

Sindre Godager

Endringer i muskelkvalitet og regulering av autofagi hos eldre med redusert funksjonsnivå

Effekter av 10 uker med styrketrening og
proteinsupplementering

Masteroppgave i idrettsvitenskap
Seksjon for fysisk prestasjonsevne
Norges idrettshøgskole, 2018

Sammendrag

Bakgrunn: Med aldring reduseres muskelkvalitet målt som muskelstyrke relatert til muskelmasse, med påfølgende nedsatt funksjonsevne. Målinger av autofagimarkører hos gnagere indikerer en aldersrelatert reduksjon i nedbrytningen av dysfunksjonelle proteiner, hvilket kan forklare deler av reduksjonen i muskelkvalitet. Styrketrening øker muskelstyrken og muskelkvaliteten hos eldre, og data fra dyrestudier indikerer at styrketrening også kan oppregulere autofagi, men det er usikkert om det samme er tilfellet hos mennesker. Hensikten med denne studien var derfor å undersøke hvordan markører for autofagi responderte på styrketrening hos eldre med lavt funksjonsnivå og om endringer i autofagimarkører endres sammen med muskelkvalitet.

Metode: 30 deltakere (67-96 år) ble randomisert til en intervensjonsgruppe som gjennomførte styrketrening i 10 uker med daglig proteinsupplement (ST+PRO) eller til en kontrollgruppe som inntok daglig proteinsupplement uten å trene (PRO). Styrke målt som 1RM i kneekstensjon, fettfri masse i beina målt med DXA, tverrsnitt av *m. quadriceps femoris* målt med CT og funksjonelle tester ble gjennomført før og etter intervensjonen. Muskelbiopsier ble tatt fra *m. vastus lateralis* før og etter intervensjonen og to og en halv time etter en akutt styrketreningsøkt med proteinsupplement (ST+PRO), eller to og en halv time etter proteinsupplement alene (PRO). Muskelprøvene ble analysert for autofagimarkørene LC3-I, LC3-II og p62-innhold i cytosol- og membranfraksjon.

Resultater: 1RM kneekstensjon, fettfri masse i beina og tverrsnitt av *m. quadriceps* økte i ST+PRO og signifikant mer enn i PRO. Muskelkvalitet økte like mye i begge grupper. Den akutte styrketreningsøkta og proteinsupplementet førte til en økning i LC3-I i cytosolfraksjon hos ST+PRO, og en reduksjon i LC3-II i cytosol- og membranfraksjon hos ST+PRO og PRO. LC3-I, LC3-II og p62 var uendret som følge av intervensjonen i begge grupper, men det var en signifikant intervensjonseffekt ved at p62 i membranfraksjon gikk mer ned i ST+PRO enn i PRO.

Konklusjon: 10 uker med styrketrening og proteinsupplementering bedret muskelkvaliteten hos de eldre. Økningen i muskelkvalitet var imidlertid ikke relatert til endringer i de målte markørene i autofagisystemet.

Forord

Resultatene i denne masteroppgaven er hentet fra forskningsprosjektet STAS (Styrketrening, aldring og sarkopeni) gjennomført 2016 og 2017 ved seksjon for fysisk prestasjonsevne på Norges idrettshøgskole. Det har vært veldig inspirerende å bidra i et prosjekt som dette. Prosessen har vært lang og lærerik, og jeg er svært takknemlig for hjelpen jeg har fått på veien.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til veilederne mine, Sigve Nyvik Aas og Truls Raastad. Sigve, takk for strålende samarbeid og at du alltid har vært tilgjengelig for spørsmål og gitt raske tilbakemeldinger, uansett hvor travel du har vært. Takk, Truls, for din ekspertise, øye for detaljer og meget kyndige tilbakemeldinger på oppgaven.

Takk til Hege Nymo Østgaard og Vilde Handegard for opplæring i western blot-protokollen, og for at vi endelig løste mysteriet med de «sausete» membranene. Samtidig takk til Kristoffer Cummings, Marte Valde og Kristoffer Kokvik for god stemning på labben.

Takk til alle medstudenter som har gjort mine seks år på NIH til noen fantastiske år. Takk, Simen, for godt samarbeid og mye moro i forbindelse med STAS-prosjektet.

Takk til Tinus Dahl for korrekturlesing.

Til slutt en takk til alle forsøkspersonene i STAS. Jeg var kanskje litt i overkant brutal med dere på trening, men uten innsatsen deres hadde ikke denne oppgaven vært mulig.

Norges idrettshøgskole, mai 2018

Sindre Godager

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
Forord	5
1. Innledning	11
2. Teori	14
2.1 Muskulatur og aldring	14
2.1.1 Årsaker til reduksjon i muskelkvalitet.....	14
2.2 Proteinbalanse	15
2.3 Proteinsyntese	16
2.3.1 Proteinsyntese og aldring.....	16
2.4 Proteinnedbrytning	17
2.4.1 Ubiquitin-proteasom-systemet (UPS).....	17
2.4.2 Autofagi.....	18
2.4.3 Autofagi og aldring.....	20
2.4.4 p62/SQSTM1.....	22
2.4.5 LC3.....	22
2.4.6 Autofagi og perioder med trening hos eldre.....	23
2.4.7 Autofagi og akuttrespons av treningsøkter og proteinsupplement.....	24
2.4.8 Sammendrag.....	26
3. Metode	29
3.1 Studiedesign	29
3.2 Utvalg	30
3.2.1 Rekruttering.....	30
3.2.2 Inklusjons- og eksklusjonskriterier.....	30
3.3 Testing	31
3.3.1 Maksimal styrke (1RM).....	31
3.3.2 Maksimal isometrisk voluntær kontraksjon (IMVC).....	31
3.3.3 Stoltest.....	32
3.3.4 Ganghastighet.....	32
3.3.5 CT (Computed Tomography).....	32
3.4 Akuttdag	33
3.5 Muskelbiopsier	33
3.6 Trening	33
3.7 Proteinsupplement	34
3.8 Analyser	34
3.8.1 Homogenisering og fraksjonering.....	34

3.8.2	Proteinmålinger	35
3.8.3	Western blot.....	35
3.9	Statistikk	37
4.	Resultater.....	39
4.1	Baseline verdier	39
4.2	Endring i kroppsvekt og fettfri masse i beina	39
4.3	1 RM kneekstensjon.....	40
4.4	Tverrsnitt (CT).....	40
4.5	Korrelasjon mellom 1RM og tverrsnitt	41
4.6	Muskelkvalitet.....	41
4.6.1	Endringer i muskelkvalitet.....	41
4.7	Funksjonelle tester	42
4.7.1	Stoltest	42
4.7.2	Selvvalgt ganghastighet	42
4.8	Intracellulær signalering og respons på styrketreningsøkt og/eller proteintilskudd	43
4.8.1	p62	43
4.8.2	LC3-I	43
4.8.3	LC3-II.....	44
4.9	Intracellulær signalering og intervensjon.....	44
4.9.1	p62	44
4.9.2	LC3-I og LC3II.....	45
4.10	Sammendrag intracellulær signalering.....	47
5.	Diskusjon	49
5.1	Fettfri masse i beina.....	49
5.2	Endring i 1RM kneekstensjon	50
5.3	Muskeltverrsnitt	50
5.4	Muskelkvalitet.....	51
5.5	Funksjonelle tester	51
5.6	Intracellulær signalering.....	52
5.6.1	LC3	52
5.6.2	p62	56
5.6.3	Begrensninger	58
5.7	Konklusjon	59
	Referanser.....	61

Tabelloversikt	78
Figuroversikt.....	79
Forkortelser	81
Vedlegg	83

1. Innledning

Med økende alder reduseres muskelmasse og muskelstyrke gradvis, og derfor kan mange eldre få problemer med å gjennomføre daglige gjøremål (Goodpaster et al., 2006). Hvis det aldersrelaterte tapet av muskelstyrke får betydelige konsekvenser for funksjonsevnen kalles tilstanden sarkopeni (von Haehling, Morley, & Anker, 2010), en diagnose som har blitt estimert å ramme 5-13 % av eldre mellom 60-70 år og 11-50 % av dem over 80 år (von Haehling et al., 2010). Muskelkvalitet defineres som muskelstyrke relatert til muskeltverrsnitt, og siden reduksjonen i muskelstyrke er større enn reduksjonen i muskeltverrsnitt, reduseres muskelkvaliteten ved aldring (Lexell & Taylor, 1991). Årsaken til reduksjonen i muskelkvalitet er sannsynligvis sammensatt. Nedbrytning av dysfunksjonelle proteiner er avgjørende for god muskelfunksjon, og svekkelser i proteinnedbrytningen kan derfor bidra til å forklare deler av den aldersrelaterte nedgangen i muskelkvalitet (Irving, Robinson, & Nair, 2012). De største proteinene i muskelcellene brytes ned gjennom autofagi, en prosess som inneslutter proteiner i et autofagosom som fraktes til lysosomene for nedbrytning (Jiao & Demontis, 2017). Data fra dyrestudier indikerer en aldersrelatert reduksjon i autofagistimulerende proteiner (Y. A. Kim, Kim, Oh, Kim, & Song, 2013; McMullen, Ferry, Gamboa, Andrade, & Dupont-Versteegden, 2009; Wohlgemuth, Seo, Marzetti, Lees, & Leeuwenburgh, 2010), men autofagi og aldring er mindre kartlagt hos mennesker (Martinez-Lopez, Athonvarangkul, & Singh, 2015).

Studier som har målt autofagimarkører i forbindelse med en akutt styrketreningsøkt indikerer redusert aktivitet i autofagisystemet de første timene etter økta (Dickinson et al., 2017; Fry et al., 2012), men perioder med styrketrening har vist seg å kunne oppregulere markører for autofagi hos eldre rotter og mus (Y. A. Kim et al., 2013; McMullen et al., 2009; Wohlgemuth et al., 2010). Svært få har imidlertid undersøkt om styrketrening kan påvirke autofagi hos eldre mennesker (Hentila et al., 2018; Mejias-Pena et al., 2017), og ingen studier er gjort på de aller eldste og mest «skrøpelige». I denne studien ble det derfor gjort målinger av autofagimarkørene, LC3-I, LC3-II og p62/SQSTM1 i respons til styrketrening hos eldre med lavt funksjonsnivå.

Konverteringen av LC3-I til LC3-II er essensiell for dannelsen av autofagosomene, og en økning i LC3-II kan indikere flere autofagosomer og økt aktivitet i autofagisystemet (Mizushima & Yoshimori, 2007). p62/SQSTM1 sørger videre for å rekruttere proteiner

til autofagosomene, og det spekuleres i at akkumulering av dette proteinet kan indikere defekt autofagi (Sakuma et al., 2016).

Denne studien er en del av prosjektet STAS (Styrketrening, aldring og sarkopeni), gjennomført 2016 og 2017 på Norges idrettshøgskole. I dette prosjektet ble det undersøkt ulike faktorer som kan påvirke muskelkvalitet og hvordan en periode med tung styrketrening kan påvirke disse faktorene hos eldre med lavt funksjonsnivå. For å sikre god effekt av styrketreningen inntok deltakerne et daglig proteinsupplement gjennom intervensjonsperioden.

I denne studien ønsket vi hovedsakelig å undersøke hvordan en periode med styrketrening kan påvirke autofagi i hvile. Denne oppgaven vil derfor ta for seg følgende hovedproblemstilling og hypotese:

Hovedproblemstilling: Hvordan vil 10 uker med styrketrening og proteinsupplementering påvirke regulering av autofagi hos eldre med lavt funksjonsnivå?

Hypotese: 10 uker med styrketrening og proteinsupplement vil øke autofagien i hvile gjenspeilet av økt nivå av LC3-II og redusert nivå av p62/SQSTM1.

I tillegg var vi interessert i å undersøke akutte endringer i autofagiprosessen som følge av en styrketreningsøkt i kombinasjon med proteinsupplement. Denne oppgaven belyser derfor også følgende underproblemstilling og hypotese:

Hvordan vil en akutt styrketreningsøkt etterfulgt av inntak av proteinsupplement påvirke regulering av autofagi hos eldre med lavt funksjonsnivå?

Hypotese: Autofagien vil være redusert to og en halv time etter en styrketreningsøkt og inntak av proteinsupplement, gjenspeilet av redusert nivå av LC3-II.

2. Teori

2.1 Muskulatur og aldring

Muskelstyrke reduseres normalt med 15 % per tiår mellom 50- og 70-årsalderen og med 30 % per tiår etter fylte 70 (Evans, 1997). Muskelmassen reduseres ved at muskelfibrene reduseres både i antall og størrelse, spesielt type II-fibre, og tapet av muskelstyrke er større enn tapet av muskelmasse (Lexell & Taylor, 1991). I en tre år lang studie av 1800 menn og kvinner mellom 70-79 år ble muskelstyrke redusert ca. 3 ganger så mye som muskelmasse (Goodpaster et al., 2006). Muskelkvalitet, definert som muskelstyrke relatert til muskeltverrsnitt, reduseres derfor også betydelig med aldring (Lindle et al., 1997; Lynch et al., 1999). Metoder for å forhindre tapet av muskelkvalitet har fått mye oppmerksomhet siden denne ratioen kan være spesielt avgjørende for eldre sin funksjonsevne (Mistic, Rosengren, Woods, & Evans, 2007).

I en rekke studier der man har gjennomført styrketrening på eldre er det rapportert en større relativ økning i muskelstyrke enn i muskelmasse (Brown, McCartney, & Sale, 1990; Fiatarone et al., 1994; Ivey et al., 2000; Treuth et al., 1994), noe som indikerer bedret muskelkvalitet. Tracy et al. (1999) rapporterte en økning i muskelkvalitet på 15 % etter en 9-ukers styrketreningsperiode med kneekstensjon, der muskelstyrke ble målt i kneekstensjon og muskelmasse med MRI som volum av hele *m. quadriceps femoris*. Ivey et al. (2000) bekreftet videre en signifikant bedring i muskelkvalitet etter 9 uker med styrketrening og tilsvarende metodikk. Styrketrening har vist seg å øke den relative muskelstyrken mer enn muskelmassen også hos yngre (Welle, Totterman, & Thornton, 1996), men misforholdet mellom økning i styrke og økning i tverrsnitt er mindre sammenlignet med eldre.

