direkte hemmer flere steg i glykolysen. Det første via 6-fosfofrukto-1-kinase (PFK-1), noe som vil føre til en hemming av heksokinase (HK) via tilbakekopling når dets produkt, glukose-6-P akkumulerer. HK hemmes også direkte av citrat [51]. Omvendt kan glukose hemme fettsyremetabolismen i skjelettmuskel ved økning i intracellulær konsentrasjon av malonyl-CoA. Malonyl-CoA interfererer allosterisk med CPT-1, og inhiberer det hastighetsbestemmende trinnet for transport av fettsyrer inn i mitokondriene [33]. Malonyl-CoA-økningen må i denne sammenheng være som følge av økt glukoseopptak og -metabolisme, der insulinfrigjøring og -respons er en forutsetning [52].

Et annet aspekt ved metabolsk fleksibilitet *in vivo* er hvilke substrat som foretrekkes ved endring i intensitet av muskelarbeidet. Lavintensiv trening over lengre tid favoriserer en økt utnyttelse av lipider fremfor glukose, mens det ved økende intensitet vil forekomme en økt substratpreferanse for glukose, på bekostning av lipider [35].

1.5 Tilstander med forstyrret energimetabolisme

Ved insulinresistens og type 2-diabetes er energimetabolismen forstyrret, både glukose- og lipidmetabolismen. Insulinstimulert glukoseopptak i muskler er redusert, mitokondriell aktivitet er vist å være redusert [53], og muskulaturen er blant annet mindre metabolsk fleksibel [54]. Utvikling av insulinresistens og type 2-diabetes er en kompleks prosess som har sterk sammenheng med

fedme og energioverskudd. Økt lipidbelastning kan føre til akkumulering av lipider også i muskler, såkalt ektopisk fettlagring (IMTG). Dette gir opphav til det man kaller lipotoksisitet [55]. En annen viktig komponent er inflammasjon. Fedme er en kronisk inflammasjonstilstand hvor man har svakt forhøyede nivåer av pro-inflammatoriske cytokiner som for eksempel interleukin-6 (IL-6) og IL-8, samt visse bakterieprodukter som lipopolysakkarid [56]. Det er vist at slike inflammasjonsmediatorer direkte kan påvirke energimetabolisme i muskel og muskelceller [57]. I tillegg er det nylig vist en rekke sammenhenger mellom tarmflora og energimetabolisme [58]. Lipopolysakkarid (LPS) fra Gram negative bakterier er vist å være økt i plasma hos personer med fedme og type 2-diabetes [59], og det er også vist at LPS påvirker energimetabolismen i skjelettmuskelceller ved blant annet å gjøre dem mer glykolytiske [60].

1.6 Trimetylammin N-oxid (TMAO)

TMAO er et stoff som dannes som følge av bakteriell nedbrytning av karnitin og fosfatidylkolin i tarmen til TMA, med påfølgende oksidasjon av TMA i leveren til TMAO ved enzymet flavin monooksygenase 3 (FMO3). Karnitin og fosfatidylkolin er vanlig i kosten, spesielt rødt kjøtt, egg, fisk og fete meieriprodukter [61].

Kostholdet utgjør en av de største miljøfaktorene vi utsetter kroppen for, og kostholdet blant flere andre årsaker [63], er også avgjørende for sammensetningen av tarmfloraen i fordøyelsessystemet, som igjen utgjør et viktig filter for hva kroppen eksponeres for [61, 62]. Dette gjelder også igjen påvirkningen av mikrofloraens syntesekapasitet av TMA og TMAO [64].

TMAO er vist å ha nær sammenheng med hjerte og karsykdom (HKS) ved å utøve en aterogen effekt, og det er vist at TMAO-nivå i blod har predikerende effekt for å bestemme risiko for HKS [65]. TMAO er også vist å være assosiert med diabetes, men det er uklart om TMAO kan påvirke energimetabolisme i muskel direkte [66, 67].

1.7 Myokiner

Det har vært kjent i årtier at fysisk aktivitet har gunstige effekter og beskytter mot en rekke kroniske sykdommer, som hjerte-kar-sykdom, type 2-diabetes, visse kreftformer, osteoporose, muskel- og skjelettlidelser og kanskje til og med psykiske lidelser. Man har lenge tenkt at kanskje skjelettmuskulaturen som respons på trening skiller ut en faktor som kan virke systemisk, og i 2004 kom første dokumentasjon på at muskel er et endokrint organ som frigjør interleukin-6 (IL-6) under trening [68]. Etter det er det vist at muskel kan produsere en rekke slike signalproteiner, kalt myokiner [69]. En seleksjon av disse myokinene er studert i denne oppgaven.

1.7.1 IL-6

Interleukin-6 (IL-6) er prototypen på et myokin. Det produseres av myocytter som respons på kontraktilt muskellarbeid, og nivåene av IL-6 som kan gjenfinnes i blodstrømmen følger intensitet og varighet på arbeidet, med inntil 100 ganger økning i plasmakonsentrasjon [70]. Epidemiologiske studier har vist invers korrelasjon mellom fysisk aktivitet og plasma-IL-6, og basalt plasmanivå av IL-6 er sterkt assosiert med fysisk inaktivitet, overvekt og MetS [71, 72]. Det kan derfor virke som det er viktig å skille mellom basalnivå og treningseffekter på muskel. Den biologiske rollen til IL-6 som myokin er blitt identifisert som et tilbakekoplingssignal for å stimulere glukoseopptak og mitokondriefunksjon (lipolyse og lipidoksidasjon) som følge av minkende glykogenlagre bl.a. ved aktivering av AMPK, med påfølgende økt GLUT4 uttrykk og nedregulering av malonyl-CoA produksjon via defosforylering av ACC β [29, 40, 73, 74]. Utover dette er IL-6 også vist å promotere proliferasjon og differensiering av C2C12 myoblaster fra mus, og er dermed også en viktig deltaker i myogenesen som del av homeostasen i muskelvev [75, 76].

IL-6 er også et av de hematopoetiske cytokinene som har ulike oppgaver avhengig av virkested og metabolsk tilstand (pleiotropi). Det medierer både pro-inflammatorisk effekter (invasjon av makrofager), og anti-inflammatoriske (motvirker effekt av TNF α) som myokin under muskellarbeid [77, 78]. IL-6 kan og opptre som endogent pyrogen da det er i stand til å passere blod-hjernebarrieren og utøve effekt i hypothalamus. Systemisk stimulering med IL-6 medfører endret energimobilisering i fett- og muskelvev som fører til temperaturøkning i kroppen (termogenese) [79], og er i tillegg vist å forsterke leptins effekt på metthetsfølelse i hjernen hos mus [80].

1.7.2 IL-8

I likhet med IL-6, er IL-8 (CXCL8), også blitt funnet å ha økt uttrykk i arbeidende skjelettmuskulatur, og interleukin-8 kan derfor også ansees som et myokin som i likhet med IL-6 både produseres av og har auto- og parakrin effekt på myocytter [81]. IL-8 faller inn under klassen kjemokiner i underfamiliein C-X-C, en klassifisering utfra struktur, og biologisk effekt utøves ved interaksjon med de g-proteinkoplede transmembrane reseptorene CXCR1 og CXCR2. Kjemokiner er en familie av små cytokiner utsondret fra celler for å indusere bevegelsesrespons (kjemotaksis) fra bestemte celler i omkringliggende vev. De er assosiert med homeostatiske eller pro-inflammatoriske responser, der IL-8 faller inn i sistnevnte gruppe. IL-8 produseres ellers av monocytter (MO), makrofager (M ϕ), fibroblaster, epitelceller og endotelceller [83].

Ved aktivering av reseptorene CXCR1/2 vil IL-8 indusere migrasjon av immunceller fra blodstrømmen til omkringliggende vev, deriblant T-celler, basofiler, og spesielt nøytrofile granulocytter. IL-8 er dessuten en kjent potent angiogenesefaktor og mobiliserer, aktiverer og degranulerer nøytrofile granulocytter ved direkte rekruttering [82], et viktig steg i å inflammasjonskaskaden [83]. Ifølge en studie gjort av Sharabiani et al. er IL-8 blant annet vist å kunne predikere overvekt ved undersøkele av immunologisk profil, men det er ukjent i hvilken grad det er et årsaksforhold mellom IL-8 og overvekt [84].

1.7.3 Fraktalkin

Fraktalkin (CX3CL1) er blitt identifisert som myokin reaktivt nylig, med økt sirkulerende nivå som følge av trening [85]. Det har lokale effekter i skjelettmuskel hvor det antas å delta i tilretteleggelsen av et regenerativt miljø etter skade, og ved remodellering av skjelettmuskulaturen [86]. Utover dette er det vist at fraktalkin også produseres i de langerhanske øycellene i bukspyttkjertelen, hvor det kan ha en mulig beskyttende effekt på betacellefunksjon mot skadelige effekter av den velkjente pro-inflammatoriske biomarkøren TNF α (tumor nekrose faktor α) [85]. Fraktalkins reseptor CX3CR1 uttrykkes blant annet i monocytter (MO) [87]. MO og makrofager (M ϕ) er nødvendige i vedlikeholdsprosesser som remodellering av skjelettmuskel etter trening, og som følge av akutt muskelskade. Disse cellene bidrar ved å fjerne celledabri, og ellers legge til rette for tilhelingsprosesser, deriblant modning av satellittceller og angiogenese [88, 89, 90]. CX3CL1 fungerer som kjemoattraktant for monocytter som initialt er pro-inflammatoriske, men som senere vil differensiere til makrofager med en anti-inflammatorisk fenotype [91]. En studie av Strömberg et al. viste at proteinuttrykket av fraktalkin i humant skjelettmuskelvev var betydelig økt to timer etter en enkel 30 minutters (ikke-skadende) treningsperiode [86]. In-vitro forsøk med fraktalkinbehandlede celler viste sterkt indusert uttrykk av IL-6, IL-8 og TNF α , noe som kan forklare fraktalkins M ϕ og MO rekrutterende egenskaper. Fraktalkin kan derfor se ut til å ha en sentral rolle i å regulere den pro-inflammatoriske responsen som forekommer ved remodellering og tilpasning av skjelettmuskelvev. Fraktalkin er også nylig vist å kunne ha gunstig effekt på energimetabolismen ved å motvirke forstyrrelser i fosforeringen av nøkkelpoteiner i signalveier for den glukosestimulerte insulinsekresjonen, deriblant IRS-1 [92]. Det er dessuten vist at fraktalkin kan senke forekomsten av basal betacelledød. En mulig forklaring kan være at fraktalkin, som også blir indusert av TNF α , motvirker TNF α s evne til å aktivere mTOR og NF κ B, som begge er involvert i videre induksjon av cytokinproduksjon og negativ regulering av insulinsealeringskaskaden [93, 94]. Fraktalkin har i seg selv ingen effekt på basal insulinsekresjon, men dens indirekte effekt på betacellefunksjon tilsier at den kan ha en viktig rolle

siden redusert fraktalkinuttrykk i tilstanden av lavgradig inflammasjon, alder og fedme alle er vist å ha sammenhenge med T2DM [85].

1.7.4 MCP-1

Monocytat kjemoattraktant protein 1 (MCP-1) eller CCL2, er et kjent kjemokin, og er også identifisert som myokin med økt nivå i plasma etter 12 ukers utholdenhetstrening [95]. CCL2 spiller en avgjørende rolle i rekruttering av monocytter, komplementært til IL-8s makrofagerekruttering tidlig i inflammasjonsfasen [83, 96]. CCL2 produseres ellers av monocytter, makrofager og fibroblaster, men er også vist å være uttrykt i adipocytter eksponert for inflammatorisk stimuli [97, 98]. CCL2 kan være interessant å undersøke i sammenheng med at det er overuttrykt i overvektige mus [99, 100], og høyere plasmanivåer er også funnet i diabetespasienter [101]. Sell et al. fant blant annet at CCL2 førte til en signifikant reduksjon i det insulinstimulerte glukoseopptaket via ERK1/2 [102], og spiller muligvis en slik rolle i vevssamspill mellom fett og skjelettmuskelvev tilsvarende IL-6.

1.7.5 GRO α

Growth Related Oncogene α (CXCL1) er også et cytokin i kjemokinfamilien som er involvert i inflammasjon og uttrykkes bl.a. av makrofager, Th17-celler og nøytrofile granulocytter [83, 93]. Det er også vist å bli produsert i skjelettmuskelceller etter elektropulsstimulering, en *in vitro* treningsmodell [81].

1.7.6 SDF1

SDF1 (CXCL12) og dens reseptor CXCR4 er uttrykt i skjelettmuskulatur, og kjemokinet kontrollerer viktige steg i utvikling og regenerering av skjelettmuskelvev [103]. SDF1 forekommer i to ulike isoformer, α og β ved alternativ spleising av genet for SDF1. Satellittceller og myoblaster uttrykker begge reseptoren CXCR4, som kjemoattraktanten CXCL12 tiltrekker ved skader i skjelettmuskulatur. Dette promoterer fusjonering av nye celler til eksisterende myofibre som beskrevet i avsnitt 1.2 [104]. CXCL12 defineres som myokin siden det skilles ut fra skjelettmuskulatur, der det kontrollerer myogenesen både auto- og parakrint. Dyreforsøk har vist at rotter som gjennomgikk en fireukers treningsperiode hadde økt uttrykk av CXCL12 i *m. gastrocnemius*, der ytterligere in-vitro-forsøk med CXCL12 viste effekter i form av en generell aktivering av den anabolske celledisigneringen, med en samtidig hemming av katabolske prosesser i

de differensierte cellene [105]. Utslaget av effektene ble observert som en dobling av diameteren i C2C12-myotuber etter en tredagers behandling med CXCL12. Funnene kan derfor tyde på at CXCL12-CXCR4 er en viktig mediator i treningsindusert muskelvekst og vedlikehold [106].

1.8 Ryggsmarter

Ryggsmarter i nedre region av ryggen blir i denne oppgaven omtalt som low back pain (LBP). Ryggens mange oppgaver og kompliserte struktur gir opphav til at ryggsmarter har en sammensatt patofysiologi, der smerter har potensiale til å legge store begrensinger på det generelle funksjonsnivået til pasienten. Månedsprevalensen for LBP er fra 19% til 43% av populasjonen i den vestlige del av verden, og livstidsprevalensen kan være så høy som 60% til 80% [107]. Når det i tillegg antas at 10% av tilsvarende populasjon er kronisk uføre som følger av LBP, betyr dette at LBP er et svært vanlig problem med store sosioøkonomiske implikasjoner [108]. Årsakene til LBP kan deles inn i spesifikk, og ikke-spesifikk, der spesifikke tilfeller knyttes til spinalinfeksjon eller tumor. Derimot kan 80% til 90% av tilfellene tilskrives ikke-spesifikke årsaker som ofte er ukjente, kroniske i natur, og vanskelige å behandle [107]. Mellomhvirvlene (intervertebral disk, IVD) utgjør det fleksible leddet mellom bensegmentene i ryggspylen, og nedbrytningen av IVD-vev er blitt identifisert som mulig kilde til LBP [109, 110]. Både inflammasjon, overdreven innervering og mekanisk hypermobilitet i IVD er blitt undersøkt som faktorer i de patofysiologiske mekanismene bak LBP, og flere undersøkelser har vist funn av høyere nivåer av cytokiner som IL-6, IL-8 og prostaglandin E₂ i slikt degenerert IVD-vev fra pasienter med LBP [111, 112].

Ryggsmarter i nedre region av ryggen (low back pain, LBP) er vist å ha sammenheng med metabolsk syndrom (MetS). Ono et al. fant i en studie av kjønnsforskjeller at 23,7% av kvinner med LBP hadde en helseprofil som oppfylte alle krav til (den japanske og strengere) definisjonen for MetS [114], mens andelen kvinner med MetS uten LBP til sammenlikning var 12,4%. Forskjellene for mennene som deltok i studien var mindre der andel med MetS var 21,2% uten LBP, mot 24,7% med LBP [113]. Zhai et al. fant videre at kronisk smertestimuli forverrer insulinresistens i allerede diabetiske rotter (ZDF, leptinreseptor-knockout mus) [115]. Dette tyder på at smerter kan ha sammenheng med metabolske forstyrrelser. Hvorvidt myokiner også kan være involvert i lokale ryggsmarter er uvisst, men det er ikke utenkelig at kjente myokiner som også er pro-inflammatoriske kan ha en rolle.

1.9 Hensikt med oppgaven

Cytokiner som IL-6, IL-8 m.fl. er nødvendige i regulering av betennelsestilstander som kan gi opphav til rygg smerter, men er også dypt involvert i regulering av metabolske prosesser på cellenivå, og også som signalmolekyler som deltar i vevssamspill (cross-talk) i forbindelse med energihomeostase. Mange tilstander som fedme/MetS/type 2-diabetes kjennetegnes av en forstyrret energimetabolisme, hvor det er en kjent sak at inflammasjon spiller en viktig rolle. Flere av de overnevnte er fulgt av økte nivåer av inflammasjonsmarkører, og med bakgrunn i det vi vet om flere av disse i dag, er det av interesse å undersøke om det er noen sammenheng mellom opplevd smerte, produksjon av myokiner, og metabolske egenskaper i dyrkede skjelettmuskelceller fra ryggopererte pasienter, en pasientgruppe med langvarig tilstand av smerter.

TMAO er et nedbrytningsprodukt fra et kosthold basert på animalske produkter som rødt kjøtt, egg, fisk, og fete meieriprodukter der mengden som kan frigjøres til sirkulasjonen i kroppen avhenger av tarmflora og leverkapasitet og diett, der sammensetningen i tarmflora også er utsatt for ytre påvirkning (som diett). TMAO er tidligere vist å være assosiert med utvikling av både aterosklerose og diabetes. Det var derfor av interesse å undersøke om TMAO har noen effekt på energimetabolisme i skjelettmuskelceller, og om responsen på TMAO var annerledes i muskelceller fra pasienter med kroniske smerter (LBP) enn i muskelceller fra friske donorer.

Problemstillinger som ble undersøkt i oppgaven

- Karakterisering av energimetabolismen i myotuber fra pasientgruppen med LBP
 - Hvordan er effekten av TMAO på energimetabolisme i skjelettmuskelceller, og er det noen forskjell mellom celler fra pasienter med LBP og celler fra friske frivillige?
 - Hvordan er glukose- og oljesyremetabolisme sammenlignet med muskelceller fra friske frivillige?
 - Kan metabolske variable i myotubene fra pasienter med LBP relateres til smerteopplevelse *in vivo*?
- Studere uttrykk og utskillelse av sentrale myokiner i myotubene fra pasientgruppe med LBP
 - Er det noen sammenheng mellom uttrykk av myokiner og energimetabolisme?
 - Er uttrykk av myokiner relatert til smerteopplevelse eller andre karakteristika (BMI, alder) ved muskelbiopsidonorene?

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1: Kjemikalier og reagenser benyttet i forbindelse med oppgaven.

Leverandør	Kjemikalie/reagens
American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA)	D-[¹⁴ C(U)]glukose 10mCi/mmol (0,1mCi/ml)
Applied Biosystems™ (Warrington, Storbritannia)	Power SYBR® Green PCR Master Mix (5 ml)
BioRad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)	Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate Bio-Plex Pro™ Human Chemokine panel, 6-plex
Gibco®, Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia)	Dulbecco's Modified Eagle medium med glutamax (DMEM/Glutamax-I 1g/L glukose) Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺) Fungizone® (250 µg/ml amphotericin B) Føtalt kalveserum (FCS) Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺ Penicillin-streptomycin (10000 IE/ml) Trypsin-EDTA 0,05%
Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Primere (RPLP0 (36B4), GAPDH, IL-6, IL-8)

Lonza Clonetics, levert av Medinor	Human skeletal muscle growth medium (SkGM BulletKit) bestående av SkBM basal medium og SkGM SingleQuot Kit, Supplements & Growth Factors (uten insulin)
Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark)	NovoRapid® (FlexPen®) Insulin aspart. 100 E/ml
Pall Life Sciences (Cergy-Saint-Christophe, Frankrike)	Ultroser™G
PerkinElmer™ (Boston, MA, USA)	[1- ¹⁴ C]oljesyre 56,3mCi/mmol (0,1 mCi/ml)
PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA, USA)	OptiPhase Supermix
PROMEGA (Madison, WI, USA)	β-merkaptoetanol
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre (HEPES)
	Bovint serumalbumin (BSA)
	Dimetylsulfoksid (DMSO)
	Glukose
	L-karnitin HCl
	Oljesyre (OA)
	Trimetylamin N-oxid (TMAO)
ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)	Ambion™ Nuclease-free H ₂ O, 50ml (non-DEPC-treated)
VWR® International (Kalbakken, Norge)	NaOH

2.1.2 Utstyr

Tabell 2.2: Utstyr som ble benyttet i forbindelse med oppgaven.

Leverandør	Utstyr
Applied Biosystems™ (Foster City, CA, USA)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
Applied Biosystems™ (Stockholm, Sverige)	2720 Thermal Cycler
	StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block
	StepOne™ Software 2.3 for Windows
Corning Inc. (Corning, NY, USA)	15 ml Centrifuge Tube, CentriStar™ Cap
	50 ml Centrifuge Tube, CentriStar™ Cap
	96-brønners Corning® CellBIND® Surface Brett med lokk
	96-brønners Corning® Costar® Non-Treated med flat bunn og lokk
	Celleflaske 25 cm ² med Corning® CellBIND® Surface og ventilert lokk
Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland)	Celleflaske 75 cm ² med Corning® CellBIND® Surface og ventilert lokk
	Centrifuge 5415 R Safe-Lock rør 1,5 ml
GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)	GraphPad Prism version 6.07 for Windows
Hettich GmbH (Tutlingen, Tyskland)	ROTOFIX 32 sentrifuge
Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)	Trappingstativ, med metallknotter, metallplate og silikonpakning

Integra Biosciences AG (Zizerz, Sveits)	Fireboy eco Bunsen Burner Vacusafe med VacuBoy multikanal
Luminex® (Austin, TX, USA)	Luminex MAGPIX®
Motic GmbH (Wetzlar, Tyskland)	Motic AE31 mikroskop
PerkinElmer™ (Shelton, Scotland, USA)	1450 Rigid 96 Plate Casette
	2450 Microplate Counter MicroBeta ² ®
	Isoplate™-96
	TopSeal®-A Plus gjennomsiktig film
	Unifilter®-96 GF/B
QIAGEN GmbH (Hilden, Tyskland)	Wallac 1420 Victor ³ Multilabel Counter
	QIAshredder kolonne Rneasy® Plus Mini Kit
Sartorius AG (Göttingen, Tyskland)	Sartorius stedim Minisart® 0,20µm sterilfilter
Thermo Scientific (Roskilde, Danmark)	Reagent Reservoirs with Dividers 25ml
	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
TPP®/MIDSCI® (St. Louis, MO, USA)	Cell scrapers 24 cm
VWR® International (Radnor, PA, USA)	Microcentrifuge MiniStar Silverline
	VWR Collection Cryotube, 2ml

2.2 Celler og donorkarakteristika

I denne studien ble det benyttet humane myotuber fra tilsammen 14 frivillige donorer (Tabell 2.3 og 2.4). Donorene er fra to ulike forskningsbiobanker med hver sin navnkode (LD og RT). Fra LD (lean donor) ble muskelbiopsier tatt fra bukveggen, *m. obliquus internus abdominis* hos friske nyredonorer. Fra RT (raskere tilbake) ble muskelbiopsier tatt fra *m. spinae erector* hos pasienter som ble operert for en diskusprolapslidelse. Alle donorene har gitt skriftlig samtykke til deltakelse i studien. Opprettelse av biobank til bruk i studien er blitt godkjent av regional etisk komite, (godkjenning S-04133-5/2009/1095 (LD) og 2015/124/REK sør-øst B (RT)).

Tabell 2.3: Kliniske data for donorene. BMI, kroppsmasseindeks.

