



Faculty of Social Sciences
Department of Sports Science

Mads-Henrik Hafsmo

Masteroppgave

Det er ingen forskjell i muskelhypertrofi mellom moderat og høyt treningsvolum i løpet av en 10 ukers styrketreningsperiode hos utrente individer.

Mastergrad i treningsfysiologi

2020

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet i forbindelse med gjennomføring av prosjektet «Contratrain» ved høgskolen i Lillehammer 2020.

Jeg vil først og fremst takke veileder Håvard Hamarsland for all hjelp og nyttige tips jeg har fått i løpet av masteroppgaven. Takk gud for at du valgte å ta din post-doc på denne høgskolen, så det hvert fall var én i idrettsseksjonen som interesserte seg for spesielt styrketrening, og muliggjorde dette for meg.

Vil også rette en takk til bioingeniørene på sykehuset Innlandet, Sykehuset Innlandet HF Lillehammer for innfarging til immunohistokjemiske analyser, og til Daniel Hammarström for all statistisk hjelp i R Studio.

Vil også takke samtlige i idrettsseksjonen for fem flotte år, noen med "normal" sans for humor, andre ikke (Stian Ellefsen som får selv forsøkspersonene til å stilne i 5-10 sekunder før de skjønner hva han mener).

Deretter vil jeg rette en stor takk til alle forsøkspersonene som var med i denne studien. Uten dere hadde ikke dette prosjektet vært gjennomførbart. Med tanke på studiedesignet var utrente forsøkspersoner en riktig populasjon å velge fra, da de ikke er helt kjent med konseptet treningsvolum og hvor tungt det ville bli for noen av dem. I tillegg lot de seg selv bli stukket flere ganger med en nokså stor nål, kun for å gi oss små biter av muskulaturen deres.

Til slutt vil jeg takke kjæresten min for all motivasjon hun har gitt meg i løpet av denne tiden.

Mads-Henrik Hafsmo

Lillehammer, juni 2020

Ulemper knyttet til Korona

Grunnet korona-pandemien fikk ikke tre deltagere gjennomført treningsintervensjonen. I tillegg skulle flere biopsi-prøver innfarges på nytt av bioingeniører ved sykehuset Innlandet, men dette lot seg ikke gjøre. I tillegg til at statistikk-«guruen» var mye opptatt, var hjelp av analyser og statistikk i R også utfordrende da møtet måtte foregå via zoom.

Sammendrag

Introduksjon: Det optimale treningsvolumet for hypertrofi og muskulære adaptasjoner er enda ukjent, særlig ved et høyere treningsvolum. Hovedmålet med studien var å undersøke effekten av styrketrening med ulikt treningsvolum på muskeltykkelse, fibertverrsnittsareal, myokjerner og myonukleær domenestørrelse i *m. vastus lateralis* i løpet av 10 ukers treningsperiode.

Metode: 38 deltagere ble rekruttert til én av tre eksperimentelle grupper, eller en negativ kontrollgruppe. De eksperimentelle gruppene gjennomførte 3 ulike treningsvolum i et kontralateralt design med ulikt antall sett på hvert bein (G1: 3/0 ($n=11$), G2: 6/0 ($n=9$), G3: 6/3 ($n=10$)). G4 var først ikke-trenende kontroller (0/0, $n=8$) før de gjennomførte intervensjonen (3/3, $n=5$). Treningsintervensjonen besto av 9 tilvenningsøkter (12 sett/uke) og 21 treningsøkter (varierende volum; 3-sett og 6-sett) i beinpress og kneekstensjon. Ultralyd og biopsi fra *m. vastus lateralis* ble tatt før og etter tilvenningsøktene, halvveis ut i treningsøktene og etter 21 treningsøkter. Muskeltykkelse, fibertverrsnittsareal, myokjerner og myonukleær domenestørrelse ble analysert i R Studio.

Resultat: Muskeltykkelse økte i trente bein sammenlignet med KON som følge av treningsintervensjonen (3-sett: 0.22cm (0.17, 0.27), 6-sett: 0.30cm (0.22, 0.37)), uten forskjeller mellom treningsvolum (0.08cm (-0.002, 0.16)). Fibertverrsnittsareal økte i trente bein sammenlignet med KON i type 2 (3-sett: $457.0\mu\text{m}^2$ (141.3, 72.7); 6-sett: $600.4\mu\text{m}^2$ (235.3, 965.5)), og type 1 for 3-sett ($326.9\mu\text{m}^2$ (12.7, 641.0)), uten forskjeller mellom treningsvolum. 3-sett hadde flere myokjerner enn KON (type 1: 13.1% (2.8, 24.3), type 2: 16.7% (6.0, 28.5)) og 6-sett (type 1: 16.3% (3.1, 33.1), type 2: 16.6% (3.3, 31.5)) etter intervensjonen. Det myonukleære domenet økte for 6-sett sammenlignet med KON i type 2 fibre ($361.1\mu\text{m}^2$ (26.2, 696.1)), men det var ingen volumforskjeller.

Konklusjon: Det er ikke forskjell i hypertrofi mellom moderat og høyt treningsvolum i løpet av en 10 ukers treningsperiode for denne populasjonen. Den observerte hypertrofien ble ikke støttet av myonukleær akkresjon i noen av settene.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	2
Ulemper knyttet til Korona	3
Sammendrag	4
1. Teori	6
1.1 Treningsvolum	6
1.2 Fibertyper	11
1.3 Myokjerner	13
2. Introduksjon	16
3. Metode	18
3.1 Deltagere og eksperimentelt design	18
3.2 Treningsprotokoll	20
3.3 Innhenting av muskelvev og prosessering.....	21
3.4 Styrketester.....	21
3.5 Immunohistokjemi	21
3.6 Muskeltykkelse og kroppssammensetning.....	22
3.7 Mikroskop	22
3.8 Analyse av data og statistikk.....	24
4. Resultater	25
4.1 Treningsvolum	25
4.2 Muskeltykkelse	25
4.3 MFA	26
4.4 Myokjerner og MND.....	27
5. Diskusjon	29
5.1 Muskeltykkelse og MFA.....	29
5.2 Myokjerner og MND.....	30
5.3 Metodediskusjon.....	32
5.4 Praktiske anbefalinger	32
5.5 Konklusjon	33
Referanseliste.....	34
Vedlegg.....	43
Vedlegg 1 - Samtykkeskjema	43
Vedlegg 2 - Cellprofiler.....	52

1. Teori

Styrketrening er godt etablert som en metode for å øke muskelmasse, styrke og generell helse hos forskjellige populasjoner (Folland & Williams, 2007; Ibanez et al., 2005; Lopez et al., 2018), og er en viktig strategi for behandling og forebygging for en rekke sykdommer (Loenneke et al., 2019; Westcott, 2012). Helsefordelene ved styrketrening fungerer primært som tiltak mot omstendigheter der svakhet i muskulaturen har ført til nedsatt funksjon (f.eks. sarkopeni, skjelettplager, immobilisering og insulinresistens). De morfologiske adaptasjonene som følge av styrketrening er hovedsakelig en økning av tverrsnittsarealet i muskelfibrene, som oppstår som følge av en økning i antall myofibriller (Folland & Williams, 2007). Økningen i muskelfibrene skyldes økt proteinsyntese som fører til flere myofilamenter, myofibriller, og sarkomerer i muskelfibrene (Frontera & Ochala, 2015). Dette kan undersøkes ved biopsier hvor man skiller de ulike fibertypene, ofte identifisert som trege (type 1) og raske (type 2) fibre (Grgic, Homolak, Mikulic, Botella & Schoenfeld, 2018), hvor det ofte vises til at type 2 fibre har et større vekstpotensial enn type 1 ved styrketrening (A. C. Fry, 2004). Hver muskelfiber inneholder flere myokjerner som kontrollerer genekspressjonen og proteinsyntesen over et gitt volum cytoplasma i cellen, kjent som det myonukleære domenet (Conceicao et al., 2018). Endringer i fiberstørrelse som følge av styrketrening vil derfor medføre endringer i den myonukleære domenestørrelsen, antall myokjerner eller en kombinasjon av begge (Snijders et al., 2016).

1.1 Treningsvolum

Å designe et godt styrketrenings-program er en kompleks prosess som krever god kunnskap om de forskjellige treningsvariablene, i tillegg til treningsprinsippene (Sooneste, Tanimoto, Kakigi, Saga & Katamoto, 2013). Motstand, øvelsesutvalg, treningsstruktur (f.eks. antall trente muskelgrupper), pausetid mellom settene, repetisjons-hastighet, og ikke minst treningsvolum (totalt antall sett og repetisjoner) er viktige variabler som kan manipuleres i et treningsprogram (Kraemer & Ratamess, 2004). Å endre på noen av disse variablene vil ha en effekt på trenings-stimuliet og kan bidra til å endre effekten av treningsprogrammet, samt øke/vedlikeholde personens motivasjon.

Treningsvolum spiller en viktig rolle for kroniske adaptasjoner i muskulaturen som muskelstyrke og muskelmasse (Hammarstrom, 2019; Kraemer & Ratamess, 2004). Dersom andre variabler er konstante vil økt volum føre til lenger tid med spenning, som har blitt foreslått å være en viktig faktor for muskelvekst (Burd et al., 2012). En tidlig meta-analyse av

Carpinelli og Otto (1998) viste at ett sett er like effektivt som flere for muskulære adaptasjoner som økning i muskelfibrenes tverrsnittsareal. Flere studier gjort over det siste tiåret har derimot vist større effekt med flere sett per øvelse (J. W. Krieger, 2010). En meta-analyse av B. Schoenfeld, Ogborn og Krieger (2016) har anbefalt minst 10 sett per muskelgruppe i løpet av uka for å oppnå optimal økning i muskelmasse, i tillegg til økt intracellulær anabol signalering og muskelproteinsyntese, som støtter påstanden til Burd et al. (2012). Selv om det ikke er konsensus angående det optimale treningsvolumet, ser det ut til at gjentakende stimuli i form av flere versus ett sett er nødvendig for å indusere maksimal anabol respons i intracellulære signaler (Burd et al., 2010; B. Schoenfeld et al., 2016).

Det ser ut til at en 8-12 ukers treningsintervensjon er nødvendig for å se betydelige endringer i muskelvekst hos utrente individer, der >10 uker varighet viser signifikante endringer mellom grupper, og at et høyere treningsvolum har best effekt på hypertrofi (tabell1) (Mitchell et al., 2012; Radaelli et al., 2015; Ronnestad et al., 2007; B. J. Schoenfeld et al., 2019; Sooneste et al., 2013). I studien til Amirthalingam et al. (2016) gjort på trente individer fant de derimot størst muskelvekst hos gruppen som trente med lavest treningsvolum. Forfatterne spekulerer imidlertid rundt hvorvidt den korte intensive treningsperioden kan ha vært for tøff i gruppen med høyt volum, hvor en hvileperiode i etterkant hadde vært nødvendig for en «rebound»-effekt.

Det er også store forskjeller på når man først ser signifikante endringer i studier. Som regel har studier kun målinger før og etter intervensjonen. Ut ifra tabellen er det 5 studier som har målinger underveis (Barcelos et al., 2018; Chilibeck, Calder, Sale & Webber, 1998; Damas et al., 2016; Kadi et al., 2004; Staron et al., 1994). Av disse viser to studier signifikante endringer allerede etter 3 og 4 uker (Barcelos et al., 2018; Damas et al., 2016). I studien til Damas et al. (2016) argumenterer de for at dettes skyldes ødem-indusert muskelødeleggelse og ikke muskelvekst. I de resterende studiene er det store forskjeller på når man ser betydelige endringer, der det blant annet i en studie av Staron et al. (1994) ikke ble observert signifikant endring i løpet av en 8 ukers treningsperiode. Mye av usikkerheten i de foreliggende studiene kan skyldes metodiske svakheter. Studier bruker vanligvis et «between-subject»-design for å måle volum-avhengige utfallsmål på muskelvekst. Et sterkere design som kan bidra med å fjerne biologisk variasjon som en konfunderende faktor er et «within-subject»-design der samme deltaker trener ulikt treningsvolum på hvert bein og anbefales som et sterkt studiedesign (Hammarstrom, 2019; MacInnis, McGlory, Gibala & Phillips, 2017).

Klassifikasjon av høyt treningsvolum varierer mellom studier. I tabell 1 er det kun studien til Radaelli et al. (2015) og Kadi et al. (2004) som har undersøkt treningsadaptasjoner hos utrente individer med virkelig høyt treningsvolum (henholdsvis 30 og 36-45 sett/uka. I samsvar med Radaelli et al. (2015) fant B. J. Schoenfeld et al. (2019) et dose/respons-forhold mellom volum og muskelvekst i trente individer opp til et betydelig treningsvolum (45 sett/uke). Til tross for at disse funnene støtter teorien om et dose/respons-forhold presentert i meta-analysen til B. Schoenfeld et al. (2016), betyr ikke det at det nødvendigvis er det høyeste volumet som har best effekt på muskelvekst hos alle, da en nylig studie av Damas et al. (2019) fant individuelle forskjeller i hypertrofi, der noen responderte bedre med et lavere treningsvolum.

Utrente individer ser ikke ut til å trenge et like stort treningsvolum for å oppnå liknende resultater som trente. Dette ser man i en studie av Ronnestad et al. (2007), der de øker muskeltykkelsen i *m. vastus lateralis* 11% med 18 sett i uka, mens man i studien til B. J. Schoenfeld et al. (2019) ser en tilsvarende økning (13,7%) med 45 sett i uka, mens de så en lavere ved 27 sett/uke (7,9%). Til tross for at utrente individer ser liknende endringer i muskelvekst som trente individer med mindre treningsvolum, er det ukjent hvor mye som er det optimale for begge populasjoner, og hva «toleransen» er. Her er det sprikende funn, der studier har funnet signifikante økninger ved 3-20 sett i uka (Chilibeck et al., 1998; Damas et al., 2016; Sooneste et al., 2013), mens de få studiene som er gjort med virkelig stort volum har sett signifikante økninger av 30-45 sett i uka (Kadi et al., 2004; Radaelli et al., 2015; B. J. Schoenfeld et al., 2019).

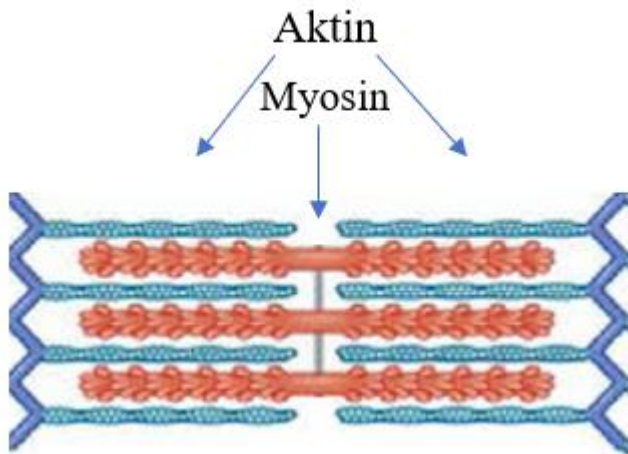
Tabell 1. Studier på hypertrofisk styrketrening som undersøker treningsvolum. M; Menn. K; Kvinner. U; Utrent. T; Trent. ↑; signifikant økning i løpet av treningsperioden uten forskjell mellom grupper. *; Signifikant endring mellom grupper der lavest volum hadde størst effekt. **; Signifikant endring mellom grupper der høyest volum hadde størst effekt.

Referanse	Alder	Kjønn	Status	Lengde (uker)	Øvelser for andre			Frekvens, d-uka ⁻¹	Sett i uka	Måleinstrument	Utfall	Funn
					Øvelser	muskelgrupper	Intensitet					
Sooneste et al. (2013) n = 8 n = 8	25 (2.1)	M	U	12	Dumbbel preacher curl	Nei	80% av 1RM	2	Lav: 2 Høy: 6	MR	**	Signifikant større tverrsnittsareal i overarmen hos gruppen som trente med høyere volum (15.9% vs. 2.8%).
Staron et al. (1994) n = 33	~22	M & K	U	8	Knebøy, beinpress, kneekstensjon	Nei	RM til utmattelse Fredag: 10-12RM til	2	18	Immunohistokjemi	↔	Ingen endring i tverrsnittsareal for <i>m. vastus lateralis</i> .
Damas et al. (2016) n = 10	27(3)	M	U	10	Beinpress, kneekstensjon	Nei	9-12 reps til utmattelse	2	12	Ultralyd	↑	Signifikant økning i tverrsnittsareal av <i>m. vastus lateralis</i> .
Radaelli et al. (2015) n = 12 n = 13 n = 13	24.4 (0.9)	M	U	24	Albuefleksor, albueekstensor	Ja	8-12 RM til utmattelse	3	Lav: 6 Middels: 18 Høy: 30	Ultralyd	**	Signifikant forskjell mellom grupper, der det fulgte et dose-respons forhold mellom gruppene.
Amirthalingam et al. (2016) n = 10 n = 9	19-24	M	T	6	Beinpress, kneekstensjon, lunges	Ja	10 RM til utmattelse	3	Høy: 24 Lav: 14	Ultralyd	*	Å halvere mengden sett på baseøvelser, og dermed mindre volum førte til bedre resultater i muskeltykkelse og kroppssammensetning.
Abe et al. (2000) n =18 n =19	25-50	M & K	U	12	Kneekstensjon	Ja	8-12RM 70% av 1RM	3	Lav: 3 Høy: 9	Ultralyd	↑	Ingen signifikant endring mellom gruppene i <i>m. vastus lateralis</i> .
Rønnestad et al. (2007) n =10 n =11	~26	M	U	11	Beinpress, kneekstensjon	Ja	Uke 1-2: 10RM Uke 3-4: 8RM Uke 5-11:7RM	3	Lav: 6 Høy: 18	MR	**	Et høyere treningsvolum førte til signifikant forskjell i hypertrofi i <i>m. vastus lateralis</i> mellom intervensjonsgruppene.
Schoenfeld et al. (2018) n =11 n =12 n =11	23.8(3.8)	M	T	8	Knebøy, beinpress, kneekstensjon	Ja	8-12RM til utmattelse	4	Lav: 9 Middels: 27 Høy: 45	Ultralyd	**	Studien viser et dose-respons forhold med større hypertrofi med høyere volum der 45 sett/uka viste størst hypertrofi av <i>m. vastus lateralis</i> .
Ostrowski et al. (1997) n =9 n =9 n =9	~23	M	T	10	Knebøy, beinpress, kneekstensjon	Ja	12RM til utmattelse	4	Lav: 3 Middels: 6 Høy: 12	Ultralyd	↑	Signifikant endring fra pre-post i <i>m. rectus femoris</i> , men ingen forskjell mellom gruppene.
Barcelos et al. (2018) n =10 n =10 n =20	23 (4)	M	U	8	Kneekstensjon	Nei	9-12RM 80% av 1RM	2 3 5	Lav: 6 Middels: 9 Høy: 15	Ultralyd	↑	Signifikant økning over tid hos alle grupper, men ingen forskjell mellom grupper. Størst effektstørrelse hos gruppen med høyest treningsvolum (ES=0.54).