2.1.1 Årsaker til reduksjon i muskelkvalitet

Endringer i muskelkvalitet med aldring kan skyldes mange ulike faktorer. Det kan se ut til at nervesystemet spiller en rolle, der redusert maksimal voluntær aktivering av agonist eller endringer i agonist-antagonist-koaktivering kan bidra til å redusere muskelkvalitet (Hakkinen et al., 1998). I tillegg øker mengden ikke kontraktile-vev i musklene, mye i form av fett både inter- og intramuskulært (Delmonico et al., 2009). Alt dette ikke-kontraktile vevet mellom muskelbuker, mellom fibre og inne i fibre tar opp plass og kan begrense funksjonen til muskelen (Delmonico et al., 2009). Endringer

i muskelarkitektur kan også tenkes å påvirke muskelkvaliteten ved at pennasjonsvinkelen til muskelfibrene i fjærformede muskler reduseres (Fragala, Kenny, & Kuchel, 2015). Muskelfibre i plantarfleksorene hos eldre har vist seg å ha mindre pennasjonsvinkel sammenlignet med yngre (Morse et al., 2004; M. V. Narici, Maganaris, Reeves, & Capodaglio, 2003), og dette vil svekke potensialet for kraftproduksjon og dermed dreiemomentet over ankelleddet (Marco V Narici & Maganaris, 2006). Enkeltfibre har også vist seg å produsere mindre kraft per fiberareal hos eldre sammenlignet med yngre, og dette kan skyldes svekkelser på kryssbro-nivå (Frontera et al., 2000). Proteinbalansen, forholdet mellom proteinsyntese og proteinnedbrytning, sørger for en kontinuerlig utskiftning av kontraktile proteiner og organeller og er avgjørende for god muskelfunksjon (Mitchell, Churchward-Venne, Cameron-Smith, & Phillips, 2015). Dysfunksjonelle kontraktile proteiner og organeller som ikke blir brutt ned og erstattet, vil potensielt kunne ta opp plass og svekke muskelfibrenes evne til å utvikle kraft. Det er derfor mulig at svekkelser i proteinnedbrytningen hos eldre kan forklare deler av endringene i muskelkvalitet (Irving et al., 2012).

2.2 Proteinbalanse

Muskelvevet har en enorm evne til å tilpasse seg, og er i kontinuerlig endring gjennom regulering av både proteinsyntese og proteinnedbrytning (Mitchell et al., 2015). Noen timer etter et måltid brytes proteiner ned i større hastighet enn det syntetiseres nye (Nicholas A. Burd, Tang, Moore, & Phillips, 2009), men nytt inntak av næring gjør at syntesen av proteiner for en periode er større enn nedbrytningen av proteiner (Brook, Wilkinson, Smith, & Atherton, 2016). En positiv proteinbalanse vil over tid gi en økning i muskelmasse (Deutz & Wolfe, 2013). Varig negativ proteinbalanse vil til motsetning føre til en reduksjon i muskelmasse (Deutz & Wolfe, 2013).

Skjelettmuskulaturen har gjennom samtidig syntese og nedbrytning en imponerende evne til å fornye dysfunksjonelle proteiner, og det har blitt anslått at utskiftningen av muskelproteiner tilsvarer 1-2 % per dag (Smith & Mittendorfer, 2015). Hastigheten på proteinsyntesen og proteinnedbrytningen blir påvirket av en rekke faktorer, inkludert styrketrening, inntak av næringsstoffer, sykdom, inaktivitet og aldring (Areta et al., 2014; Cermak, Res, de Groot, Saris, & van Loon, 2012; S. M. Phillips, 2009; Stuart M Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997; Rudrappa et al., 2016).

Proteinsyntesen er godt kartlagt gjennom målinger med stabile isotoper, men

proteinnedbrytningen er vanskeligere å kvantifisere in vivo fordi man er avhengig av mer indirekte metoder (Attaix, Baracos, & Pichard, 2012). Videre i denne teoridelen vil jeg først beskrive kort hvordan syntesen av nye muskelproteiner foregår, og deretter forklare mekanismene bak proteinnedbrytning med særlig fokus på autofagi.

2.3 Proteinsyntese

Gjennom proteinsyntese fornyes proteiner i skjelettmuskulaturen og ved behov sørger prosessen for vekst i muskelcellene (Millward, Garlick, Stewart, Nnanyelugo, & Waterlow, 1975). Prosessen er avhengig av at baserekkefølgen i genet kopieres (transkriberes) og fraktes som mRNA til ribosomene der det konverteres til å bli en aminosyrekjede (Schwanhäusser et al., 2011). En rekke stimuli påvirker signaleringen som styrer transkripsjonen og translasjonen i muskelcellene, blant dem trening, næringsinntak og hormoner (Burgos, Dai, & Cant, 2010). Styrketrening stimulerer også proteinsyntesen (Schoenfeld, 2010), men responsen varierer mye avhengig av treningsvolum og intensitet (Nicholas A Burd et al., 2010; Holm et al., 2010). Inntak av protein stimulerer også proteinsyntesen positivt, og i denne sammenhengen har myseprotein, som finnes naturlig i melk, vist seg å være spesielt effektivt for den raske stimuleringen etter inntak (Devries & Phillips, 2015). Proteinsyntesen vil øke når stimulus er trening eller næringsinntak alene, men effekten er størst når man kombinerer begge (Dideriksen et al., 2011). For å måle hastigheten på proteinsyntesen er det vanlig å benytte stabile isotoper som merkelapper på bestemte aminosyrer, og prosent inkorporert isotopmerkede aminosyrer i muskel per time angir syntesehastigheten, fractional synthetic rate (FSR) (Toffolo, Foster, & Cobelli, 1993).

2.3.1 Proteinsyntese og aldring

I noen studier er det indikert at eldre trenger et større inntak av protein enn yngre for å stimulere proteinsyntesen maksimalt (Pennings et al., 2012). Gaffney-Stomberg, Insogna, Rodriguez & Kerstetter (2009) antyder at eldre bør øke proteininntaket sitt med 50 % i forhold til anbefalingen slik at de inntar minimum 1,2 g/kg kroppsvekt daglig. I postabsorptiv fase (etter siste måltid er tatt opp i tarmen) har FSR i enkelte tilfeller vist seg å være mindre hos eldre (Nicholas A Burd, Gorissen, & van Loon, 2013; Irving et al., 2012; Short, Vittone, Bigelow, Proctor, & Nair, 2004), men på grunn av sprikende funn er generell konsensus per i dag at basal FSR i liten grad påvirkes av aldring (Markofski et al., 2015).

2.4 Proteinnedbrytning

På samme måte som det er viktig å erstatte proteiner som er brutt ned er det også livsviktig å kvitte seg med skadde, dysfunksjonelle og ødelagte proteiner. Overflødig protein som ikke blir brutt ned i muskulaturen vil kunne ta opp plass, og de kan over tid virke direkte ødeleggende for muskelfunksjonen (Goldberg, 2003). Proteinenes begrensede levetid gjør at cellene i kroppen bryter ned ca. 400 g protein daglig, og det syntetiseres samtidig like mye (Schutz, 2011). Når et protein brytes ned spaltes proteinet ned til aminosyrer ved hjelp av enzymer som bryter peptidbindingene mellom aminosyrene (Grune, Reinheckel, & Davies, 1997). Aminosyrene kan deretter gjenbrukes til å syntetisere nye proteiner. Sånn sett er nedbrytning essensielt for å tilføre aminosyrer i muskulaturen sammen med inntak i kosten. En defekt i et av systemene som bryter ned protein har faktisk vist seg å føre til muskelatrofi (Jung, Catalgol, & Grune, 2009; Sandri, 2010). Samtidig er kroppen avhengig av en oppregulering av ekspresjonen av proteiner som styrer proteinnedbrytningen for å stimulere til muskelatrofi (Jackman & Kandarian, 2004). Hvis proteinnedbrytningen blir stimulert i stor nok grad vil dette bare føre til tap av muskelmasse. For god muskelfunksjon og opprettholdelse av en normal muskelmasse er det dermed viktig at disse prosessene reguleres nøye.

2.4.1 Ubiquitin-proteasom-systemet (UPS)

Muskelproteiner brytes hovedsakelig ned gjennom to ulike prosesser, autofagi og ubiquitin-proteasom-systemet (UPS). Mindre proteiner i cytosol blir brutt ned av proteasomer gjennom UPS ved forbruk av ATP (Sakuma, Aoi, & Yamaguchi, 2015). Før proteinene blir kappet i mindre deler, må de merkes med ubiquitin, kjeder av et lite protein som bindes kovalent til proteinene som skal brytes ned. Proteasomet kan deretter fange og kappe av ubiquitinkjeden og deretter bryte ned proteinet til mindre deler. De ubiquitin-merkede proteinene brytes ned av 26S proteasome-komplekset som samtidig frigjør ubiquitin som kan brukes på nytt (Sakuma et al., 2015). Sakuma et al. (2015) beskriver tre enzymer som er ansvarlige for reguleringen av ubiquitineringen: ubiquitin-activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2) og ubiquitin ligase (E3). Av disse ser det ut til at E2 og E3 kan være spesielt viktige. mRNA-ekspresjon for E3-ligasene atrogin-1 og MurF1 har vist seg å øke ved muskelatrofi (Bodine & Baehr, 2014). Disse to ligasene ser ut til å være spesielt viktige for muskelatrofi, og de er mye studert i forbindelse med UPS (Bodine & Baehr, 2014).

MuRF1 og atrogen-1 sine funksjoner ser ut til å involvere binding av bestemte substrater for ubiquitinerings og påfølgende nedbrytning i 26S-proteasom-komplekset (Bodine & Baehr, 2014). MuRF1 ubiquitinerer mange muskelspesifikke proteiner som myosin heavy chain, myosin light chain og titin (Dahl & Jensen, 2016). Om atrogen-1 også har direkte funksjon på kontraktile proteiner er usikkert, men den styrer transkripsjonsfaktorer og stimulerer generelt til atrofi (Dahl & Jensen, 2016). Økt ekspresjon av mRNA for MuRF1 og atrogen-1 vil derfor kunne indikere økt proteinnedbrytning i proteasomene.

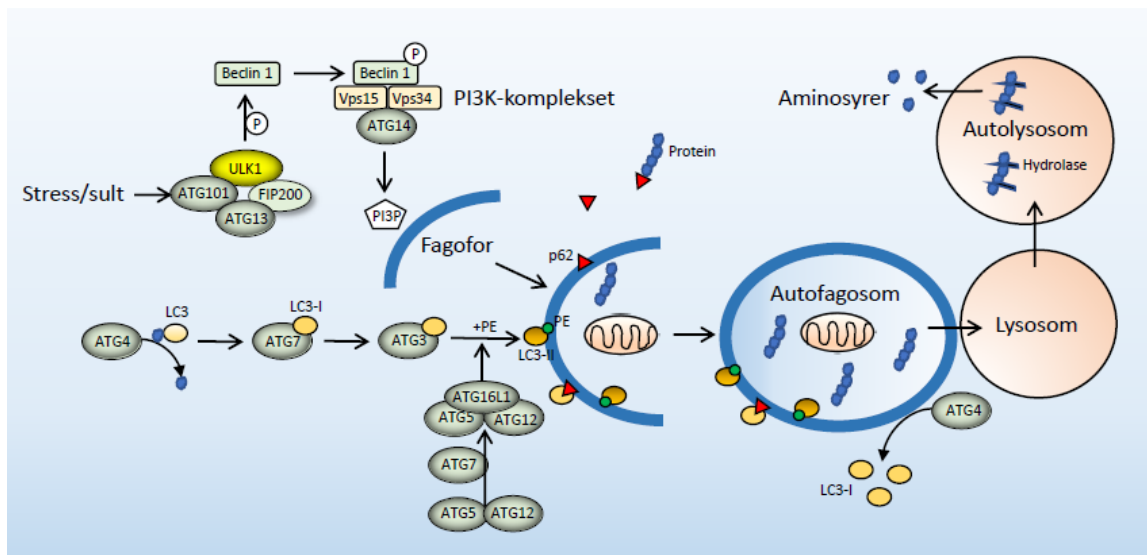
Studier som har målt mRNA-ekspresjon for atrogen-1 og MuRF1 hos eldre har vist sprikende funn. Altun et al. (2010) påviste en moderat økning, Whitman, Wacker, Richmond & Godard (2005) ingen endring mens Edström, Altun, Hagglund & Ulfhake (2006) påviste en reduksjon. Fry et al. (2013) fant en økning i MuRF1 og atrogen-1 akutt etter en styrketreningsøkt, men ingen aldersrelatert forskjell. Om UPS reduseres med aldring er derfor usikkert, men det ser mest sannsynlig ikke slik ut. Derfor vil hovedfokuset i denne oppgaven være på autofagi. Det eksisterer mindre forskning på autofagi, og mesteparten av denne forskningen er gjort på dyr. Enkelte studier av gnagere tyder på at autofagien kan være svekket med aldring (Y. A. Kim et al., 2013; McMullen et al., 2009; Wohlgemuth et al., 2010).

2.4.2 Autofagi

Autofagi er en katabol prosess som bryter ned og resirkulerer aminosyrer fra store proteiner og organeller i cytosol via lysosomene (Jiao & Demontis, 2017). Begrepet autofagi, som betyr «selvfortæring» på gresk, er det samme som autofagocytose og betegner transportmekanismene som frakter komponenter til lysosomene for nedbrytning (Parzych & Klionsky, 2014). Autofagien er i stand til å bryte ned de største strukturene i cytosol, inkludert mitokondrier, ribosomer og peroksisomer (Kundu et al., 2008; Lee, Giordano, & Zhang, 2012; Till, Lakhani, Burnett, & Subramani, 2012). Store aggregater av feilfoldede proteiner som ikke blir brutt ned raskt, brytes også ned i lysosomene via autofagi (Ravikumar, Duden, & Rubinsztein, 2002). Autofagi er aktiv i alle eukaryote celler og opererer i de fleste vev i kroppen hos mennesker. Prosessen spiller en avgjørende rolle for at celler skal vokse og utvikle seg, og den er også viktig for homeostasen i cellen (Parzych & Klionsky, 2014). Siden autofagiprosessen bryter ned proteiner bidrar den også til å regulere proteinbalansen. Autofagisystemet sørger for

å bryte ned skadde eller svekkede proteiner, og er derfor sammen med UPS avgjørende for resirkuleringen av dysfunksjonelle og potensielt skadelige proteiner i cellen (Yang & Klionsky, 2010). På den måten kan prosessen bidra til å forebygge visse typer nevrodegenerasjon og kreft, og den har også vist seg å bidra til å fjerne patogener (Mizushima & Klionsky, 2007). Siden autofagi ser ut til å reduseres med aldring (Y. A. Kim et al., 2013; McMullen et al., 2009; Wohlgemuth et al., 2010) og vi allerede vet at autofagi er viktig for muskelfunksjonen, kan det tenkes at svekkelser i autofagisystemet kan bidra til redusert muskelkvalitet med aldring, og nettopp dette spørsmålet undersøkes i denne oppgaven.