Donor	Kjønn (M/K)	Alder(år)	BMI(kg/m²)	Legemidler
LD8	K	43	21,8	*
LD12	K	51	26,2	*
LD14	M	63	25,5	*
LD24	K	70	24,2	*
LD30	M	36	26,2	*
RT2	K	48	28,6	Avamys, Nasonex
RT3	K	42	18,3	Microgynon
RT5	M	43	25,0	Pinex Forte
RT8	K	43	31,2	Adalat Oros
RT11	K	57	21,0	Somac, Triobe, Calcigran Forte, Alendronat, Maxalt, Loratadin Hexal
RT16	K	46	23,5	*
RT17	K	53	21,3	Paracet, Tramagetic Retard, Neurontin, Nocinan, Oxynorm
RT18	M	58	33,3	Adalat Oros, Atacand, Carduran, Cozar Comp, Tenormin, Arcoxia
RT19	M	23	24,3	*

* Ingen kjente faste legemidler

Tabell 2.4 viser oversikt for gjennomsnitt og median av alder og BMI i hver av de to gruppene, og for begge gruppene kombinert.

	Alder			BMI		
	LD	RT	LD+RT	LD	RT	LD+RT
Gj. snitt (±SD)	52,6 (14,0)	45,9 (10,5)	48,3 (11,8)	24,8 (1,8)	25,2 (5,0)	25,0 (4,0)
Median	51,0	46,0	47,0	25,5	24,3	24,7

Tabell 2.4: Gjennomsnitt og median av alder og BMI i henholdsvis LD og RT, samt for gruppene kombinert.

2.3 Opplysninger om smerte brukt i korrelasjonsanalyser

Fra gruppen av RT-donorer ble pasientopplysninger og informasjon om smerte innhentet ved at pasientene fylte ut et spørreskjema preoperativt. Skjemaet som ble brukt var «spørreskjema for pasienter som skal opereres i ryggen» (Appendiks 7.3), og er utarbeidet og validert av nasjonalt kvalitetsregister for ryggkirurgi ved universitetsykehuset i Nord-Norge. Informasjon om alder, BMI, helsetilstand, smertevarighet, og ben- og rygg smerter ble brukt som datagrunnlag i denne oppgaven. Spørsmålene som angikk gradering av smerteopplevelse og helsetilstand er vist i tabell 2.5.

Tabell 2.5: Pasienten ble bedt om å svare på følgende spørsmål relatert til smerteopplevelse.

	Spørsmål	Skala
Ryggsmerter	Hvordan vil du gradere smertene du har hatt i rygg/hofte i løpet av den siste uken?	Pasienten ble bedt om å sette ring rundt et tall fra en skala på 0 til 10, der 0 betegna «ingen smerter», og 10 betegna «så vondt det går an å ha». (NRS)
Bensmerter	Hvordan vil du gradere de smertene du har hatt i benet (ett eller begge) i løpet av den siste uken?	
Helsetilstand	Pasienten ble bedt om å vise sin nåværende helsetilstand ved å markere et punkt på skalaen	VAS fra 0 til 100, der 0 betegnet «Verst tenkelige helsetilstand», og 100 betegnet «Best tenkelige helsetilstand»

NRS, «numeric rating scale»; VAS, visuell analog skala.

I det samme spørreskjemaet ble det også etterspurt opplysninger om symptomvarighet, der pasienten ble spurt om varighet av nåværende rygg-/hoftesmerter, og varighet av nåværende utstrålende smerte. Syv av ni pasienter svarte på dette spørsmålet der samtlige oppga likt svar for begge spørsmålene. To av pasientene har hatt smertevarighet mer enn 2 år, én i 1-2 år, tre i 3-12 måneder, og én har hatt smertevarighet under 3 måneder.

2.4 Etablering av cellebank

Satellittceller ble isolert fra muskelbiopsier ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, og fryst ned i nitrogentank ved -196°C . For å kunne gjøre gjentatte forsøk med cellene ble det opprettet en forskningsbiobank ved at cellene ble oppskalert i flere passasjer ved fremdyrking og aktivering til prolifererende myoblaster. Rør med myoblaster fra samme donor ble merket med donorkode og passasjenummer før oppbevaring i nitrogentank ved -196°C . Alt arbeide med celledyrking foregikk under aseptiske forhold i LAF-benk.

2.4.1 Oppskalering av celler

Celleampuller (kryorør) à 1 ml ble tatt fra nitrogentanken, og trykk ble utlignet ved å løsne lokket. Ampullen ble raskt tint ved 37°C i vannbad. Innholdet ble overført til et 50 ml sentrifugerør, og 5 ml forvarmet utsåingsmedium (se appendiks) ble tilsatt og forsiktig blandet med stripette. Deretter ble 1 ml av blandingen overført tilbake til celleampullen og så tilbake til sentrifugerøret for å få med alle cellene. Røret ble sentrifugert ved 380 g i 5 minutter, og DMSO-holdig supernatant ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 40 ml dyrkingsmedium (SkGM, se appendiks), og 10 ml ble overført til fire 75 cm^2 celleflaskene med Corning® Cellbind® overflate og ventilert lokk. SkGM ble benyttet som dyrkingsmedium for å unngå spontan differensiering av myoblaster til myotuber, og inneholdt ikke insulin. Cellene ble inkubert ved 37°C med 5% CO_2 , og cellene ble observert i lysmikroskop ved bytte av medium. Dyrkingsmediet ble første gangen byttet etter 1-2 døgn, og deretter hvert 3-4 døgn til cellene nådde 80-90% konfluens. Derfra ble cellene enten splittet eller fryst ned i nitrogentank for eventuell videre oppskalering eller forsøk på et senere tidspunkt.

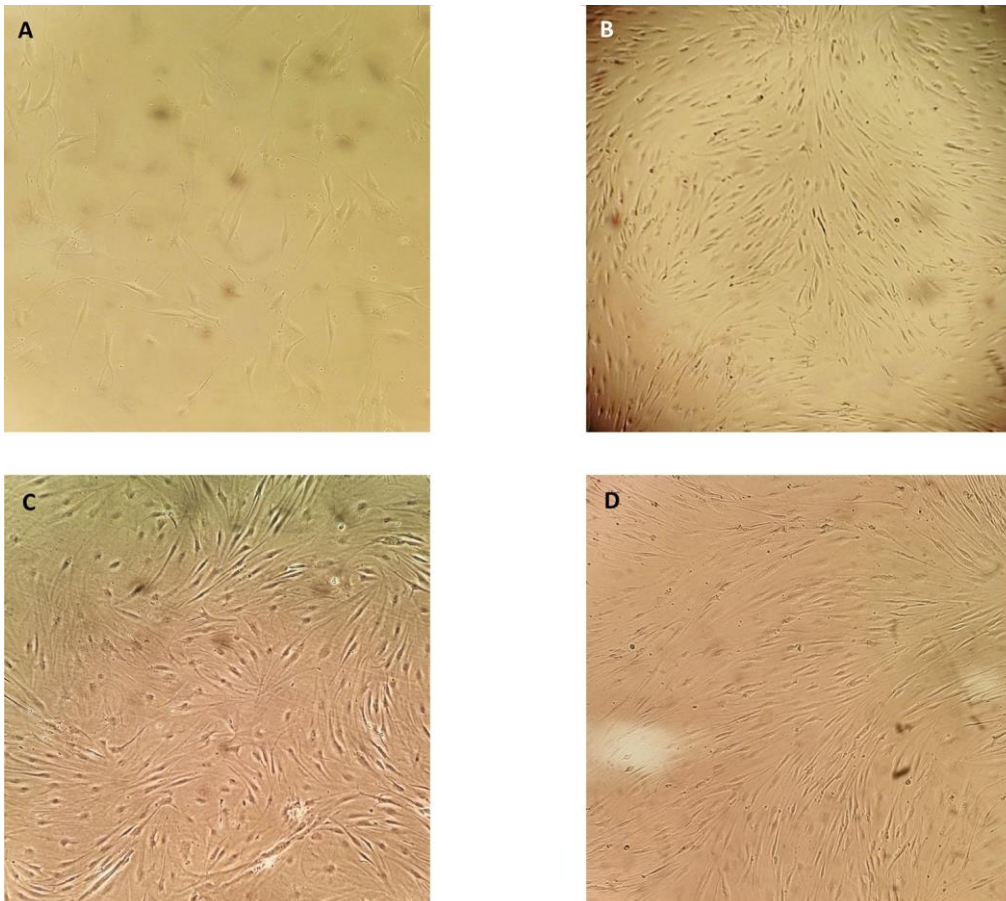
2.4.2 Nedfrysing av celler

Mediet i celleflaskene ble fjernet, og cellene ble vasket tre ganger med 4 ml DPBS eller HBSS (begge uten Ca^{2+} og Mg^{2+}). Deretter ble 5 ml 0,05 % trypsin-EDTA tilsatt for å løsne cellene fra plastoverflaten. Celleflaskene ble inkubert ved 37°C i et par minutter. Cellene ble observert i lysmikroskop, og forsøkt dunket løs med en rolig og bestemt bevegelse hvis de ikke hadde løsnet. Ytterligere inkubering med trypsin inntil høyst 5 minutter totalt ble gjennomført hvis cellen fremdeles ikke løsnet. 5 ml serumrikt utsåingsmedium (M1) ble tilsatt hver av flaskene, og hele flaskeoverflaten ble skylt med denne for å inaktivere trypsinløsningen. Cellesuspensjonen ble overført fra flaske til et 50 ml sentrifugerør, og sentrifugert ved 380 g i 5 minutter. Supernatant ble forsiktig fjernet og cellepellet ble resuspendert i frysemedium (se appendiks).

Cellesuspensjonen ble overført til merkede celleampuller, 1 ml til hver ampulle som umiddelbart fryses ned ved -20°C . Etter 30 minutter ble ampullene overført til -80°C fryser for oppbevaring i 24 timer. Ampullene ble deretter overført til nitrogentank for oppbevaring ved -196°C .

2.5 Celledyrking

Figur 2.1 viser bilder fra celledyrkingsprosessen fra utsåing av myoblaster, til modne skjelettmuskelceller på forsøksdagen. Bildene er av celler fra samme donor (RT16), dyrket frem i 96-brønners brett over en 12 dagersperiode. Det ble ikke observert synlige endringer i celler som fikk behandling med TMAO i ulike konsentrasjoner.



Figur 2.1: Bilder fra celledyrkingsprosessen. **A:** Bilde av muskelceller som har festet seg til bunn etter 1 døgn i proliferasjonsmedium (M1). **B:** Bilde av muskelcellene etter 4 dager i proliferasjonsmedium (M2). Cellen vil fortsatt få M2 til de er 80-90% konfluente. **C:** Muskelcellene etter første døgn med differensieringsmedium (M3). **D:** Muskelcellene etter 7 dager med M3. Cellene har differensiert og vokst sammen i myotuber, cellekjernene er blitt mindre synlige enn i C.

2.5.1 Utsåing av celler

Celleampuller ble tatt opp fra nitrogentanken og raskt tint i vannbad ved 37°C. Innholdet ble overført til et 15 ml sentrifugerør og tilsatt 5 ml utsåingsmedium (M1). Røret ble sentrifugert ved 380 g i 5 minutter. Supernatant med frysemedium ble forsiktig fjernet, og cellepelletten resuspendert

i 4,5 ml utsåingsmedium (M1) ved forsiktig blanding med pipette. Cellesuspensjonen ble overført til et pipettekar, og 50 µl ble tilsatt hver brønn ved hjelp av en multikanalpipette i et 96-brønnersbrett med CellBIND overflate. Celler til qPCR- og multipleksforsøk ble utsådd i 25 cm²-flaske. Cellenpelleten ble da resuspendert i 3 ml utsåingsmedium (M1), og overført til flasken med autopipette.

2.5.2 Proliferasjon og differensiering

Etter 24 timer blir utsåingsmediet (M1) erstattet med proliferasjonsmedium (M2, se appendiks) 100 µl per brønn for å stimulere cellene til å proliferere etter at de har festet seg til bunnen. M2 ble byttet hver 2-3 dager inntil cellene nådde 80-90% konfluens. Etter dette fikk cellene differensieringsmedium (M3, se appendiks) som ble byttet annenhver dag over en 7-dagers periode. M3 er tilsatt mindre serum og inneholder insulin for å stimulere myoblaster til å differensiere til flerkjernede myotuber (modne skjelettmuskelceller).

2.5.3 Forbehandling av myotuber før forsøk

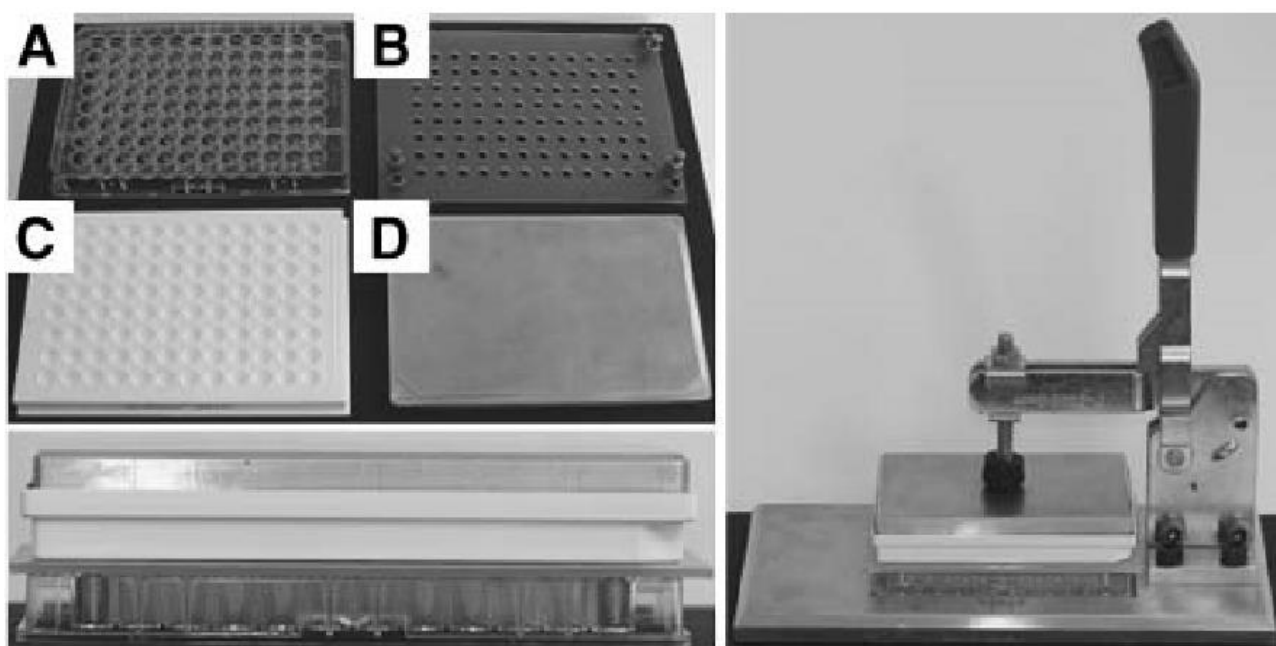
Det er i celler differensiert til myotuber at det er av interesse å undersøke energimetabolismen. Det ble gjort forsøk på glukose- og oljesyreomsetning i cellene både med og uten forbehandling med trimetylamin N-oksid (TMAO). Ubehandlede celler ble brukt som kontroll, og er videre angitt som 0 mM i forsøk med dose-respons, og 0 t i forsøk med tidseffekter.

Forbehandling med TMAO ble startet under differensieringsperioden 24, 48 eller 96 timer før forsøksdagen, og forsøk ble utført på dag 7 eller 8 etter initiert differensiering. Det ble laget i stand differensieringsmedier (M3) tilsatt TMAO i konsentrasjonsområdet 1µM – 100mM. Cellene ble inkubert under normale betingelser ved 37°C og 5 % CO₂, der bytte av medium med TMAO ble gjort samtidig som med kontrollbrønnene, der kontrollene fikk kun M3.

Tillaging av TMAO-løsninger ble gjort ved at TMAO ble tilsatt M3 i endelige konsentrasjoner på 1 µM, 10 µM, 0,1 mM, 1 mM, 10mM og 100 mM fra en stock-løsning på 1M TMAO, løst i sterilfiltrert vann.

2.6 Substratoksidasjonsmetoden

Substratoksidasjonsmetoden ble utviklet av Wensaas et al. i 2007, og muliggjør måling av ^{14}C -radiomerket glukose og/eller fettsyrer omsatt av skjelettmuskelceller [116]. Metoden er basert på at ^{14}C -merkede substrater tas opp og omsettes av levende skjelettmuskelceller dyrket i kultur. Radioaktivitet fra omsatt substrat vil gjenfinnes om det er inkorporert i cellen, og ved at det fanges opp i form av $^{14}\text{CO}_2$ ved «trapping», som resultat av at substratet er oksidert ved oksidativ fosforylering. Apparaturen er vist i figur 2.2, og ferdig montert under pågående «trapping» er dette et lukket, lufttett system. Prinsippet bak metoden er illustrert i figur 2.3. Måling av radioaktivitet fra substrat ble gjort med PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta2® scintillasjonsteller.



Figur 2.2: Utstyret som ble benyttet med substratoksidasjonsmetoden. **A:** 96-brønners Corning® CellBIND®-brett. **B:** Silikonpakning med stabiliserende metallknotter. **C:** Forseglet UniFilter®-96 GF/B-brett fuktet med 1 M NaOH, 20 μl for hver brønn. **D:** Metallplaten fordeler jevnt trykk fra låsemekanismen for å oppnå lufttethet. Til høyre: Ferdig montert sandwich plassert i trappingstativet under inkubering. Figur hentet fra [116].

2.6.1 $^{14}\text{CO}_2$ trapping

På forsøksdagen ble cellene først observert i lysmikroskop, og trappingstativ ble satt til forvarming i inkubator. Differensieringsmediet med eventuell forbehandling ble fjernet før tilsetting av radiomerket medium (bikarbonat-fritt). 96-brønnersbrettet med celler ble plassert nederst i trappingstativet med silikonpakning stabilisert av metallknotter. Over silikonpakningen ble et 96-brønners UniFilter®-brett med forseglet bakside plassert med filtersiden ned. Filteret var på forhånd

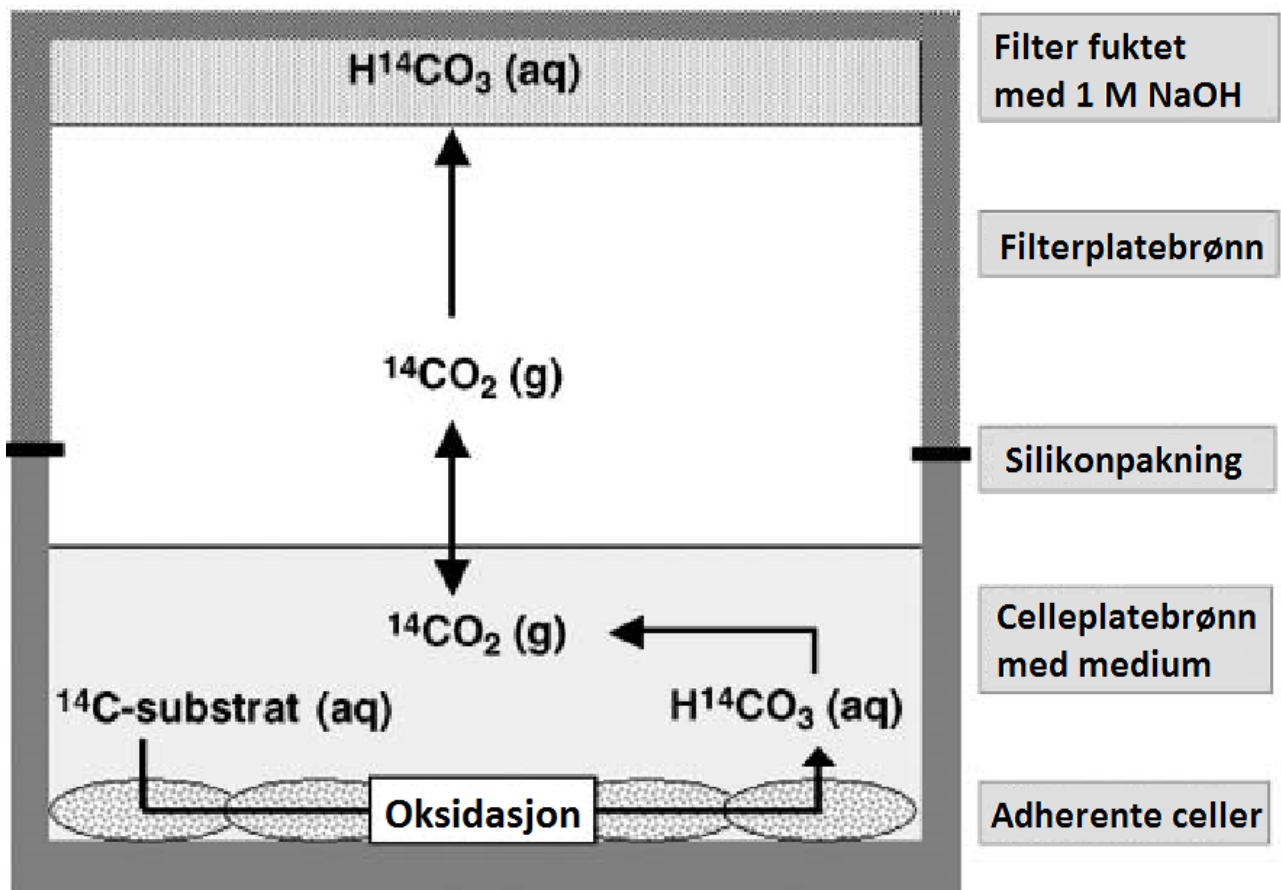
fuktet med 20 μl 1 M nylaget NaOH per brønn, og «sandwichen» ble låst sammen med metallplate og låsespaken på stativet. Hele stativet ble satt i inkubator i 4 timer ved 37°C.

Etter at 4 timer var gått ble «sandwichen» demontert, og det radiomerkede mediet som ble tilsatt før trapping ble raskt fjernet fra 96-brønnersbrettet med celler. Cellene ble vasket to ganger med 200 μl PBS før 200 μl 0,1 M NaOH ble tilsatt hver brønn for å lysere cellene. 96-brønnersbrettet med de lyserte cellene ble deretter fryst ned ved -20°C. Unifilter®-brettet ble tilsatt 40 μl scintillasjonsvæske per brønn (Optiphase supermix), og denne fikk trekke inn et par minutter før filterbrettet ble dekket med Topseal®-A gjennomsiktig film. Scintillasjonsvæsken viser ^{14}C -desintegrasjoner som lysglimt, og filterbrettene ble inkubert i to dager ved romtemperatur før $^{14}\text{CO}_2$ ble målt med PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta²® scintillasjonsteller.

2.6.2 Celleassosiert radioaktivitet

Brettet med nedfryst cellelysat ble tint ved romtemperatur. 50 μl lysat i hver brønn ble overført til et 96-brønners IsoplateTM-brett og tilsatt 100 μl Optiphase supermix. Radiomerket medium som var til overs fra trapping ble tilsatt i tripler i ledige brønner på siden. Disse ble også tilsatt 100 μl Optiphase supermix, med hensikt å måle mengde radioaktivitet som i utgangspunktet ble gitt cellene. Brettet ble dekket med TopSeal®-A gjennomsiktig film, og ble inkubert ved romtemperatur i minst 2 timer før celleassosiert radioaktivitet (^{14}CA) ble målt med PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta²® scintillasjonsteller.

^{14}CA er den mengde radioaktivitet som akkumuleres av cellene, og representerer den mengden radioaktivitet som forblir i det nederste laget av adherente celler (Figur 2.3). Sammen med $^{14}\text{CO}_2$, gir ^{14}CA et estimat på totalt opptak av radiomerket substrat i cellene. Dette kan videre brukes for å beregne oksidert mengde radiomerket substrat i forhold til opptaket, angitt som fraksjonell oksidasjon.