Mitchell et al. (2012) <i>n</i> = 9 <i>n</i> = 9 <i>n</i> = 9	21 (0.8)	M	U	10	Kneekstensjon	Nei	80% av 1RM til utmattelse 80% av 1RM til utmattelse 30% av 1RM til utmattelse	3	Lav: 3 (80% 1RM) Høy: 9 (30% 1RM) Høy: 9 (80% 1RM)	MR	**	Lik muskelvekst ved både 80% og 30% av 1RM så lenge det var gjort til utmattelse. Økt volum i form av mer sett resulterte i større hypertrofi.
Chilibeck et al. (1998) <i>n</i> = 19	20.2(0.8)	K	U	20	Beinpress, kneekstensjon, knefleksjon	Ja	10-12 RM til utmattelse	2	20	DXA	↑	Så signifikant økning i magermasse i bein fra mid-post, men ikke pre-mid.
Damas et al. (2019) <i>n</i> = 10 <i>n</i> = 10 <i>n</i> = 20	20.2(4)	M	U	8	Kneekstensjon	Nei	9-12RM til utmattelse	2 3 5	Lav: 6 Middels: 9 Høy: 15	Ultralyd	↑ *	Individuelle forskjeller i forhold til treningsfrekvens (dermed høyere volum) og hypertrofi, der noen økte signifikant med lavere treningsvolum kontra høyt.
Kadi et al. (2004) <i>n</i> = 15	24(1)	M	U	12	Hacksquat, beinpress, kneekstensjon	Ja	6-12 RM til utmattelse	3	36-45	Immunohistokjemi	↑	Signifikant økning i fiberareal i <i>m. vastus lateralis</i> .

1.2 Fibertyper

Den menneskelige skjelettmuskulaturen består av en heterogen samling av ulike typer muskelfibre (Staron, 1997). Muskelfibrene er sammensatt av funksjonelle enheter kalt sarkomerer. Innad i hver sarkomer er det flere sett av tykke (myosin) og tynne (aktin) filamenter som gjør at muskelfiberen kan kontrahere (Scott, Stevens & Binder–Macleod, 2001) (figur 1).



Figur 1. Illustrasjon av myosin og aktin-filament i skjelettmuskulaturen. Inspirert av Frontera og Ochala (2015).

I sarkomerene forekommer aktin som én form, mens myosin i tre ulike former. Disse er også kjent som isoformer, som vil si forskjellige varianter av samme protein som har ansvar for samme oppgave, men har forskjellige funksjonelle karakteristikk (Schiaffino & Reggiani, 1994). Enzymaktiviteten er i stor grad det som avgjør de ulike funksjonelle karakteristikkene (A. C. Fry, 2004).

Mekanismen som styrer fibertypeprofilen i en muskelfiber er impulsmønsteret fra de motoriske nevronene, og kan undersøkes ved immunohistokjemiske analyser hvor man klassifiserer muskelfibrene inn i trege (type 1) og raske (type 2) (Pette & Staron, 2000). Den tradisjonelle klassifiseringen av trege og raske fibre er basert på fysiologiske parametere som tid til maks muskelspenning og avspenningstid. Det gjenspeiler hovedsakelig forskjeller i eksitasjon-kontraksjon (EK) koblingsprosessen mellom langsomme og hurtige ‘rykk’ i muskelfibrene, avhengig av om muskelfibrene som aktiveres er sammenkoblet med trege eller raske motoriske nevroner (Schiaffino & Reggiani, 2011). Plastisiteten til muskulaturen gjør at den kan adaptere til en rekke ulike typer eksterne stimuli, som for eksempel nivå av kontraktil aktivitet (f.eks. utholdenhetstrening), vektbærende aktivitet (f.eks. styrketrening) og substrat-tilgjengelighet (f.eks. tilgang på makronæringsstoffer) (Zierath & Hawley, 2004).

Hos mennesker er de raske fibre videre delt inn i to, der den mer aerobe fibertypen er betegnet type 2A, og de mer anaerobe (glykolytiske) fibre er betegnet som type 2X (Brooke & Kaiser, 1970). Studier har vist at det vil skje en overgang fra type 2X til 2A som følge av styrketrening (Adams, Hather, Baldwin & Dudley, 1993; Andersen & Aagaard, 2010), samtidig som type 2A vil ha størst muskelvekst (Campos et al., 2002; Shoepe, Stelzer, Garner & Widrick, 2003; Tarpinning, Wiswell, Hawkins & Marcell, 2001). Mens man ser denne endringen i fibertyper som følge av styrketrening med tilstrekkelig varighet (mer enn 8 uker), vil fravær fra styrketrening ha motsatt utfall (Andersen & Aagaard, 2000; Kraemer et al., 1995; Staron et al., 1994; Staron et al., 1990). Til tross for at begge fibertyper har potensiale for muskelvekst, ser det ut som type 2-fibre har det største vekstpotensialet (Adams et al., 1993; Andersen & Aagaard, 2000; Shoepe et al., 2003). Både utholdenhets- og styrketrening vil føre til lik reduksjon i koekspresjonen av de tunge myosinkjedene, som fører til flere muskelfibre med bestemte karakteristikk. Selv om trendene for omdannelsen av muskelfibre er lik for styrke- og utholdenhetstrening, er de forskjellige fysiologiske forandringene som oppstår ved de forskjellige treningsformene også viktig (Scott et al., 2001).

Forkortningshastigheten for en muskelfiber kan måles, og det viser et tydelig mønster; type 1-fibre er de tregeste og type 2X-fibre de raskeste. Fibrene kan også være "hybride", en sammensetning av type 1 og 2A, eller type 2A og 2X (Andersen, Klitgaard & Saltin, 1994). Dette forekommer i muskler som gjennomgår endring av fibertype, og også på grunn av den langsomme proteinomsetningen til myosinet (Schiaffino & Reggiani, 2011). Sammenlignet med type 2-fibre har type 1-fibre en høyere oksidativ kapasitet og en høyere trøtthets-terskel, men type 2 kan skape større effekt (Grgic et al., 2018).

Hos utrente individer ser man en 10-31% økning i type 1 fibre og 20-45% økning i type 2 fibre etter en styrketreningsintervensjon, der økningen av tverrsnittsarealet hovedsakelig kommer som følge av økt myofibrillært areal, med en liten til nærmest ingen endring i tettheten av myofibriller (Campos et al., 2002). Endringer i muskelproteiner begynner etter kun noen få økter, og det er sett markant hypertrofi av muskelfibre allerede etter 3-6 uker med styrketrening (Amirthalingam et al., 2016; Damas et al., 2016; Kadi et al., 2004).

Myosin- og aktinfilamentene legges til i periferien av hver myofibrill, som resulterer i større myofibriller uten endring i filamentets pakningstetthet (Bird, Tarpinning & Marino, 2005). Siden myofibrillene tar opp hele 80% av plassen i muskelfibre vil det heller ikke være plass til for at tettheten av disse kan øke betraktelig (Phillips, 2000).

1.3 Myokjerner

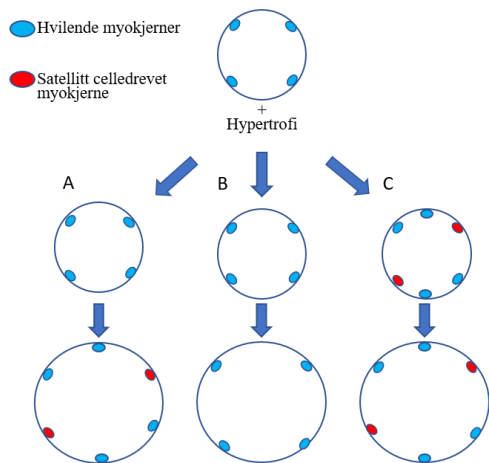
Skjelettmuskulaturens muskelfibre er èn av de tre hovedkategoriene av celler i kroppen, sammen med osteoklaster og cytotrofoblaster (Allen, Roy & Edgerton, 1999). Disse celletypene er multinukleære, som vil si at de har flere cellekjerne i cellen, og får flere når de stimuleres. Satelittceller er stamcellene som er ansvarlig for å donere cellekjerne til muskulaturen, og befinner seg mellom sarkolemma og basal lamina i muskelfibrene (Mauro, 1961). Disse er med på å fasilitere nye myokjerner til muskulaturen, og spiller en viktig rolle i vekstprosessen (C. S. Fry et al., 2014; Petrella, Kim, Cross, Kosek & Bamman, 2006; Snijders et al., 2016). Når satelittcellene blir utsatt for et tilstrekkelig stimuli går de inn i cellyklus hvor de prolifererer og kan donere en kjerne til den eksisterende muskelfiberen ved muskelvekst eller reparasjon (Kadi et al., 2005). I tillegg er muskelfibrene en av de få post-mitotiske syncytiale cellene hos mennesker, der hver muskelfiber inneholder flere hundre myokjerner fordelt utover cellen (Bruusgaard, Liestol, Ekmark, Kollstad & Gundersen, 2003). Myokjernene har som oppgave å kontrollere genekspresjonen og proteinsyntesen over et gitt volum cytoplasma, også kalt myonukleær domene (Snijders et al., 2016).

Akkresjon av myokjerner er et krav i situasjoner der det er et behov for økt transkripsjonskapasitet (Conceicao et al., 2018). Dersom de eksisterende myokjernene imøtekommer den økte transkripsjonskapasiteten og proteinsyntesen ved en ytterligere vekst vil det ikke være nødvendig med nye myokjerner (Petrella et al., 2006). Frem til da er det de eksisterende myokjernene og deres drivkraft som er ansvarlige for den ytterligere veksten (Snijders et al., 2016). Hypertrofi og tilvekst av nye myokjerner ved testosteron-supplement forsterker også teorien om at myonukleær akkresjon bidrar til muskelvekst (Sinha-Hikim, Roth, Lee & Bhasin, 2003).

Under visse omstendigheter er tilbøyeligheten for aktiverte satelittceller til å fusere en iboende mekanisme (Moss & Leblond, 1971), så det kan tenkes at akkresjonen av myokjerner man ser ved styrketrening også kun er et svar på muskelfiberskade, og ikke et krav for å opprettholde myonukleær domenestørrelse. I en studie av Farup et al. (2014) så de myonukleær akkresjon i type 2 fibre i løpet av 12 uker med eksentrisk (skadelig), men ikke konsentrisk (mindre skadelig) styrketrening, til tross tilsvarende hypertrofisk respons i begge modalitetene, og støtter dermed denne hypotesen.

Til tross for at begge fibertyper ser ut til å respondere likt på tilvekst av myokjerner, ser man at type 2 fibre er svært fleksible, med forskjellige funn mellom studier. En studie av Bellamy

et al. (2014) så en økning i antall myokjerner uten signifikant økning i domenestørrelse etter 16 uker styrketrening, mens en studie av Herman-Montemayor, Hikida og Staron (2015) så over 30% hypertrofi etter kun 6 uker i *m. vastus lateralis* uten signifikant økning av myonukleær tilvekst (9.5%, $p < 0.10$). Det er altså ikke konsensus i litteraturen angående akkresjon av myokjerner til muskulaturen ved hypertrofi, og det er forskjellige perspektiver på akkresjon og myonukleær domeneutvidelse ved hypertrofi, spesielt type 2 fibre (Damas et al., 2018; C. S. Fry et al., 2014) (Figur 2).

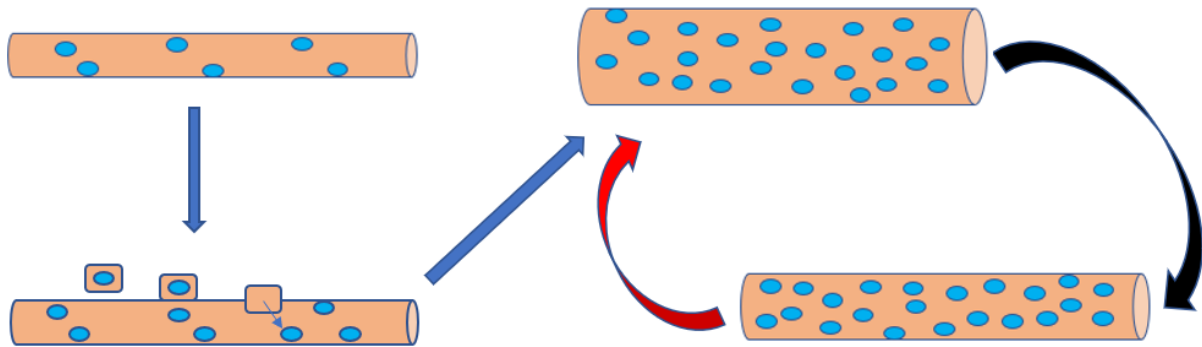


Figur 2. Figuren viser de tre forskjellige perspektivene av satellitt celle-mediert akkresjon av myokjerner og utvidelsen av myokjernes domene ved hypertrofi av type 2-fibre. A) Myokjernes domene utvides gradvis helt til en øvre grense er nådd, så vil satellitt celle-mediert akkresjon av myokjerner sørge for videre støtte til hypertrofi. B) Tettheten av satellittcellene øker i fravær av myonukleær akkresjon, og myokjernes domene utvides betydelig eller på ubestemt tid der hypertrofien foregår. C) Satellitt celle-mediert akkresjon av myokjerner går forut for hypertrofi og er nødvendig for muskelvekst, og antyder at myokjernes domene i stor grad er regulert. Figuren er inspirert av Murach, Englund, Dupont-Versteegden, McCarthy og Peterson (2018).

Økning av antall myokjerner har oppstått både akutt (Bellamy et al., 2014; Farup et al., 2014; Herman-Montemayor et al., 2015), men også noen dager i etterkant av intervensjonen, der en nylig studie av Bjornsen et al. (2019) så en videre økning av myokjerner ti dager etter treningsintervensjonen var over. Tidsforløpet for akkresjon av myokjerner til muskulaturen ser derfor ut til å være forskjellig, og kan skyldes en forsinket økning av cellekjerner som følge av treningsindusert muskelødeleggelse (Mackey et al., 2016).

Det er indikasjoner på at tidligere trent muskulatur oppnår noen parametere som f.eks. fiberareal med en akselerert hastighet når de utsettes for et stimuli etter en lengre periode uten styrketrening (Staron et al., 1991). Dette fenomenet kalles "muskel-hukommelse" og var først sett på som resultatet av økt motorisk læringskapasitet i sentralnervesystemet (Rutherford & Jones, 1986). Dette støttes av nyere forskning, der flere studier viser at

myokjerner er resistente mot apoptose og forblir forhøyet i atrofierte muskler og kan fungere som biologiske mediatorer for muskel hukommelsen i tidligere trente muskelfibre (Bruusgaard, Johansen, Egner, Rana & Gundersen, 2010; Egner, Bruusgaard, Eftestol & Gundersen, 2013) (figur 3).



Figur 3. En modell av sammenhengen mellom muskelstørrelsen og antall myokjerner. I denne modellen er myokjernene permanente. Tidligere trent muskulatur krever nye myokjerner ved fusjon av satelittceller for videre hypertrofi. Lenger tid uten stimuli til muskulaturen vil føre til atrofi uten tap av myokjerner. Det økte antallet myokjerner i muskelfiberen som har vært utsatt for en periode med hypertrofisk stimuli vil gi en mekanisme for muskel-hukommelse. Figuren er inspirert av Bruusgaard et al. (2010).

Myonukleær domenestørrelse er én av to teorier om hvordan hypertrofi oppstår.

Studier har konkludert med at ~26% hypertrofi som følge av en treningsintervensjon er nødvendig for å fremkalle tilvekst av myokjerner, og at domenestørrelsen per myokjerne er 2000-2247 μm^2 (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006). En nyere meta-analyse av Conceicao et al. (2018) hevder den foreslåtte veksten før nye myokjerner inkorporeres nødvendigvis ikke stemmer, og sier at myonukleær tilvekst vil forekomme selv under 10% hypertrofi, men at en betydelig økning først skjer når muskelveksten er større enn ~22%. Hverken kjønn eller alder hadde påvirkning på utfallet, og det var heller ikke en spesifikk fibertype som viste større tilvekst av myokjerner enn andre.

Hovedmålet med denne oppgaven var derfor å sammenligne å sammenligne effekten av ulikt treningsvolum på muskeltykkelse og fysiologiske endringer i skjelettmuskulaturen hos utrente individer over en 10 ukers treningsintervensjon. Med det sagt, er hypotesene for studien følgende:

1. Det er et dose/respons-forhold mellom treningsvolum og muskelvekst.
2. Et høyere treningsvolum vil føre til større økning i antall myokjerner.

2. Introduksjon

Styrketrening er en viktig faktor for å opprettholde skjelettmuskulaturens muskelmasse og muskelstyrke (Brigatto et al., 2019; Colquhoun et al., 2018). Resultatet av en lengre periode med styrketrening avhenger av manipuleringer av flere variabler, deriblant volum (sett * repetisjoner * motstand), og spiller en viktig rolle for kroniske adaptasjoner i skjelettmuskulaturen for blant annet størrelse og styrke (B. J. Schoenfeld et al., 2019). Det optimale treningsvolumet er enda ukjent, og det er observert signifikant muskelvekst ved både lavt (Abe, DeHoyos, Pollock & Garzarella, 2000; Sooneste et al., 2013) og høyt treningsvolum (Kadi et al., 2004; Radaelli et al., 2015). De sistnevnte studiene viser et tydelig dose/respons-forhold mellom treningsvolum og muskelvekst (J. W. Krieger, 2010; B. Schoenfeld et al., 2016).