Det finnes ulike typer autofagi; mikroautofagi, selektiv autofagi, chaperon-mediert autofagi og makroautofagi, og disse beskrives grundig i en review av Glick, Barth, and Macleod (2010). Under mikroautofagi invaginerer lysosommembranen og danner en liten blære med deler av cytosol, eller bestemte organeller i området rundt lysosomet, hvor substansene brytes ned. Selektiv autofagi bryter ned utvalgte organeller, fettdråper eller proteiner. Chaperon-mediert autofagi benytter et hjelpeprotein, chaperon-protein, som gjenkjenner utpekte sekvenser av aminosyrer som skal brytes ned. Den tredje formen for autofagi, makroautofagi, er den mest studerte med tanke på muskelprotein- nedbrytning og -funksjon og derfor vil denne heretter bli omtalt som autofagi og få hovedfokuset i denne oppgaven. Makroautofagi er en ikke-selektiv prosess der store deler av cytoplasma, eller til og med hele organeller, pakkes inn av en flat dobbelmembranskive, fagofor, som danner en lukket vesikkel kalt autofagosom. Prosessen starter med dannelsen av fagoforet som videre elongerer helt til membranskiva har lukket seg rundt bestanddelene som skal brytes ned. Fagoforet har nå blitt til et autofagosom, en vesikkel som transporterer proteinene og organellene til lysosomene. Autofagosomene smelter deretter sammen med lysosomene og danner et autolysosom der autofagosomet og dens proteiner brytes ned til aminosyrer som senere kan benyttes til å syntetisere nye proteiner. Figur 2.1 viser de mest sentrale stegene i autofagiprosessen.



Figur 2.1: Overblikk over autofagiprosessen. Figuren er basert på arbeidet til Lippai & Szatmari (2017), Martinez-Lopez et al. (2015), Rubinsztein, Marino og Kroemer (2011) og Tanida (2011).

Glick et al. (2010) beskriver videre mekanismene i forbindelse med makroautofagi. Makroautofagi reguleres nøye under basale forhold, under sult og ved stress ved hjelp av ATG-proteiner (autophagy-related genes). Autofagiprosessen aktiveres ved sult eller stress, og i første omgang er et fagofor avhengig av ULK-1 og et kompleks med ATG13, FIP200 og ATG101 for å elongere. ULK-1 fosforilerer og aktiverer et nytt protein, Beclin-1, som sammen med ytterligere flere proteiner danner Class III phosphoinositide 3-kinase (PI3K) -komplekset. Dette komplekset får PI3Ps til å rekruttere ATG-proteiner til autofagosom-dannelsen. Aktivering av ATG7 danner forbindelse mellom ATG5 og ATG12 som inkorporeres i kompleks med ATG16L1. Dette komplekset bidrar til lipidering av LC3-I i cytosol til LC3-II i membranen til fagoforet, og denne konverteringen sørger for at vesikkelen lukkes og blir et autofagosom. Autofagosomet kan deretter ta med seg proteiner til lysosomene der proteinene og autofagosomet selv brytes ned ved hjelp av sterk syre og hydrolytiske enzymer.

2.4.3 Autofagi og aldring

Senere studier har demonstrert at autofagi er avgjørende for å beholde muskelmasse og funksjon (Jiao & Demontis, 2017). En rekke studier hvor proteiner involvert i autofagi har blitt målt, har konkludert med at aldring reduserer effektiviteten til autofagien hos gnagere (Y. A. Kim et al., 2013; McMullen et al., 2009; Wohlgemuth et al., 2010), noe

som fører til en opphopning av intracellulære avfallsprodukter (Y. A. Kim et al., 2013). Akkumulering av skadde og dysfunksjonelle proteiner og organeller kan begrense muskelfunksjonen (Y. A. Kim et al., 2013). Svekkelser i autofagisystemet kan derfor bidra til sarkopeni og redusert muskelkvalitet, men det er fortsatt behov for mer forskning på feltet.

Det er vanskelig å si akkurat hvilke mekanismer som gjør at autofagien fungerer dårligere med aldring, da det er mange faktorer som spiller inn og fordi forklaringen sannsynligvis er kompleks (Martinez-Lopez et al., 2015). Dannelsen og nedbrytningen av autofagosomene kan være redusert, enten på grunn av manglende sammensmelting med lysosomene eller en redusert aktivitet i lysosomene (Höhn et al., 2017).

Nedregulering av ATG-proteiner kan muligens også bidra til redusert autofagi med aldring (Martinez-Lopez et al., 2015). Fjerning av ATG-proteiner («gene-knock-out-modeller») hos yngre mus har vist seg å gi en rekke symptomer assosiert med aldring inkludert akkumulering av fett i muskulaturen (Singh et al., 2009), defekte mitokondrier (I. Kim, Rodriguez-Enriquez, & Lemasters, 2007), nevrodegenerasjon (Komatsu et al., 2006) og redusert muskelmasse (Masiero et al., 2009).

Transkripsjonen av viktige ATG-proteiner som ATG5 og ATG7 har vist seg å være nedregulert i hjernen hos eldre mennesker (Lipinski et al., 2010). Hos gnagere har man sett en aldersrelatert nedgang i proteolysen, spaltningen av proteinkjeder til kortere kjeder eller aminosyrer, både in vivo og in vitro i isolerte hepatocytter fra disse dyrene (Donati et al., 2001). LC3-II og Beclin-I i helhomogenatprøver har også vist seg å være nedregulert med aldring (Y. A. Kim et al., 2013). I en studie av Sakuma et al. (2016), der de gjorde målinger i cytosolfraksjon, var dessuten p62 akkumulert hos eldre mus sammenlignet med yngre mus, og Beclin-1 var redusert. Aldring har i tillegg vist seg å ha sammenheng med hyperfosforylering og dermed hyperaktivering av mTORC1 (Ravikumar et al., 2004). Dette proteinkomplekset kontrollerer proteinsyntese, og blir stimulert av næringsinntak og styrketrening (Hay & Sonenberg, 2004).

Hyperfosforylering av mTORC1 vil hemme autofagien gjennom å inhibere ULK-1 (J. Kim, Kundu, Viollet, & Guan, 2011). Det er foreløpig vanskelig å si om det er reduksjon i ATG-proteinene eller redusert intracellulær signalering som er årsak til endringer i autofagi med aldring (Martinez-Lopez et al., 2015; Rea, Majcher, Searle, & Layfield, 2014). Det kan være spesielt vanskelig å tolke resultater fra intracellulær

signalering. En reduksjon i en autofagimarkør kan bety at det er mindre aktivitet i autofagisystemet, men dette trenger ikke alltid være tilfellet. En akkumulering av en autofagimarkør kan også representere en propp i systemet slik at resten av prosessen ikke fungerer optimalt (Sakuma et al., 2016). Ulike tolkninger av endringer i de ulike autofagimarkørene vil belyses nærmere senere i denne oppgaven.

2.4.4 p62/SQSTM1

p62/SQSTM1, heretter kun kalt p62, er et protein som sørger for en selektiv utvelgelse av proteiner for nedbrytning ved at det binder ubiquitinerte proteinaggregater for autofagi (Johansen & Lamark, 2011). Proteiner og proteinaggregater blir på den måten rekruttert til fagoforet (Johansen & Lamark, 2011). p62 er et adaptorprotein med mange domener som binder seg til proteinkomplekser (Lin et al., 2013). Det fungerer også som et viktig bindeledd til LC3 ved at det binder LC3-I på innsiden av autofagosomet (Pankiv et al., 2007). Det spekuleres i at akkumulering av dette proteinet har sammenheng med defekt autofagi, siden man har sett økt mengde p62 i cytosolfraksjon når man fjerner ATG-proteiner (“gene-knock-out”) hos eldre mus (Sakuma et al., 2015). Hvis resten av autofagiprosessen ikke fungerer som den skal vil p62 på den måten ikke bli brutt ned og derfor akkumuleres. Dermed ser det ut som en redusert mengde p62 vil indikere aktivert autofagi. En økning i p62 vil også kunne indikere en økning i aktiviteten i autofagien dersom man antar at resten av systemet fungerer som det skal.

2.4.5 LC3

LC3 er et annet reseptorprotein i autofagiprosessen som har vist seg å spille en avgjørende rolle for dannelsen av autofagosomet. Dette proteinet eksisterer i første omgang fritt i cytosol der ATG4 kutter av aminosyrehalen på LC3 slik at den går over til den aktive formen, LC3-I (Kabeya et al., 2000). LC3-I binder seg deretter kovalent til fosfatidyletanolamin (PE), et fosfolipid i fagofor membranen (Lippai & Szatmari, 2017). ATG7 og ATG3 aktiverer i neste omgang LC3-I som konverteres til LC3-II. Sistnevnte protein binder seg både til den indre og ytre delen av autofagosommembranen og sørger for at membranen elongerer slik at vesikkelen lukkes og blir til et autofagosom (Lippai & Szatmari, 2017). En økt mengde LC3-II vil derfor indikere flere autofagosomer i hvile og dermed også økt autofagi (Mizushima & Yoshimori, 2007). LC3-II/LC3-I-ratioen har blitt påstått å være en god indikator på aktiviteten i autofagien, siden den sier noe om andelen LC3-I som konverteres til LC3-II (Sakuma et al., 2015), men det er

viktig å merke seg at denne ratioen utelater informasjon om endringer i LC3-I og LC3-II separat (Wohlgemuth et al., 2010). Det er derfor en fordel å oppgi proteinnivåer av LC3-I og LC3-II i tillegg til LC3-II/LC3-I-ratioen for å få informasjon om hvilket av proteinene som driver en eventuell endring i ratioen. Wohlgemuth et al. (2010) påviste en tydelig økning i mengden LC3-I og LC3-II i cytosolfraksjon med aldring hos rotter, men de klarte ikke demonstrere noen aldersrelatert økning i LC3-II/LC3-I-ratioen.

2.4.6 Autofagi og perioder med trening hos eldre

Som nevnt tidligere øker muskelkvaliteten hos eldre som trener styrketrening (Ivey et al., 2000; Tracy et al., 1999). Hvis det er slik at autofagien oppreguleres samtidig kan det være en sammenheng mellom muskelkvalitet og autofagi. Mesteparten av forskningen som er gjort på trening og autofagi hos eldre er imidlertid gjort på utholdenhetstrening. Målinger av autofagiproteiner i disse studiene indikerer generelt en oppregulering av autofagien både hos mus og mennesker (Y. A. Kim et al., 2013; Mejias-Pena et al., 2016; White et al., 2016). Resten av denne teoridelen vil fokusere på styrketrening siden det er den treningsformen vi har benyttet i vår studie. Studier på både dyr og mennesker indikerer at også styrketrening kan oppregulere autofagisystemet hos eldre individer (Luo et al., 2013; Mejias-Pena et al., 2017).

Luo et al. (2013) testet eldre rotter etter 9 uker med motstandstrening, der rottene klatret trapper med vektlodd festet til halen. Målingene deres ble gjort i cytosolfraksjon og viste en økning i Beclin-1, ATG5/12, ATG7 og en reduksjon i p62. De konkluderte derfor med at styrketrening kan aktivere autofagi, og denne økningen var assosiert med endringer i IGF-1 og dens reseptorer samt Akt/mTOR og Akt/FOXO3a –signalveiene. Videre var LC3-II/LC3-I-ratioen i cytosolfraksjon redusert etter treningsperioden, hovedsakelig som følge av redusert LC3-II, siden LC3-I var uendret. Styrketrening og autofagi har nylig også blitt studert på mennesker. I en studie av Mejias-Pena et al. (2017) konkluderes det med at en periode med styrketrening kan oppregulere autofagien hos eldre kvinner og menn. Deltakerne i denne studien hadde en gjennomsnittsalder på 70 år og trente et program med beinpress to ganger i uka i 8 uker med en motstand tilsvarende 60-80 % av 1RM. Målinger av autofagimarkører ble gjort på venøst blod og avdekket en økning i Beclin-1, ATG12, ATG16 og LAMP-2 som følge av perioden med styrketrening, mens p62 og fosforylert ULK-1 samtidig var signifikant redusert (Mejias-Pena et al., 2017). LC3-II/LC3-I-ratioen hadde dessuten en tendens til økning ($p < 0,1$).

Siden disse målingene ble gjort på venøst blod er det vanskelig å relatere resultatene deres til studier som har analysert muskelprøver. Målinger i venøst blod vil kun reflektere nivåer i sirkulasjonssystemet, og ikke lokalt i muskulaturen. Videre målte Hentila et al. (2018) autofagimarkører i helhomogenatprøver hos eldre mennesker (61±6 år) som følge av en 21 uker-lang periode med styrketrening. Deltakerne i denne studien trente et fullkroppsprogram to ganger i uka med hovedvekt på kneekstensjon og beinpress med en belastning tilsvarende 40-60 % av 1RM. Denne treningen hadde ingen effekt på hverken p62, LC3-I eller LC3-II. Hos de yngre forsøkspersonene, som også var med i denne studien, økte derimot LC3-II som følge av tilsvarende styrketreningsperiode, men siden det i dette tilfellet ikke så ut til at autofagien var stimulert av en periode med styrketrening kan det kanskje være for tidlig å konkludere med at styrketrening over tid oppregulerer autofagi hos eldre mennesker.

Det er viktig å understreke at statiske målinger av mRNA eller proteininnhold ikke kan måle den faktiske autofagihastigheten. LC3-II-innhold vil være påvirket av autofagihastigheten, men LC3-II alene vil ikke kunne skille mellom økning eller reduksjon i hastigheten (Tanida, Minematsu-Ikeguchi, Ueno & Kominami, 2005). For å få mer informasjon om autofagiprosessen er man derfor avhengig av å måle andre proteiner i tillegg, og gjerne gjøre målinger av mRNA også (Rubinsztein, Marino, & Kroemer, 2011). I mangel på tilstrekkelig mengde studier på mennesker omtales det mye forskning på gnagere i denne oppgaven. Det er åpenbart ikke ideelt å relatere dyremodeller til studier av mennesker, men denne forskningen gir oss likevel nyttig informasjon med tanke på at motstandstrening forårsaker mange av de samme muskulære adaptasjonene hos gnagere som hos mennesker (Philippe et al., 2015).