Figur 2.3: Forklaring av prinsippet bak substratoksidasjonsmetoden. Adherente celler i monolag er blitt dyrket frem til myotuber som under forsøket tar opp og oksiderer tilsatt ^{14}C -merket substrat. Surt $^{14}\text{CO}_2(\text{g})$ frigjøres ved celleånding og vil bli fanget i det alkaliske filteret. Substrat som tas opp, men som ikke oksideres, vil akkumulere i de adherente cellene og måles som celleassosiert radioaktivitet (^{14}CA). Modifisert fra [116]

2.6.3 Radioaktive medier brukt i utførelse av metoden

Se appendiks for radioaktive løsninger.

2.7 Formler brukt til beregning av metabolske parametere

Glukosesuppresjon (heretter kalt suppressibilitet): Cellenes evne til å redusere oksidasjon av oljesyre ved akutt tilsetning av glukose.

$$[(1 - (\frac{\text{oksidasjon av 100 } \mu\text{M oljesyre ved tilstedeværelse av 5 mM ikke-radioaktiv glukose}}{\text{oksidasjon av 100 } \mu\text{M oljesyre uten tilstedeværelse av ikke-radioaktiv glukose}})) \cdot 100\%]$$

Oljesyresuppresjon:

$$[(1 - (\frac{\text{oksidasjon av 200 } \mu\text{M glukose ved tilstedeværelse av 100 } \mu\text{M ikke-radioaktiv oljesyre}}{\text{oksidasjon av 200 } \mu\text{M glukose uten tilstedeværelse av ikke-radioaktiv oljesyre}})) \cdot 100\%]$$

Adapterbarhet: Cellenes evne til å øke oksidasjon av oljesyre med økende konsentrasjon av oljesyre.

$$[\frac{\text{oksidasjon av 100 } \mu\text{M oljesyre}}{\text{oksidasjon av 5 } \mu\text{M oljesyre}}]$$

2.8 Bradfords metode for å måle proteinkonsentrasjon

Med substratoksidasjonsmetoden oppgis resultat i benevnningen nmol CO₂ fra oksidert substrat per mg protein. Det fremgår derfor at det må justeres for ulike mengder protein i hver brønn for at det skal være et felles sammenlikningsgrunnlag på tvers av brønner. Proteinkonsentrasjon brukes som surrogat for mengde celler i hver brønn, og ble målt med Bradfords metode [117].

Prinsippet bak metoden er basert på at fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 bytter farge med absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm ved binding til protein under sure betingelser.

Fargestoffet bindes til basiske og aromatiske aminosyrer, og visuelt skjer fargeskiftet fra rødbrunt til blå, som måles fotospektrometrisk. Det ble laget standarder fra bovint serumalbumin (BSA) på 0, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2 og 0,3 mg/ml løst i 0,1 M NaOH. Bio-Rad Protein Assay Dye reagent

Concentrate ble fortynnet med 1 del konsentrat og 4 deler deionisert vann (1+4), og deretter filtrert gjennom 0,20µm-filer for å fjerne partikler. Proteinstandarder ble tilsatt de to første kolonnene i et Corning® Costar®-brett med flat bunn, to paralleller av hver standard med 50 µl i hver brønn. Fra 96-brønners brettet som beskrevet i 2.6.1 ble det overført 50 µl prøve med cellelysat fra hver brønn, til ledige brønner i Corning® Costar®-brettet. Hver brønn, både standard og prøve ble deretter tilsatt 200 µl av fortynnet Bio-Rad Protein Assay Reagent. Eventuelle luftbobler ble fjernet før brettet ble plassert i Wallac Victor² for analyse. Måling av absorbans ble gjort ved 595 nm, og mg/ml proteinkonsentrasjon i prøvene ble estimert med standardkurven generert fra standardene med kjent konsentrasjon. Kravet til beregnet R²-verdi for standardkurve ble satt til >0,95 for å sikre god nok prediksjon av prøvene.

2.9 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR), også kjent som revers-transkriptase real-time PCR, er en kvantitativ analysemetode som kan anvendes på celler for å undersøke endringer i genekspresjon ved mRNA-uttrykk. Med mRNA som utgangspunkt, kan metoden gjøres i én av to varianter; 1-trinns eller 2-trinns, hvor sistnevnte ble brukt ved at cDNA syntetiseres i eget trinn. I denne oppgaven ble metoden brukt som en relativ kvantifiseringsanalyse for å studere donorvariasjoner i basaluttrykket av IL-6 og IL-8 i forhold til de to referansegene syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4) og glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase. Data fra myotuber fra seks ulike donorer ble brukt i i korrelasjonsanalyser for å undersøke sammenhenger med smerteopplevelse eller parametere for metabolsk fleksibilitet og mRNA-uttrykk for henholdsvis IL-6 og IL-8.

Celler ble dyrket til flerkjernede myotuber etter samme prosedyre som beskrevet i avsnitt 2.5, men i stedet for 96-brønnersbrett ble det benyttet 25 cm² celleflaske med Corning® CELLBIND® overflate. For hver flaske ble det sådd ut én celleampulle i 3 ml medium. Siste bytte av differensieringsmedium ble gjort 48 timer før innhøsting.

2.9.1 Høsting av celler

Under innhøsting ble QIAshredder og buffer fra RNeasy® Plus Mini Kit fra Qiagen benyttet. Cellene ble høstet etter 7 dagers differensiering. Differensieringsmediet ble tatt av, og overført til eget sentrifugerør merket dato og donorkode (se avsnitt for kjøring med Luminex). Cellene ble

vasket to ganger med 2 ml DPBS uten Ca^{2+} og Mg^{2+} , deretter ble flasken tilsatt 500 μl lysesbuffer (Buffer RLT Plus tilsatt β -merkaptoetanol (β -ME) 10 μl /ml). Lysesbufferen inneholder nå guanidin thiocyanat og β -ME som denaturerer alle proteiner inkludert RNase. Cellene ble skrapet løs og alt lysatet ble overført til en QIAshredder kolonne med oppsamlingsrør som ble sentrifugert ved 8000 g i 2 minutter. Samlerøret med det homogeniserte lysatet ble merket og fryst ved -80°C til RNA-isolering senere.

2.9.2 Isolering av RNA

RNeasy® Plus Mini Kit fra Qiagen er en kolonnebasert metode for RNA-isolering, og protokoll for rensing av total RNA fra dyreceller ble fulgt. Samlerør som ble fryst ned etter innhøsting ble tint ved 37°C . Homogenisert cellelysat ble overført og sentrifugert i 30 sekunder ved 8000 g gjennom en kolonne som binder genomisk DNA (gDNA). gDNA-kolonnen ble kastet, og et tilsvarende volum 70% etanol ble tilsatt filtratet etterfulgt av blanding med pipette, dette for å sikre optimale bindingsforhold for RNA i neste steg. Blandingen ble overført til en RNA-bindende RNeasy sentrifugekolonne plassert i et oppsamlingsrør. Dette ble sentrifugert ved 8000 g i 15 sekunder og gjort i to omganger siden kolonnen kun har kapasitet inntil 700 μl . Filtratet ble kastet i hver omgang. Etter dette ble 700 μl buffer RW1 tilsatt samme kolonne for å vaske membranbundet RNA for celledabri. Filtratet ble kastet. 500 μl buffer RPE med etanol ble tilsatt samme kolonne etterfulgt av sentrifugering ved 8000 g i 15 sekunder, etterfulgt av ytterligere tilsetning av 500 μl buffer RPE, med sentrifugert ved 8000 g i 2 minutter. Dette ble gjort for å fjerne salter brukt i forrige vasketrinn, og filtratet ble kastet i begge omgangene. Kolonnen ble satt over i et nytt samlerør og sentrifugert i ytterligere 1 minutt for å tørke før eluering. 30 μl RNase-fritt vann ble tilsatt direkte på membranen i sentrifugekolonnen etterfulgt av 1 minutt sentrifugering ved 8000 g for å eluere RNA. Samlerør med RNA ble fryst ned ved -70°C etter utbytte- og renhetstesting.

2.9.3 Kvantifisering og renhetstesting av RNA med NanoDrop

NanoDrop® ND-1000 er en spektrofotometrisk metode som ble brukt for å måle utbytte og renhet av isolert RNA i hver prøve. Apparatet må være tilkople PC som kjører analyseprogramvare innstilt på RNA-måling. Etter å ha etablert en blank prøve med nukleasefritt vann, ble 1,5 μl prøve plassert på den nedre sokkelen og absorbans for RNA målt ved 260 nm. Lofritt papir bukes for å tørke sokkelen mellom hver måling. Utbyttet blir oppgitt som konsentrasjon i ng/ μl , og renhet blir oppgitt som ratio av absorbans målt ved både 260 nm og 280 nm. Proteininnholdet ble målt ved 280 nm, og

ratioen A_{260}/A_{280} skal optimalt være $\sim 2,00$. Ratio $< 2,00$ indikerer høyere innhold av protein enn RNA i prøven, og ratioen bør være mellom 1,80 og 2,10 for god nok renhet i RNA-utbyttet.

2.9.4 cDNA-syntese

Som del av qPCR-prosedyren benyttes DNAPolymerase (AmpliTaq) for å replikere DNA, og RNA må derfor revers transkriberes til komplementært DNA (cDNA). High-Capacity cDNA Revers Transcription kit fra Applied Biosystems ble brukt i syntese av cDNA. En reaksjonsblanding bestående av standardiserte mengder med random primere, revers transkriptase, RNase-inhibitor og nukleotidtrifosfater festet til deoxyribose (dNTP) ble blandet sammen i henhold til bruksanvisningen. Et volum tilsvarende 0,5 μg RNA ble tatt ut fra hver prøve og overført til et mini-ependorfrør (MicroAmp®). Nukleasefritt vann ble tilsatt til totalvolum på 13,2 μl . Se appendiks for beregning av vannmengder som ble tilsatt hver av prøvene. 6,8 μl av den istandgjorte reaksjonsblandingen ble derette tilsatt hver prøve som ble forseglet, og plassert i Thermal Cycler 2720 for cDNA-syntetisering. Følgende eksponeringsbetingelser ble brukt under syntese: 25°C i 10 minutter for templatpriming, 37°C i 80 minutter for revers transkripsjon og til slutt 85°C i 5 minutter for inaktivering av revers transkriptase. Rør med cDNA ble fryst ned ved -20°C til senere PCR-kjøring.

2.9.5 qPCR-kjøring

qPCR kombinerer multisyklisk amplifisering av DNA, med sanntidsanalyse av mengde DNA som blir syntetisert i hver syklus med amplifisering. Dette tillater deteksjon av økende grad av fluorescens med økende mengde replikert DNA for hver syklus. Fluorescenssignalet R_n detekteres som følge av at SYBR Green bindes til dobbeltrådet DNA, og ved et spesifikt trinn avhengig av prøvemengde, vanligvis i intervallet etter 25-30 sykluser med kjedereaksjoner vil økning i fluorescenssignalet reflektere en detekterbar eksponensiell vekst. Dette bestemmes som terskelverdien C_T , og denne representerer kryssningspunktet på amplifiseringskurven der detektor med sikkerhet registrerer eksponensiell amplifisering av templat-DNA ut fra fluorescenssignalet. Det fremgår derfor at C_T -verdien er avhengig av mengde cDNA det i utgangspunktet var i prøven med isolert mRNA. Jo flere amplifiseringssykluser som må til for å nå C_T -verdien, dess mindre mRNA var det i prøven i utgangspunktet, og fluorescenssignalet som blir rapportert fra prøven er derfor også knyttet til prøvens spesifikke C_T -verdi.

Det ble laget en standardkurve fra en fortyningsserie med alle prøvene sammen, med hensikt å utføre en relativ kvantifiseringsanalyse. Absolutt konsentrasjon cDNA i fortyningene var derfor ukjent, men tillater å sammenlikne donorene relativt i forhold til hverandre. Dette forutsetter at standardfortynninger og prøver fra alle donorene ble gjort på samme brett for hvert gen som ble undersøkt. Målgenene ble relatert i en ratio til referansegeneene 36B4 og GAPDH. Disse ble brukt for å korrigere for variasjon i kvalitet/kvantitet i total mengde RNA mellom prøvene, siden de behandles likt som målgenene under gjennomføring av forsøk. Referansegeneene ble valgt ut på bakgrunn av at de er jevnt og stabilt uttrykt med likt antall kopier i alle celler, og at de tidligere er benyttet ved studier av genuttrykk i muskulatur [14, 17].

Tabell 2.6: Primere som ble benyttet i oppgaven. Alle primere ble fortynnet til 30 µM.

Gener	Genbanknummer	Primer
RPLP0 (36B4)	M17885	F: 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'
		R: 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
GAPDH	NM002046	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
		R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
IL-6	NM000600	F: 5'-CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTAT-3'
		R: 5'-AGGCGCTTGTGGAGAAGGA-3'
CXCL8 (IL-8)	NM000584.2	F: 5'-ACCGGAAGGAACCATCTCACT-3'
		R: 5'-ATCAGGAAGGCTGCCAAGAG-3'

36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; IL-6, interleukin-6; CXCL8 (IL-8), C-X-C motif ligand 8 (Interleukin-8); F, forward; R, reverse.

2 µl fra hver prøve ble tatt ut for å lage cDNA-miks. Blandingen ble fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann (standard 1000), som videre ble fortynnet 1:5 (standard 200, 40 og 8). Denne fortyningsserien av standarder ble brukt for å lage en standardkurve med hensikt å relatere cDNA prøvene i forhold til hverandre. Hver av prøvene ble deretter fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann, og 2,5 µl av standarder, fortynnede prøver og nukleasefritt vann (negativ kontroll) ble overført til MicroAmp® Optical Reaction Plate. 22,5 µl av tilberedt reaksjonsblanding (se egen appendiks) med riktige primere for genet som skulle undersøkes, ble tilsatt brønnene, og brettet ble dekket med

MicroAmp® Optical Adhesive Film før qPCR-reaksjonen ble kjørt på StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block.

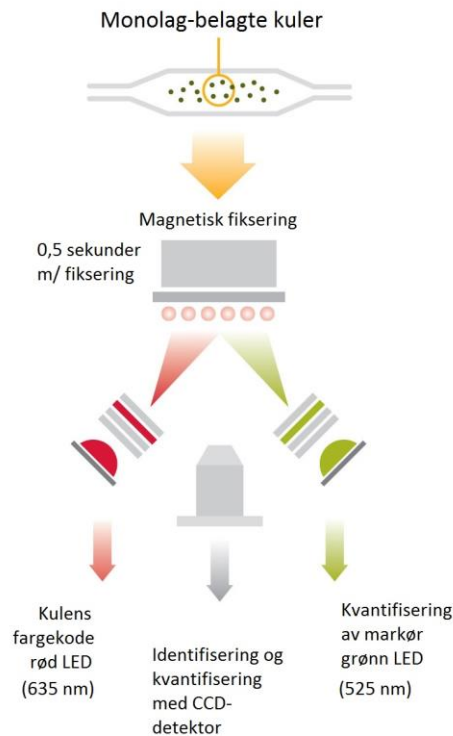
qPCR-reaksjonen ble kjørt i 41 sykluser der siste syklus utgjorde dissosiasjonsfasen for å produsere smeltekurven. Første trinn innebærer gradvis oppvarming til 94-96C som vil medføre denaturering av DNA ved at hydrogenbindingene som holder baseparene sammen brytes. Deretter senkes temperaturen til ~60C for å tillate annealing av primer, hvor DNA hybridiseres ved at primer spesifikt festes til genet av interesse. Dette trinnet etterfølges av temperaturøkning og elongering der polymerisering foregår. Syklusen repeteres.

2.9.6 Kvalitetssikring av gendata

SYBR Green binder seg uselektivt til alt av dobbel-trådet DNA-sekvens. For å unngå falskt positivt signal ble det gjort smeltekurveanalyse for å sjekke for eventuell dannelse av ikke-spesifikt PCR-produkt. Applied Biosystems StepOne software 2.3 ble benyttet for å utføre analyser og til å hente ut data om smeltekurve og standardkurve. Smeltekurven plotter reduksjon i fluorescens, som funksjon av økning i temperatur over tid. Dette gjøres for å skille mellom eventuelt primerprodukt (DNA) med ulik lengde. Hvis det bare er én «topp» der det forekommer fall i fluorescens, betyr det at denaturering av primerprodukt forekommer samtidig, og derfor kan antas å være det samme (kun ett primerprodukt), hvilket er ønskelig.

2.10 Kvantifisering av cytokiner med Luminex MAGPIX®

Multiplex betegner en metode som muliggjør en kvantitativ analytisk prosedyre for å undersøke flere analytter simultant i én enkelt prøve (multiplex bead array assays, MBAA). Selve prinsippet bak deteksjon og kvantifisering av målanalytten kan variere avhengig av assay og apparat. Metoden som ble brukt i denne oppgaven kan i korte trekk ansees som en parallelisert utgave av immunoassay som ELISA.



Figur 2.4: Prinsipp bak deteksjonsmetoden for multiplex med Luminex MAGPIX®. Fargekodete kuler med monolag av ligand har bundet målanalytten, og er blitt fiksert magnetisk. Identifisering av hvilken målanalytt kulen binder foregår under rød LED-belysning, mens kvantifisering av fluorescenssignal blir gjort under grønn belysning. Modifisert fra [118].

Prinsippet bak MAGPIX® (Figur 2.4) utnytter fargekodete mikrosfærer coatet med ligand som binder en spesifikk målanalytt. Binding av målanalytten vil resultere i dannelsen av et fluorescerende kompleks. Mikrosfærene er magnetiske, og i deteksjonskammeret vil apparatet utnytte dette for å posisjonere kulene slik at de sammen utgjør en fiksert rektangulær struktur (matrise). Deretter vil et kamera (CCD-detektor) avbilde strukturen gjennom to fargefiltere. Det ene fargefilteret (rødt) brukes først i kombinasjon med LED-belysning for å avgjøre kulens fargekode, og dermed hvilken ligand den binder. Det andre fargefilteret (grønt) brukes for å kvantifisere fluorescensintensitet (FI). Programvare utnytter en kules bestemte posisjon i matrisen for å kombinere informasjon om kulens fargekode (hvilken ligand den binder) med FI-signal (hvor mye den har bundet). Standardkurver for hver av analyttene brukes for å relatere FI-signal til konsentrasjon i pg/mL respektivt.

Prøver ble tatt av differensieringsmediet (M3) fra flaske med celler som ble høstet inn til qPCR-forsøk. Alle medieprøvene var inkubert med celler fra de siste 48 timer av differensieringsfasen. Før innhøsting ble cirka 3mL volum overført fra celleflaske til et sentrifugerør merket med dato og donorkode. M3 er tilsatt FCS, og det ble derfor tatt et tilsvarende volum av M3 som ikke hadde

vært i kontakt med celler som ble brukt som kontroll til hver prøve. Sentrifugerør med prøve og kontroll ble fryst ned ved -80°C til senere bruk med parallellkjøring på Luminex MAGPIX.

2.11 Statistikk

GraphPad Prism 6.07 for Windows ble brukt for å utføre alle statistiske analyser. Det ble ikke antatt normalfordeling av dataene, så kun ikke-parametriske statistiske tester er benyttet. Paret, tosidig «Wilcoxon signed rank test» ble utført ved alle tids-/konsentrasjon- og dose-respons-forsøk med TMAO, mens uparet «Mann-Whitney test» ble benyttet i sammenlikninger mellom gruppen av LD og RT. Tosidig «Spearman» ble utført ved alle korrelasjonsanalyser. Det ble brukt signifikansnivå på 5% ($\alpha=0,05$), og statistisk signifikans er vist som *. Alle data er presentert som gjennomsnittsverdi \pm SEM-verdi, om ikke annet er spesifisert. For korrelasjonsanalysene ble spearmans korrelasjonskoeffisient, ρ , oppgitt og brukt i tolkningen for hver av korrelasjonene. ρ er negativ når assosiasjonen mellom x og y er negativ, og positiv når assosiasjonen mellom x og y er positiv. En perfekt korrelasjon har $\rho = 1$ eller $\rho = -1$; når alle punktene utgjør en rett linje og følgende lineære sammenheng.

Det ble brukt gjennomsnitt beregnet fra 8 paralleller per parameter (= 1 brønnekolonne i 96 brønnersbrett) i alle substratoksidasjonsforsøk, med unntak av forsøkene som inkluderte 96 timers inkubering med TMAO, hvor gjennomsnittet fra 4 paralleller ble brukt. Ved undersøkelser gjort på gen- og proteinnivå er gjennomsnitt beregnet fra triplerter.

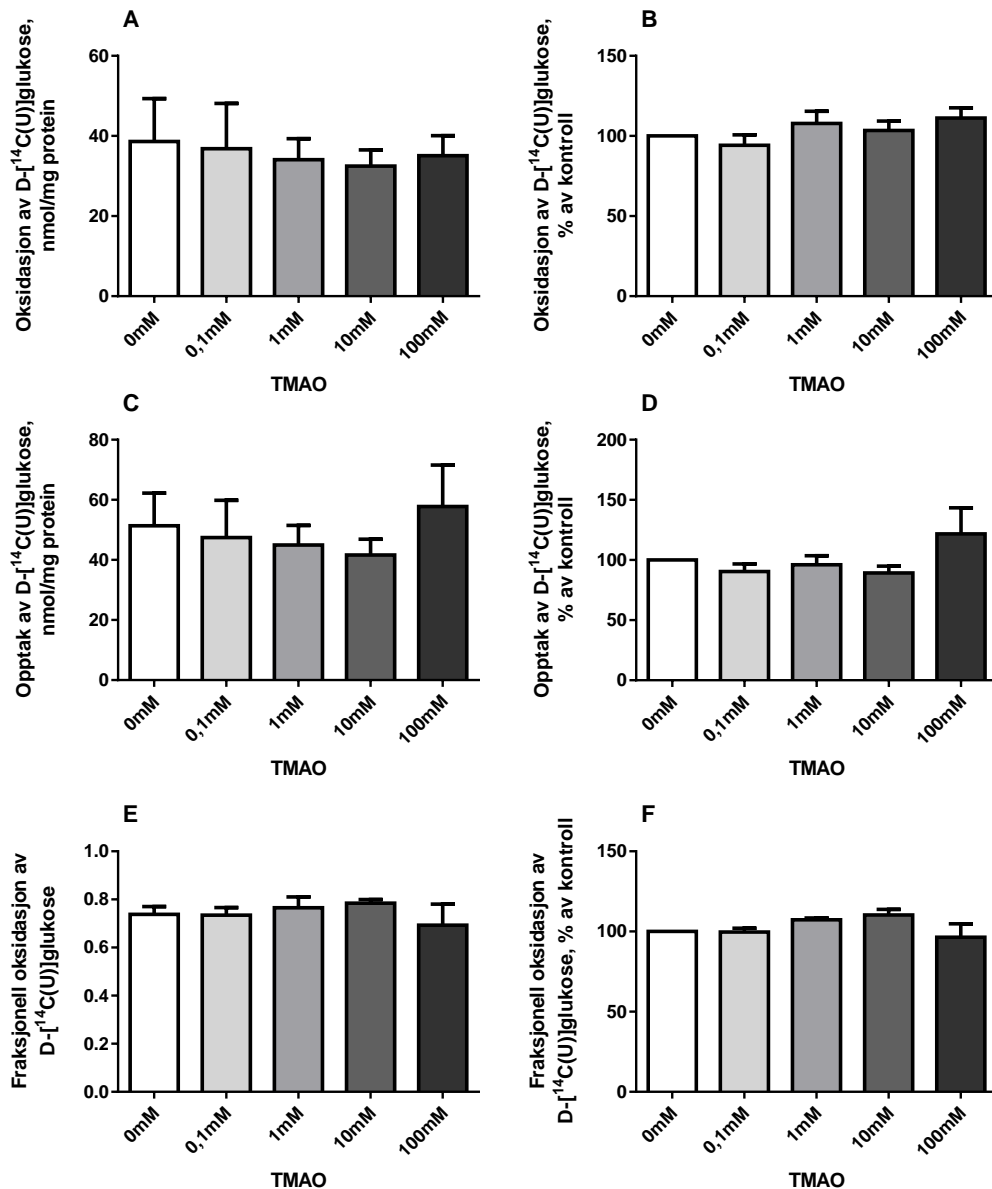
Noen deltakere (RT) er blitt ekskludert fra korrelasjonanalysene av subjektiv smerteopplevelse, cytokin, og/eller gendata: Dette var ufullstendige VAS-data for nåværende helsetilstand og ryggsmarter for én av deltakerne.