Økt muskelfiberareal (MFA) er grunnen til muskelvekst, og resulterer i økt mengde kontraktile proteiner i fibre som gir mulighet for flere kryssbro-koblinger på et gitt tidspunkt (Frontera & Ochala, 2015). Disse fibre er betegnet som trege (type 1) og raske (type 2) muskelfibre (Scott et al., 2001), og har muligheten til å tilpasse sin fenotype og endre størrelse og arkitektur som følge av endringer i indre eller ytre miljø (van Wessel, de Haan, van der Laarse & Jaspers, 2010). Av disse fibre ser det ut til type 2 er den med størst vekstpotensialet som følge av tung styrketrening (Bellamy et al., 2014; Grgic et al., 2018; Herman-Montemayor et al., 2015). Hver muskelfiber inneholder flere myokjerner som har som oppgave å regulere gentranskripsjonen og proteinsyntesen i et begrenset volum cytoplasma i cellen, også kalt det myonukleære domenet (MND) (Petrella et al., 2006). Dersom det er nødvendig vil myonukleær tilvekst fasiliteres av hvilende satelittceller som prolifererer, differensierer, og donerer sin kjerne til muskulaturen for å støtte den videre muskelveksten og regenereringen (Lee et al., 2018; Petrella, Kim, Mayhew, Cross & Bamman, 2008). Det er ikke konsensus i litteraturen angående denne tilveksten ved hypertrofi, der noen studier har vist at hypertrofi støttes av en betydelig økning av myokjerner (Bellamy et al., 2014; Leenders et al., 2013; Olsen et al., 2006), mens andre ikke finner myonukleær akkresjon ved muskelvekst (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006; Verdijk et al., 2009). For å forklare de forskjellige funnene er det foreslått en to-fasers modell av Kadi et al. (2004) og Petrella et al. (2006) hvor de sier at hypertrofi først oppstår som følge av en økning i den myonukleære domenestørrelsen, og at inkorporering av flere myokjerner først oppstår når det behøves for ytterligere muskelvekst.

Få studier har undersøkt effekten av et virkelig høyt treningsvolum, spesielt på utrente, og hvor lenge man kan opprettholde den hypertrofiske responsen, og i så fall ved hvilket tidspunkt det vil nå et platå. Resultater fra tidligere studier angående en dose/respons-effekt mellom treningsvolum og muskelvekst har vært motstridende, der noen studier viser at et høyere treningsvolum fører til en betydelig økt muskelvekst (Correa et al., 2015; Ronnestad et al., 2007; Sooneste et al., 2013), mens andre studier ikke har funnet en volum-avhengig forskjell (Bottaro, Veloso, Wagner & Gentil, 2011; McBride, Blaak & Triplett-McBride, 2003; Ostrowski, Wilson, Weatherby, Murphy & Lyttle, 1997). Dermed var denne studien gjort for å sammenligne effekten av ulikt treningsvolum, og fysiologiske endringer i skjelettmuskulaturen hos utrente individer over en 10 ukers treningsintervensjon. Mine hypoteser er:

1. Det er et dose/respons-forhold mellom treningsvolum og muskelvekst.
2. Et høyere treningsvolum vil føre til større økning i antall myokjerner.

3. Metode

3.1 Deltagere og eksperimentelt design

Deltagerne i studien var utrente friske individer (24.9 (4) år; 174 (7.4) cm; 77.7 (16) kg) som ble rekruttert via e-post, flyers, sosiale medier og muntlig ansikt til ansikt. Inklusjon- og eksklusjonskriterier for prosjektet er oppsummert i tabell 2. 116 personer meldte interesse for studien, 62 takket nei, 12 svarte ikke på henvendelser, og 45 signerte samtykke etter å ha lest infoskrivet (se vedlegg). Av de 45 var det 8 som ikke fullførte studien, og grunnene var som følger: ikke tid (1), smerte etter biopsi (1), møtte aldri opp (1), skade ikke relatert til studien (1), personlige årsaker (1), avsluttet studien grunnet korona-pandemi (3). Studien var godkjent av den lokale etiske komité (#2019/818) og fulgte helsinkideklarasjonen.

Tabell 2. Inklusjon- og eksklusjonskriterier

Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
<ul style="list-style-type: none">• 18-35 år• Friske• Ikke-røykende• Utrente (<1 styrkeøkt/uke hver 14 dag i løpet av de siste 6 månedene, eller mer enn to økter utholdenhetstrening)• Ikke være på medisiner som kan påvirke tilpasning til trening• Ingen muskel- eller skjelettplager som hindrer deltagelse i tung styrketrening	<ul style="list-style-type: none">• Tidligere skadet som har ført til hemmet styrke• Manglende evne til å gjennomføre styrketrening• Symptomer på dårlig helse eller rapportert sykdom

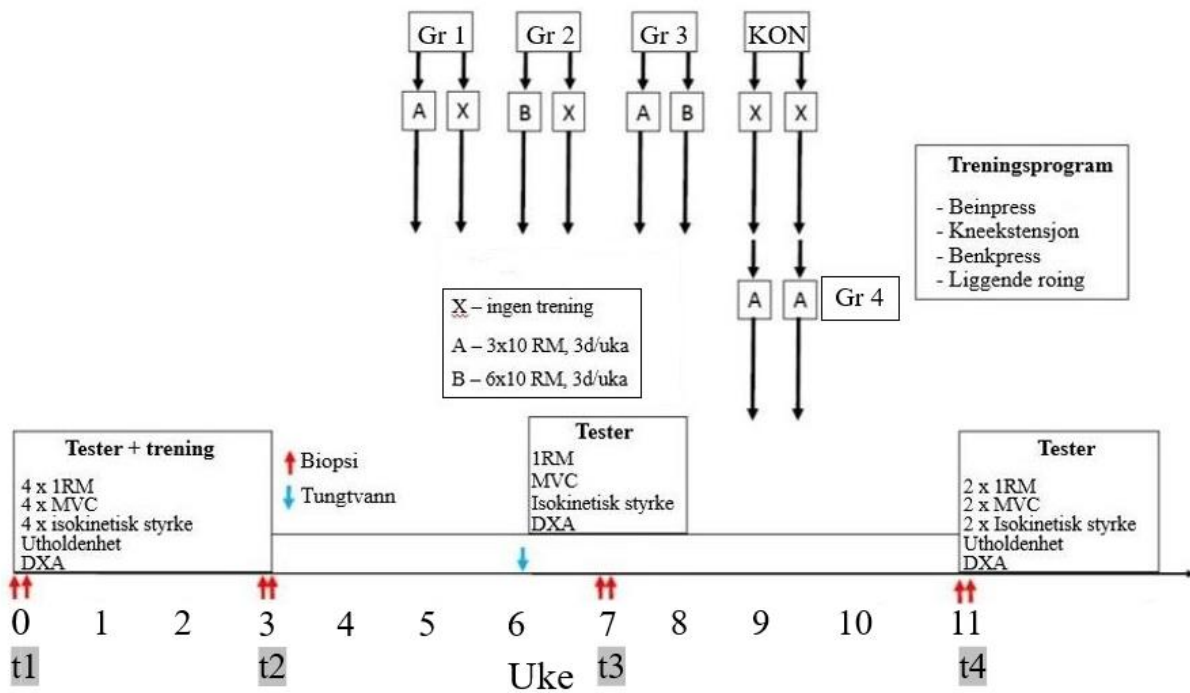
Deltagerne ble tilfeldig plassert i én av tre eksperimentelle grupper, og trente ett eller begge bein ut ifra hvilken gruppe de var i ($n = 38$), eller en negativ kontrollgruppe (KON, $n = 5$) (figur 4). I forhold til tidligere studier der lav statistisk styrke ofte er et problem med for få forsøkspersoner per gruppe, reduserer vår studie litt av støyen i dataen da de også fungerer som sin egen kontroll. KON deltok ikke i treningen og ble bedt om å fortsette deres hverdagslige aktiviteter. Deltagerne i den eksperimentelle gruppen gjennomførte tre fullkropps-treninger i uka i 10 uker der tre ulike former for trening av underekstremiteten ble manipulert. Gruppe 1 gjennomførte 3 sett på det ene beinet mens det kontralaterale beinet

fungerte som kontroll (Gr 1, $n = 11$). Gruppe 2 (Gr 2, $n = 9$) gjennomførte 6 sett på det ene beinet mens det kontralaterale beinet fungerte som kontroll. Gruppe 3 (Gr 3, $n = 10$) gjennomførte 6 sett på det ene beinet og 3 sett på det andre beinet. Gruppe 4 var først ikke-trenende kontroller i løpet av sommeren 2019 før de gjennomførte studien (Gr 4, $n = 5$) unilateralt med 3 sett på begge bein. Baseline karakteristikker for hver gruppe er oppsummert i tabell 3. De tre første ukene av intervensjonen besto av tilvenningsøkter for å instruere deltagerne til å gjennomføre øvelsene med god teknikk, og for å kartlegge motstanden deres ved oppstart av treningen.

Tabell 3. Baseline karakteristikker av deltagerne.

	Gruppe 1 $n = 11$	Gruppe 2 $n = 9$	Gruppe 3 $n = 10$	Gruppe 4 $n = 5$	Kontroll $n = 8$
Alder	23.1 (3.3)	25 (3.9)	25.1 (4.1)	27.4 (4.2) ^a	26.1 (4.2) ^a
Vekt (kg)	77.5 (14.2)	81.3 (25.3)	75 (15.6)	79.2 (10.6)	76.6 (9.5)
Kropps fett (%)	34.9(8.9)	38.6(9.5)	36.7(8.4)	36.3(7.7)	33.1(8.1)
Total mager masse (kg)	48.2 (8.9)	46.5 (9.4)	45.1 (7.5)	48.6 (9.3)	49.1 (7.7)
Høyde (cm)	174.8 (7.5) ^b	173.3 (4.6)	170 (7.7)	172.8 (3.3)	177.7 (7.2) ^b

Verdiene er fremstilt som gjennomsnitt (standardavvik). ^a; signifikant forskjell i alder vs. gruppe 1. ^b; signifikant forskjell i høyde vs. gruppe 3.



Figur 4. Figuren viser gruppene og tidsforløpet for de ulike testene. Tidspunkter for biopsi, ultralyd og DXA er markert med rød pil. Blå pil viser tidspunkt for inntak av tungtvann. Gr; gruppe. 1RM; Èn repetisjon maksimum. MVC: Maksimal kontraksjonskraft. DXA: dual-energy X-ray absorpiometry.

3.2 Treningsprotokoll

Før alle treningsøktene varmet deltagerne opp i 5 minutter på ergometersykkel med lav intensitet, etterfulgt av 2 sett med 10 repetisjoner i beinpress på det/de beina som skulle trenes. Gruppe 3 og 4 varmet altså opp begge bein (unilateralt). Treningsprogrammet bestod av beinpress og kne-ekstensjon, i tillegg til benkpress og benktrekk for å få trent overkropp òg. Treningen av underekstremiteten ble gjennomført med enten 6, 3 eller 0 sett per øvelse avhengig av gruppetilhørighet. Intensiteten var satt til 10 repetisjoner per sett utført til utmattelse (10 RM). Dersom deltageren gjennomførte 10 repetisjonene i beinpress økte vi motstanden med 2,5kg, og reduserte den med tilsvarende vekt dersom de ikke klarte det. På kneekstensjon økte vi 1,25kg og reduserte med tilsvarende vekt dersom de ikke gjennomførte alle 10 repetisjonene. Øvelsene for overkropp besto av 3 sett på 10 repetisjoner med ett oppvarmingssett i forkant. For hvert vellykkede sett (10 repetisjoner) økte vi motstanden med 1kg, og reduserte med tilsvarende vekt dersom de ikke gjennomførte alle repetisjonene. Dette gjaldt for begge overkroppsovelser. Deltagerne ble instruert å gjennomføre hver repetisjon basert på en gitt repetisjonshastighet, og repetisjon maksimum (RM) ble oppnådd dersom vekten ikke kunne løftes på en kontrollert måte. Hvis noen av deltagerne gikk glipp av en

treningsøkt ble det avtalt ny treningstid med prosjekt-ansvarlig for å sikre at det ble totalt 9 tilvenningsøkter og 21 treningsøkter. Det var personlige trenere til stede på hver økt.

3.3 Innhenting av muskelvev og prosessering

Gruppene gjennomførte muskelbiopsier før og etter tilvenningsøktene (T1 og T2), underveis (T3) (etter ~12-13 økter) og etter intervensjonen (T4) (figur 4). Alle biopsiene ble tatt bilateralt fra *m. vastus lateralis* (VL) under sterile forhold med lokal bedøvelse (Lidokain 10 mg ml⁻¹, Mylan Hospital A/S, Oslo, Norway) minst 48 timer etter forrige treningsøkt og 12 timer faste over natt. Det ble tatt i bruk en godt etablert mikro-biopsi teknikk (Hayot et al., 2005) med bruk av en fjærbelastet biopsi-pistol (Bard Magnum, Bard Medical, New Jersey, USA), montert med en 12-g nål (Universal Plus, Mermaid Medical A/S, Stenløse, Denmark). Den første biopsien ble tatt 1/3 distalt til proksimalt på låret, med de etterfølgende biopsiene ~1 cm proksimalt fra forrige biopsi. Hver prøve ble øyeblikkelig dissekert for synlig bindevev og blod i salin-løsning på is (4°C; NaCl 0,9%, B. Braun) før den ble veid. Prøvene for immunohistokjemiske analyser ble overført til 4% formalin-løsning for fiksering i 24-72 timer før videre behandling. Deltagerne ble fortalt å la bandasjen være på minst 1 time etter biopsien, og plasteret i ca. 3 døgn. De ble bedt om å la stripsen være på til den løsnet av seg selv.

3.4 Styrketester

Én repetisjon maksimum (1RM) tester ble gjennomført i beinpress, kne-ekstensjon, benkpress og benketrekk minst 48 timer etter forrige treningsøkt. Deltagerne varmet først opp i 5 minutter på ergometersykkel, for å deretter gjennomføre like mange oppvarmingssett på alle øvelser som bestod av 4 sett med økende motstand ut ifra deres forrige 1RM (50%, 70%, 80%, 95-100% av forrige 1RM) og reduserte antall repetisjoner ved hvert sett (10, 6, 3, 1) For hvert vellykkede forsøk i beinpress økte vi motstanden med minimum 2,5kg, og 1,25kg i kneekstensjon helt til forsøkspersonen ikke lenger klarte å løfte vekten. Dersom deltageren ikke klarte deres forrige 1RM reduserte vi belastningen med tilsvarende vekt. Pauseperioden mellom hvert forsøk var satt til 2 minutter. Rekkefølgen på testene var lik ved alle testforsøkene.

3.5 Immunohistokjemi

De immunohistokjemiske metodene ble gjennomført av bioingeniører ved Innlandet Sykehus Trust HF Lillehammer. Prøvene av muskelvevet ble fiksert i formalin og lagt i parafin. Vevsprøvene ble kuttet i tverrsnitt (4µm) og inkubert ved 97 °C i 20 minutter for deretter å

legges i destillert vann for avkjøling. Visualisering av antistoffene ble gjort ved inkubering av passende sekundære antistoffer: goat-anti-mouse Alexa Fluor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For bestemmelse av fibertverrsnittareal, fibertype og antall myokjerner relatert til de ulike fibertypene ble det farget for antistoffer mot fibermembran (dystrofin; cat.no. PA121011, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) og myosin-tungkjede I (cat.no. M8421, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), med etterfølgende sekundære antistoffer som Alexa Fluor 594 og 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Til slutt ble muskelprøvene dekket med et dekkglass og limt sammen med EverBrite™ Hardset Mounting Medium og tilsatt DAPI (Biotium Inc., Fremont, CA, USA). Antistoffene ble fortyntet i 5% BSA.

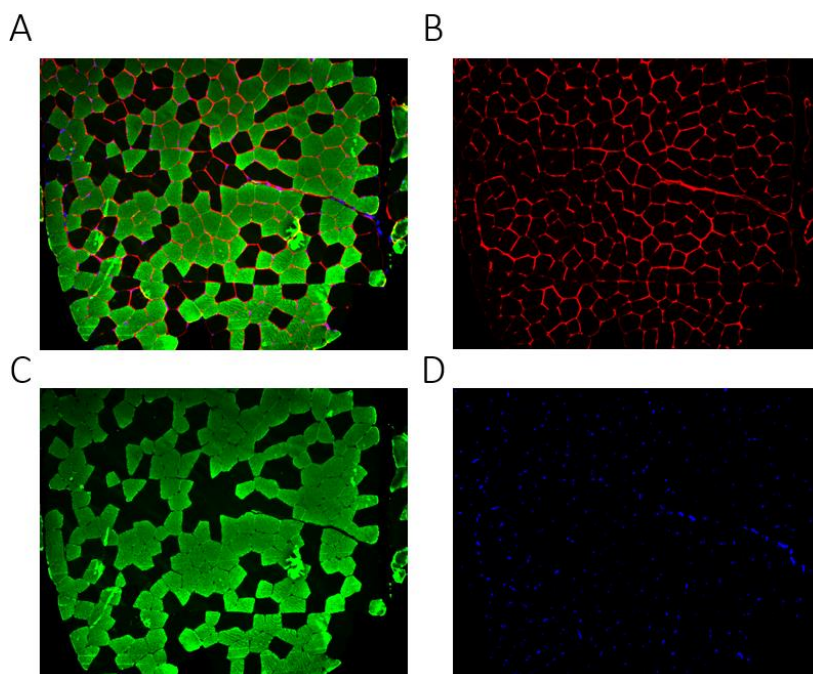
3.6 Muskeltykkelse og kroppssammensetning

Muskeltykkelsen av VL ble målt på begge bein ved bruk av ultralyd (HD11XE, Philips, Bothell, WA, USA) før (T1) og etter (T2) tilvenningsøktene, underveis (T3) og etter intervensjonen (T4). Deltagerne ble fortalt å unngå anstrengende fysisk aktivitet minst 48 timer før hver måling. Målingene ble gjort liggende. Det ble smørt gel på området ultralyden skulle tas på begge ben for å sikre god kontakt mellom apparatet og huden. Ved første måling ble 50% av femurlengden målt med målebånd og et merke ble satt over den prominente delen av VL i kontrahert tilstand. For å sikre samme nøyaktige plassering av sonden ved neste måling benyttet vi et gjennomsiktig ark for å merke av målepunktet og dets plassering i forhold til kjennetegn som for eksempel føflekker. Sonden ble plassert vinkelrett til vevet, men uten å komprimere huden. Det ble tatt tre bilder hver gang på hvert bein. For å måle muskeltykkelsen målte vi distansen mellom fasciene til VL. Alle målinger ble gjort av samme person. Målinger av muskeltykkelsen ble gjort ved bruk av et B-Mode ultralyd med en 50-mm lineær matrise transduser. Ferdige bilder ble analysert ved å bruke en imageJ plug-in som er beskrevet tidligere (Olivier R. Seynnes & Cronin, 2020). Kroppssammensetningen ble målt ved samme tidspunkt som biopsi og ultralyd ved bruk av dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (Lunar Prodigy, GE healthcare) med en standard protokoll. Deltagerne leverte urinprøve ved hver måling og kom fastende (12 timer).