2.4.7 Autofagi og akuttrespons av treningsøkter og proteinsupplement

Få studier har undersøkt akutteffekt av en styrketreningsøkt og proteinsupplement på autofagistimulerende proteiner hos eldre mennesker, men data fra dyrestudier og yngre kan gi oss relevant informasjon. He et al. (2012) fant en akutt økning i LC3-II/LC3-I-ratioen og en reduksjon i p62 når de analyserte lysater fra cerebral cortex i hjernen ved løp til utmattelse hos yngre mus. I en annen studie av Fritzen et al. (2016) ble det gjort målinger i muskelprøver fra *m. vastus lateralis* hos mus ved løp på submaksimal belastning (50 % av maksimal hastighet). I denne studien var p62 uendret, mens LC3-II/LC3-I-ratioen økte. Det ser altså ut til at en utholdenhetstreningsøkt stimulerer

autofagien, og dette ser også ut til å kunne være tilfellet hos eldre. Lenhare et al. (2017) påviste nettopp dette da de testet eldre mus i forbindelse med en times lang økt med svømming der de målte autofagimarkører i muskel i helhomogenatprøver. Åtte timer etter økta var p62 redusert, LC3-I uendret mens LC3-II økte. ULK-1-fosforylering, ATG5 og ATG7 økte også.

Styrketrening ser ut til å gi en litt annen akutt respons i autofagien hos mennesker. I en studie av Fry et al. (2012) gjennomførte eldre kvinner og menn (70 ± 2 år) en styrketreningsøkt med 8 serier kneekstensjon på 70 % av 1RM med 10 repetisjoner. Biopsier fra *m. vastus lateralis* ble tatt 3, 6 og 24 timer etter økta, og LC3-II/LC3-I-ratioen i helhomogenat var signifikant redusert på alle tre tidspunkt. Det var forøvrig ingen forskjell når de sammenlignet responsen med yngre. Ved å ta en nærmere titt på denne studien kan man se at de eldre har relativt lik fettfri masse og muskelmasse som de yngre. Dermed kan responsen være en annen hos eldre med lavere funksjonsnivå. I en nyere studie av Hentila et al. (2018) ble det målt autofagimarkører i helhomogenat i etterkant av en styrketreningsøkt hos både eldre og yngre utrente mennesker. De eldre deltakerne i denne studien var 61 ± 6 år og gjennomførte en økt bestående av beinpress med 5 serier på 10 RM. Førtiåtte timer etter økta var p62, LC3-I og LC3-II uendret. Derimot var responsen en annen hos de yngre (26 ± 4 år). Hos de yngre var både p62 og LC3-I uendret, mens LC3-II var redusert en time etter styrketreningsøkta. Derimot hadde både p62, LC3-I og LC3-II økt 48 timer etter økta. Autofagien ser, ifølge denne studien, ut til å være oppregulert som følge av en styrketreningsøkt hos yngre, men ikke hos eldre, og denne effekten blir først tydelig to døgn etter styrketreningsøkta. Tidspunktet muskelbiopsiene tas på ser med andre ord ut til å være avgjørende for hvilken ekspresjon vi ser av de ulike autofagimarkørene. En biopsi vil bare representere et øyeblikksbilde, og resultatene fra disse studiene må derfor tolkes med forsiktighet. I tillegg vil hvilken fraksjon man måler i, og om ser endring mellom fraksjoner være av betydning for hvordan man tolker disse endringene.

Studier av dyremodeller indikerer at proteininntak alene vil redusere proteinnedbrytning hos eldre (Nagasawa, Kido, Yoshizawa, Ito, & Nishizawa, 2002; Nakashima, Ishida, Yamazaki, & Abe, 2005). Glynn et al. (2010) har demonstrert at høyere dose av den essensielle aminosyren, leucin, uten trening, kan redusere muskelproteinnedbrytning hos yngre, mest sannsynlig gjennom å påvirke hastigheten på autofagien. Målingene

deres i helhomogenatprøver viste en reduksjon i LC3-II en time etter proteininntak og to timer etter en styrketreningsøkt, mens LC3-I var uendret. Videre studerte Dickinson et al. (2017) eldre, og fant en signifikant reduksjon i mengden LC3-II i helhomogenat to timer etter en styrketreningsøkt og proteininntak, noe som indikerer svekket autofagi i dette tidsrommet. Interessant nok steg nivået av LC3-II såpass mye det påfølgende døgnet slik at det 24 timer senere ikke lenger var forskjell fra baseline. Allikevel, høyere inntak av leucin så ut til å favorisere en større reduksjon i basal nedbrytning av autofagosomer 24 timer etter treningsøkta (Dickinson et al., 2017). Høyere inntak av leucin vil gi en større mengde leucin tilgjengelig intracellulært, noe som ved flere anledninger har vist seg å føre til en reduksjon i LC3-II i helhomogenatprøver (Glynn et al., 2010; Yan et al., 2012).

2.4.8 Sammendrag

Med aldring reduseres muskelkvaliteten, målt som maksimal styrke relativt til muskeltverrsnitt. Ubiquitin-proteasom-systemet og autofagi sørger for å fjerne dysfunksjonelle proteiner i muskelcellene, og hvis overflødige og skadelige proteiner ikke blir brutt ned kan de hemme muskelfunksjonen. En rekke studier på dyr, der de har målt autofagimarkører, indikerer en aldersrelatert reduksjon i autofagi. Det er derfor mulig at svekkelser i autofagien kan ha sammenheng med endringer i muskelkvalitet med aldring. Autofagiprosessen sørger for å bryte ned de største proteinkomponentene i cytosol ved å danne en vesikkel, et autofagosom, rundt proteinene som skal brytes ned. De autofagiregulatoriske proteinene, p62, LC3-I og LC3-II spiller en avgjørende rolle for dannelsen av autofagosomene, og mengden av disse proteinene har i flere studier vist seg å være forskjellig hos eldre i forhold til yngre. Perioder med styrketrening har vist seg å kunne reversere aldersrelaterte endringer i autofagi både hos rotter og mennesker, blant annet ved at LC3-II økte i de fleste av disse tilfellene, noe som indikerer flere autofagosomer etter en treningsintervensjon. Som følge av en akutt styrketreningsøkt og proteininntak viser imidlertid noen studier redusert LC3-II/LC3-I-ratio hos eldre i de første timene etter økta, og det ser ut til at biopsitidspunkt er avgjørende for hvilken ekspresjon vi ser av de ulike proteinene.

Det eksisterer lite forskning på autofagi og aldring hos mennesker, og svært få har undersøkt effekten av styrketrening på autofagi hos eldre mennesker. I denne studien ønsket vi derfor å undersøke hvordan styrketrening, akutt og over tid, påvirker viktige

regulatorer av autofagi hos eldre kvinner og menn med redusert funksjonsnivå. Den aldersrelaterte reduksjonen i muskelkvalitet har store konsekvenser for den daglige funksjonsevnen. Hvis man får en bedre forståelse for hvilke cellulære endringer som ligger til grunn, vil man ha bedre forutsetninger for å utvikle strategier som kan bremse eller motvirke nedgangen i muskelkvalitet.

3. Metode

Resultatene i denne masteroppgaven er hentet fra STAS (Styrketrening, aldring og sarkopeni), gjennomført på Norges idrettshøgskole. Datainnsamlingen ble gjort i to runder, høsten 2016 og høsten 2017. Hensikten med prosjektet var å undersøke faktorer som påvirker muskelkvaliteten hos eldre med lavt funksjonsnivå og hvordan 10 uker med tung styrketrening påvirker disse faktorene. Prosjektet ble godkjent av regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Sør-Øst Norge og gjennomført i tråd med Helsinkideklarasjonen. Forsøkspersonene signerte informert samtykke og ble informert om potensielle risikoer ved å delta i prosjektet (vedlegg 1).

Prosjektet i 2017 ble gjennomført med utgangspunkt i tilsvarende prosjekt i 2016. Høsten 2016 fullførte 14 forsøkspersoner, 7 i intervensjonsgruppa og 7 i kontrollgruppa. På grunn av det lave antallet deltakere, ble det høsten 2017 og vinteren 2018 gjennomført en ny runde. I denne oppgaven benyttes resultater fra begge rundene av prosjektet. Det ble gjennomført en omfattende mengde tester i begge rundene av STAS-prosjektet, men denne metoddelen vil kun beskrive testene som er relevante for å besvare problemstillingene presentert innledningsvis.

3.1 Studiedesign

Prosjektet ble gjennomført som en kontrollert randomisert studie. Forsøkspersonene ble randomisert til to grupper, en intervensjonsgruppe (ST+PRO) og en kontrollgruppe (PRO). Intervensjonsgruppa gjennomførte en 10-ukers treningsperiode med tung styrketrening to ganger per uke og inntok proteintilskudd (333ml Tine styrk) hver dag gjennom hele perioden. Kontrollgruppa inntok også det samme proteintilskuddet daglig i samme periode, men gjennomførte ikke noe trening. Kontrollgruppa fikk tilbud om tilsvarende treningsoppfølging i 10 uker etter endt intervensjon og to av deltakerne i kontrollgruppa i 2016-prosjektet ble testet på nytt etter treningsperioden. Resultatene fra disse er inkludert i denne oppgaven. Vi ønsket at funksjonsnivået skulle være likt i de to gruppene, og det ble derfor gjennomført en stratifisert randomisering basert på relativ muskelstyrke, stoltest og ganghastighet.

3.2 Utvalg

3.2.1 Rekruttering

I løpet av prosjektet ble 30 forsøkspersoner i alderen 67-96 år rekruttert fra sykehjem, aldershjem og boliger tilknyttet seniorsentre i Oslo (19 i ST+PRO og 14 i PRO). Til sammen fullførte 25 deltakere prosjektet, 12 i ST+PRO og 13 i PRO. Informasjonsskriv ble utdelt til potensielle forsøkspersoner, og både forsøkspersoner og ansatte ved sykehjem/eldresentre ble informert ved at representanter fra prosjektet reiste ut og besøkte dem. I enkelte tilfeller ble i tillegg pårørende kontaktet og informert. På grunn av stort frafall i ST+PRO den første runden av prosjektet i 2016, fikk deltakerne i PRO tilbud om å gjennomføre samme treningsperiode som ST+PRO, for deretter å gjennomføre tester på nytt etter treningen. 7 deltakere i PRO ønsket å delta på dette, og fem av dem fullførte treningsperioden. Totalt presenteres derfor 17 deltakere i ST+PRO, og 13 deltakere i PRO. Fem deltakere inngår i begge grupper. To deltakere i PRO tok nye biopsier etter treningsperioden, og resultater fra disse og resten av testene til PRO etter treningsperioden er inkludert i denne oppgaven. Antall forsøkspersoner for de ulike variablene er varierende siden noen deltakere av ulike årsaker ikke kunne gjennomføre enkelte tester. Vi fikk ikke biopsi fra enkelte deltakere på grunn av medisinbruk, fordi vi ikke greide å ta biopsi på grunn av liten muskelbuk og/eller mye underhudsfett, og fordi kvaliteten på muskelbiopsiene i noen tilfeller ikke var tilfredsstillende.

3.2.2 Inklusjons- og eksklusjonskriterier

Fried Frailty Criteria ble brukt for å undersøke om forsøkspersonene var egnet for å bli med i prosjektet (vedlegg 2). Den opprinnelige Fried Frailty Criteria består av fem forskjellige faktorer (vektreduksjon, svakhet, dårlig utholdenhet, treghet og lavt aktivitetsnivå) som gir en score fra 0-5 poeng (Fried et al., 2001). En eldre person (>65 år) blir regnet som skrøpelig hvis tre eller flere av disse kriteriene er oppfylt. Personer som oppfyller ett eller to av kriteriene regnes som «pre-skrøpelige». Alle personene som ble karakterisert som «skrøpelige» ble inkludert i prosjektet. I tillegg ble personer karakterisert som «pre-skrøpelige» inkludert hvis de oppfylte to av følgende tre kriterier: svakhet, treghet, lavt funksjonsnivå. Alle potensielle forsøkspersoner gjennomførte i tillegg Short Physical Performance Battery (SPPB) (vedlegg 3) før inkludering. Personer med lav score (0-6) på SPPB-testen ble regnet som kvalifisert for deltakelse, uavhengig av kategorisering basert på Fried criteria for frailty. Det ble også gjennomført måling av blodtrykk og blodprofil (kolesterol, glukose, triglyserider), og

alle forsøkspersonene måtte fylle ut egenerklæring om helse (vedlegg 4) som grunnlag for å vurdere helserisiko ved deltakelse. Personer med muskelsykdommer eller helseproblemer som umuliggjorde testing og/eller trening ble ekskludert. I tillegg ble personer med laktoseintoleranse eller melkeallergi ekskludert.

3.3 Testing

Samtlige tester beskrevet i denne metoddelen ble gjennomført på Norges idrettshøgskole, med unntak av Computed Tomography (CT), som ble gjennomført på Aleris Røntgen (Oslo City).

3.3.1 Maksimal styrke (1RM)

Maksimal styrke ble testet i ett-beins kneekstensjon i et Gym2000-apparat (Gym Equipment, Vikersund, Norway) på hvert bein separat (unilateralt). Oppvarmingen bestod av 5 minutter sykling på 70 watt og en spesifikk oppvarming i kneekstensjonsapparatet. Den spesifikke oppvarmingen bestod av tre sett med 10, 6 og 3 repetisjoner med gradvis økende belastning. Deretter ble det gjennomført maksimale forsøk på annenhvert bein helt til forsøkspersonene ikke lengre var i stand til å løfte ytterligere vekt til godkjent høyde. Det første forsøket ble gjort på en vekt 5-10 % under forventet 1RM, og for hvert forsøk ble vekta økt med omtrent 2,5-5 %. Hvert forsøk var adskilt av 2-3 minutters pause. Under forsøkene ble forsøkspersonene instruert til å ta i maksimalt, og de ble muntlig oppmuntret helt til de hadde nådd tilstrekkelig ekstensjon. For å forhindre at forsøkspersonene benyttet seg av det andre beinet ble motsatt bein fysisk holdt igjen under forsøkene. En pinne ble festet horisontalt over vektskivene for å angi godkjent ekstensjon. Pinnen ble festet på ulike steder avhengig av forsøkspersonenes bevegelse i kneleddet, men ble festet på nøyaktig samme sted på post-testen. Forsøket ble godkjent så lenge toppen på den øverste vektskiva berørte pinnen. Alle innstillingene ble notert for hver forsøksperson på pre-testene slik at de samme innstillingene ble brukt på post-testene.