3 Resultater

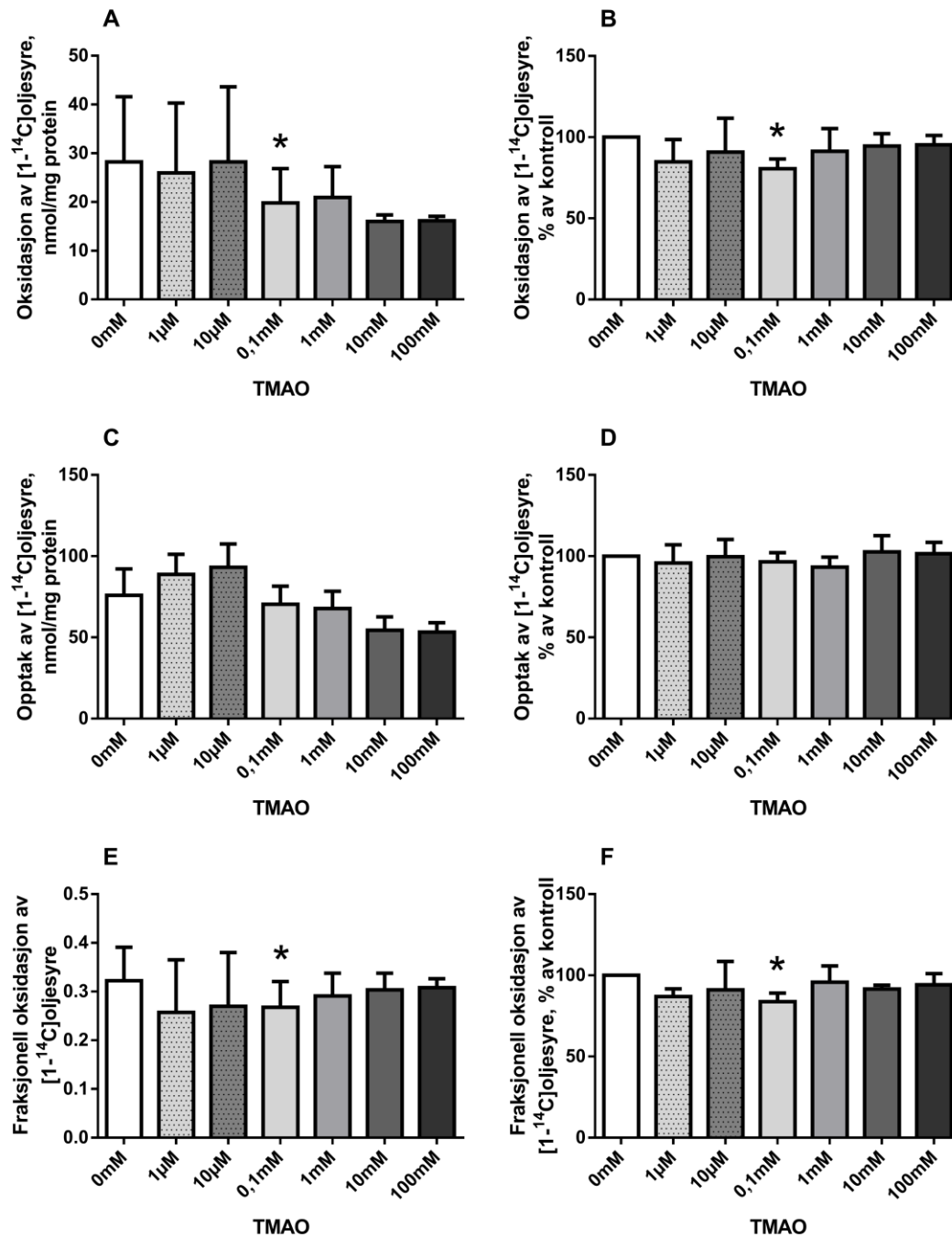
3.1 Dose-respons av TMAO på energimetabolisme

Det er per idag så vidt vi vet ikke blitt undersøkt om TMAO har direkte effekt på glukose- og oljesyremetabolisme i skjelettmuskelceller. Muskelceller fra normalvektige, friske frivillige (LD) ble derfor forbehandlet med TMAO (0,1 – 100 mM) i 24 timer, og effekt på glukose- (Figur 3.1) og oljesyremetabolisme (Figur 3.2) ble studert. Det ble ikke funnet noen signifikante effekter av TMAO på glukoseoksidasjon eller -opptak (Figur 3.1). TMAO (0,1 mM) førte imidlertid til signifikant reduksjon i oljesyreoksidasjon etter 24 timers forbehandling (Figur 3.2A, B) uten å påvirke oljesyreopptak (Figur 3.2 C, D).

Figur 3.2A viser en signifikant forandring i oljesyreoksidasjon tilsvarende en reduksjon på 20 % i forhold til kontrollcellene ($p=0,031$) (Figur 3.2B). Dette var nok til å gi utslag i beregningen av fraksjonell oksidasjon. Det var ikke noen tilsvarende effekt på oljesyreopptaket.



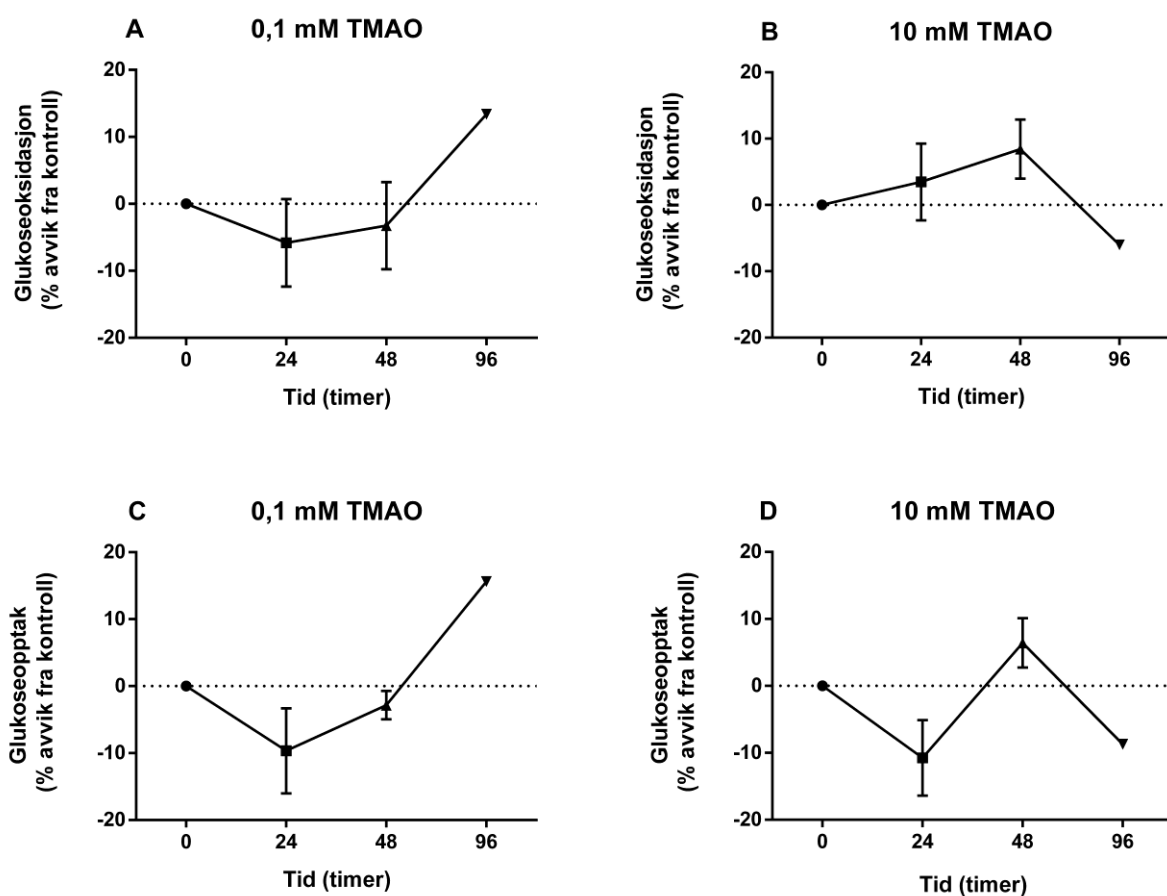
Figur 3.1: Effekter av TMAO på glukosemetabolisme som dose-respons (LD-celler): Myotuber ble forbehandlet med 0,1mM, 1mM, 10mM eller 100mM TMAO i 24 timer, det siste differensieringsdøgnet. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D-¹⁴C(U)glukose (1 μ Ci/ml) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A:** Oksidasjon av glukose til CO₂, **B:** Oksidasjon i % av kontroll, **C:** Opptak (CA+CO₂), **D:** Opptak i % av kontroll, **E:** Fraksjonell oksidasjon, **F:** Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Alle resultater er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. N= 6 (0,1mM), N= 3 (1mM, 10mM, 100mM).



Figur 3.2: Effekter av TMAO på oljesyremetabolisme som dose-respons (LD-celler): Myotuber ble forbehandlet med 1µM, 10µM, 0,1mM, 1mM, 10mM eller 100mM TMAO i 24 timer, det siste differensieringsdøgnet. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 100µM [^{14}C]oljesyre (1 µCi/ml) og CO_2 -produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A:** Oksidasjon av oljesyre til CO_2 , **B:** Oksidasjon i % av kontroll, **C:** Opptak (CA+ CO_2), **D:** Opptak i % av kontroll. **E:** Fraksjonell oksidasjon, **F:** Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Alle resultater er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. N= 6 (0,1mM, 1mM), N= 3 (1µM, 10µM, 10mM, 100mM). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll (0 mM).

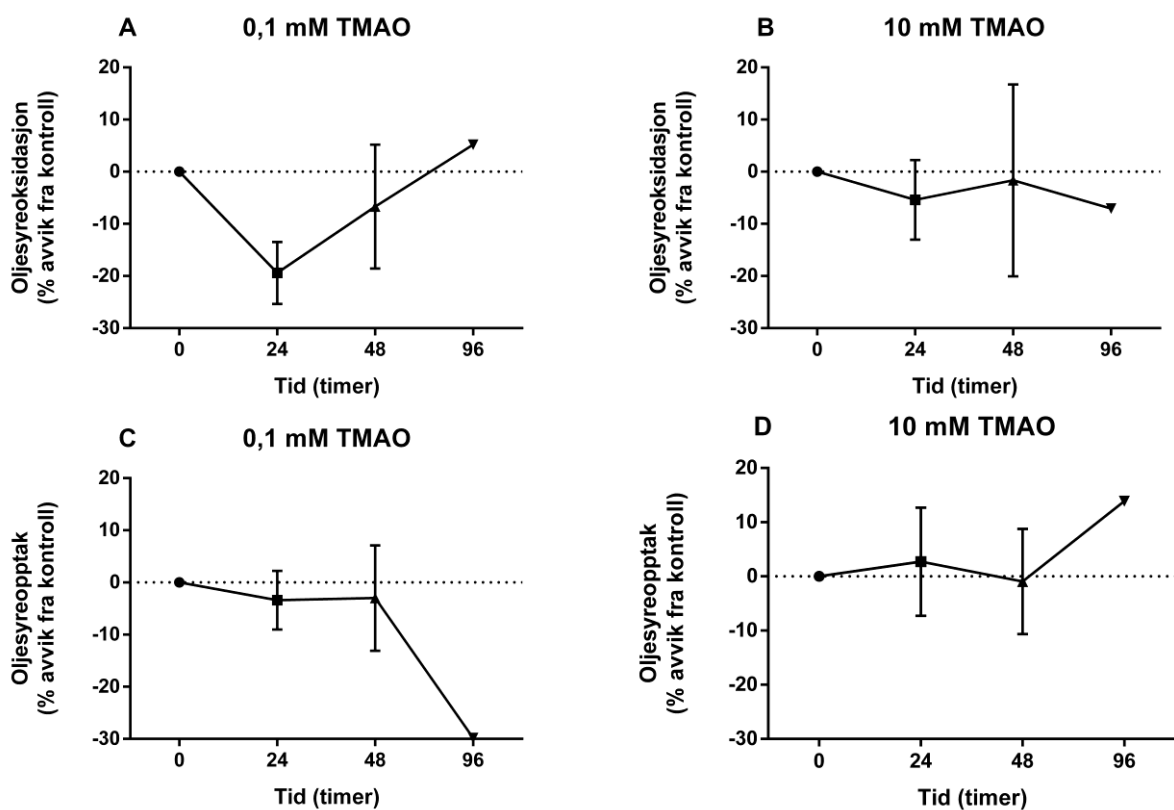
3.2 Tidsavhengig effekt av TMAO på energimetabolisme

For å undersøke i hvilken grad effekten av TMAO var tidsavhengig, ble energimetabolismen i muskelceller (LD) studert etter 24t, 48t og 96t forbehandling med TMAO (0,1 og 10 mM). Resultatene er presentert i figur 3.3 og 3.4 (hhv. glukose- og oljesyremetabolisme). Det var ingen effekt av TMAO på glukoseoksidasjon eller -opptak verken ved 24 timers eller 48 timers inkubering. Etter 96 timer var det en tendens til økt oksidasjon og opptak ved 0,1 mM TMAO (Figur 3.3A, C), og motsatt effekt ved 10 mM TMAO (Figur 3.3B, D). Det er vel og merke kun ett forsøk som ligger bak observasjonen ved 96 timer. Glukoseopptak i kontrollcellene var i dette forsøket 50,0 nmol/mg protein ($\pm 6,6$) og glukoseoksidasjon var 39,6 nmol/mg protein ($\pm 6,4$).



Figur 3.3: Tidsavhengige effekter av TMAO på glukosemetabolisme i myotuber (LD-celler) etter 24-96 timers forbehandling med 0,1mM eller 10mM TMAO. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D- 14 C(U)glukose (1 μ Ci/ml) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A** og **B**: Oksidasjon (CO₂) av glukose ved 0,1 mM (A) og 10mM (B) TMAO. **C** og **D**: Opptak av glukose (CA+CO₂) ved 0,1 mM (C) og 10mM (D) TMAO. Alle resultater er beregnet som avvik fra kontroll (%) og presentert som gjennomsnitt \pm SEM. A, C (0,1mM): N=6 (24t), 3 (48t) og 1 (96t). B, D (10mM): N=3 (24t), 3 (48t) og 1 (96t).

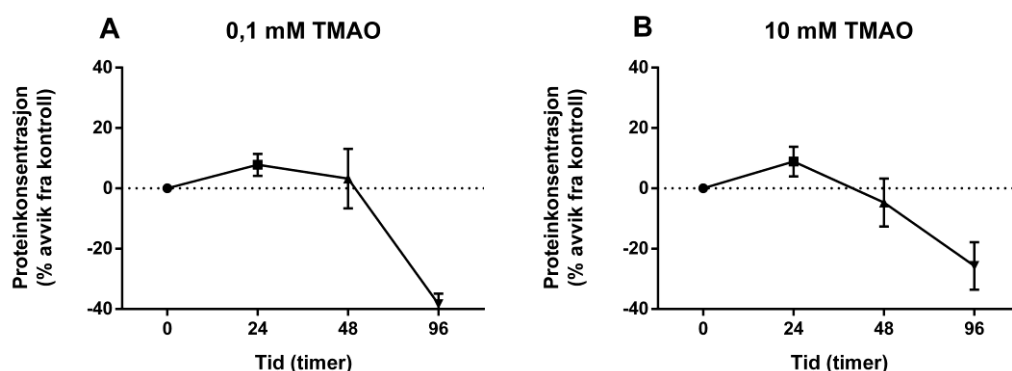
Det var lignende effekter av TMAO på oljesyreoksidasjon som på glukoseoksidasjon etter 24-96 timer (Figur 3.4 A, B), og ingen signifikant forskjell mellom kontroll og 24 timer, eller 48 timer verken i oljesyreoksidasjon (Figur 3.4 A, B) eller oljesyreopptak (Figur 3.4 C, D). Noe avvikende verdier ble observert etter 96 timer inkubering med 0,1 mM TMAO, der opptak av oljesyre syntes å være redusert (Figur 3.4 C), og hvor 10mM TMAO ga økning i opptaket (Figur 3.4D). Dette er også basert på kun ett enkeltforsøk etter 96 timer. Oljesyreopptak i kontrollcellene var i disse forsøkene 79,3 nmol/mg protein ($\pm 11,1$) og oljesyreoksidasjonen var 24,6 nmol/mg protein ($\pm 8,0$).



Figur 3.4: Tidsavhengige effekter av TMAO på oljesyremetabolisme i myotuber (LD-celler) etter 24-96 timers forbehandling med 0,1mM eller 10mM TMAO. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μ M[1-¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A** og **B**: Oksidasjon (CO₂) av oljesyre ved 0,1 mM (A) og 10mM (B) TMAO. **C** og **D**: Opptak av oljesyre (CA+CO₂) ved 0,1 mM (C) og 10mM (D) TMAO. Alle resultater er beregnet som avvik fra kontroll (%) og presentert som gjennomsnitt \pm SEM. A, C (0,1mM): N=6 (24t), 3 (48t) og 1 (96t). B, D (10mM): N=3 (24t), 3 (48t) og 1 (96t).

3.3 Toksiske effekter av TMAO

Resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene kunne tyde på at en uspesifikk effekt oppsto ved inkubering med TMAO i tidsrommet mellom 48 og 96 timer. For å studere eventuelle toksiske effekter av TMAO ble proteinkonsentrasjonen målt etter inkubering med TMAO (0,1 mM og 10 mM) i 24-96 timer (Figur 3.5). Proteinkonsentrasjonen er et indirekte mål for levende celler under gjennomføring av substratoksidasjonsmetoden, da døde celler blir vasket bort.



Figur 3.5: Effekter av TMAO på proteinkonsentrasjon i brønner med myotuber (LD-celler) etter 24-96 timers forbehandling med 0,1mM eller 10mM TMAO. Data er fra forsøk med oljesyre- og glukosemetabolisme slått sammen. Proteinkonsentrasjon ble målt ved Bradfords metode som beskrevet i avsnitt 2.8 etter endt inkubering og vasking av cellene. **A:** Proteinkonsentrasjon ved 0,1mM TMAO. **B:** Proteinkonsentrasjon ved 10mM TMAO. Alle resultater er beregnet som avvik fra kontroll (%) og presentert som gjennomsnitt \pm SEM. A (0,1mM): N=12 (24t), 6 (48t) og 2 (96t). B (10mM): N=6 (24t), 6 (48t) og 2 (96t).

Figur 3.5 viser proteinkonsentrasjon i substratoksidasjonsforsøk med sammenslåtte data for glukose- og oljesyreforsøk. Ingen effekter av TMAO på proteinkonsentrasjon kunne observeres i tidsintervallet 0-48 timer. Etter 96 timer var det markert lavere proteinkonsentrasjon både i forhold til 0 og 48 timers forbehandling med 0,1 mM TMAO (Figur 3.5A), noe som tyder på toksisk effekt. Effekten ved 96 timers forbehandling med 0,1mM eller 10mM TMAO tilsvarer henholdsvis en 38% (Figur 3.5A) og 21% (Figur3.5B) reduksjon i proteinkonsentrasjon i forhold til cellene som ble inkubert i 48 timer. Proteinkonsentrasjon i kontrollcellene var i dette forsøket 0,031 mg/ml (\pm 0,002).

Basert på karakteriseringen av TMAO-effekter i LD-cellene ved dose-respons, tidskurver og proteinkonsentrasjoner, ble 48 timer inkubering med 0,1 mM og 10 mM TMAO valgt for videre forsøk med RT-celler.

3.4 Karakterisering av energimetabolisme i muskelceller fra ryggopererte smertepasienter

Kroniske ryggsmertepasienter er i en konstant smertesituasjon hvor blant annet direkte eller indirekte påvirkning av vedvarende inflammasjon kan være involvert. Som tidligere beskrevet er lavgradig systemisk inflammasjon, som bla. ved fedme en medvirkende årsak til endringer i energimetabolisme [56, 57]. Det var derfor ønskelig å karakterisere glukose- og oljesyremetabolisme i celler fra ryggopererte pasienter (RT-celler). Tallene fra substratoksidasjonsforsøkene med LD- og RT-celler er oppsummert i Tabell 3.1. Både oljesyre- og glukoseoksidasjonen kunne se ut til å være noe lavere enn i LD-cellene, men dette var ikke signifikante forskjeller. Det var imidlertid et signifikant høyere oljesyreopptak i RT-cellene; iberegnet den lavere oljesyreoksidasjonen gikk det frem at fraksjonell oljesyreoksidasjon i RT-cellene i snitt var 44 % lavere enn i LD-cellene.

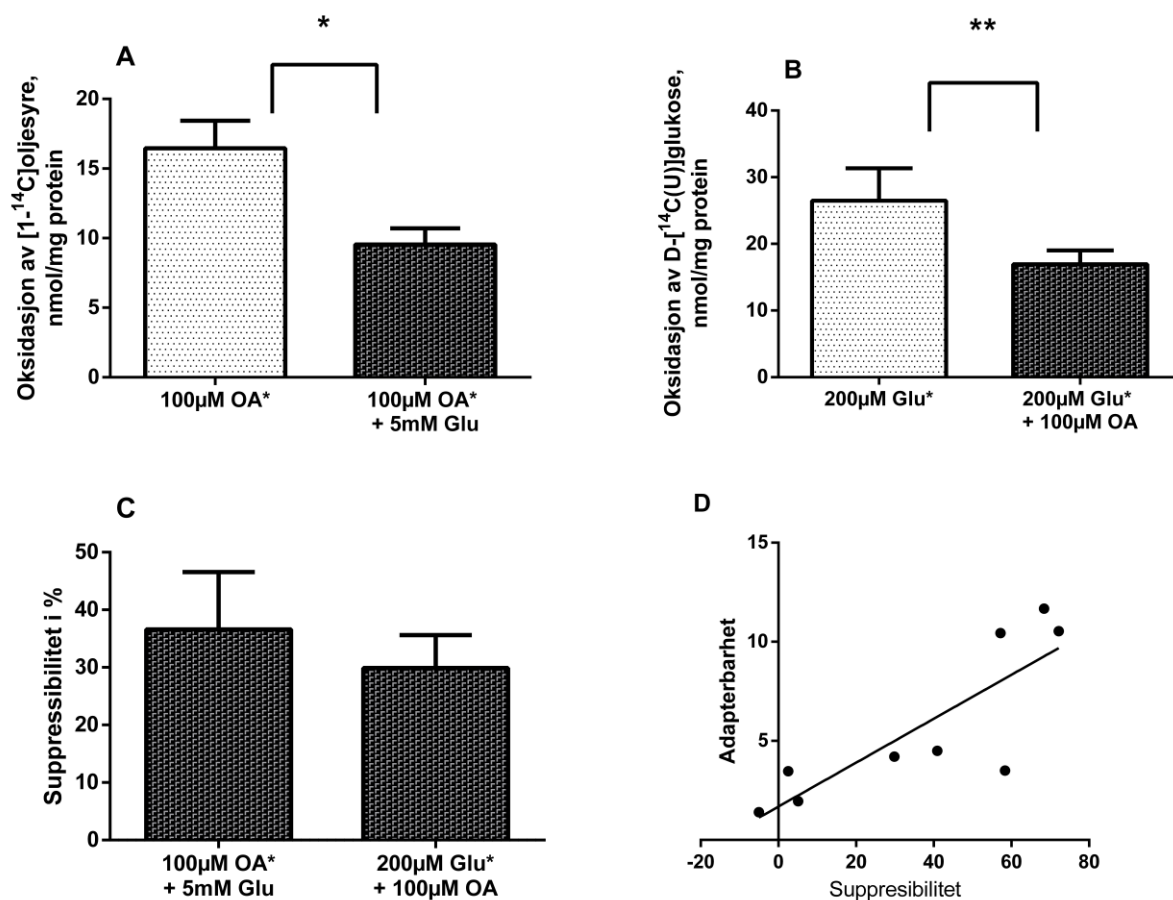
Tabell 3.1: Gjennomsnitt av oksidasjon (CO₂) og opptak (CA+CO₂) av radiomerket oljesyre og glukose i henholdsvis myotuber fra ryggopererte pasienter (RT-celler) og tynne, friske frivillige (LD-celler).