3.7 Mikroskop

Muskelprøvene ble oppbevart i et kjøleskap som holdt 4°C uten tilgang til lys. Alle bildene ble tatt ved bruk av et kamera (Carl Zeiss AxioCam, München Germany) som var montert på en Axioskop 2 mot plus mikroskop (Carl Zeiss Light Microscopy, Göttingen, Germany) med

programvaren Axio Vision 4.3 (Carl Zeis Vision, München, Germany). Mikroskopet var plassert på et mørkt rom for å unngå forstyrrelser fra uønskede lyskilder. For kvantifisering av mengde type 1 og type 2 fibre og gjennomsnittlig TSA ble det tatt tre til fem x10 Z-stack bilder per muskelprøve avhengig av størrelsen på muskelprøven (figur 5). For å unngå samme muskelfibre ved påfølgende bilder av samme muskelprøve ble det tatt utgangspunkt i én bestemt muskelfiber som kun hadde halve fiberen i periferien av bildet til å bli med på hele neste bilde. For hvert Z-stack bilde ble prøvene tatt med lys for FITC, Alexa og DAPI-filtre som var tildelt en kanal hver ved bruk av det flerdimensjonale hjelpeverktøyet. Dette gjorde at vi fikk et sammenslått bilde med tre forskjellige lysstoffkanaler. Kameramodus var satt til ‘fast’ for alle kanalene. For å forsikre best mulig bildekvalitet benyttet vi fokuslinjen nederst i ‘direkte-vinduet’. Eksponering, lysstyrke og kontrast ble automatisk justert, mens indikatoren for overeksponering alltid var aktivert. Før hvert bilde ble kanalene som er nevnt ovenfor justert gjennom det flerdimensjonale hjelpeverktøyet ved å bruke alternativet ‘measure’. Ved noen tilfeller ga det automatiske målingsalternativet for dårlig bildekvalitet som følge av sterkt konsentrerte flekker med immunofluorescerende lys som var forårsaket av ujevnheter og skader på snittene. De gangene dette var tilfellet ble eksponeringen justert manuelt for å oppnå best mulig bildekvalitet.



Figur 5. Viser bilder tatt i mikroskop med de forskjellige kanalene. A: Dystrofin/ fibertype 1/ DAPI (samlet); B: Dystrofin; C: Fibertype 1; D: DAPI.

3.8 Analyse av data og statistikk

All deskriptiv data presenteres som gjennomsnitt (gjennomsnitt (standardavvik)). Effekten av de forskjellige treningsvolumene ble undersøkt med en linear mixed model (LMM) med endringer fra baseline som den avhengige variabelen og antall sett som den satte (fixed) effekten. Det var i gjennomsnitt 209 fibre for type 1 og 259 for type 2 per snitt ved analysene for immunohistokjemiske data. Resultatene oppgis i både absolutte og relative verdier, avhengig av modell, og sier noe om forskjellen mellom grupper og tidspunkter gitt den samme baseline-verdien. Relativ endring ble brukt som avhengig variabel ved myokjerner, hvor baseline ble gjennomsnittssentrert som den uavhengige variabelen sammen med tidspunkt og sett. Muskeltykkelse, MFA og MND ble analysert med absolutt endring som avhengig variabel, hvor baseline ble brukt som uavhengig variabel sammen med tidspunkt og sett. Estimerte verdier fra modellene er vist som gjennomsnitt med 95% konfidensintervall unntatt data for myokjerner, som ble logtransformert før statistiske beregninger og presenteres som tilbake-transformerte gjennomsnitt og konfidensintervall. Forenkling av modellen ble utført gjennom reduksjon av ulike parametere for tilfeldige effekter basert på sannsynlighetsratio-tester. De immunohistokjemiske analysene ble gjort i Cellprofiler™ (Jones et al., 2008), med modifiserte metoder (se vedlegg). Siden vi ønsker å sammenligne effekten av ulike treningsvolum, ble gruppene heller fordelt ut ifra sett (6 sett (6-sett); $n = 18$, 3 sett (3-sett); $n = 29$, KON; $n = 34$). Det ble ikke tatt biopsi ved T3 hos gruppen som fungerte som kontroll i løpet av sommeren 2019, ettersom vi regnet med at det ikke ville være en endring, og for å begrense antall biopsier. Når det gjelder immunohistokjemiske analyser var kvaliteten på noen av bildene for dårlig, og ble derfor ekskludert. Antall analyser per tidspunkt er oppsummert i tabell 4. Statistiske tester, tabeller og figurer ble gjort i R (R Core Team, 2018). Nivået for statistisk signifikans var satt til $\alpha = 0,05$.

Tabell 4. Antall personer analysert ved hvert tidspunkt.

A		T1	T2	T3	T4
	<i>Type 1</i>				
	3-sett	25	22	25	23
	6-sett	18	17	16	18
	KON	27	27	20	26
	<i>Type 2</i>				
	3-sett	25	21	25	22
	6-sett	18	17	16	18
	KON	27	27	20	25
B	<i>Ultralyd</i>				
	3-sett	29	29	29	29
	6-sett	18	18	16	18
	KON	33	33	31	33

A: Antall personer analysert ved de immunohistokjemiske analysene for de ulike fibertypene. B: Antall personer analysert ved ultralyd.

4. Resultater

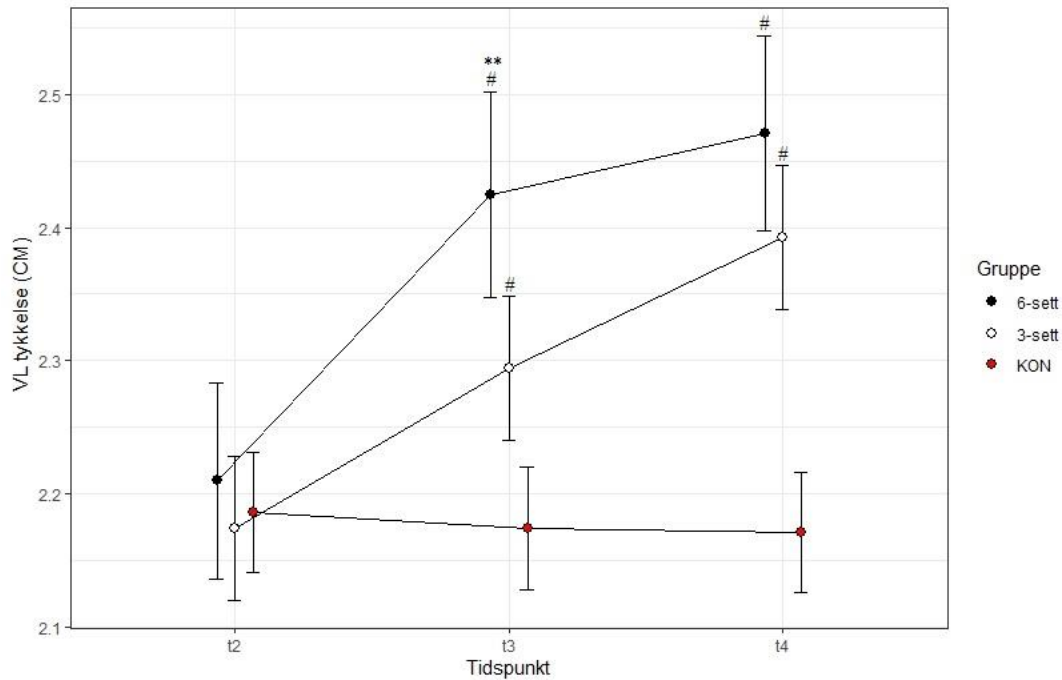
4.1 Treningsvolum

Det gjennomsnittlige treningsvolumet per økt ved tilvenning for 6-sett var 2095.0kg (226), og 2489.4kg (249) for 3-sett. 3-sett hadde signifikant høyere treningsvolum per økt enn 6-sett (394.9kg (254.3, 535.5)). Det gjennomsnittlige treningsvolumet per økt ved treningsøktene for 6-sett var 8684.0kg (807), og 4994.0kg (333) for 3-sett. 6-sett hadde signifikant høyere treningsvolum per økt enn 3-sett (3689.7kg (3447.3, 3932.2)).

4.2 Muskeltykkelse

Ved baseline hadde menn 0.09cm tykkere *m. vastus lateralis* enn kvinner (0.01, 0.16). Begge settene økte signifikant i muskeltykkelse sammenlignet med KON som følge av treningsintervensjonen (T4, 3-sett: 0.22cm (0.17, 0.27); 6-sett: 0.30cm (0.22, 0.37)). Det ble observert signifikant forskjell i muskeltykkelse mellom volumene ved T3, der 6-sett hadde

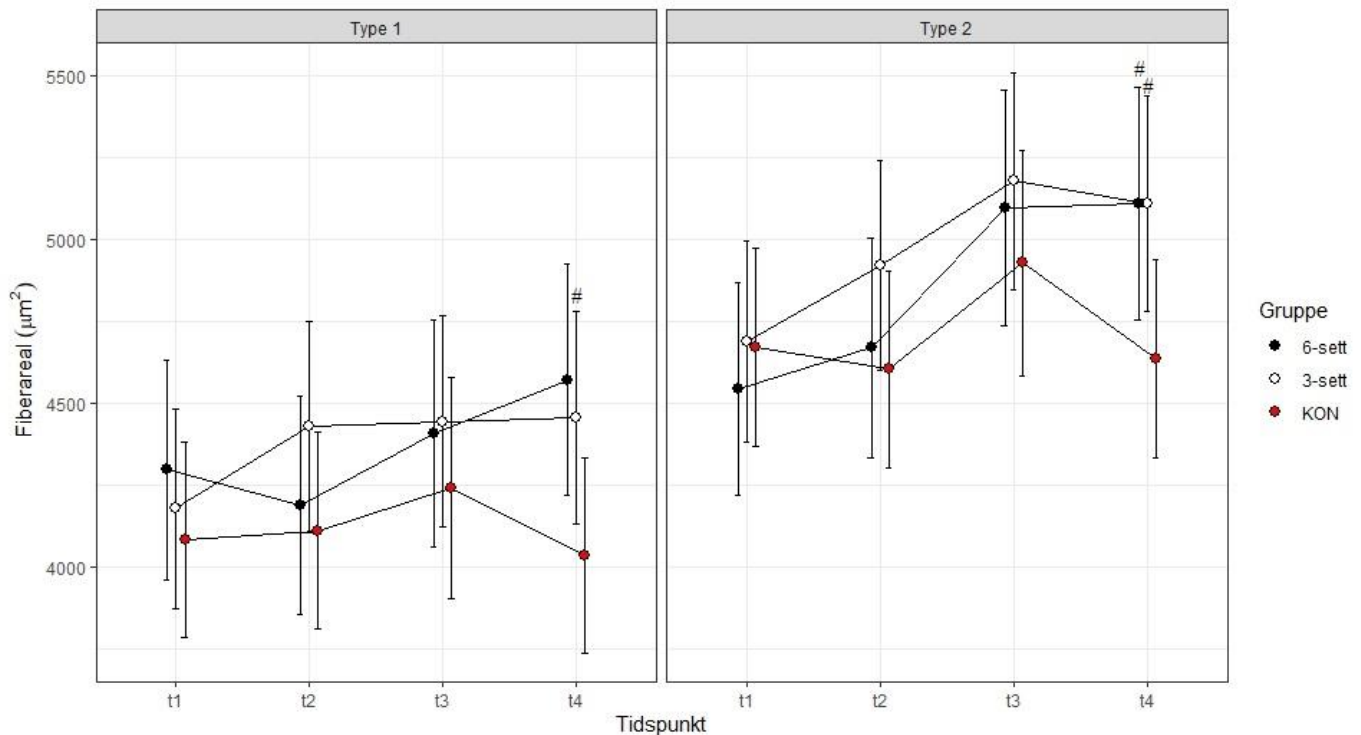
signifikant større økning enn 3-sett (0.13cm (0.05, 0.21)), men det var ingen forskjell etter intervansjonen (0.08cm (-0.002, 0.16)) (Figur 6).



Figur 6. Viser endring i muskeltykkelse(cm) i VL i løpet av treningsintervansjonen. # signifikant vs. KON, ** signifikant forskjell mellom treningsvolum.

4.3 MFA

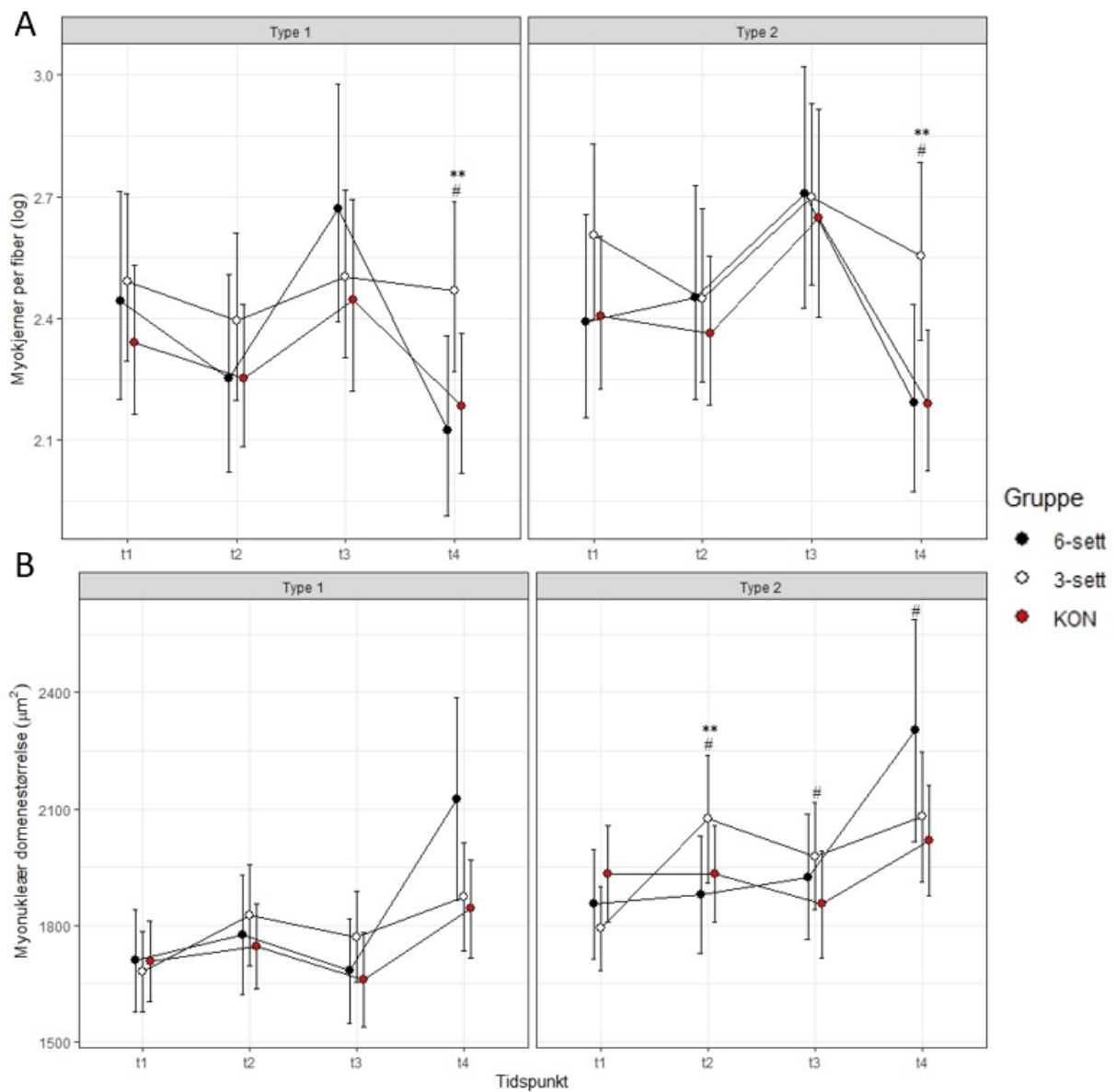
Ved baseline hadde menn $949.5\mu\text{m}^2$ signifikant større MFA enn kvinner i type 2 fibre (437.9, 1461.1). Fibertypefordelingen var lik mellom volumene gjennom hele treningsintervansjonen. 10 uker styrketrening førte til signifikant økning i begge fibertyper for 3-sett (type 1: $326.9\mu\text{m}^2$ (12.7, 641.0), type 2: $457.0\mu\text{m}^2$ (141.3, 772.7)), og i type 2 fibre for 6-sett sammenlignet med KON (type 1: $323.0\mu\text{m}^2$ (-51.7, 697.8), type 2: $600.4\mu\text{m}^2$ (235.3, 965.5)). Det var ingen signifikant forskjell i type 1 eller type 2 fibre mellom volumene i løpet av treningsintervansjonen (figur 7).



Figur 7. Viser gjennomsnittlig økning i fiberareal per muskelfiber for type 1 og type 2 fibre. #: signifikant forskjell vs. KON.