3.3.2 Maksimal isometrisk voluntær kontraksjon (IMVC)

IMVC ble testet på begge bein separat (unilateralt) sittende i et kneekstensjonsapparat (GYM 2000 Gym Equipment, Geithus, Norway) med 90 ° i kneleddet og ankelen pressende mot en kraftcelle (HBM U2AC2, Darmstadt, Germany) festet til Labview 8.2 analysis software (National instr., Austin, Texas). Før forsøkene varmet

forsøkspersonene opp ved å sykle 5 minutter på ergometersyssel. Deretter gjennomførte de tre submaksimale isometriske kontraksjoner med begge bein i kneekstensjonsapparatet med 5 sekunders varighet på 25, 50 og 75 % av maksimalt dreiemoment. Hver oppvarmingskontraksjon var separert med 10 sekunders pause. Forsøkspersonene gjennomførte så tre IMVC-forsøk med 5 sekunders varighet der de ble instruert til å produsere maksimal kraft så hurtig som mulig.

3.3.3 Stoltest

Stoltest ble gjennomført på samme standardiserte stol for alle deltakerne. Deltakerne ble instruert til å reise seg 5 ganger fra stolen så hurtig som mulig, og tiden ble målt med stoppeklokke fra deltakerne startet bevegelsen til knærne var rettet ut på den femte repetisjonen. Under forsøkene fikk deltakerne beskjed om å holde armene på brystet, rette kneleddet fullstendig ut på toppen av bevegelsen og lette beina fra gulvet før hver repetisjon. Deltakerne fikk inntil tre forsøk, og testen ble avsluttet når deltakerne ikke var i stand til å forbedre resultatet sitt. Enkelte deltakere benyttet armene for å reise seg, og i disse tilfellene ble dette notert og gjennomført på samme måte etter intervensjonen.

3.3.4 Ganghastighet

Tid på 6 meter gange ble målt med fotoceller (Brower Timing Systems, USA). Deltakerne ble først instruert til å gå i sitt vanlige gangtempo og deretter gå så raskt de var i stand til uten å ta noen sjanser. Det ble gjennomført tre forsøk på hver av de to hastighetene og deltakerne startet og avsluttet hvert forsøk med to meters avstand fra fotocellene. Ved bruk av hjelpemidler som rullator eller stokk ble dette notert og gjennomført på samme måte etter intervensjonen. I denne oppgaven presenteres kun resultatet fra selvvalgt ganghastighet (vanlig gangtempo).

3.3.5 CT (Computed Tomography)

Får å få informasjon om tverrsnittsareal og mengde ikke-kontraktile vev ble det gjennomført CT-scan av hamstrings og quadriceps på begge bein hos Aleris Røntgen på Oslo City før og etter intervensjonen. Bildene ble tatt på 1/3, 1/2 og 2/3 av lengden mellom trochanter major og leddspalte i kneet. I denne oppgaven benyttes kun resultatet fra det midtre snittet på *m. quadriceps femoris*.

3.4 Akuttdag

Forsøkspersonene møtte fastende på NIH og inntok en standardisert frokost bestående av havregryn og vann. En time senere ble det tatt en muskelbiopsi fra m. vastus lateralis. 30 minutter etter dette gjennomførte forsøkspersonene en unilateral isometrisk maksimal voluntær kontraksjons-test (IMVC). Deretter fulgte en styrketreningsøkt i kneekstensjon som varte i 19 minutter. I denne økta ble det gjennomført 6 serier på estimert 8 RM, der hver serie startet hvert tredje minutt. Øyeblikkelig etter økta inntok forsøkspersonene proteinsupplement (én enhet Tine Styrk). To og en halv time etter endt treningsøkt ble det tatt en ny muskelbiopsi fra det samme snittet.

3.5 Muskelbiopsier

Muskelbiopsier ble tatt fra m. vastus lateralis mens forsøkspersonene lå i en supinert posisjon. Området for biopsitaking ble først desinfisert med klorhexidin og deretter lokalbedøvet (Xylocaine adrenaline, $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} + 5 \mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$, AstraZeneca, London, UK). Etter bedøvelsen ble det laget et 1-2 cm langt, og 15-20 mm dypt snitt i huden og muskelfasciaen med en skalpell. En 6 mm Bergström biopsinål (Pelomi, Albertslund, Danmark) ble ført inn gjennom snittet og posisjonert i enten distal eller proksimal retning. Der ble det tatt 1-3 små muskelprøver (omtrent 150 mg totalt), og biopsinåla var koblet til en vakuumsprøyte for å trekke vevet inn i nåla. Begge muskelbiopsiene på akuttdagen ble tatt fra det samme snittet, men i ulike retninger (distalt og proksimalt). Etter at prøven var tatt ble snittet lukket med strips, og muskelprøven ble rensert for eventuelle rester av bindevev, fett og blod før de ble kuttet og lagt i eppendorfrør for ulike formål. Prøvene ble umiddelbart etter dette lagret i ultrafryser ved -80° inntil videre analyser.

3.6 Trening

Etter at alle testene var gjennomført startet ST+PRO-gruppa en 10 uker lang treningsintervensjon med tung styrketrening for underekstremiteten to ganger i uka. Treningen fant sted på fire ulike eldrecentre/sykehjem i Oslo med unntak av en forsøksperson som trente på Norges idrettshøgskole. Forsøkspersonene hadde oppfølging av instruktør på hver treningsøkt. Programmet inkluderte beinpress, kneekstensjon og tilpasset ettbeins-knebøy (tabell 3.1). Oppvarmingen bestod av 5 minutter sykling på lav intensitet etterfulgt av step up på kasse. Belastning ble økt gradvis gjennom perioden basert på individuell progresjon hos hver forsøksperson. Med

unntak av uke 1 ble alle økter gjennomført på RM-belastning. Tabell 3.1 viser en oversikt over treningsprogrammet.

Tabell 3.1: Styrketreningsprogrammet til ST+PRO.

Uke	Øvelse	Økt 1		Økt 2	
		Sett	Reps	Sett	Reps
1	Beinpress	3	12	3	12
	Kneekstensjon	3	12	3	12
2-4	Beinpress	3	12	3	10
	Kneekstensjon	3	12	3	10
	Ettbeins knebøy	2	10	2	10
5-7	Beinpress	3	10	3	8
	Kneekstensjon	4	10	4	8
	Ettbeins knebøy	2	10	2	10
8-9	Beinpress	3	8	4	6
	Kneekstensjon	4	8	4	6
	Ettbeins knebøy	2	8	2	6

3.7 Proteinsupplement

Proteinsupplement ble inntatt umiddelbart etter treningsøkta på akuttdagen og under den 10-uker lange intervensjonen ble det samme proteinsupplementet inntatt daglig i begge grupper. Deltakerne ble instruert til å innta supplementet på kvelden, med unntak av treningsdagene for ST+PRO, da deltakerne ble instruert til å innta supplementet innen to timer etter endt treningsøkt. Supplementet bestod av 330 ml Tine Styrk som tilsvarte 151,8 kcal, 3,5 g fett, 18,5 g karbohydrat og 17,8 g protein.

3.8 Analyser

3.8.1 Homogenisering og fraksjonering

En bit fra muskelvevsprøvene (ca. 50 mg) ble homogenisert ved å tilsette 1 ml homogeniseringsbuffer (TPER®, TissueProtein Extraction Reagent, cat#78510, Thermo Scientific Rockford, IL, USA), 20 µl Halt™ protease) og 35 µl phosphatase inhibitor cocktail (cat#1861281, Thermo Scientific) og til slutt 20 µl EDTA (Cat#1861274, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). En annen muskelbit fra prøvene (ca. 50 mg) ble fraksjonert til cytosol-, membran-, nukleær- og cytoskjelettfraksjon ved hjelp av

ProteoExtract® Subcellular Proteasome Extraction kit (Cat#539790, Calbiochem, EMD Biosciences, Schwalbach, Tyskland). Prøvene ble fordelt i 25µl rør og lagret i ultrafryser ved -80 °.

3.8.2 Proteinmålinger

Proteinkonsentrasjon ble målt med RC/DC Protein assay kit (Bio-Rad, cat#5000121, Herkules, CA, USA). Som standardprotein ble det brukt Bivine γ -globin med 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cytoskjelett ble fortynnet 1:6 med ultrarent vann slik at proteinkonsentrasjonen for denne fraksjonen også havnet innenfor det definerte standardområdet. Triplikater med 5 μl av hver standard og 5 μl av hver prøve ble pipetert i en 96-brønns mikroplate (Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Germany). 25 μl reagens A*S (cat#500-0113 and #500-0115, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) og 200 μl reagens B ble deretter tilsatt hver brønn med multipipetter. Etter minimum 15 og maksimalt 60 minutters inkubering i et mørkt skap ble mikroplata analysert med ASYS Expert 96 (Biochrom, Cambridge, UK) på 690 nm. Proteinkonsentrasjon (CV<10 %) ble kalkulert med KIM Immunochemical Processing Software 32.

3.8.3 Western blot

Det ble gjennomført elektroforese og western blot på cytosol- og membranfraksjonerte prøver for å undersøke nivåer og lokasjon av proteiner involvert i autofagi. Prøvene ble fortynnet med ultrarent vann (dH_2O) og tilsatt sample buffer med 24/25 Laemmli (4x Laemmli Sample buffer, cat#151-0610, Bio-rad Laboratories Inc., USA) og 1/25 5M DTT (dithiothreitol, cat#161-0610, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Prøveløsningene ble varmet på varmeblokk på 70 ° i 10 minutter før de ble pipetert i en 10-brønners Stain-free gel (Mini-PROTEAN® 36 TGX Stain-Free™Gels, cat#456-8094, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). 5 μl vektmarkør (Protein Ladder PS 11, cat#310005, GeneOn., Germany) ble pipetert i første og siste brønn av hver gel og en kontrollprøve ble pipetert i brønn 2 og 7. 30 μl av hver prøveløsning ble pipetert i de resterende 6 brønnene med duplikater på en ny identisk gel. Cytosol- og membranfraksjon ble analysert på separate geler, og fraksjonene for hver enkelt forsøksperson ble analysert på samme gel. Elektroforese ble kjørt med romtemperert running buffer på 200 volt i 30-40 minutter (MiniPROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad) eller til merket for 10,5kDa vandret ut av gelen.

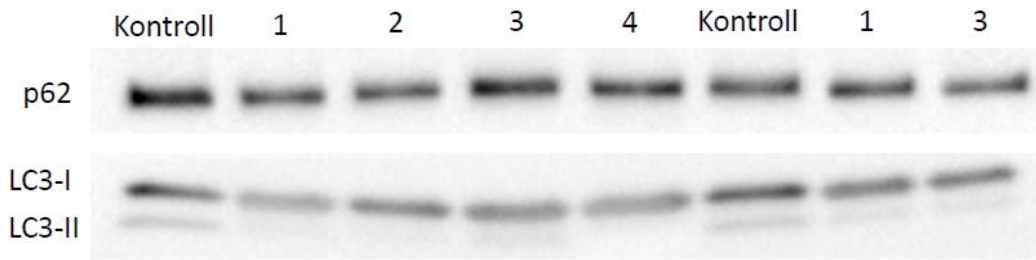
For å kontrollere for tilsetningsfeil og aktivere tryptofan ble gelene eksponert for UV-lys i 2 minutter og 30 sekunder i Bio-Rad ChemiDoc™ MP System (#170-8280, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), og de ble deretter lagt i transferbuffer i 15 minutter. PVDF-membraner (cat#162-0177, Bio-Rad, CA, USA) ble aktivert ved å ligge 30 sekunder i metanol (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), 30 sekunder i dH₂O, 2 nye minutter i nytt dH₂O og deretter 15 minutter i transferbuffer.

Proteiner ble overført fra gel til membran med Criterion™ Blotter (BioRad, CA, USA) på 100 volt i 60 minutter i kald transferbuffer. For å kontrollere overføringen ble det igjen tatt bilde av membran og gel. Deretter ble membranene blokkert i 5 % skummet melkeløsning (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) i TBS-t (10X Tris Buffered Saline, cat#170-6435, Bio-Rad, CA, USA & 0,1 % Tween® 20, cat#P7949-100 ml, Sigma Aldrich) i to timer ved romtemperatur. Etter blokkering ble membranene kuttet i mindre deler basert på vekten til de aktuelle proteinene; p62 (62 kDa) og LC3B (14 og 16 kDa), og inkubert med primære antistoff (tabell 3.2) ved 4 ° over natt på et ristebrett.

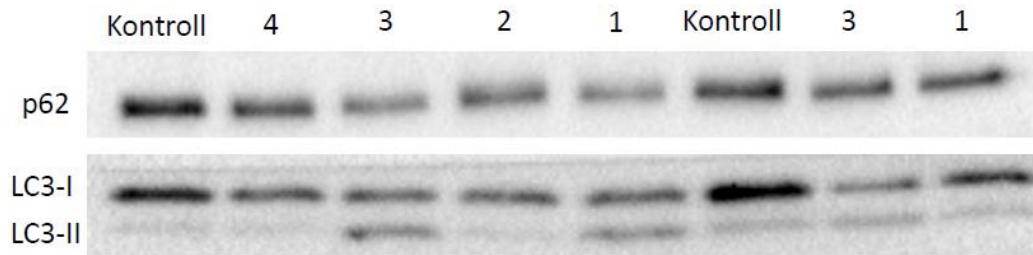
Neste dag ble membranene vasket med TBS-t i 15 minutter og deretter 3x5 minutter i TBS før de ble inkubert i sekundært antistoff fortynnet 1:3000 i 1% skummet melkeløsning med TBS-t. Etter inkubering med sekundært antistoff ble membranene igjen vasket med samme prosedyre. Membranene ble så inkubert i 5 minutter med Chemiluminescent Substrate SuperSignal WestDura® (Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, cat#34076, Rockford, IL, USA) før det ble tatt bilder med ChemiDoc™ MP Imaging System og analysert med Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Figur 3.1 og 3.2 viser representative proteinbånd i cytosol- og membranfraksjon.

Tabell 3.2: Oversikt over primære og sekundære antistoff.

	Antistoff	Produsent	Vertsdyr	Fortynning	Cat.no
<i>Primært antistoff</i>	SQSTM/p62	Cell signalling	Kanin	1:2000	#5114
	LC3B (LC3I og LC3II)	Cell signalling	Kanin	1:1000	#2775
<i>Sekundært antistoff</i>	Anti-rabbit IgG HRP-linked AB	Cell signalling	Geit	1:3000	#7074



Figur 3.1: Representative proteinbånd i cytosolfraksjon. Tallene indikerer biopsirekkefølge der 1 og 2 er fra akutt dag 1 mens 3 og 4 er fra akuttdagen etter intervensjonen.



Figur 3.2: Representative proteinbånd i membranfraksjon. Tallene indikerer biopsirekkefølge der 1 og 2 er fra akutt dag 1 mens 3 og 4 er fra akuttdagen etter intervensjonen.