	RT (±SEM)	LD (±SEM)	Δ (LD-RT)
n=	9	6	
Glukose			
Oksidasjon	26,5 (4,9)	38,6 (10,7)	12,2
Opptak	43,8 (5,1)	51,4 (10,9)	7,5
Oljesyre			
Oksidasjon	16,5 (2,0)	28,2 (13,4)	11,8
Opptak	90,0 (5,3)	75,9 (16,3)	-14,1*

Alle tabellverdiene for oksidasjon og opptak av glukose eller oljesyre er oppgitt i nmol/mg protein.

* p<0,05 (Mann-Whitney test)

Det ble gjort beregninger på to av parameterne som inngår i mål på metabolsk fleksibilitet ved bruk av en egen protokoll med akutt tilsetning av ikke-radiomerket substrat. I følge hypotesen for glukose-fettsyresyklus presentert av Randle et al. vil en slik forandring mellom tilgjengeligheten på glukose og oljesyre føre til en endring i muskelcellens substratpreferanse [47]. Resultatene fra forsøk på metabolsk fleksibilitet i RT-celler er vist i figur 3.6. Det var en signifikant glukosesuppressjon av oljesyreoksidasjon med 36 % (Figur 3.6A, C), og oljesyresuppressjon av glukoseoksidasjon med 29% (Figur 3.6 B). Det ble også funnet en signifikant positiv korrelasjon mellom adapterbarhet og glukosesuppressibilitet i denne gruppen (Figur 6D). Adapterbarhet ble i myotuber fra ryggopererte pasientene beregnet til $5,74 (\pm 1,33)$ (data ikke vist).



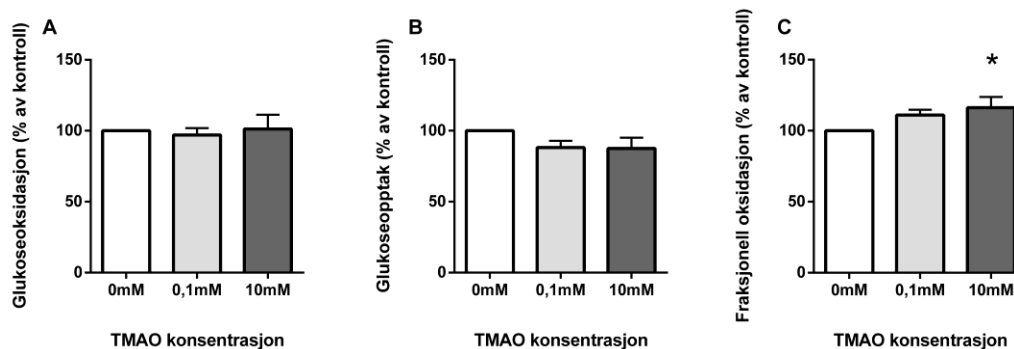
Figur 3.6: Metabolsk fleksibilitet i myotuber fra ryggopererte pasienter (RT-celler). Beregning av suppressibilitet og adapterbarhet (ikke vist) ble gjort etter formel som angitt i avsnitt 2.7. **A:** Glukoses evne til å undertrykke oksidasjon (CO_2) av oljesyre (suppressibilitet) førte til en signifikant reduksjon i oksidasjon av oljesyre med 36%. **B:** Oljesyres evne til å undertrykke glukoseoksidasjon (CO_2) førte til en signifikant reduksjon i oksidasjon (CO_2) av glukose med 29%. **C:** Sammenligning av de to suppressibilitetsparameterne beregnet fra hhv. A og B. **D:** Korrelasjon mellom adapterbarhet og suppressibilitet ($\rho=0,867$, $p=0,0045$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM (A, B, C) fra 9 uavhengige forsøk ($n=9$). $*$ ($p<0,05$), $**$ ($p<0,01$). OA, Oljesyre; Glu, Glukose; OA*, [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre; Glu*, D-[$^{14}\text{C(U)}$]glukose.

Det ble undersøkt om parameterne for metabolsk fleksibilitet hadde sammenheng med pasientenes BMI eller alder, men ingen signifikante korrelasjoner ble funnet for adapterbarhet eller oljesyre- og glukosesuppressibilitet.

3.5 Effekt av TMAO på muskelceller fra ryggopererte smertepasienter

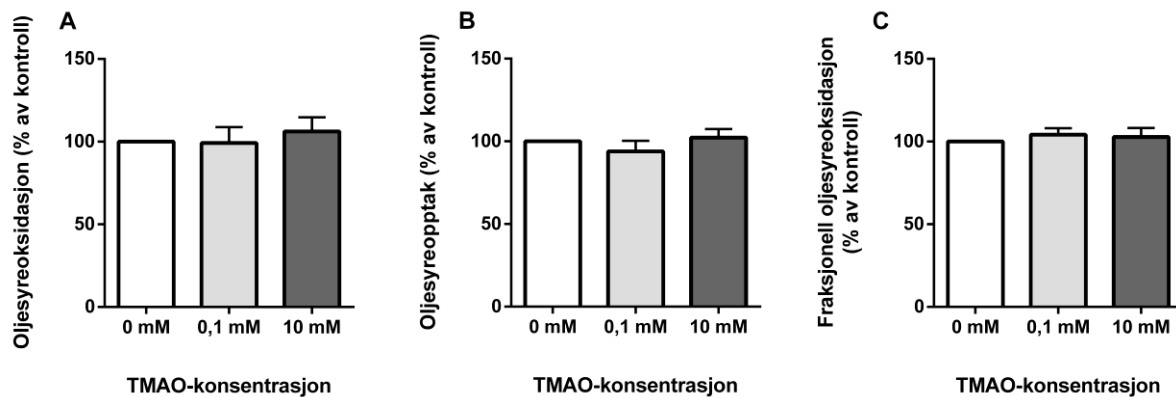
Muskelceller fra ryggopererte pasienter (RT) ble forbehandlet med 0,1 mM, eller 10 mM TMAO i 48 timer for å studere effekt på glukose- (Figur 3.7) og oljesyremetabolisme (Figur 3.8).

Forbehandlingen med 0,1 mM TMAO kunne se ut til å redusere glukoseopptak (12%), men effekten var ikke signifikant ($p=0,0547$) (Figur 3.7B). Fraksjonell oksidasjon av glukose økte signifikant med 16% ved 10mM TMAO (Figur 3.7C), men det var ingen signifikant endring i oksidasjon eller opptak (Figur 3.7A, B). Glukoseopptak i kontrollcellene var i dette forsøket 43,8 nmol/mg protein ($\pm 5,1$) og glukoseoksidasjon var 26,5 nmol/mg protein ($\pm 4,9$).



Figur 3.7: Effekter av TMAO på glukosemetabolisme i RT-celler. Myotuber ble forbehandlet med 0,1mM eller 10mM TMAO i 48 timer, de siste 48 timene av differensieringsperioden. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 200 μ M D- 14 C(U)]glukose (1 μ Ci/ml) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A:** Oksidasjon (CO₂) av glukose i % av kontroll, **B:** Opptak (CA+CO₂) av glukose i % av kontroll, **C:** Fraksjonell oksidasjon av glukose relatert til kontroll. Alle resultater er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 9 uavhengige forsøk (n=9). * $p<0,05$ vs. kontroll (0 mM).

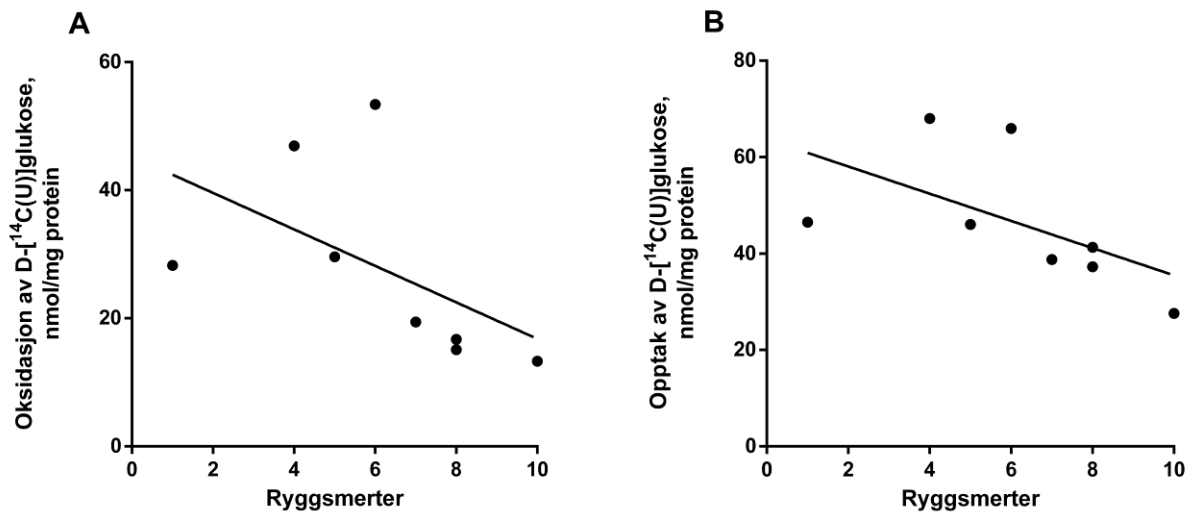
Ingen signifikante effekter av TMAO ble funnet på oljesyreopptak eller -oksidasjon. (Figur 3.8), dette i motsetning til funn i forsøk med LD-cellene (Figur 3.2). Oljesyreopptak i kontrollcellene var i dette forsøket 90,0 nmol/mg protein ($\pm 5,3$) og oljesyreoksidasjon var 16,5 nmol/mg protein ($\pm 2,0$).



Figur 3.8: Effekter av TMAO på oljesyremetabolisme i RT-celler. Myotuber ble forbehandlet med 0,1mM eller 10mM TMAO i 48 timer, de siste 48 timene av differensieringsperioden. Etter forbehandling ble myotubene inkubert i fire timer med 100 μ M[1-¹⁴C]oljesyre (1 μ Ci/ml) og CO₂-produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. **A:** Oksidasjon (CO₂) av oljesyre i % av kontroll, **B:** Opptak (CA+CO₂) av oljesyre i % av kontroll, **C:** Fraksjonell oksidasjon av glukose relatert til kontroll. Alle resultater er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 9 uavhengige forsøk (n=9).

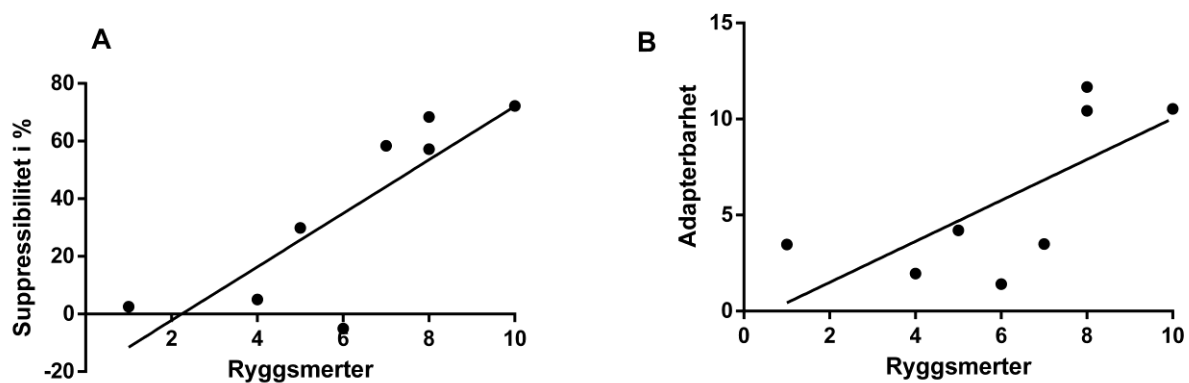
3.6 Metabolske egenskaper og smerteopplevelse

Det var ønskelig å undersøke om metabolske egenskaper i muskelcellene hadde noen sammenheng med grad av opplevd smerte hos pasientene. Det ble funnet to signifikante korrelasjoner mellom ryggsmarter og resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene der ryggsmarter korrelerte negativt med glukoseoksidasjon (Figur 3.9A) og glukoseopptak (Figur 3.9B).



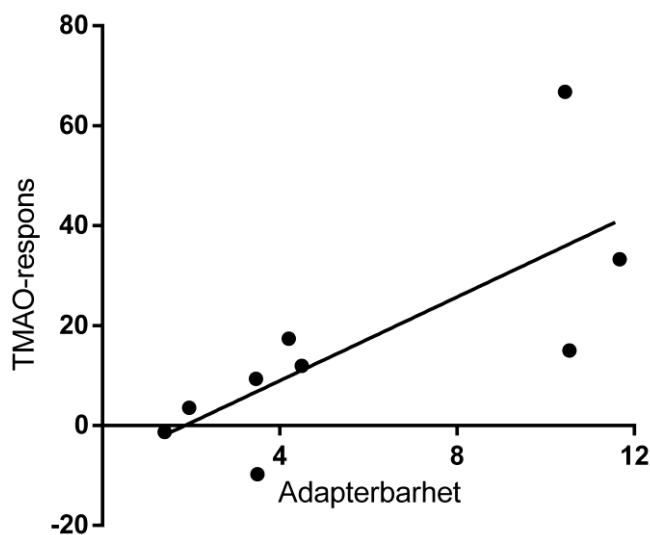
Figur 3.9: Korrelasjon mellom ryggsmerter og glukosemetabolisme i gruppen av ryggopererte pasienter. Myotubene ble inkubert i fire timer med 200 μM D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) og CO_2 -produksjon og celleassosiert radioaktivitet (CA) ble målt som beskrevet i avsnitt 2.6. Ryggsmerter er pasientens egenrapporterte smerteopplevelse på skala fra 1 – 10, hvor 10 betegner mest smerteopplevelse, slik som beskrevet i avsnitt 2.3. **A:** Signifikant korrelasjon ($\rho=-0,778$, $p=0,025$) mellom ryggsmerter og glukoseoksidasjon (CO_2). **B:** Signifikant korrelasjon ($\rho=-0,838$, $p=0,011$) mellom ryggsmerter og glukoseopptak ($\text{CA}+\text{CO}_2$). A, B: $N=8$.

Ved korrelasjonsanalysene mellom smerte og metabolsk fleksibilitet ble det funnet to signifikante korrelasjoner der ryggsmerter korrelerte positivt med suppressibilitet (Figur 3.10A) og adapterbarhet (Figur 3.10B). Ingen signifikante korrelasjoner ble funnet mellom bensmerter, allmenn helsetilstand og parameter for metabolsk fleksibilitet.



Figur 3.10: Korrelasjon mellom ryggsmerter og parametre for metabolsk fleksibilitet i gruppen av ryggopererte pasienter. **A:** Signifikant korrelasjon ($\rho=0,814$, $p=0,018$) mellom ryggsmerter og suppressibilitet. **B:** Signifikant korrelasjon ($\rho=0,743$, $p=0,042$) mellom ryggsmerter og adapterbarhet. Ryggsmerter er pasientens egenrapporterte smerteopplevelse på skala fra 1 – 10, hvor 10 betegner mest smerteopplevelse, slik som beskrevet i avsnitt 2.3. A, B: $N=8$.

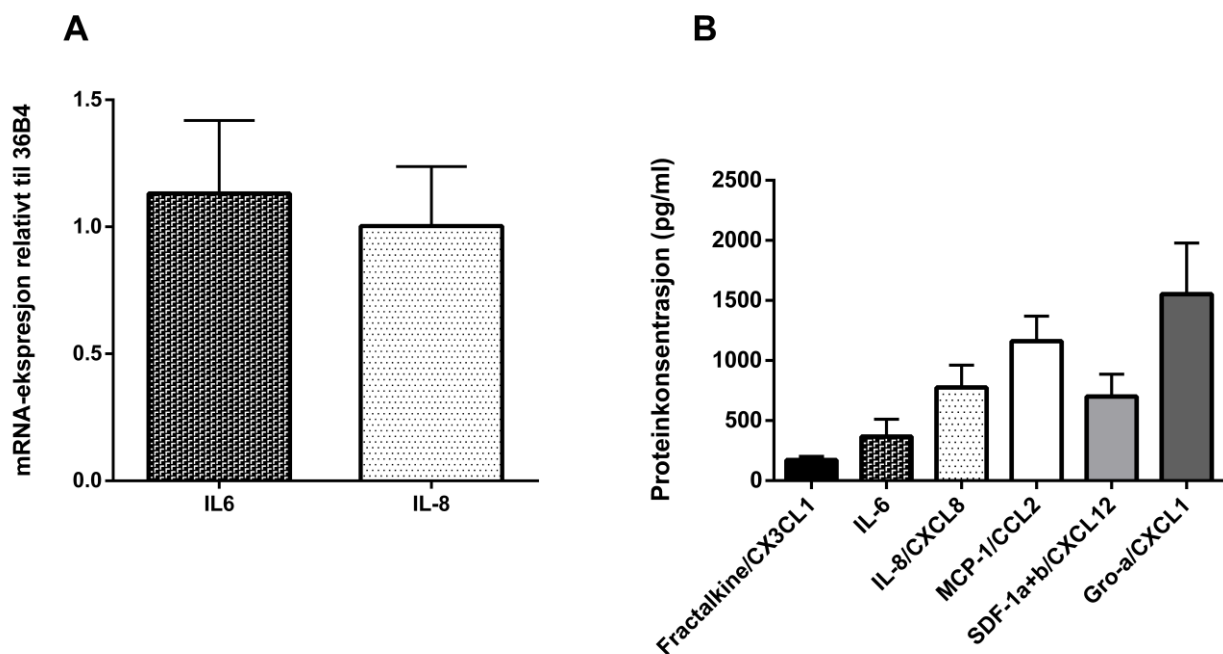
Økning i fraksjonell oksidasjon av glukose ble definert som TMAO-respons. Det ble sett en signifikant positiv korrelasjon mellom adapterbarhet og TMAO-respons (Figur 3.11) for de ryggopererte pasientene ($\rho=0,78$, $p=0,017$). TMAO-responsen ble også forsøkt korrelert med pasientenes BMI, alder, oljesyre- og glukosesuppressibilitet, glukose- og oljesyreoksidasjon og -opptak, men ingen ytterligere korrelasjoner ble funnet. Det ble også undersøkt for signifikante korrelasjoner mellom TMAO-respons og parametere for subjektiv smerteopplevelse i de ryggopererte pasientene, men ingen ble funnet. Smertedata som ble brukt i korrelasjonene var henholdsvis bensmerter, ryggmerter og allmenn helsetilstand.



Figur 3.11: Korrelasjon mellom TMAO-respons og adapterbarhet i muskelceller fra ryggopererte pasienter var signifikant positiv ($\rho=0,783$, $p=0,0172$). TMAO-respons er definert som prosentvis økning av fraksjonell glukoseoksidasjon etter forbehandling i 48 timer med 10 mM TMAO. N=9.

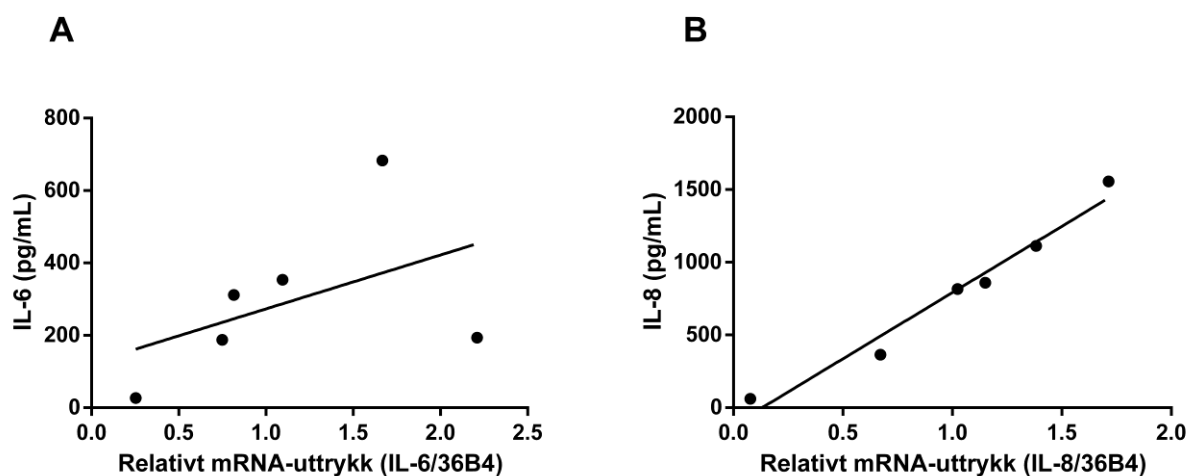
3.7 Ekspresjon av myokiner i muskelceller fra ryggopererte smertepasienter

Figur 3.12 viser ekspresjon av interleukin-6 (IL-6) og interleukin-8 (IL-8) på gen- og proteinnivå i muskelcellene (RT). Figur 3.12B viser også at muskelcellene uttrykker fraktalkin (CX3CL1), monocytt-kjemoattraktantprotein-1 (MCP-1), «stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) og GRO α (CXCL1) på proteinnivå. Gendata fra qPCR med IL-6 og IL-8 ble normalisert i forhold til syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4) som endogen kontroll (Figur 3.12A). Alle cytokinkonsentrasjonene ble målt i differensieringsmedium (M3) som hadde vært i kontakt med myotubene i 48 timer.



Figur 3.12: Ekspresjon av interlukin-6 (IL-6) og interleukin-8 (IL-8) på gen- og proteinnivå i muskelcellene (RT). **A:** Gendata fra qPCR med IL-6 og IL-8 normalisert i forhold til syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4) som endogen kontroll (IL-6: 1,132±0,29, IL-8: 1,003±0,23). **B:** Muskelcellene (RT) uttrykker fraktalkin (CX3CL1), IL-6, IL-8 (CXCL8), monocytt-kjemoattraktantprotein-1 (MCP-1), «stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) og GRO α (CXCL1). Cytokine ble målt i differensieringsmedium (M3) som hadde vært i kontakt med myotuber i 48 timer før høsting, og prøvene ble kjørt på Luminex MAGPIX® med ueksponert M3 som kontroll, slik som beskrevet i avsnitt 2.10. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. A: n=6, B: n= 9.