4.4 Myokjerner og MND

Ved baseline hadde menn 17.5% flere myokjerner enn kvinner (6.9, 29.2). 10 uker styrketrening førte til signifikant økning i antall myokjerner i begge fibertyper hos 3-sett sammenlignet med KON (type 1: 13.1% (2.8, 24.3); type 2: 16.7% (6.0, 28.5), men ikke hos 6-sett (type 1: -3% (-13.0, 9.8); type 2: 0.1% (-11.0, 12.6). Det var en gruppe \times tid forskjell mellom settene, der 3-sett hadde signifikant flere myokjerner enn 6-sett i begge fibertyper ved T4 (type 1: 16.3% (3.1, 33.1); type 2: 16.6% (3.3, 31.5) (figur 8A). Treningsintervensjonen førte ikke til signifikante endringer i MND i noen av fibertypene, definert som MFA per myokjerne, hos 3-sett sammenlignet med KON (type 1: $-4.0\mu\text{m}^2$ (-172.8, 164.8); type 2: $88.2\mu\text{m}^2$ (-98.6, 275.1). 6-sett hadde signifikant større MND i type 2 fibre, men ikke type 1 sammenlignet med KON (type 1: $361.1\mu\text{m}^2$ (26.2, 696.1); type 2: $280,4\mu\text{m}^2$ (-21.1, 581.9). Det var ingen signifikant gruppe \times tid forskjell i MND mellom volumene i noen av fibertypene etter treningsintervensjonen (type 1: $223.1\mu\text{m}^2$ (-83.5, 529.7); type 2: $159.9\mu\text{m}^2$ (-179.7, 499.4) (figur 8B).



Figur 8. A: Gjennomsnittlig antall myokjerner per muskelfiber for type 1 og type 2 fibre. B: MFA per myokjerne for type 1 og type 2 fibre. #; signifikant forskjell vs. KON. **; signifikant forskjell mellom treningsvolum.

5. Diskusjon

Hovedmålet med denne studien var å undersøke effekten av moderat (18 sett/uke) vs. høyt (36 sett/uke) ukentlig treningsvolum over en 10 ukers treningsperiode på muskelvekst og morfologiske endringer i VL hos utrente individer. Resultatene fra denne studien viser at det ikke er en forskjell i muskelvekst målt som muskeltykkelse mellom de ulike treningsvolumene i løpet av en 10 ukers treningsperiode. Økningen i MFA ble ikke støttet av myonukleær tilvekst i hverken type 1 eller type 2 fibre hos noen av settene som følge av treningsintervensjonen.

5.1 Muskeltykkelse og MFA

Økningen i muskeltykkelse som ble observert hos 3-sett samsvarer med tidligere studier som har rapportert om en forventet økning på ~9-11% etter 8-12 uker styrketrening hos denne populasjonen, mens 6-sett hadde en større økning enn forventet (3-sett: 11.9% (6.17)), 6-sett: 16.2% (8.92)) (DeFreitas, Beck, Stock, Dillon & Kasishke, 2011; Wakahara, Ema, Miyamoto & Kawakami, 2015). Selv om forskjellen mellom settene ikke var signifikant ved etter intervensjonen (4.3%), samsvarer det med tidligere meta-analyser og artikler som konkluderer med at et høyere treningsvolum, i form av flere sett per muskelgruppe, fører til større økning i muskelmasse (J. Krieger, 2010; J. W. Krieger, 2010; B. Schoenfeld et al., 2016; Wolfe, LeMura & Cole, 2004).

Til tross for få studier som har sammenlignet moderat vs. høyt treningsvolum, har resultater vist større hypertrofi som følge av et høyere treningsvolum. I en studie av B. J. Schoenfeld et al. (2019) fant de signifikant større muskelhypertrofi i VL av 45 vs. 27 sett/uke (5.8%), og en signifikant økning ved 30 vs. 18 sett/uke for albueekstensor og albuefleksor i en studie av Radaelli et al. (2015) (data ikke vist). Disse resultatene samsvarer ikke med vår studie som viser at 18 sett i uka lik effekt som 36 sett på muskeltykkelse. Den signifikante forskjellen mellom settene ved T3 (6.7%) skyldes nødvendigvis ikke muskelvekst, men økt svelling som et resultat av muskelødeleggelse for 6-sett, og at muskulaturen adapterte til treningsvolumet og svellingen forsvant. Etter det jeg vet har kun én studie undersøkt dette (Damas et al., 2016). I hans studie ble det observert 17.6% økning i muskeltykkelse allerede etter 3 uker, men mener dette skyldes ødem-indusert muskelsvelling som et resultat av muskelødeleggelse, og ikke muskelvekst. Det er tenkelig at dette var tilfelle for 6-sett ved T3 med tanke på det høye treningsvolumet, til tross for at økningen ble sett etter ~7 uker (4 uker med de respektive volumene). I Damas et al. (2016) sin studie trente deltagerne 12 sett i uka i 10

uker, og er den samme mengden treningsvolum vi hadde ved tilvenningsøktene for alle deltagerne. Vi observerte for øvrig 3.16% (6.6) økning i muskeltykkelse for 6-sett og 1.63% (6.4) for 3-sett ved T2, og er i tillegg lavere enn det tidligere studier har sett etter en liknende treningsperiode (~4.5-6%) (O. R. Seynnes, de Boer & Narici, 2007). I studien til O. R. Seynnes et al. (2007) hadde de også høyintensiv styrketrening, men forskjellen fra vår og deres var antall forsøkspersoner ($n = 7$), målemetode (MRI) og den forskjellige treningsmetoden. I motsetning til ultralyd som kun måles i én dimensjon, måles MRI i to dimensjoner, og kan derfor gi et større resultat. Dersom økningen ved T3 faktisk var muskeltykkelse kan det tenkes at deltagerne ikke fikk nok restitusjon mellom øktene som følge av belastningen i løpet av treningsperioden, og derfor responderte dårligere mens treningen fortsatte etter dette tidspunktet. I tillegg ser det ut som at 6-sett hadde nådd et plåta dersom studien hadde hatt lenger varighet, og at 3-sett hadde endt opp med større muskelhypertrofi.

Det ble observert signifikant økning i MFA i begge fibertyper hos 3-sett (type 1: 11.1% (18.8); type 2: 12.2% (11.1)) og kun i type 2 fibre hos 6-sett (type 1: 7.0% (9.49); type 2: 15.2% (12.9)), og samsvarer med tidligere studier som viser at type 2 fibre har det største vekstpotensialet ved tung styrketrening (Bellamy et al., 2014; Damas et al., 2018; Nederveen et al., 2016; Snijders et al., 2016). Det ser ut til at type 1 fibre heller oppnår større vekst ved lavere belastning (< 50% av 1RM), så lenge det er gjort til utmattelse. En nylig studie av Bjornsen et al. (2019) fant en større økning av type 1 fibre (19%) enn type 2 (11%) som følge av 14 treningsøkter med okklusjons-trening hvor de trente med 20% av 1RM til utmattelse. Dette støttes av tidligere studier som også har funnet større økning i type 1 fibre ved lavere belastning (Mitchell et al., 2012; Netreba et al., 2013). I vår studie økte kun 3-sett signifikant i type 1 fibre som følge av treningsintervensjonen, men det var ikke forskjell mellom settene.

5.2 Myokjerner og MND

Et vanlig utfall som følge av styrketrening er økning i MFA. Ifølge teorien om myonukleær domenestørrelse er kapasiteten til de eksisterende myokjernene nok til å støtte den tidlige muskelveksten ved påbegynt styrketrening, men krever flere myokjerner ved ytterligere vekst (Snijders et al., 2016). Det er ikke konsensus i litteraturen angående virkningen av styrketreningsindusert hypertrofi når det kommer til endringer i myonukleær domenestørrelse og myonukleær akkresjon. Noen studier har vist at muskelvekst i betydelig grad støttes av økt antall myokjerner (Kadi & Thornell, 2000; Leenders et al., 2013; Olsen et al., 2006), mens andre ikke har klart å oppdage myonukleær akkresjon som følge av styrketrening (Herman-

Montemayor et al., 2015; Kadi et al., 2004; Verdijk et al., 2009). I vår studie var ikke hypertrofien av muskelfibrene stor nok til å observere økning i myonukleært innhold hos noen av settene. Dette stemmer overens med tidligere studier med lik varighet (Damas et al., 2018; Mackey, Andersen, Frandsen & Sjøgaard, 2011), og indikerer derfor at de eksisterende myokjernene hadde kapasitet til å ta opp den ytterligere økningen av det cytoplasmatiske området.

Styrketreningen førte imidlertid til en økning i MND hos begge settene i begge fibertypene. I motsetning til vår så de i en studie av Petrella et al. (2006) signifikant økning av antall myokjerner hos unge menn ved 27 sett i uka for VL. Forskjellen fra vår og deres studie var varigheten på studien (16 uker). Antall sett til utmattelse kan derfor ha større betydning enn treningsvarighet, og støttes av tidligere studier der det er observert signifikant økning i antall myokjerner ved totalt 240-432 sett i løpet av treningsintervensjonen (Bellamy et al., 2014; Leenders et al., 2013; Olsen et al., 2006; Snijders et al., 2016). Derfor kan det tenkes at vi ville observert en økning i myokjerner hos 6-sett ettersom de gjennomførte 288 sett i løpet av studien. Det hadde vært interessant å undersøke om det var en forsinket myonukleær akkresjon hos dem, da de i studien til Bjørnsen et al. (2019) observert en videre økning i antall myokjerner 10 dager etter endt treningsintervensjon. Det kan tenkes at 6-sett muligens hadde en «funksjonell overtrening» som følge av treningsvolumet, og at det ville vært en økning ved et senere tidspunkt. Til tross for variasjon i målingene er det mulig at den observert myonukleære tilveksten ved t3 heller var en respons til regenerering av ødem-indusert muskelødeleggelse som kan ha oppstått av treningsvolumet (Crameri et al., 2007; Mackey et al., 2016).

Den fraværende økningen av myokjerner samsvarer dog med tidligere studier som har foreslått ~26% hypertrofi av muskelfibrene som nødvendig for inkorporering av nye myokjerner (Kadi et al., 2004), og en foreslått minimum hypertrofi på 15% (Petrella et al., 2006). Disse forslagene utfordres i en meta-analyse av Conceicao et al. (2018), hvor de fant at myonukleær tilvekst forekom selv under 10%, men at en signifikant økning først oppstår ved ~22% hypertrofi. De hevder at grunnen til å oppdage små forandringer ved moderat hypertrofi kan skyldes mangelen på følsomheten i de immunohistokjemiske prosedyrene, som kan være tilfelle i vår studie ettersom begge settene økte mer enn 10% i type 2 fibre, mens 3-sett økte mer enn 10% i type 1. Studier er basert på tverrsnitt fra muskelbiopsier for å måle fiberstørrelse, myonukleært innhold og domenestørrelse. Det er også viktig å ta hensyn til at endringer i muskelarkitekturen ikke oppstår i kun to dimensjoner. Teorien om MND er at hver

myokjerne kontrollerer et bestemt område cytoplasma i muskelfiberen, og består av tre dimensjoner, noe som ikke er redegjort for i de histokjemiske analysene (Conceicao et al., 2018).

5.3 Metodediskusjon

Det ble observert signifikant forskjell i alder og høyde mellom noen av gruppene ved baseline, men forskjellene var såpass små og har sannsynligvis heller ikke en påvirkning for utfallet. Flere av deltagerne i KON spilte innebandy underveis i studien, og trente i tillegg dette to til tre ganger i uka. Dette gjorde de også før de deltok, og representerer derfor ingen endring i deres aktivitetsnivå i løpet av perioden som kontroll. Flere av snittene for mikroskopet var av generelt lav kvalitet og hadde dårlig DAPI-innfarging, som kan ha påvirket utfallet (vil innfarges på nytt ved mulig anledning). Dette gjør at MND muligens er større enn hva den opprinnelig er siden CellprofilerTM ikke klarer å detektere alle myokjernene i analysen. Det er heller ikke kjent om myokjernene er homogent distribuert over hele lengden på muskelfiberen (Conceicao et al., 2018), så det kan tenkes at en økning i antall myokjerner skjules av hypertrofien da veksten også skjer i lengde på muskulaturen, og ikke kun der biopsien ble tatt. Studier bruker vanligvis frysesnitt som analysemetode, som i motsetning til parafinsnitt kan inneholde vann. En følge av styrketrening er muskelsvelling, som kan føre til mer vann i muskulaturen. Om væskeinnholdet endres med trening, men påvirkes forskjellig av analysemetodene kan det påvirke utfallet.

5.4 Praktiske anbefalinger

Selv om et høyere treningsvolum førte til litt større vekst, var forskjellen ubetydelig, og det forekom i tillegg knesmerter hos flere av deltagerne som følge av belastningen. Det er viktig å gjøre en vurdering av om verdien av den minimale økningen vi ser hos 6-sett er tilstrekkelig til å forsvare et dobbelt så høyt treningsvolum. Vi vet heller ikke om de siste settene i en øvelse var unødvendig for videre muskelvekst for 6-sett. Det kan tenkes at denne gruppen nådde det maksimale vekstpotensialet innen hver økt etter 4 eller 5 sett per øvelse. Personlig ville jeg ikke anbefalt så stor økning fra tilvenning til respektivt volum som 6-sett for denne populasjonen da det i tillegg til å være tidkrevende kan føre til skader. Til tross for at vår studie hadde progresjon i form av økt mostand (relativ intensitet), vil jeg for den generelle populasjonen heller anbefale en gradvis økning i treningsvolum i form av sett.

5.5 Konklusjon

Resultatene fra denne studien viser at det ikke er forskjell i hypertrofi mellom moderat og høyt treningsvolum som følge av en 10 ukers treningsperiode for utrente individer. Den observerte hypertrofien ble ikke støttet av myonukleær akkresjon hos noen av settene.

Referanseliste

- Abe, T., DeHoyos, D. V., Pollock, M. L. & Garzarella, L. (2000). Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. *Eur J Appl Physiol*, 81(3), 174-180. <https://doi.org/10.1007/s004210050027>
- Adams, G. R., Hather, B. M., Baldwin, K. M. & Dudley, G. A. (1993). Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol (1985)*, 74(2), 911-915. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.2.911>
- Allen, D. L., Roy, R. R. & Edgerton, V. R. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*, 22(10), 1350-1360.
- Amirthalingam, T., Mavros, Y., Wilson, G., Clarke, J., Mitchell, L. & A. Hackett, D. (2016). *Effects of a Modified German Volume Training Program on Muscular Hypertrophy and Strength*.
- Andersen, J. L. & Aagaard, P. (2000). Myosin heavy chain IIX overshoot in human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 23(7), 1095-1104. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200007\)23:7<1095::aid-mus13>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200007)23:7<1095::aid-mus13>3.0.co;2-o)
- Andersen, J. L. & Aagaard, P. (2010). Effects of strength training on muscle fiber types and size; consequences for athletes training for high-intensity sport. *Scand J Med Sci Sports*, 20 Suppl 2, 32-38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01196.x>
- Andersen, J. L., Klitgaard, H. & Saltin, B. (1994). Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiol Scand*, 151(2), 135-142. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1994.tb09730.x>
- Barcelos, C., Damas, F., Nobrega, S. R., Ugrinowitsch, C., Lixandrao, M. E., Marcelino Eder Dos Santos, L. & Libardi, C. A. (2018). High-frequency resistance training does not promote greater muscular adaptations compared to low frequencies in young untrained men. *Eur J Sport Sci*, 18(8), 1077-1082. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1476590>
- Bellamy, L. M., Joannis, S., Grubb, A., Mitchell, C. J., McKay, B. R., Phillips, S. M., ... Parise, G. (2014). The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PLoS One*, 9(10), e109739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109739>
- Bird, S., Tarpinning, K. & Marino, F. (2005). Designing resistance training programmes to enhance muscular fitness: A review of the acute programme variables. *Sports Medicine*, 35, 841-851. <https://doi.org/10.2165/00007256-200535100-00002>
- Bjornsen, T., Wernbom, M., Lovstad, A., Paulsen, G., D'Souza, R. F., Cameron-Smith, D., ... Raastad, T. (2019). Delayed myonuclear addition, myofiber hypertrophy, and increases in strength with high-frequency low-load blood flow restricted training to volitional failure. *J Appl Physiol (1985)*, 126(3), 578-592. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00397.2018>
- Bottaro, M., Veloso, J., Wagner, D. & Gentil, P. (2011). Resistance training for strength and muscle thickness: Effect of number of sets and muscle group trained. *Science & Sports*, 26(5), 259-264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scispo.2010.09.009>

- Brigatto, F. A., Braz, T. V., Zanini, T., Germano, M. D., Aoki, M. S., Schoenfeld, B. J., ... Lopes, C. R. (2019). Effect of Resistance Training Frequency on Neuromuscular Performance and Muscle Morphology After 8 Weeks in Trained Men. *J Strength Cond Res*, 33(8), 2104-2116. <https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000002563>
- Brooke, M. H. & Kaiser, K. K. (1970). Three "myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem*, 18(9), 670-672. <https://doi.org/10.1177/18.9.670>
- Bruusgaard, J. C., Johansen, I. B., Egner, I. M., Rana, Z. A. & Gundersen, K. (2010). Myonuclei acquired by overload exercise precede hypertrophy and are not lost on detraining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(34), 15111-15116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913935107>
- Bruusgaard, J. C., Liestol, K., Ekmark, M., Kollstad, K. & Gundersen, K. (2003). Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J Physiol*, 551(Pt 2), 467-478. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045328>
- Burd, N. A., Andrews, R. J., West, D. W., Little, J. P., Cochran, A. J., Hector, A. J., ... Phillips, S. M. (2012). Muscle time under tension during resistance exercise stimulates differential muscle protein sub-fractional synthetic responses in men. *J Physiol*, 590(2), 351-362. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.221200>
- Burd, N. A., Holwerda, A. M., Selby, K. C., West, D. W., Staples, A. W., Cain, N. E., ... Phillips, S. M. (2010). Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol*, 588(Pt 16), 3119-3130. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192856>
- Campos, G. E., Luecke, T. J., Wendeln, H. K., Toma, K., Hagerman, F. C., Murray, T. F., ... Staron, R. S. (2002). Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol*, 88(1-2), 50-60. <https://doi.org/10.1007/s00421-002-0681-6>
- Carpinelli, R. & Otto, R. (1998). Strength Training: Single Versus Multiple Sets. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 26, 73-84. <https://doi.org/10.2165/00007256-199927060-00006>
- Chilibeck, P. D., Calder, A. W., Sale, D. G. & Webber, C. E. (1998). A comparison of strength and muscle mass increases during resistance training in young women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 77(1-2), 170-175. <https://doi.org/10.1007/s004210050316>
- Colquhoun, R. J., Gai, C. M., Aguilar, D., Bove, D., Dolan, J., Vargas, A., ... Campbell, B. I. (2018). Training Volume, Not Frequency, Indicative of Maximal Strength Adaptations to Resistance Training. *J Strength Cond Res*, 32(5), 1207-1213. <https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000002414>
- Conceicao, M. S., Vechin, F. C., Lixandrao, M., Damas, F., Libardi, C. A., Tricoli, V., ... Ugrinowitsch, C. (2018). Muscle Fiber Hypertrophy and Myonuclei Addition: A Systematic