3.9 Statistikk

Data er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik (\pm SD). Statistiske analyser ble gjort i Microsoft® Excel 2016 og Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For å avgjøre om data var normalfordelt ble Shapiro-Wilk-test og D'Agostino-Pearson-test brukt, i tillegg til visuell vurdering av normalfordelingsplot. For normalfordelte data ble uavhengig t-test brukt for å sammenligne ST+PRO og PRO, og parett-test ble brukt for å beregne endring innad i hver gruppe. Data som ikke var normalfordelte ble beregnet med Mann-Whitney U (for sammenligning mellom ST+PRO og PRO) og Wilcoxon-test (innad i hver gruppe). P-verdi $< 0,05$ ble brukt som signifikansnivå.

4. Resultater

4.1 Baseline verdier

Kontrollgruppen, som bare fikk protein (PRO), hadde høyere vekt ($p < 0,05$), BMI ($p < 0,001$) og fettprosent ($p < 0,01$) sammenlignet med treningsgruppen som både gjennomførte styrketrening og inntok protein (ST+PRO). Det var imidlertid ingen forskjeller mellom gruppene i noen av de fysiske testene ved baseline. Alder, kjønn, høyde, fettfri masse, fettfri masse i beina og SPPB score var heller ikke forskjellig mellom ST+PRO og PRO ved baseline.

Tabell 4.1: Oversikt over deltakerne i ST+PRO og PRO ved baseline. * indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$).

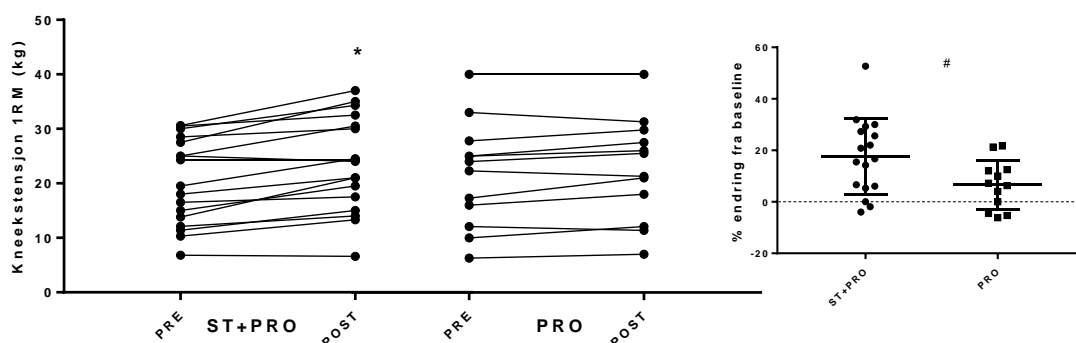
	ST+PRO (n=19)	PRO (n=14)
Alder (år)	87,6±7,3	83,7±6,4
Kjønn	♂=10 ♀=9	♂=8 ♀=6
Vekt (kg)	64,1±13,0	75,7±13,3 *
Høyde (m)	1,7±0,1	1,7±0,1
BMI (vekt/m ²)	23,2±3,5	27,0±3,4 *
Fettprosent (%)	30,8±7,1	38,5±5,8 *
Fettfri masse (kg)	42,6±7,9	45,3±9,3
Fettfri masse i beina (kg)	14,1±3,0	15,7±4,2
IRM kneekstensjon snitt (kg)	17,5±6,9	21,2±9,4
Sit-to-stand (s)	19,2±18,6	18,3±19,9
Ganghastighet (m/s)	0,66±0,24	0,75±0,23
SPPB score	5,6±2,8	5,6±3,1

4.2 Endring i kroppsvekt og fettfri masse i beina

Det var ingen endring i kroppsvekt som følge av intervensjonen i hverken ST+PRO eller i PRO, og det var ingen forskjell i endring mellom de to gruppene (resultat ikke vist). Fettfri masse i beina økte signifikant hos ST+PRO med $0,34 \pm 0,55$ kg, og fettfri masse i beina var uendret hos PRO (resultat ikke vist). ST+PRO hadde en tendens til større endring i fettfri masse i beina sammenlignet med PRO ($p < 0,1$).

4.3 1 RM kneekstensjon

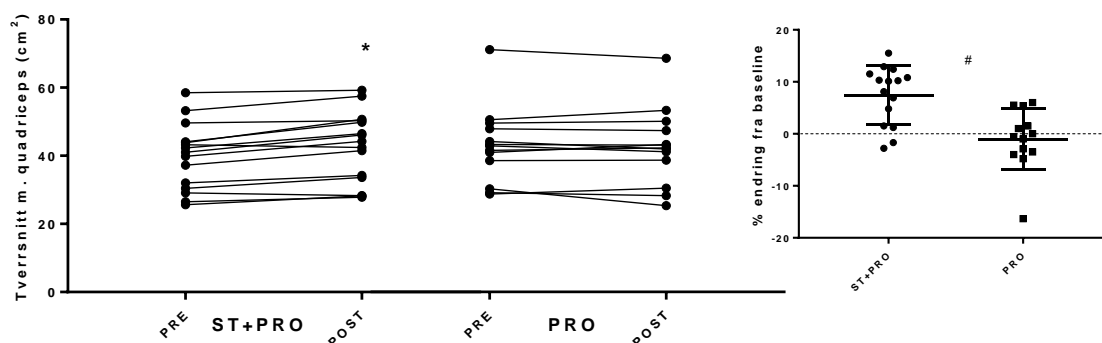
Maksimal styrke (1RM) i unilateral kneekstensjon, målt som gjennomsnitt av høyre og venstre bein, økte med $18 \pm 15\%$ i ST+PRO og var uendret i PRO (figur 4.1). Endringen i ST+PRO var signifikant større enn i PRO ($p < 0,05$).



Figur 4.1: Endring i 1 RM kneekstensjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.4 Tverrsnitt (CT)

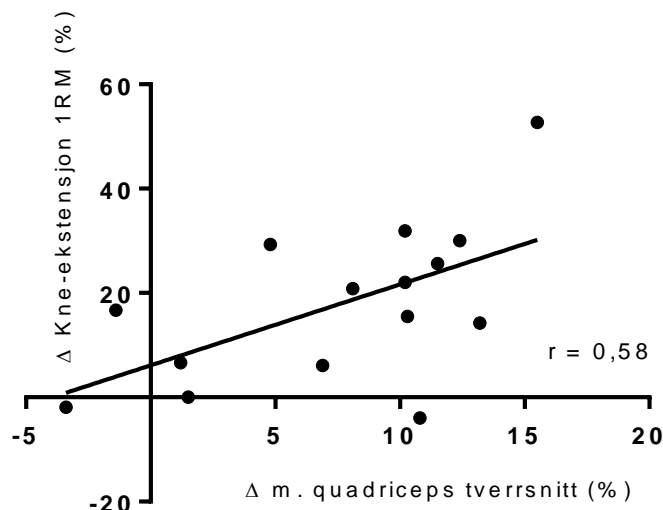
Tverrsnitt av *m. quadriceps femoris* målt med computertomografi (CT) økte med $7,5 \pm 5,7\%$ ST+PRO og var uendret i PRO (figur 4.2). Endringen i tverrsnitt i ST+PRO var signifikant større enn i PRO ($p < 0,01$).



Figur 4.2: Endring i tverrsnitt av *m. quadriceps* som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.5 Korrelasjon mellom 1RM og tverrsnitt

Det var en signifikant, moderat korrelasjon mellom endring i 1RM kneekstensjon og endring i tverrsnitt i m. quadriceps ($r=0,58$) (figur 4.3).

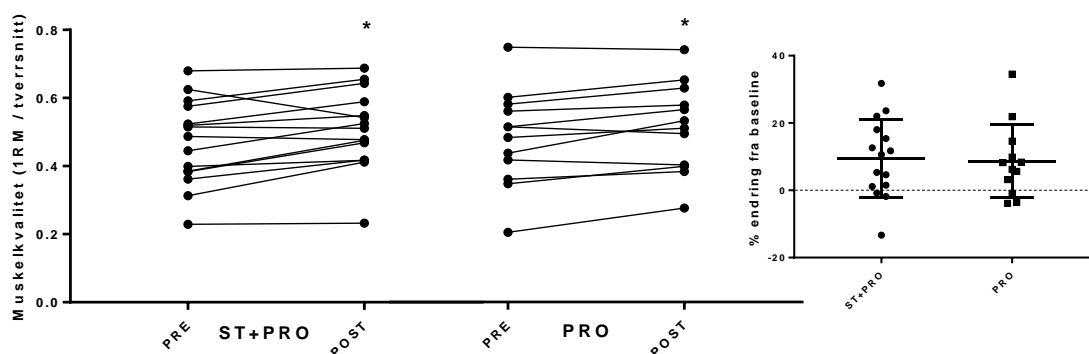


Figur 4.3: Korrelasjonsplott mellom endring i 1RM kneekstensjon og endring i tverrsnitt i m. quadriceps som følge av intervensjon hos ST+PRO.

4.6 Muskelkvalitet

4.6.1 Endringer i muskelkvalitet

Muskelkvalitet (1RM kneekstensjon/tverrsnitt av m. quadriceps) økte med $9,9 \pm 12,0$ % i ST+PRO og $8,5 \pm 10,5$ % i PRO (figur 4.4). Det var ingen forskjell mellom gruppene i endring av muskelkvalitet.

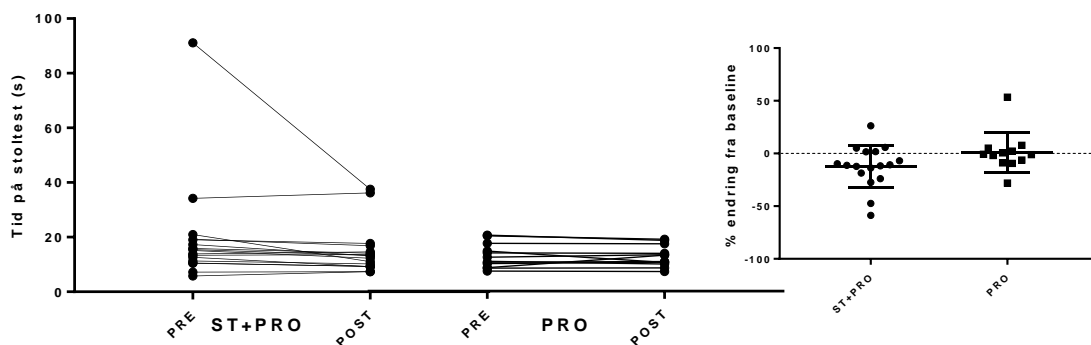


Figur 4.4: Endring i muskelkvalitet som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.7 Funksjonelle tester

4.7.1 Stoltest

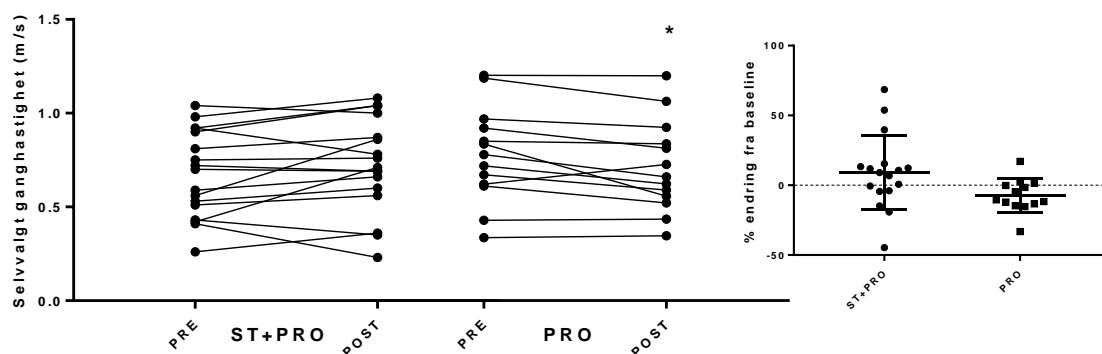
Tid på stoltest var ikke signifikant endret innad i ST+PRO eller PRO, men det var en signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom de to gruppene i endring (figur 4.5). Det var en tendens ($p < 0,1$) til redusert tid i ST+PRO.



Figur 4.5: Endring i tid på stoltest som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. #=signifikant forskjell mellom gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.7.2 Selvvalgt ganghastighet

Selvvalgt ganghastighet i PRO var redusert med $9,8 \pm 15,4$ % etter intervensjonsperioden (figur 4.6). I ST+PRO var selvvalgt ganghastighet uendret som følge av intervensjonen (figur 4.6). Det var ingen forskjell mellom ST+PRO og PRO når vi sammenlignet endringene mellom de to gruppene.



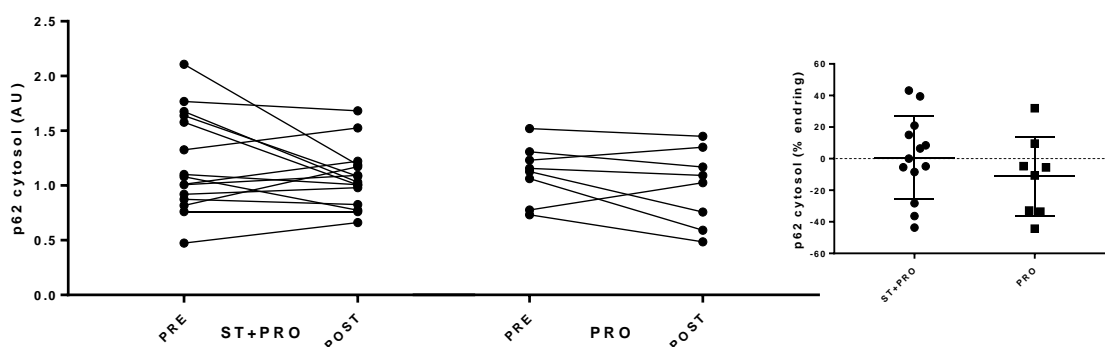
Figur 4.6: Endring i selvvalgt ganghastighet som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.8 Intracellulær signalering og respons på styrketreningsøkt og/eller proteintilskudd

Det ble i dette prosjektet gjennomført to akutt dager, men siden akuttresponsen ikke ble påvirket av intervensjonen, presenteres kun resultater fra akutt dag 1.