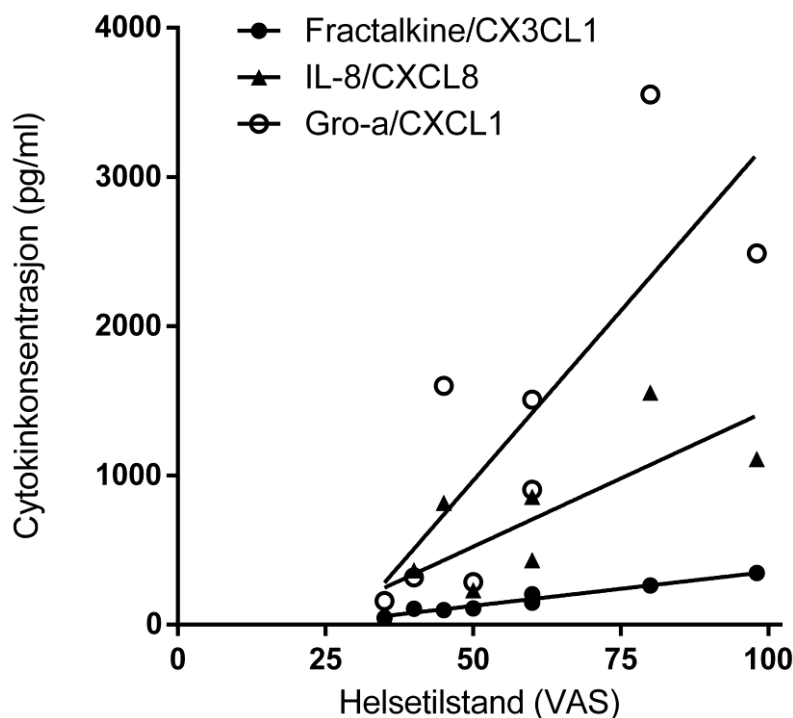
Kvalitetssikring av gendata var relevant grunnet lavt RNA-utbytte etter isolering. Det ble gjort cDNA-syntese med utgangspunkt i 0,5 μ g RNA for å inkludere flest mulige donorer i qPCR-kjøringen. Vanligvis gjøres cDNA-syntese med utgangspunkt i 1 μ g RNA for å holde antall sykluser før inntredelse av C_T lavt nok til å unngå støy fra uspesifikke PCR-reaksjoner. Det var ønskelig å undersøke om denne avgjørelsen hadde betydning for om valg av gendata eller proteinkonsentrasjon i videre korrelasjoner med IL-6 og IL-8 kunne føre til forskjellige utfall, eller om de kunne ansees som samstemmige.



Figur 3.13: Korrelasjon mellom cytokinkonsentrasjon og deres respektive genuttrykk normalisert mot 36B4 (RT-celler). **A:** Ikke-signifikant korrelasjon mellom cytokinet IL-6 og dets gen ($\rho=0,657$, $p=0,175$). **B:** Signifikant korrelasjon mellom cytokinet IL-8 og dets gen ($\rho=0,998$, $p=0,003$). A, B: $n=6$.

Figur 3.13 viser korrelasjon mellom cytokinkonsentrasjon av cytokinene IL-6 (Figur 3.13A), IL-8 (Figur 3.13B) og deres respektive gener normalisert mot 36B4. Det ble funnet en signifikant korrelasjon mellom genuttrykk og cytokinkonsentrasjon for IL-8 ($\rho=0,998$, $p=0,0028$) (Figur 3.13B), men ikke for IL-6 ($\rho=0,657$, $p=0,175$) (Figur 3.13A) ved bruk av 36B4 som endogen kontroll. Derimot ble tilsvarende korrelasjonen for IL-6 funnet signifikant ($\rho=0,886$, $p=0,033$) ved bruk av glyseraldehyd-3-fosfat-dehydrogenase (GAPDH) som endogen kontroll for normalisering av gendata (IL-6/GAPDH: $0,977\pm 0,22$) (data ikke vist).

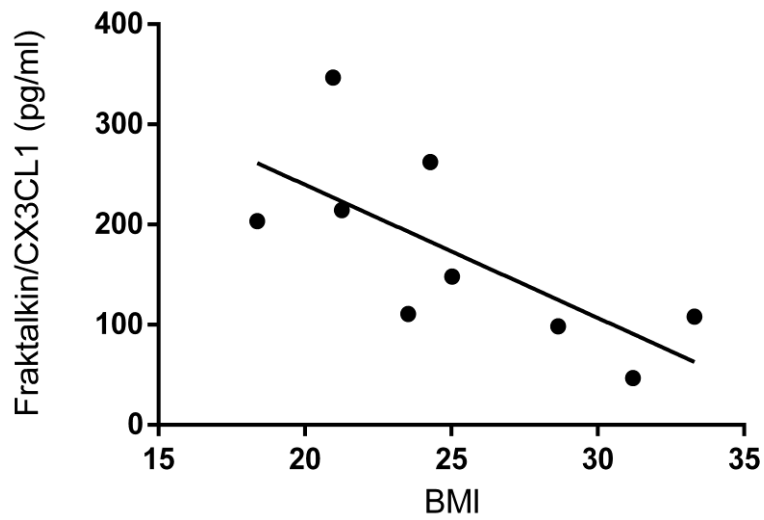
Figur 3.14 viser de av korrelasjonene som ble funnet signifikante ved korrelasjonsanalyse mellom cytokinkonsentrasjon og smertedata i ryggopererte pasienter. Det ble funnet signifikant positiv korrelasjon mellom pasientenes egenrapporterte opplevelse av allmenn helsetilstand, og cytokinene fraktalkin, IL-8 og GRO α . Fraktalkin var det av cytokinene med jevnest ($171,1$ pg/ml, $SD\pm 94,25$) og generelt lavest uttrykk, som spente fra 47 pg/ml til 347 pg/ml. Det motsatte var tilfelle for GRO α (1553 pg/ml, $SD\pm 1273$) hvor konsentrasjonene spente fra 160 pg/ml til 3553 pg/ml mellom de ulike donorene.



Figur 3.14: Signifikante korrelasjoner mellom allmenn helsetilstand og cytokinkonsentrasjon for fraktalkin (CX3CL1) ($\rho=0,970$, $p=0,0005$), IL-8 (CXCL8) ($\rho=0,838$, $p=0,0131$) og GRO α (CXCL1) ($\rho=0,778$, $p=0,0295$) i gruppen av ryggopererte pasienter. Allmenn helsetilstand er pasientens egenrapporterte funksjonsgrad på VAS-skala fra 1 – 100, hvor 100 betegner best tenkelige helsetilstand, slik som beskrevet i avsnitt 2.3. N=8.

Ved korrelasjonsanalysene med henholdsvis ben- eller ryggmerter ble det ikke funnet noen signifikant korrelasjon med noen av de 6 ulike cytokinene. Korrelasjonsanalyse ble også utført med parametere for metabolsk fleksibilitet og TMAO-respons, men ingen signifikante korrelasjoner ble funnet mellom cytokinene og henholdsvis suppressibilitet, adapterbarhet, TMAO-respons eller glukose- og oljesyremetabolisme.

Det var imidlertid en signifikant negativ korrelasjon mellom fraktalkinkonsentrasjon og kroppsmasseindeksen (BMI) til deltakerne i gruppen av ryggopererte pasienter (Figur 3.15). Av alle cytokinene som ble undersøkt var det kun uttrykk av fraktalkin som var signifikant korrelert med BMI ($\rho= -0,75$, $p=0,026$).



Figur 3.15: Det var en signifikant negativ korrelasjon ($\rho = -0,750$, $p = 0,0255$) mellom fraktalkin og kroppsmasseindeksen (BMI) i gruppen av ryggopererte pasienter. $N = 9$.

3.8 Korrelasjoner for cytokinene seg imellom

Det ble utført korrelasjonsanalyser med proteinkonsentrasjonene fra multipleks-kjøringen. Dette for å undersøke forhold cytokinene seg imellom. Signifikante korrelasjoner som ble funnet er vist i tabell 3.2.

Signifikante korrelasjoner ($p < 0,05$)		p-verdi	Spearman's korrelasjonskoeffisient (ρ)
IL-6	CXCL8 (IL-8)	0,0001	0,933
	CX3CL1	0,042	0,683
	CCL2 (MCP-1)	0,005	0,833
	CXCL1 ($\text{GRO}\alpha$)	0,002	0,867
CXCL8 (IL-8)	CX3CL1	0,013	0,783
	CCL2 (MCP-1)	0,002	0,867
	CXCL1 ($\text{GRO}\alpha$)	0,0001	0,967
$\text{GRO}\alpha$ (CXCL1)	CX3CL1	0,020	0,750
	CCL2 (MCP-1)	0,0001	0,933
	SDF-1 $\alpha+\beta$	0,050	0,667

Tabell 3.2: Signifikante korrelasjoner mellom proteinkonsentrasjon av cytokiner i RT-donorene. Cytokinene ble målt i differensieringsmedium (M3) som hadde vært i kontakt med myotuber i 48 timer før høsting, og prøvene ble kjørt på Luminex MAGPIX® med ueksponert M3 som kontroll, slik som beskrevet i avsnitt 2.10.

3.9 Oppsummering av korrelasjonsanalysene

En oversikt over korrelasjonene som ble funnet ved gjennomgang av alle data er presentert i tabell 3.3.

Tabell 3.3: Oversikt over signifikante korrelasjoner som ble funnet i gruppen av RT-donorer ved korrelasjonsanalysene av TMAO-respons, energimetabolisme, smerteopplevelse og cytokinutrykk. TMAO, trimetylammin N-oxid; CX3CL1, fraktalkin; BMI, kroppsmasseindeks.

Signifikante korrelasjoner (p<0,05)		p-verdi	Spearman's korrelasjonskoeffisient (ρ)
Adapterbarhet og suppressibilitet (n=9)		0,0045	0,867
TMAO-respons og adapterbarhet (n=9)		0,017	0,783
Smertes og energimetabolisme (n = 8)			
Ryggsmerter	Glukoseoksidasjon	0,025	-0,778
	Glukoseopptak	0,011	-0,838
	Supressibilitet	0,018	0,814
	Adapterbarhet	0,042	0,743
Smertes og cytokiner (n = 8)			
Helsetilstand	CX3CL1	0,0005	0,970
	CXCL8 (IL-8)	0,013	0,838
	CXCL1 (GROα)	0,029	0,778
BMI og cytokin (n = 9)			
BMI og CX3CL1 (fraktalkin)		0,025	-0,750

4 Diskusjon

4.1 Vurdering av metodikken

4.1.1 Donorkarakteristika og utvalg

For å undersøke første del av problemstillingen ble det brukt celler fra to grupper, LD og RT. Data fra begge gruppene ble sammenlignet for å karakterisere og undersøke for eventuelle forskjeller i den basale glukose- og oljesyremetabolismen og TMAO-respons. LD-cellene var hentet fra tynne, friske donorer i forbindelse med nyredonasjon, de hadde normal BMI og denne gruppen ble ansett som kontrollgruppe. RT-cellene var hentet ut fra pasienter med kjent forekomst av langvarige ryggsmarter ved tidspunktet for biopsitakingen. I denne gruppen var det en rapportert smertevarighet over en periode på 3-12 måneder (median) før operasjonstidspunktet. Ingen tilsvarende informasjon eksisterer for kontrollgruppen (LD), og det kan ikke utelukkes at én eller flere LD-donorer kan ha vært igjennom forhold som kan ha bidratt til å påvirke eventuelle forskjeller i den basale energimetabolismen og TMAO-respons mellom LD og RT.

Risikofaktorer som kan forklare patofysiologien til ryggsmarter er sammensatte og er derfor vanskelig å studere på grunn av metodologiske begrensninger. Utdanningsnivå, alder, BMI og kjønn er disponerende faktorer som er vist å ha sammenheng med problemstillinger relatert både til smerte og energimetabolisme [113, 119]. Det vil derfor være utfordrende å forklare årsakssammenhenger ved observasjonene som ble gjort, og studien tok derfor et deskriptivt standpunkt. Gruppen av ryggopererte pasienter var satt sammen av et utvalg som representerer forekomst av ryggsmarter i den generelle befolkningen. Selv om det ikke var kjent forekomst av ryggsmarter i gruppen av LD-donorene, er disse også representative. Resultatene viste at begge gruppene var sammensatt av donorer med lik bakgrunn med tanke på alder og BMI, og kjønnsfordelingen var også tilnærmet lik slik som vist i tabell 2.4.

For å undersøke andre del av problemstillingen ble kliniske data, data for metabolske fleksibilitetsparametere, smerteopplevelse og data fra forsøk på myokiner relatert til hverandre innad i gruppen av ryggopererte pasienter (RT). Dette betyr at resultatene ble relatert til RT-donorene seg imellom siden data for myokin og egenrapportert smerte kun var tilgjengelig for

denne gruppen. Ved undersøkelse av basal energimetabolisme ble det derimot gjort sammenlikninger mot LD-celler som kontroll.

4.1.2 Smerteopplevelse og tolkning

Det ligger i smerteopplevelsen at denne er av en subjektiv natur. For å måle en slik variabel ble det brukt data fra psykometriske skalaer som visuell analog skala (VAS), og numeriske skalaer (Numerical rating scale, NRS) i spørreskjemaet. VAS ble benyttet for spørsmål om nåværende helsetilstand, mens NRS ble benyttet for spørsmål angående ben- og ryggsmarter. Forskjellen på disse skalaene er sensitivitet, der VAS gir mer fingraderte svar enn NRS som er grovere gradert. Data fra VAS skal i utgangspunktet ha større statistisk styrke enn mer kategoriske smerteskalaer [120]. En viktig forutsetning for at skalaer skal være pålitelig er selvfølgelig at pasienten har forstått spørsmålet, og hvordan skalaen fungerer [121]. I tilfellet med VAS-skalaen er det også viktig å poengtere at helsetilstand er et vidt begrep, og pasienter kan ha ulik forståelse av begrepet eller vektlagt ulike aspekter forskjellig. Eksempelvis kan aktivitetsnivå veie tyngre enn smertefrihet eller v.v avhengig av pasient. Spørreskjemaet (appendiks) er utformet med NRS skalaene der økende tallverdi representerer økende ben- og ryggsmerte. Motsatt var tilfelle for VAS med spørsmål om helsetilstand, der økende tallverdi representerer bedre helsetilstand. Hvis en forutsetter en sammenheng mellom helsetilstand (VAS) og ben- eller ryggsmarter (NRS), vil man forvente å finne en negativ korrelasjon dersom det forutsettes at smerter påvirker helsetilstanden negativt. Det er ikke kjent om pasientene fikk veiledning før utfylling av spørreskjemaet, og det er funn som kan tyde på at minst én pasient kan ha misforstått ved gradering av helsetilstand. Forsøksvis inklusjon eller eksklusjon av data fra denne pasienten førte ikke til signifikant endring i utfallet i noen av korrelasjonsanalysene med helsetilstand.

4.1.3 Oppdyrking og differensiering av skjelettmuskelceller (myotuber)

Satellittceller ble isolert fra muskelbiopsier fra donorene, og celler fra passasje 3 og 4 ble brukt i forsøk. I forbindelse med måling av gen- og proteinuttrykk, og substratoksidasjonsforsøkene ble disse dyrket opp til myoblaster og videre differensiert til flerkjernede myotuber. Aas et al. har nylig oppsummert fordeler og utfordringer ved bruk myotuber i kultur for å studere metabolismen i skjelettmuskel *in vivo* [7]. Cellene i seg selv innehar relevant genetisk bakgrunn og gir mulighet for å studere medfødte metabolske egenskaper knyttet til donor, der kultivering gir mulighet for kontroll over ekstracellulære betingelser [13]. Dette er samtidig også en av utfordringene med bruk

av en cellemodell, der cellene har vært utsatt for andre betingelser enn skjelettmuskel *in vivo*. Cellene er fjernet fra samspillet med sitt mikromiljø, og har aldri kontrahert som følge av nervestimuli eller blitt påvirket endokrint, noe som kan ha relevans for problemstillingene som ble undersøkt. Fremdyringsforholdene er også forskjellige fra *in vivo* forhold, eksempelvis ved annerledes oksygentilgang [122]. Det er blitt funnet at cellene i kultur skiller seg fra skjelettmuskel *in vivo* ved annerledes fordeling av fibertype og substratpreferanse. Det er mer forekomst av glykolytiske type 2-fibre [20] (liknende "Warburg-effekten", som ved dårligere utviklet OXPHOS-kapasitet), i tillegg til at forskjellene i fibertypfordelingen mellom kjønnene er mindre uttrykt *in vitro* [123, 124]. Proteinuttrykket er mindre, men likheten ved mønsteret det følger, gjør myotuber til foretrukket modell for å studere energimetabolisme. Cellene er ikke immortaliserte, og har et bestemt antall delinger noe som både gjør at alder og livsstils påvirkning på energimetabolisme også kommer til uttrykk gjennom karakteristika knyttet til donor, som delvis også kan tilskrives epigenetiske kontrollmekanismer [18, 19]. Dette kan være en styrke eller svakhet alt ettersom hva man ønsker å undersøke. Myotuber *in vitro* er også vist å inneha fleksibilitetspotensiale, noe som er relevant for forsøkene som ble gjort i denne oppgaven, der dynamiske effekter som følge av "metabolsk switching" ble studert ved styrt endring i relativ tilgjengelighet mellom oljesyre og glukose [14, 15].

4.1.4 Metodene brukt for å måle energimetabolisme, cytokinkonsentrasjon og genekspresjon

I substratoksidasjonsforsøkene var radiomerket glukose eller oljesyre tilsatt for å undersøke energimetabolismen i myotubene. Denne metoden ble utviklet av Wensaas et al. [116], og er godt validert. Det samme er Bradfords metode for måling av protein [117]. RNA ble isolert etter en standardisert prosedyre av QIAGEN® (Hilden, Tyskland) før qPCR ble benyttet til bestemmelse av genuttrykk *in vitro*. Metoden er godt etablert og ble først beskrevet av Mullis et al. som mottok Nobels pris i kjemi i 1993 [125]. Multiplex bead array assays (MBAA) tillot parallellundersøkelser av flere cytokiner i de samme prøvene. Prøvene for alle donorene ble kjørt på Luminex samme dag, utført av Susanna Honkanen ved Statens arbeidsmiljøinstitutt. Multipleks med kit-basert MBAA er en relativt ny metode som det er mest nærliggende å sammenlikne med ELISA, både i prinsipp og bruksområde. ELISA er en godt validert og veletablert metode [126]. Umiddelbare fordel ved multipleks er bedre kostnadseffektivitet og mulighet for å undersøke flere prøver, og mange analytter per prøve uten videre ulemper enn ved ELISA [127]. Dupont et. Al har vist at ELISA og MBAA er likeverdige, men påpekte at ulikheter i krav til fortynninger i de to metodene kan medføre forskjeller i pH som påvirker bindingsaffinitet mellom antistoff og analytt [128]. Det ble

ikke gjort noen fortyngninger ved kjøring av prøvene i denne oppgaven, og problemstillinger rundt fortyngninger er derfor trolig irrelevante.

Det ble i denne oppgaven funnet en sterk positiv korrelasjon mellom genuttrykk og målt proteinkonsentrasjon for CXCL8 (IL-8) når genuttrykket var korrigert mot 36B4 som referansegen slik som vist i Figur 3.13B. I teorien vil det være en sammenheng mellom RNA- og proteinkonsentrasjon, og resultatene ved undersøkelse av cytokiner på gen, og proteinnivå ble derfor ansett som samstemmige for henholdsvis IL-6 og IL-8 ved bruk av MBAA og qPCR. Det er vanlig å bruke flere referansegener, og gjennomsnitt av disse ved normalisering av gendata.

Referansegener skal ikke bli påvirket av eksperimentelle betingelser. GAPDH er i motsetning til 36B4 blant annet direkte involvert i glykolysen som del av glukosemetabolismen, men påvirker også glukosetransport via binding med GLUT4 [27]. Mulig alternativ for GAPDH som kunne vært brukt i tillegg til 36B4 kunne vært α -tubulin, som er brukt i tidligere studier med myotuber [129].

4.1.5 Analyse av data og statistikk

Det ble ikke antatt normalfordeling av data, noe som i de fleste tilfeller stemte ved Shapiro-Wilk test for normalfordeling. For sammenligningsgrunnlag ble derfor ikke-parametriske tester benyttet. "Wilcoxon matched-pairs signed rank test" ble brukt ved tolkning av resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene. Hypotesetestene var to-sidige da det ikke ble gjort antakelser om utslag av TMAO-effekt på energimetabolismen. Ved uparede sammenlikninger av LD- og RT-gruppevis ble "Mann-Whitney test" benyttet. Andre forhold som talte for valg av ikke-parametriske tester var et lite antall (parvise) observasjoner. En fordel ved bruk av ikke-parametriske tester er robusthet mot forekomsten av ekstreme observasjoner, men dette forutsetter lignende sannsynlighetsfordeling i utvalgene som sammenlignes [130]. Dataene ble vurdert til å tilfredsstille disse betingelsene. En ulempe med bruk av ikke-parametriske tester er at det er tallrekkefølgene, og ikke resultatverdiene i seg selv som sammenliknes. Dette kan ha bidratt til dårligere utnyttelse av datamaterialet. Selv om det er median av rangtall som ble testet, er gjennomsnitt brukt for å presentere resultatene da det ikke var store avvik mellom disse. For korrelasjonsanalysene ble Spearman's test for korrelasjon benyttet.

4.2 Energimetabolisme og TMAO-effekter

Per idag er det så vidt vi vet ikke blitt gjort forsøk på å studere effekt av TMAO på energimetabolisme direkte i human skjelettmuskel. Serumnivået av TMAO er vist å være predikerende for hjerte- og karsykdommer (HKS) [64], og TMAOs rolle og bidrag i sykdomsutviklingen ved HKS i mennesket er blitt undersøkt ved måling av FMO3-aktivitet [131], diett og undersøkelser i sammensetning av tarmflora som alle er relatert til TMAO som gjenfinnes i blodet [61, 65]. I en dyremodell ble mus med intakt tarmflora foret med en TMAO-rik diett, og det ble observert endring av kolesterolflyt med akkumulering av sterol. Dette førte trolig til skumcelledannelse som del av utviklingen av aterosklerose blant flere andre endringer i musene (koeth wang). Det er viktig å påpeke at denne studien ikke kom med noen mekanistisk forklaring, og siden TMAO ble gitt gjennom dietten, er det heller ikke mulig å vite om det er en effekt som utøves av TMAO direkte, eller om det er andre elementer som spiller inn uavhengig av TMAO (konfunder). En studie av Shih et al. kan tyde på at FMO3 mer eller mindre uavhengig av TMAO, kan ha en større rolle i forstyrrelser relatert til energimetabolisme og aterosklerose [132]. Uansett var det av interesse å undersøke om TMAO har direkte effekt på energimetabolismen i skjelettmuskulaturen hos mennesket, siden skjelettmuskulatur både som viktig endokrint organ, men også ansvarlig for en stor del av den totale energimetabolismen i hele organismen, er involvert i mange livsstilssykdommer som fedme, metabolsk syndrom og type 2 diabetes (T2DM).

Det var ingen vesentlige effekter av TMAO på hverken glukose- eller oljesyremetabolismen i LD- eller RT-celler. Det var basalopptak og oksidasjon som ble studert siden myotubene hverken ble utsatt for kontraksjonsstimuli eller insulinmediert glukoseopptak. Ved dose-respons-forsøkene ble TMAO prøvd ut i konsentrasjonene 0,1-100 mM i forsøk med glukosemetabolisme, og 1 μ M – 100mM i forsøkene med oljesyremetabolisme. Kun 0,1mM TMAO førte til en signifikant reduksjon i oljesyreoksidasjon med 20% (Figur 3.2A og B). Tidsavhengig effekter av TMAO på energimetabolisme i LD-cellene var tilsynelatende større ved sammenligninger av 0,1 mM eller 10 mM TMAO-forbehandling i 0, 24, 48 og 96 timer (Figur 3.3 og 3.4). Kun oljesyreoksidasjon var signifikant redusert ved 24 timers forbehandling med 0,1 mM TMAO, som forventet fra observasjonene med dose-respons (Figur 3.1A og 3.4 A). Ellers var det ingen andre statistisk signifikante forskjeller, hverken i oksidasjon eller opptak av substrat ved sammenlikninger med 0, 24 og 48 timers forbehandling med 0,1 mM eller 10 mM TMAO-konsentrasjoner. Resultatene fra 96 timers forbehandling med TMAO var en observasjon basert på kun ett enkeltforsøk, og det var derfor umulig å gjøre noen statistisk test. Det som var av interesse med 96-timers forsøket var at det ble brukt en protokoll med 48-timers forbehandling på halvparten av det samme brettet. Ved måling

av proteinkonsentrasjon i alle brønnene på dette ene brettet ble det observert at cellene som var forbehandlet i 96 timer lå jevnt lavere tilsvarende 30-40 % reduksjon i proteinkonsentrasjon uavhengig av TMAO-konsentrasjon (data ikke vist). Det ble utført flere forsøk med 96-timers forbehandling med TMAO på celler fra en annen donor, men det var et gjennomgående problem at proteinkonsentrasjon var 0 mg/ml, eller tilnærmet 0 mg/ml. Proteinkonsentrasjon er som beskrevet i resultatdelen et mål på celler som var levende under gjennomføringen av substratoksidasjonsmetoden, da vi antar at døde celler ble vasket bort før måling. Dette stemte godt for telletallene ved måling av radiomerket substrat i disse forsøkene, som også lå svært lavt, og dette tyder på det ikke har foregått opptak eller oksidasjon av substrat i disse cellene. Det ble derfor antatt at TMAO har uspesifikk celletoksisk effekt i høye konsentrasjoner, men der det er usikkert hva slags mekanisme som ligger bak. Forbehandling i 24 timer med 100 mM TMAO hadde ingen større effekt enn ved 10 mM, hverken ved glukose eller oljesyreoksidasjon (Figur 3.1A og 3.2A), men varigheten på forbehandling tilsier at noe skjer i tidsrommet 48-96 timer. Sett fra et biologisk perspektiv er både 0,1 mM og 10 mM konsentrasjoner som er langt høyere enn det som forekommer i blodet til friske personer, der en studie nylig fant TMAO-konsentrasjoner i området 3,1 μ M – 6,0 μ M [133]. Det er ikke blitt undersøkt om TMAO interagerer med protein som forekommer i cellemediet, eller på andre måter endrer biologiske, kjemiske eller fysiske egenskaper ved dyrkningsbetingelsene, noe som kanskje burde vært ettergått i metoden med tanke på celletoksisitet *in vitro*.