- Review and Meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 50(7), 1385-1393.
<https://doi.org/10.1249/mss.0000000000001593>
- Correa, C. S., Teixeira, B. C., Cobos, R. C., Macedo, R. C., Kruger, R. L., Carteri, R. B., ... Reischak-Oliveira, Á. (2015). High-volume resistance training reduces postprandial lipaemia in postmenopausal women. *J Sports Sci*, 33(18), 1890-1901.
<https://doi.org/10.1080/02640414.2015.1017732>
- Cramer, R. M., Aagaard, P., Qvortrup, K., Langberg, H., Olesen, J. & Kjaer, M. (2007). Myofibre damage in human skeletal muscle: effects of electrical stimulation versus voluntary contraction. *J Physiol*, 583(Pt 1), 365-380. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128827>
- Damas, F., Barcelos, C., Nobrega, S. R., Ugrinowitsch, C., Lixandrao, M. E., Santos, L., ... Libardi, C. A. (2019). Individual Muscle Hypertrophy and Strength Responses to High vs. Low Resistance Training Frequencies. *J Strength Cond Res*, 33(4), 897-901.
<https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000002864>
- Damas, F., Libardi, C. A., Ugrinowitsch, C., Vechin, F. C., Lixandrao, M. E., Snijders, T., ... Phillips, S. M. (2018). Early- and later-phases satellite cell responses and myonuclear content with resistance training in young men. *PLoS One*, 13(1), e0191039.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191039>
- Damas, F., Phillips, S. M., Lixandrao, M. E., Vechin, F. C., Libardi, C. A., Roschel, H., ... Ugrinowitsch, C. (2016). Early resistance training-induced increases in muscle cross-sectional area are concomitant with edema-induced muscle swelling. *Eur J Appl Physiol*, 116(1), 49-56.
<https://doi.org/10.1007/s00421-015-3243-4>
- DeFreitas, J. M., Beck, T. W., Stock, M. S., Dillon, M. A. & Kasishke, P. R., 2nd. (2011). An examination of the time course of training-induced skeletal muscle hypertrophy. *Eur J Appl Physiol*, 111(11), 2785-2790. <https://doi.org/10.1007/s00421-011-1905-4>
- Egner, I. M., Bruusgaard, J. C., Eftestol, E. & Gundersen, K. (2013). A cellular memory mechanism aids overload hypertrophy in muscle long after an episodic exposure to anabolic steroids. *J Physiol*, 591(24), 6221-6230. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264457>
- Farup, J., Rahbek, S. K., Riis, S., Vendelbo, M. H., Paoli, F. & Vissing, K. (2014). Influence of exercise contraction mode and protein supplementation on human skeletal muscle satellite cell content and muscle fiber growth. *J Appl Physiol (1985)*, 117(8), 898-909.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00261.2014>
- Folland, J. P. & Williams, A. G. (2007). The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. *Sports Med*, 37(2), 145-168.
<https://doi.org/10.2165/00007256-200737020-00004>
- Frontera, W. R. & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, 96(3), 183-195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>

- Fry, A. C. (2004). The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Med*, 34(10), 663-679. <https://doi.org/10.2165/00007256-200434100-00004>
- Fry, C. S., Noehren, B., Mula, J., Ubele, M. F., Westgate, P. M., Kern, P. A. & Peterson, C. A. (2014). Fibre type-specific satellite cell response to aerobic training in sedentary adults. *J Physiol*, 592(12), 2625-2635. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.271288>
- Grgic, J., Homolak, J., Mikulic, P., Botella, J. & Schoenfeld, B. J. (2018). Inducing hypertrophic effects of type I skeletal muscle fibers: A hypothetical role of time under load in resistance training aimed at muscular hypertrophy. *Med Hypotheses*, 112, 40-42. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.01.012>
- Hammarstrom, D. (2019). Benefits of higher resistance-training volume depends on ribosome biogenesis.
- Hayot, M., Michaud, A., Koechlin, C., Caron, M. A., Leblanc, P., Prefaut, C. & Maltais, F. (2005). Skeletal muscle microbiopsy: a validation study of a minimally invasive technique. *Eur Respir J*, 25(3), 431-440. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00053404>
- Herman-Montemayor, J. R., Hikida, R. S. & Staron, R. S. (2015). Early-Phase Satellite Cell and Myonuclear Domain Adaptations to Slow-Speed vs. Traditional Resistance Training Programs. *J Strength Cond Res*, 29(11), 3105-3114. <https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000000925>
- Ibanez, J., Izquierdo, M., Arguelles, I., Forga, L., Larrion, J. L., Garcia-Unciti, M., ... Gorostiaga, E. M. (2005). Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(3), 662-667. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.3.662>
- Jones, T. R., Kang, I. H., Wheeler, D. B., Lindquist, R. A., Papallo, A., Sabatini, D. M., ... Carpenter, A. E. (2008). CellProfiler Analyst: data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 482. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-482>
- Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., Lexell, J., Andersen, J. L., Schjerling, P., ... Kjaer, M. (2005). The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflugers Arch*, 451(2), 319-327. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1406-6>
- Kadi, F., Schjerling, P., Andersen, L. L., Charifi, N., Madsen, J. L., Christensen, L. R. & Andersen, J. L. (2004). The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol*, 558(Pt 3), 1005-1012. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065904>
- Kadi, F. & Thornell, L. E. (2000). Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochemistry & Cell Biology*, 113(2), 99-103. <https://doi.org/10.1007/s004180050012>

- Kraemer, W. J., Patton, J. F., Gordon, S. E., Harman, E. A., Deschenes, M. R., Reynolds, K., ... Dziados, J. E. (1995). Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. *J Appl Physiol* (1985), 78(3), 976-989. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.78.3.976>
- Kraemer, W. J. & Ratamess, N. A. (2004). Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc*, 36(4), 674-688.
- Krieger, J. (2010). Determining Appropriate Set Volume for Resistance Exercise. *Strength & Conditioning Journal*, 32(3), 30-32. <https://doi.org/10.1519/SSC.0b013e3181df16f4>
- Krieger, J. W. (2010). Single vs. multiple sets of resistance exercise for muscle hypertrophy: a meta-analysis. *J Strength Cond Res*, 24(4), 1150-1159. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d4d436>
- Lee, H., Kim, K., Kim, B., Shin, J., Rajan, S., Wu, J., ... Park, J. Y. (2018). A cellular mechanism of muscle memory facilitates mitochondrial remodelling following resistance training. *J Physiol*, 596(18), 4413-4426. <https://doi.org/10.1113/jp275308>
- Leenders, M., Verdijk, L. B., van der Hoeven, L., van Kranenburg, J., Nilwik, R. & van Loon, L. J. (2013). Elderly men and women benefit equally from prolonged resistance-type exercise training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(7), 769-779. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls241>
- Loenneke, J. P., Dankel, S. J., Bell, Z. W., Buckner, S. L., Mattocks, K. T., Jessee, M. B. & Abe, T. (2019). Is muscle growth a mechanism for increasing strength? *Med Hypotheses*, 125, 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.02.030>
- Lopez, P., Pinto, R. S., Radaelli, R., Rech, A., Grazioli, R., Izquierdo, M. & Cadore, E. L. (2018). Benefits of resistance training in physically frail elderly: a systematic review. *Aging Clin Exp Res*, 30(8), 889-899. <https://doi.org/10.1007/s40520-017-0863-z>
- MacInnis, M. J., McGlory, C., Gibala, M. J. & Phillips, S. M. (2017). Investigating human skeletal muscle physiology with unilateral exercise models: when one limb is more powerful than two. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42(6), 563-570. <https://doi.org/10.1139/apnm-2016-0645>
- Mackey, A. L., Andersen, L. L., Frandsen, U. & Sjøgaard, G. (2011). Strength training increases the size of the satellite cell pool in type I and II fibres of chronically painful trapezius muscle in females. *J Physiol*, 589(Pt 22), 5503-5515. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.217885>
- Mackey, A. L., Rasmussen, L. K., Kadi, F., Schjerling, P., Helmark, I. C., Ponsot, E., ... Kjaer, M. (2016). Activation of satellite cells and the regeneration of human skeletal muscle are expedited by ingestion of nonsteroidal anti-inflammatory medication. *Faseb j*, 30(6), 2266-2281. <https://doi.org/10.1096/fj.201500198R>
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9, 493-495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>

- McBride, J. M., Blaak, J. B. & Triplett-McBride, T. (2003). Effect of resistance exercise volume and complexity on EMG, strength, and regional body composition. *Eur J Appl Physiol*, 90(5-6), 626-632. <https://doi.org/10.1007/s00421-003-0930-3>
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., West, D. W., Burd, N. A., Breen, L., Baker, S. K. & Phillips, S. M. (2012). Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. *J Appl Physiol (1985)*, 113(1), 71-77. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00307.2012>
- Moss, F. P. & Leblond, C. P. (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec*, 170(4), 421-435. <https://doi.org/10.1002/ar.1091700405>
- Murach, K. A., Englund, D. A., Dupont-Versteegden, E. E., McCarthy, J. J. & Peterson, C. A. (2018). Myonuclear Domain Flexibility Challenges Rigid Assumptions on Satellite Cell Contribution to Skeletal Muscle Fiber Hypertrophy. *Front Physiol*, 9, 635-635. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00635>
- Nederveen, J., Snijders, T., Joanisse, S., G Wavell, C., Mitchell, C., M. Johnston, L., ... Parise, G. (2016). Altered muscle satellite cell activation following 16 weeks of resistance training in young men. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312, ajpregu.00221.02016. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00221.2016>
- Netreba, A., Popov, D., Bravyi, Y., Lyubaeva, E., Terada, M., Ohira, T., ... Ohira, Y. (2013). Responses of knee extensor muscles to leg press training of various types in human. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova / Rossiiskaia akademiia nauk*, 99(3), 406-416. Hentet fra <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84879730021&partnerID=40&md5=f3143516d374219b3d87e445bf810ffa>
- Olsen, S., Aagaard, P., Kadi, F., Tufekovic, G., Verney, J., Olesen, J. L., ... Kjaer, M. (2006). Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. *J Physiol*, 573(Pt 2), 525-534. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.107359>
- Ostrowski, K., Wilson, G., Weatherby, R., Murphy, P. & Lyttle, A. (1997). The Effect of Weight Training Volume on Hormonal Output and Muscular Size and Function. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 11. [https://doi.org/10.1519/1533-4287\(1997\)011<0148:TEOWTV>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1519/1533-4287(1997)011<0148:TEOWTV>2.3.CO;2)
- Petrella, J. K., Kim, J. S., Cross, J. M., Kosek, D. J. & Bamman, M. M. (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(5), E937-946. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00190.2006>
- Petrella, J. K., Kim, J. S., Mayhew, D. L., Cross, J. M. & Bamman, M. M. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated

- myonuclear addition: a cluster analysis. *J Appl Physiol* (1985), 104(6), 1736-1742.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01215.2007>
- Pette, D. & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*, 50(6), 500-509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::Aid-jemt7>3.0.Co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::Aid-jemt7>3.0.Co;2-7)
- Phillips, S. M. (2000). Short-term training: when do repeated bouts of resistance exercise become training? *Can J Appl Physiol*, 25(3), 185-193.
- Radaelli, R., Fleck, S. J., Leite, T., Leite, R. D., Pinto, R. S., Fernandes, L. & Simao, R. (2015). Dose-response of 1, 3, and 5 sets of resistance exercise on strength, local muscular endurance, and hypertrophy. *J Strength Cond Res*, 29(5), 1349-1358.
<https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000000758>
- Rønnestad, B. R., Egeland, W., Kvamme, N. H., Refsnes, P. E., Kadi, F. & Raastad, T. (2007). Dissimilar effects of one- and three-set strength training on strength and muscle mass gains in upper and lower body in untrained subjects. *J Strength Cond Res*, 21(1), 157-163.
<https://doi.org/10.1519/r-19895.1>
- Rutherford, O. M. & Jones, D. A. (1986). The role of learning and coordination in strength training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 55(1), 100-105. <https://doi.org/10.1007/bf00422902>
- Schiaffino, S. & Reggiani, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 77(2), 493-501. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>
- Schiaffino, S. & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91(4), 1447-1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Schoenfeld, B., Ogborn, D. & Krieger, J. (2016). *Dose-response relationship between weekly resistance training volume and increases in muscle mass: A systematic review and meta-analysis.*
- Schoenfeld, B. J., Contreras, B., Krieger, J., Grgic, J., Delcastillo, K., Belliard, R. & Alto, A. (2019). Resistance Training Volume Enhances Muscle Hypertrophy but Not Strength in Trained Men. *Med Sci Sports Exerc*, 51(1), 94-103. <https://doi.org/10.1249/mss.0000000000001764>
- Scott, W., Stevens, J. & Binder-Macleod, S. A. (2001). Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Physical Therapy*, 81(11), 1810-1816. <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>
- Seynnes, O. R. & Cronin, N. J. (2020). Simple Muscle Architecture Analysis (SMA): An ImageJ macro tool to automate measurements in B-mode ultrasound scans. *PLoS One*, 15(2), e0229034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229034>
- Seynnes, O. R., de Boer, M. & Narici, M. V. (2007). Early skeletal muscle hypertrophy and architectural changes in response to high-intensity resistance training. *J Appl Physiol* (1985), 102(1), 368-373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00789.2006>

- Shoepe, T. C., Stelzer, J. E., Garner, D. P. & Widrick, J. J. (2003). Functional adaptability of muscle fibers to long-term resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 35(6), 944-951.
<https://doi.org/10.1249/01.Mss.0000069756.17841.9e>
- Sinha-Hikim, I., Roth, S. M., Lee, M. I. & Bhasin, S. (2003). Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(1), E197-205. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00370.2002>
- Snijders, T., Smeets, J. S., van Kranenburg, J., Kies, A. K., van Loon, L. J. & Verdijk, L. B. (2016). Changes in myonuclear domain size do not precede muscle hypertrophy during prolonged resistance-type exercise training. *Acta Physiol (Oxf)*, 216(2), 231-239.
<https://doi.org/10.1111/apha.12609>
- Sooneste, H., Tanimoto, M., Kakigi, R., Saga, N. & Katamoto, S. (2013). Effects of Training Volume on Strength and Hypertrophy in Young Men. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 27(1), 8-13. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3182679215>
- Staron, R. S. (1997). Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol*, 22(4), 307-327. <https://doi.org/10.1139/h97-020>
- Staron, R. S., Karapondo, D. L., Kraemer, W. J., Fry, A. C., Gordon, S. E., Falkel, J. E., ... Hikida, R. S. (1994). Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol (1985)*, 76(3), 1247-1255.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.3.1247>
- Staron, R. S., Leonardi, M. J., Karapondo, D. L., Malicky, E. S., Falkel, J. E., Hagerman, F. C. & Hikida, R. S. (1991). Strength and skeletal muscle adaptations in heavy-resistance-trained women after detraining and retraining. *J Appl Physiol (1985)*, 70(2), 631-640.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1991.70.2.631>
- Staron, R. S., Malicky, E. S., Leonardi, M. J., Falkel, J. E., Hagerman, F. C. & Dudley, G. A. (1990). Muscle hypertrophy and fast fiber type conversions in heavy resistance-trained women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 60(1), 71-79. <https://doi.org/10.1007/bf00572189>
- Tarpenning, K. M., Wiswell, R. A., Hawkins, S. A. & Marcell, T. J. (2001). Influence of weight training exercise and modification of hormonal response on skeletal muscle growth. *J Sci Med Sport*, 4(4), 431-446. [https://doi.org/10.1016/s1440-2440\(01\)80052-9](https://doi.org/10.1016/s1440-2440(01)80052-9)
- van Wessel, T., de Haan, A., van der Laarse, W. J. & Jaspers, R. T. (2010). The muscle fiber type–fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? *European Journal of Applied Physiology*, 110(4), 665-694. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1545-0>
- Verdijk, L., Gleeson, B., Jonkers, R., Meijer, K., Savelberg, H., Dendale, P. & Loon, L. (2009). Skeletal Muscle Hypertrophy Following Resistance Training Is Accompanied by a Fiber Type-Specific Increase in Satellite Cell Content in Elderly Men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64, 332-339. <https://doi.org/10.1093/gerona/gln050>

- Wakahara, T., Ema, R., Miyamoto, N. & Kawakami, Y. (2015). Increase in vastus lateralis aponeurosis width induced by resistance training: implications for a hypertrophic model of pennate muscle. *Eur J Appl Physiol*, 115(2), 309-316. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-3012-9>
- Westcott, W. L. (2012). Resistance training is medicine: effects of strength training on health. *Curr Sports Med Rep*, 11(4), 209-216. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e31825dabb8>
- Wolfe, B. L., LeMura, L. M. & Cole, P. J. (2004). Quantitative analysis of single- vs. multiple-set programs in resistance training. *J Strength Cond Res*, 18(1), 35-47. [https://doi.org/10.1519/1533-4287\(2004\)018<0035:qaosvm>2.0.co;2](https://doi.org/10.1519/1533-4287(2004)018<0035:qaosvm>2.0.co;2)
- Zierath, J. R. & Hawley, J. A. (2004). Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS biology*, 2(10), e348-e348. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020348>

Vedlegg

Vedlegg 1 - Samtykkeskjema

Vil du delta i forskningsprosjektet

”ContraTRAIN – en valideringsstudie av kontralaterale treningsdesign”?