4.8.1 p62

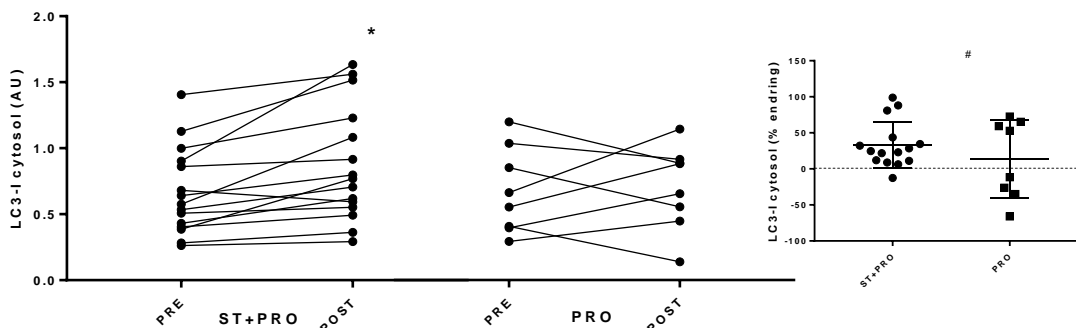
Mengden p62 i cytosol- (figur 4.7) og membranfraksjon (resultat ikke vist) var uendret etter styrketreningsøkt og inntak av proteinsupplement.



Figur 4.7: Akutt respons for p62 i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO, og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.8.2 LC3-I

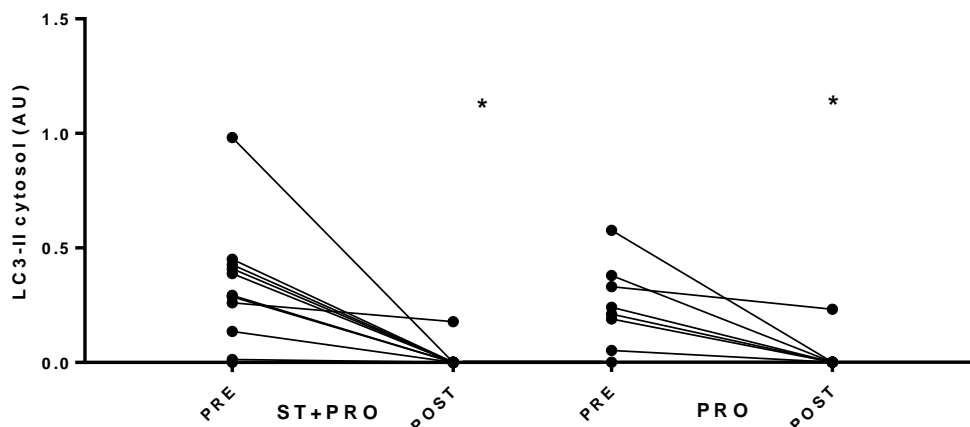
LC3-I i cytosolfraksjon økte signifikant akutt som følge av styrketreningsøkt og proteinsupplement hos ST+PRO ($p < 0,01$), og var uendret ved kun proteinsupplement hos PRO (figur 4.8). I membranfraksjon var mengden LC3-I uendret i begge grupper (resultat ikke vist).



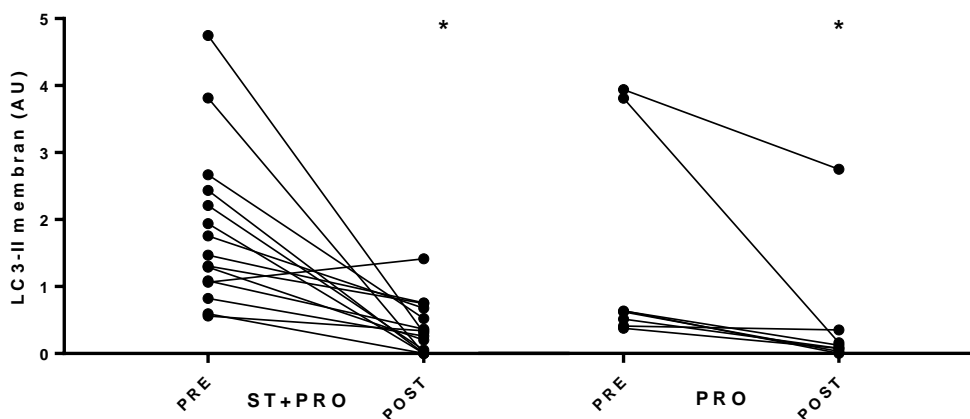
Figur 4.8: Akutt respons i LC3-I i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.5.3 LC3-II

I ST+PRO var LC3-II signifikant redusert i både cytosol- ($p < 0,01$) (figur 4.9) og membranfraksjon ($p < 0,001$) (figur 4.10). Også i PRO ble det observert en signifikant reduksjon i cytosol- ($p < 0,05$) (figur 4.9) og membranfraksjon ($p < 0,01$) (figur 9.10). Det var ingen forskjell mellom endring i ST+PRO og endring i PRO.



Figur 4.9: Akutt respons i LC3-II i cytosolfraksjon i ST+PRO og PRO. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$).



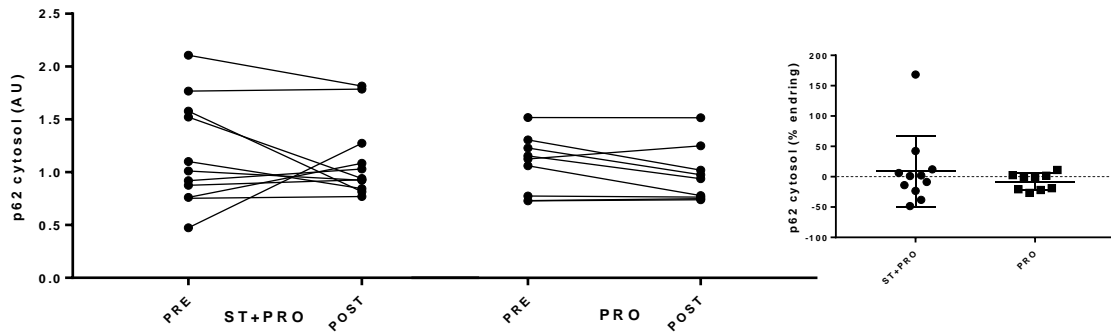
Figur 4.10: Akutt respons i LC3-II i membranfraksjon i ST+PRO og PRO. *=signifikant forskjell fra pre ($p < 0,05$).

4.9 Intracellulær signalering og intervensjon

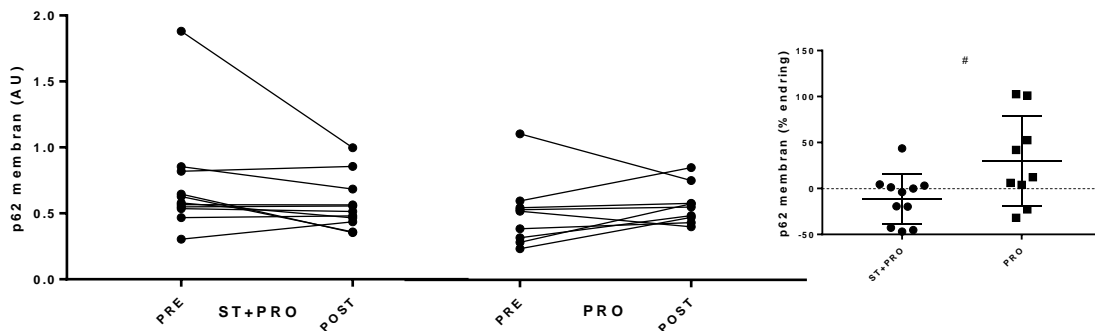
4.9.1 p62

Ingen endringer ble observert i mengden p62 som følge av intervensjon i cytosol- (figur 4.11) og membranfraksjon (figur 4.12) hverken i ST+PRO eller i PRO, men det var en

tendens til reduksjon i p62 i cytosolfraksjon hos PRO ($p < 0,1$) (figur 4.11). Endring i mengde p62 i membranfraksjon som følge av intervensjon var signifikant forskjellig ($p < 0,05$) mellom ST+PRO og PRO (figur 12).



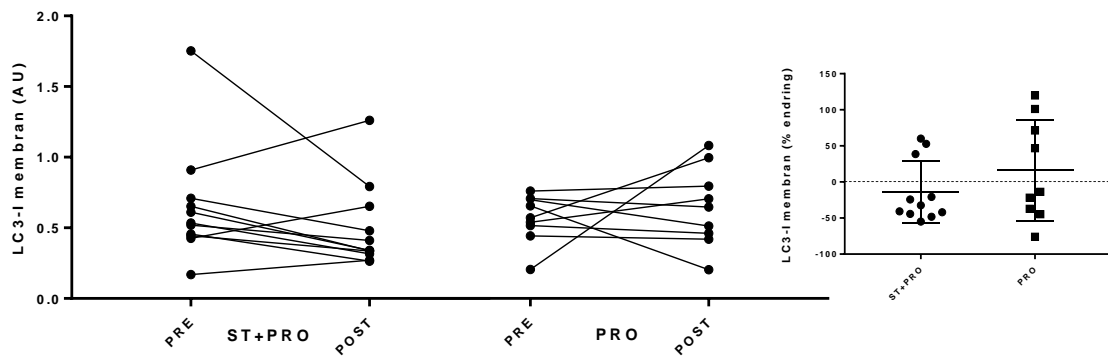
Figur 4.11: Respons i p62 som følge av intervensjon i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer baseline-nivå.



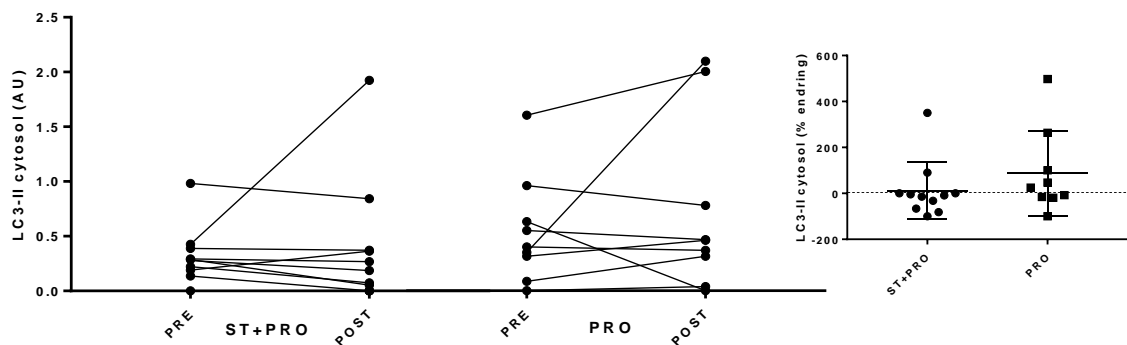
Figur 4.12: Respons i p62 som følge av intervensjonen i membranfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.9.2 LC3-I og LC3II

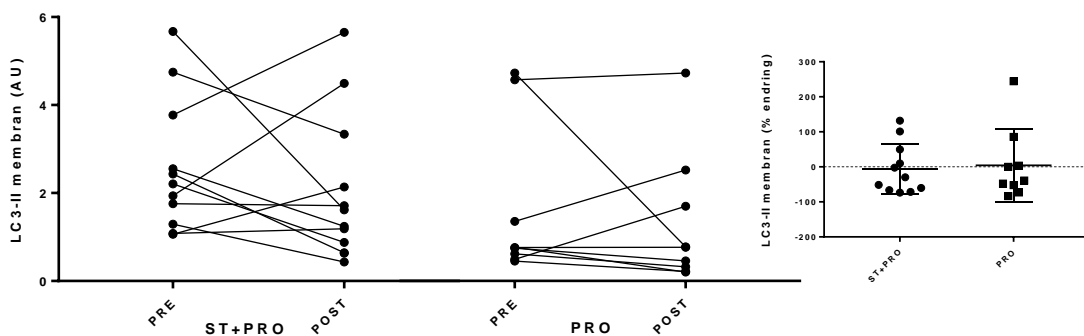
I begge grupper var mengden LC3-I og LC3-II uendret i både cytosol- og membranfraksjonen (figur 4.13-4.15) som følge av intervensjonen.



Figur 4.13: Respons i LC3-I i membranfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.



Figur 4.14: Respons i LC3-II i cytosolfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.



Figur 4.15: Respons i LC3-II i membranfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.

4.10 Sammendrag intracellulær signalering

Tabell 4.2: Oversikt over resultatene for de ulike proteinene. ↔=ingen endring. ↑=signifikant økning ($p < 0,05$). ↓=signifikant reduksjon ($p < 0,05$). ↘=Tendens til reduksjon ($p < 0,1$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$).

	Akutt		Intervensjon	
	ST+PRO	PRO	ST+PRO	PRO
p62 cytosol	↔	↔	↔	↘
p62 membran	↔	↔	↔	↔ #
LC3-I cytosol	↑	↔ #	↔	↔
LC3-I membran	↔	↔	↔	↔
LC3-II cytosol	↓	↓	↔	↔
LC3-II membran	↓	↓	↔	↔

5. Diskusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke hvordan styrketrening påvirker markører for autofagi og muskelkvalitet hos eldre med lavt fysisk funksjonsnivå. Muskelstyrke i 1RM kneekstensjon, fettfri masse i beina og tverrsnitt av m. quadriceps økte som følge av 10 uker med styrketrening og proteinsupplementering. Styrketrening og proteinsupplement, og proteinsupplement alene, førte til en akutt reduksjon i LC3-II i cytosol- og membranfraksjon. LC3-I i cytosolfraksjon økte derimot akutt kun som følge av styrketreningsøkt og proteininntak. LC3-I, LC3-II og p62 var uendret som følge av 10 uker med styrketrening og proteinsupplementering i både cytosol- og membranfraksjon. Det var imidlertid en signifikant forskjell mellom gruppene i p62 i membranfraksjon som følge av intervensjonen, og denne forskjellen var drevet av en trend til reduksjon i ST+PRO og en trend til økning i PRO. Muskelkvalitet målt som 1RM kneekstensjon relatert til tverrsnitt av m. quadriceps målt med CT var bedret etter 10 uker med styrketrening og proteinsupplementering.