I videre forsøk med celler fra ryggopererte pasienter (RT) ble forsøksbetingelsene valgt på bakgrunn av observasjonene som ble gjort i cellene fra LD-donorene. Konsentrasjoner på 0,1 mM og 10 mM TMAO ble valgt i kombinasjon med 48 timers varighet på forbehandling. Ingen signifikante effekter av TMAO ble funnet hverken på opptak eller oksidasjon av glukose eller oljesyre. Likevel var det en signifikant økning i fraksjonell oksidasjon av glukose tilsvarende 16 % økning ved 10 mM TMAO (Figur 3.7 C). Både vilkårligheten, og lite tydelige forskjeller i de signifikante observasjonene er tegn på at TMAO gjør lite med energimetabolismen i myotuber ved forsøksbetingelsene som ble gjort i denne oppgaven. Det samme ser ut til å være tilfelle uavhengig av forsøk med celler fra kontrollgruppen (LD) eller ryggopererte pasienter (RT).

4.3 Energimetabolisme og metabolsk fleksibilitet i ryggopererte pasienter

En teori var at kroniske rygg smerter kan medføre direkte eller indirekte forstyrrelse i energimetabolisme som følge av en oppregulering av inflammasjonsmediatorer som er sterkt

assosiert med ryggmerter (low back pain, LBP) [111]. Utskillelsen er lokal, men flere av cytokinene som skilles ut er involvert i de samme biologiske rollene som ved fedmerelaterte forstyrrelser i energimetabolismen [56, 57, 58, 59]. Forskjeller i myotubenes basale energimetabolisme ble derfor sammenliknet mellom gruppen av friske frivillige (LD) og ryggopererte pasienter (RT). Absoluttverdiene for opptak og oksidasjon av substratene, viste at opptak av oljesyre i myotuber fra ryggopererte pasienter var signifikant høyere. Ved beregning av fraksjonell oksidasjon av oljesyre ble denne funnet å være 44% lavere i RT cellene sammenliknet med LD-donorene. I tillegg kunne det se ut til at oljesyreoksidasjon, og både opptak og oksidasjon av glukose var noe lavere i RT-cellene, men forskjellene var ikke signifikante. Dette gir grunnlag for å tro at det kan være en endret energiflyt i cellene fra ryggopererte pasienter. Det er likevel uvisst om det er snakk om en økt lagring av oljesyre, eller hva som er da eventuelt er sammensetningen av dens lagrede metabolitter. Økt lagring av intramuskulært triacylglycerol (IMTG) forekommer ved forstyrrelser i energimetabolisme som ved fedme, men det samme er funnet i friske veltrente individer (atletparadokset) [134], der viktigste forskjell trolig er en økt forekomst av ceramider og diacylglycerol (DAG) ved fedmetilstanden. Både ceramider og DAG er kjent å ha negativ innvirkning på insulinsignalering [33], og i forbindelse med dette kunne det derfor ha vært interessant å undersøkt om det var forskjeller i insulinsensitivitet (IS) i de to gruppene *in vitro*. Det er blitt vist i en dyremodell at smerte kunne sees i sammenheng med metabolske forstyrrelser, deriblant redusert insulinresistens [115].

Det er vist at metabolsk fenotype bevares *in vitro* på tross av at cellene mister ekstracellulær kommunikasjon [15], noe som tyder på at metabolsk fleksibilitet er en iboende egenskap i skjelettmuskel som videreføres fra donor. På bakgrunn av dette var det ønskelig å undersøke parametere for metabolsk fleksibilitet i myotuber fra gruppen av ryggopererte pasienter. Der Ukropcova et al. fant at adapterbahet korrelerte positivt med *in vivo* metabolsk fleksibilitet (karakteriserer frisk skjelettmuskulatur) og IS, så var det omvendte tilfelle for glukosesuppresjon (%) som korrelerte negativt med henholdsvis *in vivo* metabolsk fleksibilitet og IS [15]. Glukosesuppressibilitet (%) er cellenes manglende evne til å opprettholde oljesyreoksidasjon i nærvær av glukose, noe som har sammenheng med hypotesen fremmet av Randle et al [47]. Glukosesuppressibilitet ble for RT-cellene beregnet til 36 % (Figur 3.6A og C), noe som er svært likt tidligere funn i celler fra friske donorer [42]. Resultatene i denne studien viste også at myotubene fra ryggopererte pasienter hadde evne til å øke oljesyreopptaket og oksidasjon ved økende konsentrasjon av oljesyre (5 μ M til 100 μ M), kalt adapterbarhet, og at adapterbarhet korrelerte positivt med parameteren for glukosesuppresjon som vist i figur 3.6D. Resultatene kan

virke tilsynelatende motstridende og det er usikkert hva dette betyr når høyere adapterbarhet og lavere glukosesuppressibilitet er kjennetegn på metabolsk fleksibel skjelettmuskel [15]. Hvis det antas at det er en endret energiflyt i cellene fra ryggopererte pasienter, så kan dette kanskje si noe om hvilken av parameterne (adapterbarhet eller glukosesuppresjon) som er viktigst for en eventuell forklaring av en slik endring i energiflyt. Opphavet til smertes påvirkning på energiflyt i skjelettmuskelens er trolig årsak av et komplekst samspill av flere viktige faktorer, og dette bør undersøkes nærmere.

Oljesyres evne til å undertrykke glukoseopptak og oksidasjon ble også målt (Figur 3.6B og C), men er ikke i litteraturen knyttet til noen av problemstillingene som ble undersøkt, og er inkludert først og fremst for sammenlikningsgrunnlag mot glukosesuppressibilitet.

4.4 Korrelasjonsvurderinger i ryggopererte pasienter

Korrelasjonsvurderinger ble benyttet for å undersøke eventuelle sammenhenger mellom *in vitro* energimetabolisme og *in vivo* smerteopplevelse i celler fra ryggopererte pasienter. Det er viktig å påpeke at alle *in vivo-in vitro* korrelasjonsanalyser inkluderer data på ulikt nivå. Alle *in vitro*-data er numeriske og kontinuerlige, mens *in vivo*-data er ordinale og mer kategoriske av natur (VAS-data kan anses som unntak). I tillegg er smerte svært subjektivt, der det er store individuelle variasjoner i smerteterskel og toleranse, noe som samlet sett betyr at det er flere lag av usikkerhet ved tolkning av *in vivo-in vitro* korrelasjonene.

Energimetabolisme, metabolsk fleksibilitet og rygg smerter (*in vivo-in vitro*)

Det ble observert en signifikant negativ korrelasjon mellom opplevelse av rygg smerter og henholdsvis opptak og oksidasjon av glukose (Figur 3.9A og B). Dette betyr at opptak og oksidasjon av glukose var mer redusert med pasientens økende gradering av rygg smerter, noe som kan tyde på at smerter på mer eller mindre indirekte vis kan ha innvirkning på glukoseopptak og oksidasjon. En teori bak dette kan være at smertepasienter kan ha større vegring for fysisk aktivitet som følge av smertene de opplever [119], noe som gir mening siden fysisk aktivitet er vist å ha positive effekter på energimetabolisme i skjelettmuskulatur [23, 34, 35]. Glukoses evne til å undertrykke oksidasjon av oljesyre (suppressibilitet) var også positivt korrelert med grad av rygg smerte (Figur 3.10A). Høy suppressibilitet er som tidligere nevnt vist å være negativt relatert i forhold til metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskulatur *in vivo* [15]. Dette kan muligens settes i

sammenheng med effekten av ryggmerter på glukoseopptak og oksidasjon som vist i figur 3.9. Det ble også funnet en signifikant korrelasjon mellom adapterbarhet og gradering av ryggmerter som vist i figur Figur 3.10B. Denne var også positiv, noe som var forventet utifra observasjonene i figur 3.6D. Dette betyr at det ble observert en økende adapterbarhet med økende gradering av ryggmerter, og som tidligere nevnt er adapterbarhetsparameteren (i motsetning til suppressibilitet) positivt korrelert med metabolsk fleksibilitet, en karakteristikk ved energimetabolisme i frisk skjelettmuskel. Som tidligere observert i figur 3.6D der adapterbarhet og supressibilitet korrelerte positivt, kan derfor også observasjonene i figur 3.10A og B virke motstridende, og det kan spekuleres i om suppressibilitet kan være et bedre mål på endringer i energiflyt. (Figur 3.9, 3.10A og Tabell 3.1).

TMAO-respons og metabolsk fleksibilitet (*in vitro-in vitro*)

TMAO-respons ble definert som prosentvis økning i fraksjonell glukoseoksidasjon, og én signifikant korrelasjon ble funnet med adapterbarhet i myotuber fra ryggopererte pasienter. Økende TMAO-respons var positivt korrelert med adapterbarhet (Figur 3.11). Dette betyr at evne til opptak og oksidasjon av oljesyre med økende konsentrasjon av oljesyre var økt i myotuber fra donorene som responderte sterkest på TMAO (størst prosentvise økning i fraksjonell glukoseoksidasjon). Det er usikkert hva dette resultatet betyr, men det ble uansett observert et vidt spenn i TMAO-respons i ryggopererte pasienter, der respons varierte fra -10 % til 70 % (Figur 3.11).

4.5 Myokiner

Alle de seks cytokinene som det ble undersøkt for i testpanelet på Luminex var uttrykt i skjelettmuskelcellene (Figur 3.12B). IL-6 som myokin er godt kjent [68, 70], og var et forventet funn som i utgangspunktet også hadde rolle som positiv kontroll ved undersøkelse av proteinuttrykket i skjelettmuskelcellene. Ekspresjon av henholdsvis interlukin-6 (IL-6) og interleukin-8 (IL-8) på gen- og proteinnivå i muskelcellene var samstemmige (Figur 3.13), og proteinkonsentrasjon ble vurdert som representativt for genekspresjon. En årsak til at sammenhengen ikke var like sterk for IL-6 (Figur 3.13A) kan være at det relative uttrykket kan variere enormt. Eksempelvis er IL-6-uttrykk svært avhengig av muskelkontraksjon, riktignok både på protein og mRNA-nivå, men der relative nivåer kan variere enormt over korte tidsrom [70], og metodologiske begrensinger legger begrensninger for korrelasjonsanalyse. Dette var variabler vi ikke hadde kontroll over, hverken med tanke på *in vivo* historikk i donorer, eller eventuelle individforskjeller i spontane kontraksjoner *in vitro*. Uttrykk og sekresjon av alle cytokinene med

unntak av fraktalkin (CX3CL1) og "stromal cell derived factor 1" (SDF-1/CXCL12) er tidligere blitt observert i myotuber av Ciaraldi et al., og ble derfor også omtalt som myokiner. Ciaraldi et al. studerte forandret myokinsekresjon fra skjelettmuskulatur i sammenheng med forstyrrelser i energimetabolisme og fant at sekresjon av flere myokiner var forskjellige mellom en gruppe av diabetiske (T2DM) og den ikke-diabetiske kontrollgruppen [135]. Det var derfor av interesse å undersøke problemstillinger relatert til sammenhenger mellom myokinuttrykk og energimetabolisme i smertepasienter.

Signifikante *in vitro-in vivo* korrelasjoner ble funnet ved korrelasjonsanalyser mellom myokinkonsentrasjon og pasientenes egenrapporterte svar på spørsmål om nåværende helsetilstand på VAS-skalaen. Samtlige av korrelasjonene med fraktalkin, IL-8 og GRO α var positive, noe som betyr at sekresjon av fraktalkin, IL-8 og GRO α var høyere jo bedre helsetilstand pasienten rapporterte. Ciaraldi et al. har vist at sekresjon av GRO α er signifikant økt ($\approx 50\%$) ved forstyrret energimetabolisme som ved T2DM [135], og GRO α gir derfor i seg selv ingen indirekte forklaring om man forsøker å sette helsetilstand i sammenheng med energimetabolisme. Fraktalkinutskillelse i skjelettmuskulatur er som tidligere nevnt positivt assosiert med treningseffekter, og økt sekresjon av fraktalkin kan derfor muligens settes i sammenheng med opplevelse av god helsetilstand [86].

Ved korrelasjonsanalyser av myokinuttrykk og donorkarakteristika ble det funnet en signifikant negativ korrelasjon mellom fraktalkinkonsentrasjon og BMI i gruppen av ryggopererte pasienter (Figur 3.15). Dette betyr at fraktalkinkonsentrasjon ble lavere med økende BMI, noe som kan gi mening med tanke på at fraktalkin både er positivt forbundet med treningseffekter [86], og positive effekter på energimetabolisme ved beskyttelse av β -cellefunksjon mot inflammasjon [85]. Variasjonen i BMI innad i gruppen av ryggopererte pasienter spente fra 18 til 33, der tre av deltakerne kunne defineres som overvektige med BMI over 30 kg/m² (klasse I) [136].

En oversikt over signifikante korrelasjoner som ble funnet ved korrelasjonsanalyse av myokinene seg i mellom er vist i tabell 3.3. Innledningsvis (avsnitt 1.7) ble det beskrevet flere egenskaper ved myokinene som ble undersøkt. Flere har immuncellerekutterende, og -aktiverende egenskaper som i en *in vivo* situasjon vil bidra til vekselvirkende påvirkning av myokinsekresjon for myokinene seg i mellom, der hensikt kan være å tilrettelegge for et regenerativt miljø som følge av fysisk aktivitet [85, 86], eller påvirke energiflyt i cellen [29, 70]. Tilsvarende kan være tilfelle for myotuber *in vitro*

selv om de ikke var i nærvær av hverken monocytter eller makrofager under noen av forsøkene, og dette kan si noe om myokinenes auto-/ parakrine virkning på myotubene uavhengig av immunceller.

Både SDF1 og IL-6 er i litteraturen blitt assosiert med treningseffekter og effekter på energimetabolisme [70, 105], mens MCP-1 er vist å være mer uttrykt ved T2DM [101]. En årsak til at disse myokinene ikke ble funnet å korrelere med parametere for energimetabolisme, smerte eller donorkarakteristika kan være at målingene ble gjort under basale betingelser uten muskelkontraksjon eller andre betingelser som er nødvendige for å studere endringer i uttrykk.

4.6 Veien videre

I retrospekt er det alltid lettere å se hvordan ting burde vært gjort annerledes.

TMAO hadde tilsynelatende liten direkte effekt på energimetabolismen i myotubene, og effektene var både vilkårlige og vanskelige å observere. TMAO er et produkt av FMO3, og det kan være av interesse å undersøke om det er alternative produkter fra dette enzymet som har effekter på energimetabolisme i myotuber. En tenkt metode for å undersøke dette uavhengig av tarmflora kunne for eksempel vært å behandle hepatocytter under bestemte (f.eks. hyperglykemiske) betingelser, og undersøkt om mediet som har vært i kontakt med hepatocytene påvirker energimetabolisme i myotuber.

Angående problemstillingene som undersøkte sammenheng mellom energimetabolisme og smerte i ryggpasientene, ville det vært aktuelt å gjøre tilsvarende forsøk i en matchet kontrollgruppe, men av tidsmessige årsaker var dette ikke gjennomførbart. Et fellestrekk for de tilstandene vi har undersøkt er at alle blir mer fremtredende med alderen, og alder burde vært grundigere undersøkt i korrelasjonsanalysene. Utvalgsstørrelsene for begge gruppene er små, noe som gjør det vanskelig å oppdage små forskjeller (som fremdeles kan være klinisk signifikante), og omvendt; fastslå troverdigheten av de forskjellene som ble funnet. Å gjenta forsøkene med et større utvalg vil derfor være nyttig for å få mer klarhet i resultatene fra en studie på en sammensatt problemstilling.

5 Konklusjon

Det ble funnet minimale direkteeffekter av TMAO på energimetabolisme i dyrkede humane skjelettmuskelceller. Det var ingen forskjell i TMAO-effekter mellom celler fra gruppene av friske frivillige og ryggopererte pasienter. Hverken glukose- eller oljesyremetabolisme var endret, men det ble observert at TMAO har celletoksiske effekter ved høye konsentrasjoner i tidsrommet 48-96 timer. Det ble observert en signifikant økning i oljesyreopptak i celler fra ryggopererte pasienter i forhold til celler fra friske frivillige under basale betingelser. Det var også en svak, men ikke-signifikant reduksjon i glukose og -oljesyreoksidasjon, og fraksjonell oljesyreoksidasjon ble derfor funnet å være signifikant lavere i gruppen av ryggopererte pasienter. Opplevd grad av rygg smerter kan trolig relateres til parametere for metabolsk fleksibilitet i celler fra ryggopererte pasienter. Høyere grad av opplevde rygg smerter var forbundet med økt glukosesuppressibilitet og redusert glukoseopptak, og glukoseoksidasjon.

Dyrkede humane skjelettmuskelceller skiller ut en rekke myokiner under basalbetingelser. Fraktalkin (CX3CL1), IL-6, IL-8 (CXCL8), MCP-1 (CCL2) SDF-1 (CXCL12) og GRO α (CXCL1) ble funnet i medier som hadde vært i kontakt med celler fra gruppen av ryggopererte pasienter, men utskillelse av myokinene korrelerte ikke med energimetabolisme eller opplevd grad av rygg smerter. Utskillelse av av fraktalkin korrelerte med BMI i gruppen av ryggopererte pasienter, der høyere BMI var forbundet med lavere utskillelse av fraktalkin.

6 Referanser

1. Widmaier P, Raff H, Strang KT. Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. 9th ed. Boston: McGraw-Hill Higher Education; 2003. p. 268-93.
2. Hardin J, Bertoni G, Kleinsmith LJ. Becker's World of the cell. 8th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings; 2012. p. 459-60.
3. Brooke MH, Kaiser KK. Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem.* 1970;18(9):670-2.
4. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447-531.
5. Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol.* 2010;199(4):451-63.
6. Staron, R.S., et al., Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem.*, 2000. 48(5): p. 623-9.
7. Aas V, Bakke SS, Feng YZ, Kase ET, Jensen J, Bajpeyi S, et al. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res.* 2013;354(3):671-82.
8. Balogh P, Engelmann P. Transdifferentiation and regenerative medicine. University of Pécs; 2011. p. 16
9. Blau HM, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(9):5623-7.
10. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1177-91.
11. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000;218(2):115-24.
12. Gaster M, Kristensen SR, Beck-Nielsen H, Schroder HD. A cellular model system of differentiated human myotubes. *APMIS.* 2001;109(11):735-44.
13. Berggren JR, Tanner CJ, Houmard JA. Primary cell cultures in the study of human muscle metabolism. *Exerc Sport Sci Rev.* 2007;35(2):56-61.

14. Nikolic N, Bakke SS, Kase ET, Rudberg I, Flo Halle I, Rustan AC, et al. Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise. *PLoS One*. 2012;7(3):e33203.
15. Ukropcova B, McNeil M, Sereda O, de Jonge L, Xie H, Bray GA, et al. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest*. 2005;115(7):1934-41.
16. Gaster M, Rustan AC, Aas V, Beck-Nielsen H. Reduced lipid oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin: evidence from cultured myotubes. *Diabetes*. 2004;53(3):542-8.
17. Feng YZ, Nikolic N, Bakke SS, Kase ET, Guderud K, Hjelmessaeth J, et al. Myotubes from lean and severely obese subjects with and without type 2 diabetes respond differently to an in vitro model of exercise. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;308(7):C548-56.
18. Sousa-Victor P, Munoz-Canoves P, Perdiguero E. Regulation of skeletal muscle stem cells through epigenetic mechanisms. *Toxicol Mech Methods*. 2011;21(4):334-42.
19. Bharathy N, Ling BM, Taneja R. Epigenetic regulation of skeletal muscle development and differentiation. *Subcell Biochem*. 2013;61:139-50.
20. Aas V, Hessvik NP, Wettergreen M, Hvammen AW, Hallen S, Thoresen GH, et al. Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(1):94-105.
21. Saris WH, van Erp-Baart MA, Brouns F, Westerterp KR, ten Hoor F. Study on food intake and energy expenditure during extreme sustained exercise: the Tour de France. *Int J Sports Med*. 1989;10 Suppl 1:S26-31.
22. Helge JW, Fraser AM, Kriketos AD, Jenkins AB, Calvert GD, Ayre KJ, et al. Interrelationships between muscle fibre type, substrate oxidation and body fat. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23(9):986-91.
23. Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*. 1998;49:235-61.
24. Tremblay F, Dubois MJ, Marette A. Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle. *Front Biosci*. 2003;8:d1072-84.
25. Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. 1990;13(3):228-43.

26. Thong FS, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:271-84.
27. Klip A. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34(3):481-7.
28. Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:55-64.
29. Shirwany NA, Zou MH. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014;19:447-74.
30. Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*. 2004;10(7-12):65-71.
31. Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *J Biol Chem*. 2005;280(19):19426-35.
32. Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1339-52.
33. Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW, Bruce CR. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol*. 2014;220(2):T61-79.
34. Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, et al. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol*. 1993;265(3 Pt 1):E380-91.
35. Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2006;86(1):205-43.
36. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. 2013;17(2):162-84.
37. Lara-Castro C, Garvey WT. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(4):841-56.
38. Holloway GP, Luiken JJ, Glatz JF, Spriet LL, Bonen A. Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;194(4):293-309.

39. Shaw CS, Clark JA, Shepherd SO. HSL and ATGL: the movers and shakers of muscle lipolysis. *J Physiol.* 2013;591(24):6137-8.
40. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1486(1):1-17.
41. Jeukendrup AE. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:217-35.
42. Thoresen GH, Hessvik NP, Bakke SS, Aas V, Rustan AC. Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2011;85(5):227-34.
43. Stull AJ, Galgani JE, Johnson WD, Cefalu WT. The contribution of race and diabetes status to metabolic flexibility in humans. *Metabolism.* 2010;59(9):1358-64.
44. Corpeleijn E, Mensink M, Kooi ME, Roekaerts PM, Saris WH, Blaak EE. Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(5):1025-32.
45. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000;49(5):677-83.
46. Kelley DE. Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1699-702. [kommentar]
47. Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(3):E578-91.
48. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998;14(4):263-83.
49. Sidossis LS, Wolfe RR. Glucose and insulin-induced inhibition of fatty acid oxidation: the glucose-fatty acid cycle reversed. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):E733-8.
50. Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J Clin Invest.* 1996;98(10):2244-50.
51. Garland PB, Randle PJ, Newsholme EA. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes, and starvation. *Nature.* 1963;200: 169-70.
52. Miyoshi H, Shulman GI, Peters EJ, Wolfe MH, Elahi D, Wolfe RR. Hormonal control of substrate cycling in humans. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1545-55.

53. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 1):E1130-41.
54. Corpeleijn E, Saris WH, Blaak EE. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev*. 2009;10(2):178-93.
55. Affourtit C. Mitochondrial involvement in skeletal muscle insulin resistance: A case of imbalanced bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(10):1678-93.
56. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther*. 2016;5:47-56.
57. de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582(1):97-105.
58. Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, Lamontagne L. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015;31(6):545-61.
59. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):E740-7.
60. Frisard MI, McMillan RP, Marchand J, Wahlberg KA, Wu Y, Voelker KA, et al. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(5):E988-98.
61. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.
62. Tang WH, Hazen SL. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4204-11.
63. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489(7415):242-9.
64. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013;368(17):1575-84.
65. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.

66. Dambrova M, Latkovskis G, Kuka J, Strele I, Konrade I, Grinberga S, et al. Diabetes is Associated with Higher Trimethylamine N-oxide Plasma Levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2016;124(4):251-6.
67. Gao X, Liu X, Xu J, Xue C, Xue Y, Wang Y. Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet. *J Biosci Bioeng*. 2014;118(4):476-81.
68. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes*. 2004;53(7):1643-8.
69. Whitham M, Febbraio MA. The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(10):719-29.
70. Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;103(3):1093-8.
71. Hamer M, Sabia S, Batty GD, Shipley MJ, Tabak AG, Singh-Manoux A, et al. Physical activity and inflammatory markers over 10 years: follow-up in men and women from the Whitehall II cohort study. *Circulation*. 2012;126(8):928-33.
72. Colbert LH, Visser M, Simonsick EM, Tracy RP, Newman AB, Kritchevsky SB, et al. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults: findings from the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc*. 2004;52(7):1098-104.
73. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2688-97.
74. Keller C, Steensberg A, Hansen AK, Fischer CP, Plomgaard P, Pedersen BK. Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;99(6):2075-9.
75. Baeza-Raja B, Munoz-Canoves P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell*. 2004;15(4):2013-26.
76. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Munoz-Canoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2008;7(1):33-44.

77. Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, et al. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(2):449-54.
78. Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J.* 2003;17(8):884-6.
79. Blatteis CM, Sehic E. Cytokines and fever. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:608-18.
80. Sadagurski M, Norquay L, Farhang J, D'Aquino K, Copps K, White MF. Human IL6 enhances leptin action in mice. *Diabetologia.* 2010;53(3):525-35.
81. Scheler M, Irmeler M, Lehr S, Hartwig S, Staiger H, Al-Hasani H, et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2013;305(8):C877-86.
82. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):559-64.
83. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. *Janeway's immunobiology.* 8th ed. New York: Garland Science; 2012. p. 102-3.
84. Sharabiani MT, Vermeulen R, Scoccianti C, Hosnijeh FS, Minelli L, Sacerdote C, et al. Immunologic profile of excessive body weight. *Biomarkers.* 2011;16(3):243-51.
85. Rutti S, Arous C, Schwartz D, Timper K, Sanchez JC, Dermitzakis E, et al. Fractalkine (CX3CL1), a new factor protecting beta-cells against TNF α . *Mol Metab.* 2014;3(7):731-41.
86. Strömberg A, Olsson K, Dijksterhuis JP, Rullman E, Schulte G, Gustafsson T. CX3CL1--a macrophage chemoattractant induced by a single bout of exercise in human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016;310(3):R297-304.
87. Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(11):1897-908.
88. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, Yahagi H, Kanematsu M, Sato M, et al. Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res.* 2008;314(17):3232-44.
89. Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci.* 2002;23(4):189-94.

90. Cantini M, Carraro U. Macrophage-released factor stimulates selectively myogenic cells in primary muscle culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(1):121-8.
91. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, et al. Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 2013;31(2):384-96.
92. Lee YS, Morinaga H, Kim JJ, Lagakos W, Taylor S, Keshwani M, et al. The fractalkine/CX3CR1 system regulates beta cell function and insulin secretion. *Cell*. 2013;153(2):413-25.
93. Imaizumi T, Matsumiya T, Fujimoto K, Okamoto K, Cui X, Ohtaki U, et al. Interferon-gamma stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med*. 2000;192(2):127-39.
94. Plomgaard P, Bouzakri K, Krogh-Madsen R, Mittendorfer B, Zierath JR, Pedersen BK. Tumor necrosis factor-alpha induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes*. 2005;54(10):2939-45.
95. Catoire M, Mensink M, Kalkhoven E, Schrauwen P, Kersten S. Identification of human exercise-induced myokines using secretome analysis. *Physiol Genomics*. 2014;46(7):256-67.
96. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-8.
97. Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):81-92.
98. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28.
99. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7265-70.
100. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, et al. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem*. 2003;278(47):46654-60.
101. Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Nishikawa M, Fukuhara S. Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2000;121(3):437-43.

102. Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology*. 2006;147(5):2458-67.
103. Puchert M, Engele J. The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets. *Cell Tissue Res*. 2014;355(2):239-53.
104. Brzoska E, Kowalewska M, Markowska-Zagrajek A, Kowalski K, Archacka K, Zimowska M, et al. Sdf-1 (CXCL12) improves skeletal muscle regeneration via the mobilisation of Cxcr4 and CD34 expressing cells. *Biol Cell*. 2012;104(12):722-37.
105. Pasini E, Le Douairon Lahaye S, Flati V, Assanelli D, Corsetti G, Specca S, et al. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats. *Exp Gerontol*. 2012;47(1):23-8.
106. Puchert M, Adams V, Linke A, Engele J. Evidence for the involvement of the CXCL12 system in the adaptation of skeletal muscles to physical exercise. *Cell Signal*. 2016;28(9):1205-15.
107. Ohtori S, Inoue G, Miyagi M, Takahashi K. Pathomechanisms of discogenic low back pain in humans and animal models. *Spine J*. 2015;15(6):1347-55.
108. Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(1):44-56.
109. Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, Dai LY. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev*. 2007;6(3):247-61.
110. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(11):1307-14.
111. Burke JG, Watson RW, McCormack D, Dowling FE, Walsh MG, Fitzpatrick JM. Intervertebral discs which cause low back pain secrete high levels of proinflammatory mediators. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84(2):196-201.
112. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995;20(22):2373-8.
113. Ono R, Yamazaki S, Takegami M, Otani K, Sekiguchi M, Onishi Y, et al. Gender difference in association between low back pain and metabolic syndrome: locomotive syndrome and health outcome in Aizu cohort study (LOHAS). *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(13):1130-7.

114. [Definition and the diagnostic standard for metabolic syndrome--Committee to Evaluate Diagnostic Standards for Metabolic Syndrome]. Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2005;94(4):794-809.
115. Zhai X, Sun C, Rong P, Li S, McCabe MF, Wang X, et al. A Correlative Relationship Between Chronic Pain and Insulin Resistance in Zucker Fatty Rats: Role of Downregulation of Insulin Receptors. *J Pain*. 2016;17(4):404-13.
116. Wensaas AJ, Rustan AC, Lovstedt K, Kull B, Wikstrom S, Drevon CA, et al. Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation. *J Lipid Res*. 2007;48(4):961-7.
117. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
118. Figur 2.4. Prinsipp for Luminex xMAP® med MAGPIX®. [accessed 2016 9. November]; Available from: http://www.merckmillipore.com/NO/en/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/luminex-instruments/xmap-technology/OUGb.qB.D_kAAAFB6sYRRk_Q.nav.
119. Arranz LI, Rafecas M, Alegre C. Effects of obesity on function and quality of life in chronic pain conditions. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(1):390.
120. Moore A, Moore O, McQuay H, Gavaghan D. Deriving dichotomous outcome measures from continuous data in randomised controlled trials of analgesics: use of pain intensity and visual analogue scales. *Pain*. 1997;69(3):311-5.
121. Faiz KW. [VAS--visual analog scale]. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2014;134(3):323. [kommentar]
122. Redshaw Z, Loughna PT. Oxygen concentration modulates the differentiation of muscle stem cells toward myogenic and adipogenic fates. *Differentiation*. 2012;84(2):193-202.
123. Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):698-709.
124. Bonavaud S, Agbulut O, Nizard R, D'Honneur G, Mouly V, Butler-Browne G. A discrepancy resolved: human satellite cells are not preprogrammed to fast and slow lineages. *Neuromuscul Disord*. 2001;11(8):747-52.
125. Pfaffl MW. The ongoing evolution of qPCR. *Methods*. 2010;50(4):215-6.

126. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63(8):879-84.
127. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-23.
128. Dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol*. 2005;66(2):175-91.
129. Solberg R, Aas V, Thoresen GH, Kase ET, Drevon CA, Rustan AC, et al. Leptin expression in human primary skeletal muscle cells is reduced during differentiation. *J Cell Biochem*. 2005;96(1):89-96.
130. Benestad HB. *Forskningsmetode i medisin og biofag*. Oslo: Gyldendal akademisk; 2004. s332
131. Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J*. 2014;35(14):904-10.
132. Shih DM, Wang Z, Lee R, Meng Y, Che N, Charugundla S, et al. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2015;56(1):22-37.
133. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):305-13.
134. Roepstorff C, Vistisen B, Kiens B. Intramuscular triacylglycerol in energy metabolism during exercise in humans. *Exerc Sport Sci Rev*. 2005;33(4):182-8.
135. Ciaraldi TP, Ryan AJ, Mudaliar SR, Henry RR. Altered Myokine Secretion Is an Intrinsic Property of Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158209.
136. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.

Appendikser

- i Medier til celledyrking
- ii Reaksjonsblanding til cDNA-syntese
- iii Reaksjonsblanding til qPCR
- iv Radioaktive medier
- v Spørreskjema

Medier til celledyrking

Utsåingsmedium (M1)

500 ml DMEM - GlutaMAX™ med 1,0 g/L glukose
50 ml FCS (føtalt kalveserum)
2,5 ml penicillin/streptomycin 10.000 enheter/mL
2,5 ml Fungizone (250 µg/ml amfotericin B)

Proliferasjonsmedium (M2)

500 ml DMEM - GlutaMAX™ med 1,0 g/L glukose
10 ml FCS (føtalt kalveserum)
10 ml Ultrosor™ G
2,5 ml penicillin/streptomycin 10.000 enheter/mL
2,5 ml Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B)

Differensieringsmedium (M3)

500 ml DMEM - GlutaMAX™ med 1,0 g/L glukose
10 ml FCS (føtalt kalveserum)
2,5 ml penicillin/streptomycin 10.000 enheter/mL
2,5 ml Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B)
25 pmol insulin

SkGM – dyrkingsmedium til oppskalering

500 ml SkBM basalmedium fra Lonza®
10 ml FCS (føtalt kalveserum)
2,5 ml Pen/Strep 10.000 enheter/ml
2,5 ml Fungizone® (250 µg/ml amfotericin B)
Tilsettes SkGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors fra Clonetics™ (0,5 ml human Epidermal Growth Factor (hEGF), 5 ml Fetuin, 0,5 ml Dexamethasone, 0,5 ml GA-1000, 5 ml BSA (Bovint serumalbumin)). Insulin skal ikke tilsettes.

Frysemedium (per mL)

0,25 ml SkGM

0,25 ml FCS/FBS

0,5 ml 20 % DMSO

DMSO fortynnes i DMEM til 20%. Fortynningen må være nylaget.

Reaksjonsblanding for cDNA-syntetisering (per prøve)

13,2 µl DEPC-dH₂O + prøve

2,0 µl 10 x TaqMan RT Buffer

0,8 µl 25 x dNTP mix

2,0 µl 10 x RT Random hexamers

1,0 µl RNase inhibitor (20 U/µl)

1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)

(Totalt 20 µl per rør)

Løsninger til qPCR

Standarder:

- Trenger 2,5 µl x 3 paralleller x 4 gener → 30 µl av hver standardkonsentrasjon → Lager 45 µl av hver konsentrasjon for å ha overskudd (4 standarder).
- cDNA-mix: 2 µl per prøve (6 prøver gir et totalvolum på 12 µl)
- Standard 1000 (1:5 fortynnet cDNA-mix):
 - 9 µl cDNA-mix, 36 µl dH₂O
- Standard 200 (1:5 fortynnet std. 1000):
 - 9 µl standard 1000, 36 µl dH₂O
- Standard 40 (1:5 fortynnet std. 200):
 - 9 µl standard 200, 36 µl dH₂O
- Standard 8 (1:5 fortynnet std. 40):
 - 9 µl standard 40, 36 µl dH₂O

Fortynning av primere (sluttkonsentrasjon 30 μM)

10 μl primer (300 μM)

90 μl dH₂O

Fortynning av cDNA-prøvene

- 2,5 μl x 3 paralleller x 4 gener = 30 μl \rightarrow Lager 40 μl av hver prøve

Skal fortynnes 1:5 \rightarrow 40/5 = 8 μl prøve + 32 μl dH₂O.

SYBR Green PCR-mix

12,5 μl SYBR Green Master Mix

0,25 μl Forward primer (se tabell 2.6)

0,25 μl Reverse primer (se tabell 2.6)

9,5 μl nukleasefritt vann

(Totalt: 22,5 μl per prøve)

Medier brukt ved gjennomføring av forsøk på metabolismeparametere (MetFlex-protokoll)

Alle mengder av testmedier er iberegnet forsøk med to brett (=80 brønner x 2) og margin siden det forekommer svinn (fordamping). Vi ønsker testmedier med aktivitet på 1 μ Ci/ml.

Radiomerket glukose: D-[¹⁴C(U)]glukose 10mCi/mmol (0,1mCi/ml)

Radiomerket oljesyre: [1-¹⁴C]oljesyre 56,3mCi/mmol (0,1 mCi/ml)

¹⁴C-glukose, 200 μ M (kontroll)

4.5 ml DPBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺

90 μ l HEPES-buffer, 1M (pH = 7,4)

45 μ l D-[¹⁴C(U)]glukose

45 μ l glukose, 10 mM (kald)

¹⁴C-glukose, 200 μ M med 100 μ M kald oljesyre

1,2 ml ¹⁴C-glukose, 200 μ M (kontroll) overføres til eget merket rør og tilsettes:

20 μ l oljesyre, 6 mM (kald).

¹⁴C-oljesyre, 100 μ M (kontroll)

4.5 ml DPBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺

90 μ l HEPES-buffer, 1M (pH = 7,4)

45 μ l [1-¹⁴C]oljesyre

62 μ l oljesyre, 6 mM (kald)

4,5 μ l karnitin (1M)

¹⁴C-oljesyre, 100 μ M med 5 mM kald glukose

1,2 ml ¹⁴C-oljesyre, 100 μ M (kontroll) overføres til eget merket rør og tilsettes:

6 μ l glukose, 1 M (kald).

¹⁴C-oljesyre, 5 μ M

2 ml DPBS uten Ca²⁺ og Mg²⁺

40 μ l HEPES-buffer, 1M (pH = 7,4)

5,6 μ l [1-¹⁴C]oljesyre

2 μ l karnitin (1M)

¹⁴C-oljesyre, 5 μM med 5 mM kald glukose

1,0 ml ¹⁴C-oljesyre, 5 μM overføres til eget merket rør og tilsettes:

5 μl glukose, 1 M (kald).

Hvor sterke smerter har du hatt siste uke?

Hvordan vil du gradere smertene du har hatt i rygg/hofte i løpet av den siste uken? Sett ring rundt ett tall.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ingen smerter Så vondt som det går an å ha

Hvordan vil du gradere de smertene du har hatt i benet (ett eller begge) i løpet av den siste uken? Sett ring rundt ett tall.

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Ingen smerter Så vondt som det går an å ha

Funksjonsscore (Oswestry)

Disse spørsmålene er utarbeidet for å gi oss informasjon om hvordan dine smerter har påvirket dine muligheter til å klare dagliglivet ditt. Vær snill å besvare spørsmålene ved å sette kryss (kun ett kryss for hvert avsnitt) i de rutene som passer best for deg.

1. Smerte

- Jeg har ingen smerter for øyeblikket
- Smertene er veldig svake for øyeblikket
- Smertene er moderate for øyeblikket
- Smertene er temmelig sterke for øyeblikket
- Smertene er veldig sterke for øyeblikket
- Smertene er de verste jeg kan tenke meg for øyeblikket

2. Personlig stell

- Jeg kan stelle meg selv på vanlig måte uten at det forårsaker ekstra smerter
- Jeg kan stelle meg selv på vanlig måte, men det er veldig smertefullt
- Det er smertefullt å stelle seg selv, og jeg gjør det langsomt og forsiktig
- Jeg trenger noe hjelp, men klarer det meste av mitt personlige stell
- Jeg trenger hjelp hver dag til det meste av eget stell
- Jeg kler ikke på meg, har vanskeligheter med å vaske meg og holder sengen

3. Å løfte

- Jeg kan løfte tunge ting uten å få mer smerter
- Jeg kan løfte tunge ting, men får mer smerter
- Smertene hindrer meg i å løfte tunge ting opp fra gulvet, men jeg greier det hvis det som skal løftes er gunstig plassert, for eksempel på et bord
- Smertene hindrer meg i å løfte tunge ting, men jeg klarer lette og middels tunge ting, hvis det er gunstig plassert
- Jeg kan bare løfte noe som er veldig lett
- Jeg kan ikke løfte eller bære noe i det hele tatt

4. Å gå

- Smerter hindrer meg ikke i å gå i det hele tatt
- Smerter hindrer meg i å gå mer enn 1 ½ km
- Smerter hindrer meg i å gå mer enn ¾ km
- Smerter hindrer meg i å gå mer enn 100 m
- Jeg kan bare gå med stokk eller krykker
- Jeg ligger for det meste i sengen, og jeg må krabbe til toalettet

5. Å sitte

- Jeg kan sitte så lenge jeg vil i en hvilken som helst stol
- Jeg kan sitte så lenge jeg vil i min favorittstol
- Smerter hindrer meg i å sitte i mer enn en time
- Smerter hindrer meg i å sitte i mer enn en halv time
- Smerter hindrer meg i å sitte i mer enn ti minutter
- Smerter hindrer meg i å sitte i det hele tatt

6. Å stå

- Jeg kan stå så lenge jeg vil uten å få mer smerter
- Jeg kan stå så lenge jeg vil, men får mer smerter
- Smerter hindrer meg i å stå i mer enn en time
- Smerter hindrer meg i å stå i mer enn en halv time
- Smerter hindrer meg i å stå i mer enn ti minutter
- Smerter hindrer meg i å stå i det hele tatt

7. Å sove

- Søvnens min forstyrres aldri av smerter
- Søvnens min forstyrres av og til av smerter
- På grunn av smerter får jeg mindre enn seks timers søvn
- På grunn av smerter får jeg mindre enn fire timers søvn
- På grunn av smerter får jeg mindre enn to timers søvn
- Smerter hindrer all søvn

8. Seksualliv

- Seksuallivet mitt er normalt og forårsaker ikke mer smerter
- Seksuallivet mitt er normalt, men forårsaker noe mer smerter
- Seksuallivet mitt er normalt, men svært smertefullt
- Seksuallivet mitt er svært begrenset av smerter
- Seksuallivet mitt er nesten borte på grunn av smerter
- Smerter forhindrer alt seksualliv

9. Sosialt liv (omgang med venner og kjente)

- Det sosiale livet mitt er normalt og forårsaker ikke mer smerter
- Det sosiale livet mitt er normalt, men øker graden av smerter
- Smerter har ingen betydelig innvirkning på mitt sosiale liv, bortsett fra at de begrenser mine mer fysiske aktive sider, som sport osv.
- Smerter har begrenset mitt sosiale liv, og jeg går ikke så ofte ut
- Smerter har begrenset mitt sosiale liv til hjemmet
- På grunn av smerter har jeg ikke noe sosialt liv

10. Å reise

- Jeg kan reise hvor som helst uten smerter
- Jeg kan reise hvor som helst, men det gir mer smerter
- Smertene er ille, men jeg klarer reiser på to timer
- Smerter begrenser meg til korte reiser på under en time
- Smerter begrenser meg til korte, nødvendige reiser på under 30 minutter
- Smerter forhindrer meg fra å reise, unntatt for å få behandling

Beskrivelse av helsetilstand (EQ-5D)

Vis hvilke utsagn som passer best på din helsetilstand i dag ved å sette kun ett kryss i en av rutene for hvert punkt nedenfor.

1. Gange

- Jeg har ingen problemer med å gå omkring
- Jeg har litt problemer med å gå omkring
- Jeg er sengeliggende

2. Personlig stell

- Jeg har ingen problemer med personlig stell
- Jeg har litt problemer med å vaske meg eller kle meg
- Jeg er ute av stand til å vaske meg eller kle meg

3. Vanlige gjøremål (f.eks. arbeid, studier, husarbeid, familie- eller fritidsaktiviteter)

- Jeg har ingen problemer med å utføre mine vanlige gjøremål
- Jeg har litt problemer med å utføre mine vanlige gjøremål
- Jeg er ute av stand til å utføre mine vanlige gjøremål

4. Smerte og ubehag

- Jeg har hverken smerte eller ubehag
- Jeg har moderat smerte eller ubehag
- Jeg har sterk smerte eller ubehag

5. Angst og depresjon

- Jeg er hverken engstelig eller deprimer
- Jeg er noe engstelig eller deprimer
- Jeg er svært engstelig eller deprimer

Smertestillende medisiner

Bruker du smertestillende medisiner på grunn av dine rygg- og/eller beinsmerter?

- Ja Nei

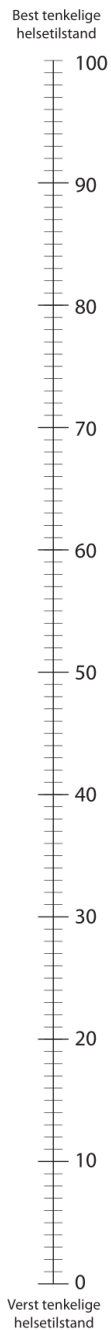
Hvis du har svart ja: Hvor ofte bruker du smertestillende medisiner? (Sett kun ett kryss)

- Sjeldnere enn hver måned
- Hver måned
- Hver uke
- Daglig
- Flere ganger daglig

Helsetilstand

For at du skal kunne vise oss hvor god eller dårlig din helsetilstand er, har vi laget en skala (nesten som et termometer), hvor den beste helsetilstanden du kan tenke deg er markert med 100 og den dårligste med 0.

Vi ber om at du viser din helsetilstand ved å trekke ei linje fra boksen nedenfor til det punkt på skalaen som passer best med din helsetilstand.



Nåværende helsetilstand

Symptomvarighet

Varighet av nåværende rygg-/hoftesmerter (sett kun ett kryss):

- Jeg har ingen rygg-/hoftesmerter
- Mindre enn 3 måneder
- 3 til 12 måneder
- 1 til 2 år
- Mer enn 2 år

Varighet av nåværende utstrålende smerter:

- Jeg har ingen utstrålende smerter
- Mindre enn 3 måneder
- 3 til 12 måneder
- 1 til 2 år
- Mer enn 2 år

Varighet sykemelding/attføring/rehabilitering pga aktuelle plager (uker)

Arbeidsstatus

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> I arbeid | <input type="checkbox"/> Aktivt sykemeldt |
| <input type="checkbox"/> Hjemmeverende, ulønnet | <input type="checkbox"/> Delvis sykemeldt |
| <input type="checkbox"/> Student/skoleelev | % sykemeldt |
| <input type="checkbox"/> Alderspensionist | <input type="checkbox"/> Attføring/rehabilitering |
| <input type="checkbox"/> Arbeidsledig | <input type="checkbox"/> Uføretrygdet |
| <input type="checkbox"/> Sykemeldt | evt % uføretrygdet |

Har du søkt om uføretrygd?

(Sett kun ett kryss)

- Ja
- Nei
- Planlegger å søke
- Er allerede innvilget

Har du søkt om erstatning fra forsikringsselskap eller folketrygden (eventuelt yrkesskadeerstatning)?

(Sett kun ett kryss)

- Ja
- Nei
- Planlegger å søke
- Er allerede innvilget