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt hvor formålet er å skaffe ny kunnskap om hvordan vi kan optimalisere designet på treningsstudier for å best mulig kunne undersøke effekten av trening. I dette skrivet gir vi deg informasjon om målene for prosjektet og hva deltakelse vil innebære for deg.

Formål

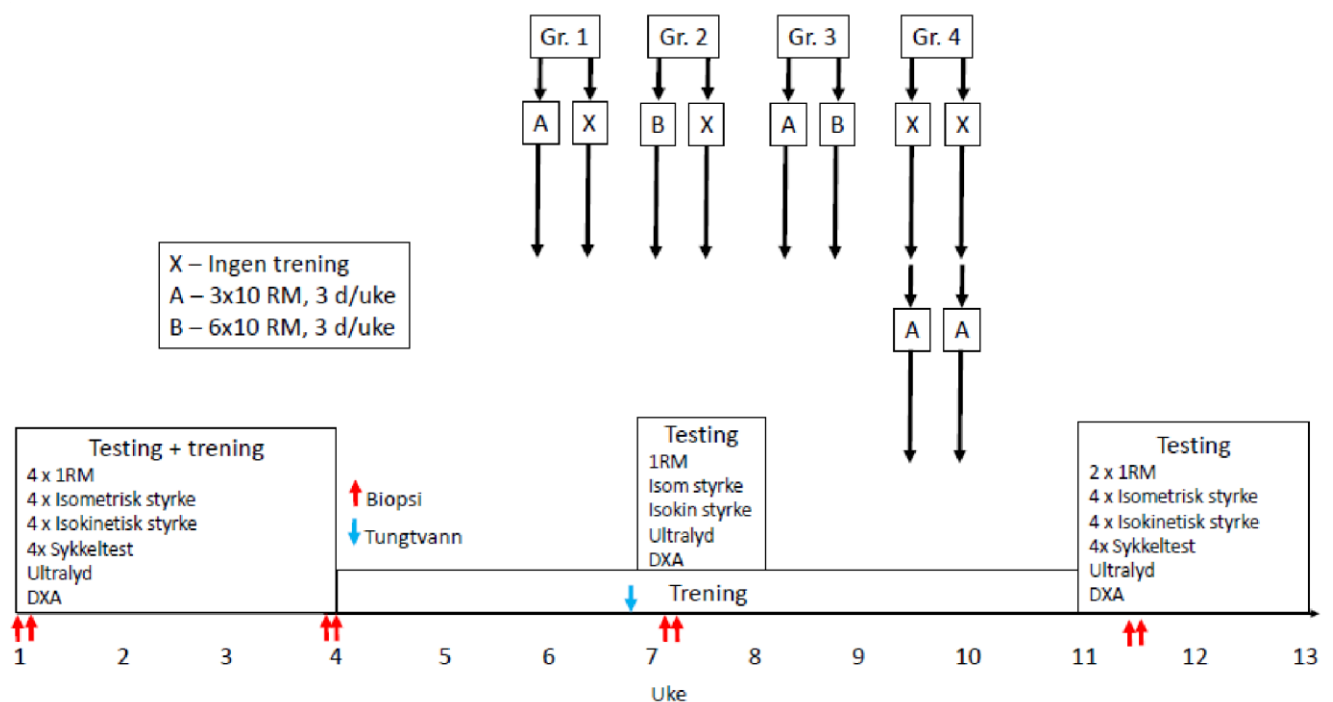
Fysisk aktivitet har en rekke positive effekter på menneskekroppens funksjoner og er et av våre viktigste virkemidler for å fremme folkehelsen. Ikke nok med at det gir forebygging av livsstilssykdommer som for eksempel hjerte-karsykdom, respiratoriske sykdommer og metabolske sykdommer, det gir også styrke og utholdenhet til å beherske dagliglivets utfordringer. For å forstå mekanismene bak de positive effektene av fysisk aktivitet er gode studiedesign helt sentrale. Vi ønsker i denne studien å øke kunnskapen om anvendelse av kontralaterale treningsprotokoller: trening av ett bein om gangen, med ulik type trening på de to beina.

Vanligvis sammenlignes to ulike treningsprotokoller ved at de utføres av to ulike grupper individer. Ulike individer responderer imidlertid ulikt på trening. I slike studier ser vi derfor stor variasjon i treningsrespons. Denne variasjonen gjør det vanskelig å sammenligne effektene av treningsprotokollene. Den vanligste måten å løse denne utfordringen på er å inkludere mange forsøkspersoner. I denne studien skal vi imidlertid se på hvordan vi kan gjøre sammenligningen innad i ett individ. Når samme individ gjennomfører begge treningsprotokoller forsvinner mye av variasjonen. Dette reduserer behovet for antall forsøkspersoner og styrker studiene betraktelig.

I denne studien skal vi anvende et kontralateralt studiedesign for å studere hvordan muskelstyrke, muskelvekst og relaterte cellulære mekanismer påvirkes av ulikt treningsvolum. Samtidig skal vi kartlegge hvordan slike studiedesign kan brukes i videre forskning. Økt forståelse for unilateral trening og individuelle responsmønstre vil være viktig for å utvikle individuelt tilpassede treningsprogrammer og derigjennom øke effekten av trening for den enkelte.

Dette skal undersøkes ved å studere effektene av de to treningsprotokollene på muskelstyrke, muskelmasse, samt cellebiologiske trekk som for eksempel cellers form og utseende, arvematerialets sammensetning (inkludert DNA-sekvens og epigenetisk modifisering), proteinsyntese (ved hjelp av deuterium), proteinforekomst og -funksjon, RNA-uttrykk i beinmuskulatur til tidligere utrente individer. Vi skal også undersøke hvordan muskulaturens og blodets sammensetning forut for treningsperioden påvirker treningseffektene.

Deltakerne skal deles inn i fire grupper som skal trene som skissert i figur 1. Avhengig av hvilken gruppe du trekkes til, vil du trene ett eller begge bein i en periode på 11 uker. Du vil også trene overkroppsmuskulaturen (på ordinær måte: to armer). Treningsprogrammet vil gjennomføres som 3 eller 6 sett med styrketrening for hver øvelse, med 10 repetisjoner maksimum i hvert sett. Totalt vil studien vare i ca 13 uker. De tre første ukene i studien vil være en kombinasjon av tilvenning til trening og testing. Fra uke 4 til 11 gjennomføres treningsintervensjonen. Testbatteriet gjentas midtveis i treningsintervensjonen (uke 7) og etter avsluttet trening (i uke 11-12). Figur 1 viser tidsplanen for studien. Gruppe 4 vil i første halvdel gjennomføre testing på samme måte som de andre gruppene, men uten trening. Etter at de andre gruppene er ferdig med sin trening gjennomfører gruppe 4 sin treningsperiode, med tilhørende testing. Studien vil derfor ha en varighet på 26 uker for deltager i gruppe 4. Figur 1



Deltakere må møte for testing og trening tre ganger i uken gjennom hele studien, med unntak av gruppe 4 som i sin første periode bare må møte til testing. Deltakere i grupper som bare trener ett bein vil få tilbud om å trene en ny periode med begge bein etter intervensjonen. All trening og testing vil foregå under veiledning på Høgskolen i Innlandet, Campus Lillehammer. Studien er et

forskningsprosjekt som involverer både master- og bachelorstudenter som vil skrive sine oppgaver basert på resultatene. *Detaljert informasjon om innhold og tidsforløp vil bli gitt i informasjonsmøte hvor det og vil være mulig å stille spørsmål.*

Hvem er ansvarlig for forskningsprosjektet?

Høgskolen Innlandet er ansvarlig for prosjektet og Håvard Hamarsland er prosjektansvarlig.

Hvorfor får du spørsmål om å delta?

Du får dette informasjonsskrivet fordi du har vist interesse for å delta i forskningsprosjektet ContraTRAIN og oppfyller inklusjonskriteriene:

- Mellom 18 og 35 år
- Utrent (ikke har trent systematisk styrketrening mer enn to ganger per måned og ikke har trent utholdenhetstrening mer enn 3 timer per uke det sist halvåret)
- Ikke røyke
- Ikke være på medisiner som kan påvirke tilpasning til trening
- Ikke ha skader i muskel eller skjelett som hindrer deltagelse i tung styrketrening

Hva innebærer det for deg å delta?

Deltakere trekkes til 4 ulike grupper som skal trene ulike kombinasjoner av tung styrketrening på bein og overkropp (se figur 1). Deltakerne i tre av gruppene må over 13 uker møte 3 ganger per uke på Høgskolen Innlandet Campus Lillehammer for testing og trening. Deltakere i den fjerde gruppen vil først fungere som en kontrollgruppe som gjennomfører testing, men ikke trening. Etter perioden som kontrollgruppe gjennomfører også denne gruppen en treningsintervensjon med testing. For denne gruppen vil intervensjonen være 26 uker. All testing og trening vil foregå under veiledning.

Testingen vil involvere:

- Blodprøve før og etter treningsperioden.
- Måling av kroppssammensetning ved DXA. Denne testen gjennomføres fastende på morgenen før, midtveis og etter treningsperioden.
- Måling av tykkelsen av lårmuskulaturen med ultralyd.
- Maksimale styrketester i beinpress, kneekstensjon, benkpress og sittende roing, før og etter treningsperioden.

- Statisk styrke i kneekstensjon (S3C) og isokinetiske tester før, midtveis og etter treningsperioden.
- Sykkeltest med ettbeinssykling.
- Vevsprøver tatt ved mikrobiopsier. Totalt vil det tas 4 mikrobiopsier fra hvert bein for deltakere i tre av gruppene, mens det i den fjerde gruppen (kontrollgruppen) vil tas 7 mikrobiopsier fra hvert bein. Noen synes vevsprøvetaking er ubehagelig. Man vil typisk bli litt støl i muskelen 1-2 dager i etterkant. I svært få tilfeller vil biopsitaking kunne føre til at følelsen i huden forsvinner for en lengre periode, eller gi tydelig arrdannelse. Biopsitaking er også forbundet med en viss infeksjonsfare. Risikoen for disse komplikasjonene er svært liten ved bruk av prosedyrene som benyttes i dette prosjektet. Du vil få klare instruksjoner om hvordan du skal behandle såret i etterkant av prøvetagningen.
- For å kunne måle hvor raskt nye proteiner bygges inn i muskulaturen må du i uke 7 av prosjektet innta en dose tungtvann. Det er ingen kjente helsekonsekvenser ved inntak av de dosene som anvendes i studien, men lett svimmelhet kan forekomme. For å unngå dette vil dosen fordeles over flere inntak og du vil følges opp av testpersonalet i perioden hvor svimmelhet kan inntreffe.

Det er frivillig å delta

Det er frivillig å delta i prosjektet. Hvis du velger å delta, kan du når som helst trekke samtykke tilbake uten å oppgi noen grunn. Alle opplysninger om deg vil da bli anonymisert. Det vil ikke ha noen negative konsekvenser for deg hvis du ikke vil delta eller senere velger å trekke deg.

Ditt personvern – hvordan vi oppbevarer og bruker dine opplysninger

Vi vil bare bruke opplysningene om deg til formålene vi har fortalt om i dette skrevet. Vi behandler opplysningene konfidensielt og i samsvar med personvernregelverket.

Det er bare studenter og forskere involvert i studien som vil ha tilgang til resultatene dine. Resultatene dine vil bli lagret digitalt på en sikker forskningsserver og eventuelt i papirformat innelåst i en safe. I disse dokumentene vil ditt navn og dine kontaktopplysninger erstattes med en kode. Kodenummeret som binder ditt navn til resultatene vil være innelåst i en safe, adskilt fra øvrige data. Dine data vil ikke kunne gjenkjennes i de vitenskapelige publikasjonene som vil publiseres.

Hva skjer med opplysningene dine når vi avslutter forskningsprosjektet?

Prosjektet skal etter planen avsluttes 31.12.2023. Etter at studien er avsluttet vil testresultater og innsamlet biologisk materiale innlemmes i en biobank (se eget delkapittel om biobank) og destruert innen 31.12.2038. Det vil ikke være mulig å spore dine resultater eller prøver tilbake til deg fra denne biobanken. Dataene i biobanken vil danne grunnlaget for doktorgrader og vitenskapelige publikasjoner.

Biobank

Alle blod- og vevsprøver, samt øvrig informasjon som innhentes i prosjektet, inklusiv informasjon som blir utledet fra det biologiske materialet, vil bli lagret i kodet tilstand i en forskningsbiobank tilknyttet prosjektet og vil etterhvert bli overført til den generelle biobanken «The TrainOME – humane cellers tilpasning til trening og miljø» (REK-id: 213483), situert ved Høgskolen i Innlandet/Sykehuset Innlandet. TrainOME-prosjektet er igangsatt for å avdekke sammenhenger mellom individers tilpasningsevne til trening, også kalt trenbarhet, og kroppslige/cellulære særtrekk. Gjennom den generelle biobanken skal prøvene analyseres sammen med prøver fra en rekke andre prosjekter, hvor den overordnede målsettingen er å studere faktorer som er bestemmende for generell trenbarhet. Dette innebærer generell analyse av cellebiologiske og genetiske trekk som for eksempel cellers form og utseende, arvematerialets sammensetning (inkludert DNA-sekvens og epigenetisk modifisering), proteinsyntese, proteinforekomst og -funksjon, RNA-uttrykk og -regulering, hormonforekomst, kroppens indre miljø (metabolomet), og mange flere mål. Det biologiske materialet vil bli anonymisert innen 31.12.2038, hvorpå det vil bli destruert innen fem år. Forskningsdata som har blitt utledet av materialet vil deretter bli oppbevart i anonymisert tilstand på sikker server på ubestemt tid, sammen med øvrige data innhentet i prosjektet. Professor Stian Ellefsen er hovedansvarshavende for forskningsbiobanken.

Dine rettigheter

Så lenge du kan identifiseres i datamaterialet, har du rett til:

- Innsyn i hvilke personopplysninger som er registrert om deg
- Å få rettet personopplysninger om deg
- Få slettet personopplysninger om deg
- Få utlevert en kopi av dine personopplysninger (dataportabilitet)
- Å sende klage til personvernombudet eller Datatilsynet om behandlingen av dine personopplysninger.

Hva gir oss rett til å behandle personopplysninger om deg?

Vi behandler opplysninger om deg basert på ditt samtykke.

På oppdrag fra Høgskolen Innlandet har NSD – Norsk senter for forskningsdata AS vurdert at behandlingen av personopplysninger i dette prosjektet er i samsvar med personvernregelverket.

Hvor kan jeg finne ut mer?

Hvis du har spørsmål til studien, eller ønsker å benytte deg av dine rettigheter, ta kontakt med:

- Høgskolen Innlandet ved Håvard Hamarsland (tlf: 93445916, epost: havard.hamarsland@inn.no, eller Stian Ellefsen (tlf: 61288103, epost: stian.ellefsen@inn.no)
- NSD – Personvernombudet, på epost (personvernombudet@nsd.no) eller telefon: 55 58 21 17.
- Vår lokale kontaktperson for personvern i forskning: Anne Sofie Lofthus, forskningsrådgiver, Høgskolen i Innlandet, anne.lofthus@inn.no, telefon: 61288277 .

Med vennlig hilsen

Håvard Hamarsland

Prosjektansvarlig

Stian Ellefsen

(Hovedansvarshavende Biobank)

Samtykkeerklæring ContraTRAIN

Jeg har mottatt og forstått informasjon om prosjektet (*ContraTRAIN*), og har fått anledning til å stille spørsmål. Jeg samtykker til å delta i treningsintervensjonen med tilhørende testing, herunder

- Blodprøver
- DXA
- Maksimale styrke- og utholdenhetstester
- Testing av statisk styrke i kneekstensjon med elektrisk stimulering av lårmuskulaturen
- Vevsprøver tatt ved mikrobiopsier. Inntak av tungtvann.

Jeg samtykker til at mine opplysninger behandles frem til prosjektet er avsluttet, ca.

31.12.2023.

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

FORESPØRSEL OM AVGIVELSE AV VEVS-OG BLODPRØVER TIL EN GENERELL FORSKNINGSBIOBANK

The TrainOme – humane cellers tilpasning til trening og miljø

Dette er en forespørsel til deg om du ønsker å bidra med vevs-og blodprøver i den generelle forskningsbiobanken the TrainOME.

Hva er The TrainOME?

The TrainOME er en generell forskningsbiobank som er godkjent av regional etisk komité (REK) og som legger til rette for oppbevaring av biologisk materiale som skal benyttes til forskning og kartlegging av sammenhengen mellom trenbarhet og cellulære egenskaper. Biobanken inkluderer vevs- og blodprøver fra en rekke enkeltstående forskningsprosjekt, som hver og en har blitt vurdert av regional etisk komite. Hvilke analyser som vil bli gjort på dine prøver vil i sin helhet være definert i den prosjektspesifikke prosjektprotokollen. For ytterligere informasjon, ta kontakt med hovedansvarshavende for forskningsbiobanken, Stian Ellefsen (epost: stian.ellefsen@inn.no; tlf: 61288103).

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvematerialet vil bli oppbevart i låsbar fryser på låst lagerrom, situert ved Høgskolen i Lillehammer/Sykehuset Innlandet. Alle opplysninger og prøver vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Denne vil bli oppbevart adskilt fra øvrige data, enten i låst skap lokalisert til låsbart kontor eller på sikker server tilhørende Høgskolen i Lillehammer og vil

kun være tilgjengelig for autorisert personell. Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene som kommer ut av biobanken når disse publiseres. Deler av materialet vil kunne bli sendt til utlandet for analyse. Merking vil i slike tilfeller være begrenset til identifikasjonsnummer; dvs. de vil bli sendt i kodet tilstand. Ubenyttet materiale vil bli returnert til Lillehammer i etterkant av analysene. Det biologiske materialet vil bli anonymisert innen 31.12.2038, hvorpå det vil bli destruert innen fem år. Høgskolen i Lillehammer ved administrerende direktør er databehandlingsansvarlig.

Dine rettigheter

Det er frivillig om du vil la ditt biologiske materiale inngå i The TrainOME-biobanken og du kan når som helst trekke tilbake ditt samtykke uten at du trenger oppgi grunn for dette. Hvis du sier ja til innlemmelse i biobanken, har du rett til å få innsyn i opplysninger som er registrert på deg og også rett til å få korrigert eventuelle feil som oppdages. Du vil etter loven ha krav på jevnlig informasjon om hvordan materialet blir benyttet. Om du trekker ditt samtykke, vil ditt biologiske materiale samt utledete data bli slettet, med mindre opplysningene allerede inngår i analyser eller har blitt brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Prosjektkoordinator eller øvrige prosjektmedarbeidere kan kontaktes når som helst i arbeidstiden:

Stian Ellefsen (hovedansvarshavende), tlf: 61288103, epost: stian.ellefsen@inn.no

Bent Rønnestad (prosjektkoordinator), tlf: 61288193, epost: bent.ronnestad@inn.no

Gunnar Slettaløkken (prosjektkoordinator), tlf: 61288182, epost: gunnar.slettalokken@inn.no

Samtykke til deltakelse i den generelle forskningsbiobanken

Jeg bekrefter med dette å ha lest informasjonsskrivet knyttet til den generelle biobanken «The TrainOME – humane cellers tilpasning til trening og miljø» og samtykker til at mine vevs- og blodprøver kan inngå i biobanken:

Sted:.....

Underskrift:

Dato:/..... 20.....

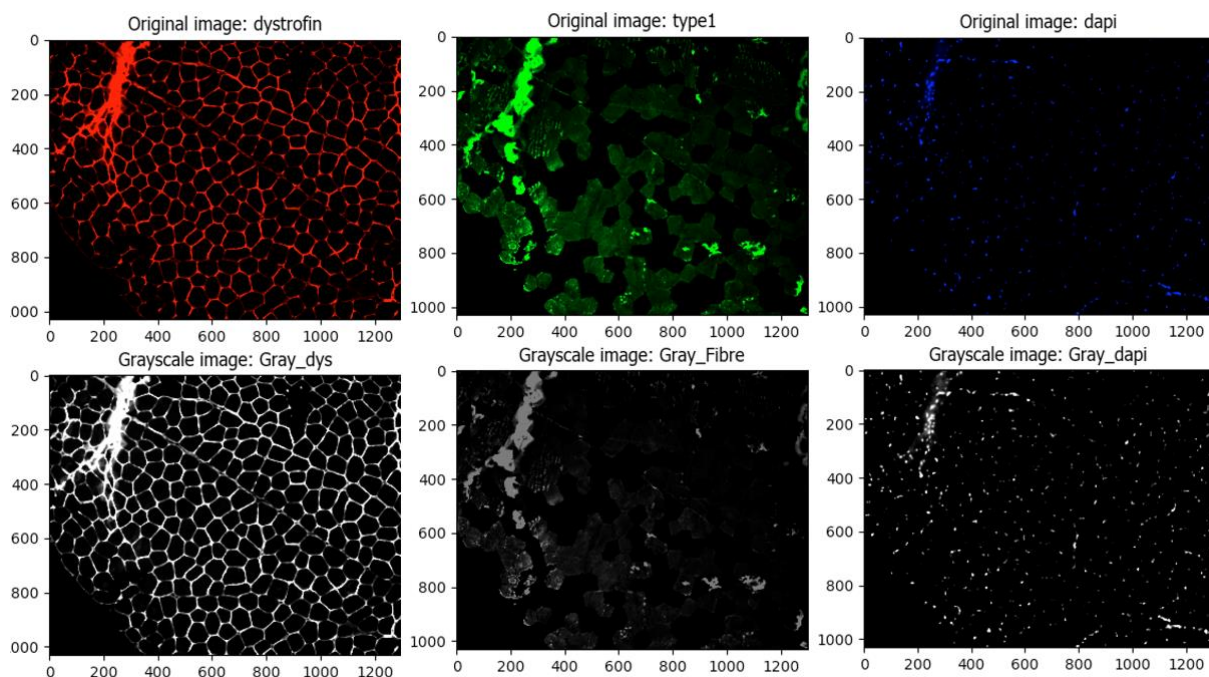
Vedlegg 2 - Cellprofiler

- Det ble tatt tre bilder og slått sammen til ett for hver biopsi.
- Bildene vi ønsket å analysere legges inn i cellprofiler og er navngitt i forhold til tidspunkt, forsøksperson og hvilket bein.
- C0 er fibertype, C1 er dystrofi og C2 er nukleus.
- Tallet som står etter C definerer hvilken type/kanal det er. Det som står etter T sier om hvilket tidspunkt det er. Det som står etter FP sier hvilken forsøksperson det er, og det som står etter VL (r eller l) sier hvilket bein det er. Disse dataene ble brukt av CellProfiler for å sortere resultatene i outputfilen.

Rekkefølgen på de forskjellige stegene og hva de gjør:

1. ColorToGray

- Konverterer et bilde med flere fargekanaler til en eller flere skalaer av gråfarge. Dette ble gjort for dystrofin, fibertype og myokjerner.

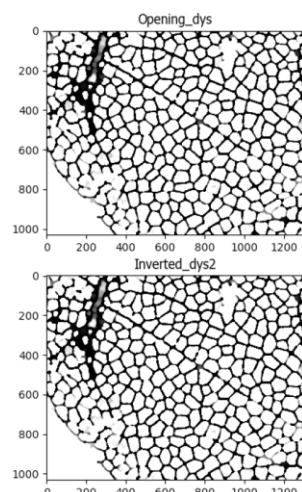


2. Invert

- Inverterer bildene.

- Correctilluminationcalculate
 - Beregner en belsningsfunksjon som brukes til å korrigere ujevne belsninger/skyggelegging eller for å redusere ujevne bakgrunner i bildene.

- Closing
 - Disk
 - Brukes for å fjerne ‘pepper noise’ (små mørke flekker) og slår sammen små lyse sprekker. Tomrom blir fylt så det blir lettere å se nettverket og ikke få uønskede fibre i det området senere. Satt innstillingene til å finne strukturer formet som ‘disk’ med en maks størrelse på 7.
- EnhanceOrSupressFeatures
 - Forbedrer eller reduserer visse bildefunksjoner (f.eks. flekker og ringformer, og gjør det mulig å forbedre etterfølgende identifikasjon av bildet.
 - Har brukt ‘neurites’ på hvordan type den skal finne, som er lange tynne ‘gjenstander’ som får frem sin intensitet. Programmet forsøker å finne de og gjøre de sterkere, og fremhever det.
 - Kan legge inn hvor kraftig vi ønsker å fremheve det (vi satt det til 10). Valgte ‘line-structures’.
- Opening
 - Gjør det motsatte av «closing»; fjerner hvite prikker og slår sammen svarte prikker og gjør de enda sterkere. Størrelsen var satt til 10.
- Imagemath
 - Utfører forskjellige matematiske formler av to eller flere bildeintensiteter med en konstant for individuelle bildeintensiteter. Her forsterket vi det svarte på bildet 20 ganger

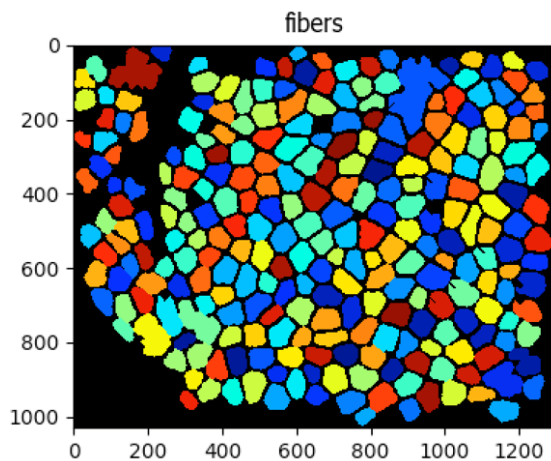


3. IdentifyPrimaryObjects

- Identifiserer biologiske objekter som er av interesse.

- Threshold

- Produserer et svart-hvitt bilde basert på en terskel som kan velges på forhånd eller beregnes automatisk ved hjelp av flere metoder. Terskelverdien som ble satt var «global», og metoden var «outso». Det ble valgt «two-classes» som terskel da nivåene av gråtonene enkelt skiller ut i kun to nivåer.



4. OverlayOutlines

- Plasserer konturer av forskjellige objekter over ønsket bilde.

- ExpandOrShrinkObjects

- Utvider eller krymper objekter med en definert avstand. I vårt tilfelle utvidet vi de.

- MeasureObjectSizeShape

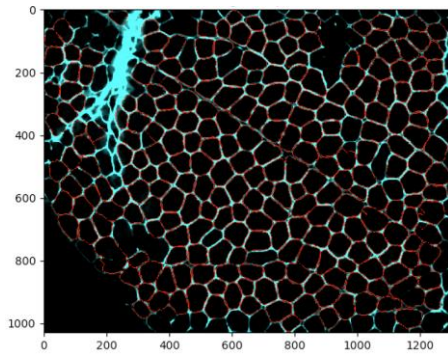
- Måler flere arealer og former ved de identifiserte objektene.

- FilterObjects

- Fjerner objekter som er basert på målinger som er produsert av en annen modul.

Alle objektene som ikke tilfredsstilte de spesifiserte parameterene ble utelukket.

- Målingen som ble valgt for å filtrere var «eccentricity» som var satt til $>0,85$, og «FormFactor». Sistnevnte sier noe om hvordan form cellen har. Hvis en celle ser lang og slank ut vet vi at den ikke er kuttet riktig (kuttet på skrått). Dette gjorde vi på de forskjellige faktorene vi ønsket å se på og filtrere ut, som f.eks. myokjerner, og det ble bestemt hvilken farge som skal være rundt de forskjellige objektene.



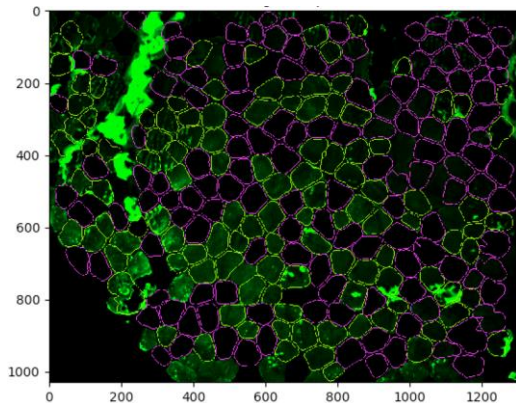
5. MeasureObjectIntensity

- Først brukte vi MeasureObjectSizeShape. Denne bruker alltid den siste målingen for å gjøre videre analyser.

- MeasureObjectIntensity måler intensiteten for de identifiserte objektene. Ved f.eks. myokjerner vil denne modulen ta ut intensitetsfunksjonen for hvert objekt basert på ett eller flere liknende gråtonebilder, og målinger registreres for hvert objekt.

- FilterObjects

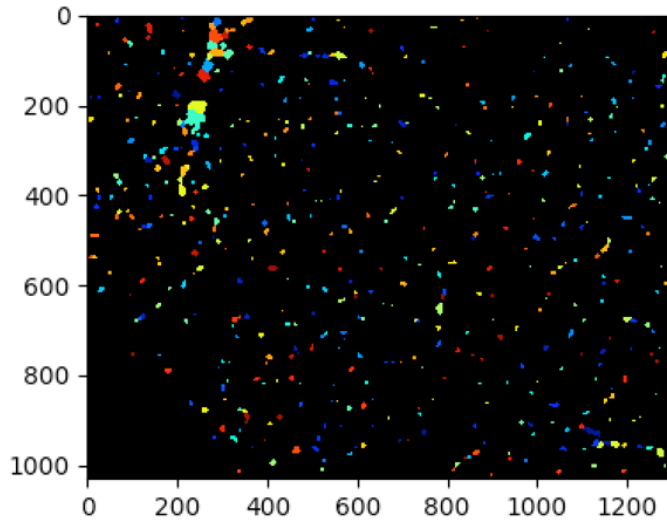
- Etter å ha målt intensiteten brukte vi FilterObjects igjen, hvor vi denne gangen filtrerte målingene ut fra «MeanIntensity» som sier noe om den gjennomsnittlige piksel-intensiteten innenfor et objekt.



6. IdentifyPrimaryObjects

- Identifiserer objektene av det vi var interessert i å se på. Ved myokjerner satt vi størrelsen 0-40 for å være sikre på at vi fikk med alle. Utfordringen her var at mange lå ganske nære hverandre, og blir derfor slått sammen til én myokjerne. «Minimum cross entropy» ble valgt som metode for terskelen. Dette gjør at fordelingen av de forskjellige intensitetene som definerer for- og bakgrunn brukes som estimater for fordelingene som produserer intensiteten til pikslene i for- og bakgrunnen.

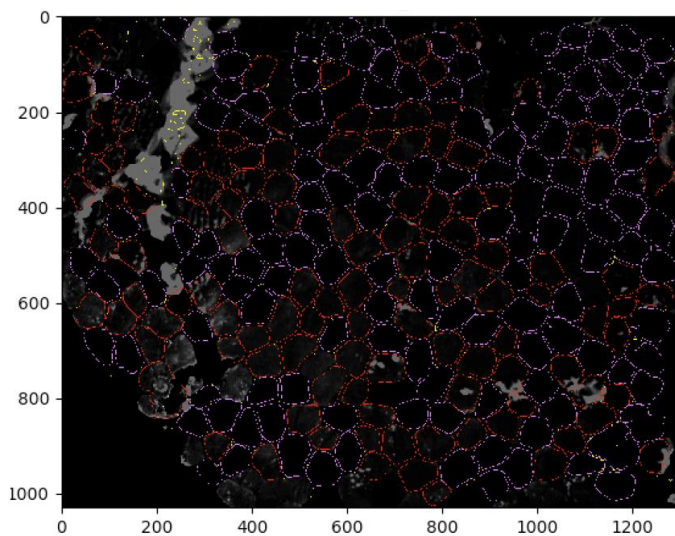
- ShrinkToAPoint; Gjør hver nukleus om til én piksel. Hvis den ligger innenfor cellen (senter av kjernen) telles det som én myokjerne.



7. OverlayOutlines

- Deretter plassere vi nye konturer av forskjellige objekter over det ønskede bildet.

- RelateObjects
 - Til slutt relaterer vi de forskjellige objektene til det vi ønsker å se på. Denne modulen lar oss knytte underordnede objekter til større objekter. Dette er et viktig steg for å telle antall myokjerner som er tilknyttet de ulike fibrene, og for å beregne gjennomsnittlige verdier for alle myokjerner tilknyttet hver fibertype.



8. Export to spreadsheet

- Til slutt eksporterte vi resultatene fra analysene i cellprofiler til et Excel-dokument.

Image	fibers_type1	Image	Image	Image	Image	Image	fibers_type1	fibers_type1	fibers_type2	fibers_type2
ImageNumber	ObjectNumber	Metadata_Frame	Metadata_Frame	Metadata_Lag	Metadata_Series	Metadata_Timepoint	AreaShape_Area	Children_ShrunkenNuclei_Count	AreaShape_Area	Children_ShrunkenNuclei_Count
1	1	33	0	L	0	1	2939	0	5785	3
1	2	33	0	L	0	1	4886	2	4086	2
1	3	33	0	L	0	1	5934	6	2330	3
1	4	33	0	L	0	1	3434	0	6575	2
1	5	33	0	L	0	1	9032	4	5363	0
1	6	33	0	L	0	1	2579	4	4535	4
1	7	33	0	L	0	1	2455	2	5365	1
1	8	33	0	L	0	1	8709	6	9187	6
1	9	33	0	L	0	1	4350	2	5341	3
1	10	33	0	L	0	1	4680	5	6208	1
1	11	33	0	L	0	1	2713	3	4005	4
1	12	33	0	L	0	1	2523	6	6046	2
1	13	33	0	L	0	1	2925	0	3262	2
1	14	33	0	L	0	1	2817	7	2289	0
1	15	33	0	L	0	1	2647	4	4196	5
1	16	33	0	L	0	1	2364	3	2486	1
1	17	33	0	L	0	1	2213	1	3805	3
1	18	33	0	L	0	1			2517	2
1	19	33	0	L	0	1			2113	0
1	20	33	0	L	0	1			4973	0
1	21	33	0	L	0	1			3372	1
1	22	33	0	L	0	1			2276	1
1	23	33	0	L	0	1			2830	1
1	24	33	0	L	0	1			6158	5
1	25	33	0	L	0	1			10798	7
1	26	33	0	L	0	1			3938	2
1	27	33	0	L	0	1			4165	5
1	28	33	0	L	0	1			4160	4
2	1	33	0	L	0	1	4207	2	3211	2
2	2	33	0	L	0	1	4407	5	3719	2
2	3	33	0	L	0	1	3119	3	5834	2
2	4	33	0	L	0	1	3640	0	4635	4
2	5	33	0	L	0	1	2431	0	3890	1
2	6	33	0	L	0	1	4200	1	2645	2
2	7	33	0	L	0	1	3184	1	3216	3
2	8	33	0	L	0	1	3236	2	2569	0
2	9	33	0	L	0	1	3741	1	2647	4
2	10	33	0	L	0	1	4099	3	2167	0
2	11	33	0	L	0	1	3287	2	2445	0
2	12	33	0	L	0	1	4001	3	4384	3
2	13	33	0	L	0	1	2196	1	2203	6
2	14	33	0	L	0	1	4953	3	4493	0
2	15	33	0	L	0	1	4314	3	3781	1
2	16	33	0	L	0	1	3797	4	4063	6
2	17	33	0	L	0	1	2597	1	5562	2
2	18	33	0	L	0	1	3985	2	4087	6
2	19	33	0	L	0	1	7160	5	2956	3
2	20	33	0	L	0	1	3807	5	3198	2
2	21	33	0	L	0	1	6504	7	2957	2
2	22	33	0	L	0	1	2135	2	13036	16
2	23	33	0	L	0	1	4674	7	3022	2
2	24	33	0	L	0	1	2773	1	3129	2
2	25	33	0	L	0	1	4374	2		
2	26	33	0	L	0	1	16680	11		
2	27	33	0	L	0	1	5049	2		
2	28	33	0	L	0	1	3882	5		
2	29	33	0	L	0	1	2634	1		
2	30	33	0	L	0	1	10622	11		
2	31	33	0	L	0	1	20189	7		
2	32	33	0	L	0	1	6470	7		
2	33	33	0	L	0	1	3304	1		
2	34	33	0	L	0	1	2136	0		
3	1	33	0	L	0	1	4126	2	3110	2