5.1 *Fettfri masse i beina*

Grappa som gjennomførte styrketrening økte fettfri masse i beina med 0,34 kg. Denne økningen var noe mindre enn forventet, men det var relativt stor individuell variasjon i treningseffekt. I en metaanalyse av 49 studier økte fettfri masse med 1,1 kg i gjennomsnitt hos eldre >50 år som trente styrketrening (Peterson, Sen, & Gordon, 2011). Denne metaanalysen oppgir imidlertid endringen i fettfri masse i hele kroppen, og i alle disse studiene ble det gjennomført helkroppsstyrketrening, mens det i vår studie primært ble gjennomført øvelser for underekstremiteten. Styrketrening har vist seg å føre til en større prosentvis økning i muskelmasse i overekstremiteten (Abe, DeHoyos, Pollock, & Garzarella, 2000), men mesteparten av muskelmassen er distribuert i underekstremiteten både hos kvinner og menn (Janssen, Heymsfield, Wang, & Ross, 2000). Ved å gjøre en vurdering av disse tallene kan vi anslå at litt i overkant av 50 % av økningen i fettfri masse kom i underekstremiteten i Peterson et al. (2011) sin studie, noe som betyr at vi fortsatt burde forventet en større økning enn 0,34 kg. Gjennomsnittlig intervensjonsvarighet i studiene i metaanalysen til Peterson et al. (2011) var 21 uker, og deltakerne var yngre (gjennomsnittlig 65 år), noe som kan forklare noe av forskjellen vi ser fra vår studie. I vår studie ble det gjennomført kun to styrketreningsøkter i uka, mens det i mange av studiene i metaanalysen ble gjennomført

tre økter i uka. I vår studie ble det dessuten kun gjennomført to hovedøvelser på beina, noe som gjorde at den aktive muskelmassen i beina var begrenset.

5.2 Endring i 1RM kneekstensjon

Maksimal styrke, målt som 1RM kneekstensjon økte med 18 % hos gruppa som trente styrketrening i 10 uker. Denne økningen er noe mindre enn hva som er funnet i de fleste tidligere studier (Peterson, Rhea, Sen, & Gordon, 2010), men det er viktig å påpeke at det var stor variasjon i endring i 1RM mellom forsøkspersonene våre. Peterson et al. (2010) lister opp 28 studier som har målt endring i 1RM kneekstensjon etter en periode med styrketrening hos eldre. I gjennomsnitt økte deltakerne 1RM med 33 % (Peterson et al., 2010). Mange av disse intervensjonene var av lengre varighet og med tre økter per uke, noe som kan forklare hvorfor økningen i maksimal styrke er større i disse studiene. Intervensjonene var i gjennomsnitt 17,6 uker lange med 2,7 økter per uke (Peterson et al., 2010), og hvis man vurderer styrkefremgang per treningsøkt er vårt resultat i god overensstemmelse med metaanalysen til Peterson et al. (2010).

5.3 Muskeltversnitt

Tverrsnitt i m. quadriceps målt med CT økte med 8 % som følge av 10 uker med styrketrening i kombinasjon med proteinsupplementering. Dette var ganske som forventet med bakgrunn i tidligere studier som har vist omtrent den samme økningen når tverrsnittet av m. quadriceps måles med CT eller magnetresonanstomografi (MRI) (Ferri et al., 2003; Häkkinen, Pakarinen, Newton, & Kraemer, 1998; Treuth et al., 1994), selv om andre studier har vist en litt mindre økning (Fiatarone et al., 1994; Frontera, Meredith, O'Reilly, Knuttgen, & Evans, 1988; Harridge, Kryger, & Stensgaard, 1999). Fiatarone et al. (1994), Treuth et al. (1994) og Frontera et al. (1988) målte til forskjell tverrsnittet av hele låret og ikke bare quadriceps, noe som kan forklare noe av variasjonen. I en nyere metaanalyse av Stewart, Saunders & Greig (2014) var gjennomsnittlig økning i tverrsnittet i m. quadriceps 2-9 % hos eldre individer (>70 år) som trente styrketrening, og vårt resultat ser dermed ut til å være i den høyere enden av dette intervallet. To av våre forsøkspersoner økte imidlertid ikke muskeltverrsnittet i m. quadriceps. Den ene av disse økte allikevel 1RM med 17 %, mens 1RM var uendret hos den andre.

Det var en moderat korrelasjon mellom endring i tverrsnitt av *m. quadriceps femoris* og endring i 1RM kneekstensjon ($r=0,58$). Dette indikerer at økningen i tverrsnitt kan forklare deler av endringen i 1RM kneekstensjon.

5.4 Muskelkvalitet

Som følge av intervensjonen økte muskelkvaliteten (1RM kneekstensjon relatert til tverrsnitt av *m. quadriceps*) med 10 % i ST+PRO og 9 % i PRO. Økningen i 1RM kneekstensjon var såpass mye større enn økningen i tverrsnitt hos ST+PRO slik at denne gruppa økte muskelkvaliteten signifikant. Økningen i muskelkvalitet hos PRO var noe uventet, og denne økningen var drevet av en svak økning i 1RM kneekstensjon og uendret tverrsnitt. PRO opplevde altså en økning i 1RM kneekstensjon til tross for at tverrsnittet var uendret, og derfor kan økningen være et resultat av utilstrekkelig tilvenning. I så fall indikerer dette at også styrkeframgangen i ST+PRO er litt overestimert, slik at økningen i muskelkvalitet kanskje reelt sett er litt mindre i begge grupper. Samtidig er det en mulighet at proteinsupplementet kan ha forårsaket økningen i muskelkvalitet, siden begge gruppene opplevde den samme økningen. Økningen i muskelkvalitet stemmer nokså godt med Tracy et al. (1999) og Ivey et al. (2000) sine studier. Begge disse studiene målte 1RM i kneekstensjon og quadriceps-tverrsnitt med MRI etter 9 uker med styrketrening og rapporterte en økning i muskelkvalitet på henholdsvis 15 og 12 %.

5.5 Funksjonelle tester

ST+PRO reduserte tid på stoltest med 12 % (ikke signifikant) mens PRO økte tiden med 10 % (ikke signifikant). Studier som har undersøkt styrketrening sin effekt på stoltest viser motstridende resultater der enkelte studier viser en forbedring, mens andre ikke viser noen endring (Chale et al., 2013; Dias et al., 2015; Pinto et al., 2014; Schot, Knutzen, Poole, & Mrotek, 2003). På selvvalgt ganghastighet forbedret ST+PRO tiden sin med 8 %, men denne forbedringen var så vidt ikke signifikant ($p<0,1$). Dette resultatet er i overensstemmelse med to tidligere metaanalyser som har vist 5-10 % forbedring på selvvalgt ganghastighet som følge av styrketrening hos eldre (Hortobagyi et al., 2015; Van Abbema et al., 2015). Tidligere forskning antyder en sammenheng mellom økning i maksimal styrke og forbedring på selvvalgt ganghastighet (Hortobagyi et al., 2015). Det var ingen korrelasjon mellom 1RM kneekstensjon og selvvalgt ganghastighet i vår studie, men det er allikevel ikke utenkelig at økningen i 1RM

kneekstensjon kan ha innvirket på forbedringen på gangtesten i ST+PRO. PRO reduserte hastigheten sin signifikant med 10 % på selvvalgt ganghastighet. Perioden med styrketrening bidro sånn sett til å opprettholde ganghastigheten hos ST+PRO.

Basert på denne studien og tidligere forskning virker det som styrketrening sammen med proteinsupplement er et effektivt tiltak for å forbedre funksjonsevnen til de eldre. Dette har stor klinisk relevans, siden denne strategien potensielt kan gjøre pleietrengende eldre mer selvstendige i dagliglivet, og i stand til å bo hjemme lengre.

5.6 Intracellulær signalering

5.6.1 LC3

LC3-I- og LC3-II-proteininnhold ble målt for å indikere mengden autofagosomer i muskelvevet. Mengden LC3-I som konverteres til LC3-II indikerer hastigheten på nydannelse av autofagosomer (Mizushima & Yoshimori, 2007). Mange studier oppgir LC3-resultater som en ratio med LC3-II/LC3-I for å gi et bilde av hvor mye LC3-I som konverteres til LC3-II. Denne ratioen utelater imidlertid informasjon om hva som skjer med hvert av proteinene og den tar ikke høyde for at LC3-I og LC3-II kan ha ulik sensitivitet til antistoff (Yamamoto et al., 1998). På grunn av disse svakhetene forbundet ved å kun oppgi ratioen, oppgis resultatene for LC3 som LC3-I og LC3-II separat i denne studien. Man får dessuten mer informasjon av å måle proteinnivå separat i ulike fraksjoner, i stedet for å benytte helhomogenat. Målinger i separate fraksjoner kan gi informasjon om hvor i cellen det skjer eventuelle endringer i proteinnivå, og om det skjer endringer mellom fraksjoner. I denne studien ble det derfor gjort separate målinger i cytosol- og membranfraksjon.

To og en halv time etter styrketreningsøkt og proteinsupplement var LC3-II signifikant redusert i både cytosol- og membranfraksjon. Dette indikerer en redusert mengde autofagosomer, noe som kan skyldes redusert konvertering av LC3-I til LC3-II (Klionsky et al., 2016). Det membranbundne proteinet, LC3-II, ble også påvist i cytosolfraksjon, hvilket kan skyldes utilstrekkelig separering i fraksjoneringsprosessen. Samtidig har det blitt påvist annen form for LC3-II i cytosol (Karim et al., 2007), men det er uvisst hvorvidt antistoffene benyttet i vår studie binder seg til denne. Man vet ikke om LC3-II i cytosol spiller en annen rolle for autofagosomdannelsen, men LC3-I

til LC3-II-konvertering i cytosol kan også fungere som en indikator på autofagosomdannelse (Karim et al., 2007).

LC3-II har tidligere vist seg å øke raskt i membranfraksjon når autofagien samtidig er aktivert (Mizushima, Yoshimori, & Levine, 2010). Vi kan likevel ikke vite om LC3-II-innhold har sammenheng med økt autofagi-hastighet før vi vet noe om hvor mye LC3-II som samtidig brytes ned i lysosomene. LC3-II som er bundet på innsiden av autofagosommembranen, brytes ned når autofagosomet smelter sammen med lysosomet, og veldig høy nedbrytningshastighet kan føre til at disse LC3-II-proteinene forsvinner raskt (Mizushima & Yoshimori, 2007). Hvis nedbrytningen i lysosomene er tilstrekkelig rask, kan man observere redusert mengde LC3-II, til tross for at mer LC3-I har blitt konvertert til LC3-II (Klionsky et al., 2016).

Den akutte reduksjonen i LC3-II som følge av en styrketreningsøkt er i overensstemmelse med to tidligere studier av eldre, Dickinson et al. (2017) som målte LC3-II i cytosol tre timer etter en styrketreningsøkt og Fry et al. (2012) som målte LC3-II i helhomogenat to timer etter en styrketreningsøkt. I begge disse studiene ble styrketreningsøkta gjennomført i kneekstensjonsapparat og biopsiene ble tatt fra *m. vastus lateralis* i likhet med vår studie. Dickinson et al. (2017) og Fry et al. (2012) målte derimot ikke LC3-II i cytosol- eller membranfraksjon. Dermed har disse studiene ikke den samme indikasjonen på hvor i cellen endringene i autofagimarkørene eventuelt skjer, og det blir vanskeligere å sammenligne resultatene deres med våre. Det er også verdt å ta med at de eldre forsøkspersonene i Fry et al. (2012) sin studie ikke hadde like lavt fysisk funksjonsnivå som de i vår studie, og de var litt yngre enn våre forsøkspersoner. I en annen studie av Hentila et al. (2018) var LC3-II i helhomogenat uendret hos eldre etter en styrketreningsøkt, men biopsien ble i dette tilfellet tatt 48 timer etter økta, og det blir derfor litt vanskelig å relatere deres resultater til våre. Hos en gruppe yngre, som også deltok i sistnevnte studie, ble LC3-II redusert en time etter styrketreningsøkta, noe som kan være med å støtte våre funn. Siden LC3-II ble redusert i både cytosol- og membranfraksjon, er det en god sjanse for at det samme hadde vært tilfellet hvis vi også hadde gjort målinger i helhomogenat.

Også i gruppen som bare inntok protein ble det observert en reduksjon i LC3-II i både cytosol- og membranfraksjon. Dette kan bety at proteininntaket alene var årsak til

reduksjonen i LC3-II akutt både i ST+PRO og PRO. Proteinsupplementet som ble brukt i denne studien var fettfri melk med et høyt innhold av essensielle aminosyrer. Inntak av essensielle aminosyrer, særlig leucin som finnes i melk, har vist seg å redusere LC3-II i helhomogenat en time etter inntak hos yngre (Glynn et al., 2010). I Dickinson et al. (2017) sin studie inntok forsøkspersonene protein etter styrketreningsøkta på samme måte som de gjorde i vår studie. Det spekuleres i at proteininntak kan redusere konverteringen av LC3-I til LC3-II, siden dette er påvist i cytosolfraksjon i hepatocytter hos yngre rotter (Karim et al., 2007), og i likhet med Dickinson et al. (2017) er det muligens dette vi ser i vår studie. I Dickinson et al. (2017) sin studie var nivået av LC3-II tilbake ved baseline etter 24 timer, så tidspunkt for biopsitaking er avgjørende. Det er også viktig å påpeke at både LC3-I og LC3-II i cytosolfraksjon responderer mer på aminosyrer enn LC3-I og LC3-II i helhomogenatprøver (Karim et al., 2007).

LC3-I økte akutt i cytosolfraksjon som følge av styrketrening og proteinsupplement, men var uendret som følge av kun proteinsupplement. Vi var derimot ikke i stand til å påvise noen endring i LC3-I i membranfraksjon hos ST+PRO, hvilket antyder at akkumuleringen av LC3-I som følge av styrketreningsøkta fant sted i cytosol og ikke i autofagosommembranen. Det tyder også på at LC3-I ikke flyttet seg fra membran- til cytosolfraksjon. En mulighet er at LC3-II på yttersiden av autofagosommembranen har blitt resirkulert tilbake til LC3-I av ATG4 når autofagosomene spleises sammen med lysosomene (Mizushima & Yoshimori, 2007). LC3-I vil på den måten bli akkumulert i cytosol, og dette vil faktisk indikere økt autofagihastighet (Mizushima & Yoshimori, 2007). Med tanke på at LC3-II ble kraftig redusert i cytosolfraksjon som følge av styrketreningsøkta er det kanskje mer sannsynlig at LC3-I i cytosol ble akkumulert som følge av hemmet konvertering til LC3-II. Siden PRO også opplevde en like markant reduksjon i LC3-II i cytosolfraksjon skulle man forvente at LC3-I økte i denne gruppa også, men dette var ikke tilfellet. LC3-I i cytosolfraksjon var uendret i PRO noe som kan indikere at det var styrketreningsøkta og ikke proteinsupplementet som førte til den akutte endringen i LC3-I i cytosolfraksjon hos ST+PRO.

Den akutte økningen i LC3-I i cytosolfraksjon er i kontrast til tidligere funn som har observert ingen endring i helhomogenatprøver hos eldre (Fry et al., 2012; Hentila et al., 2018). Fry et al. (2012) registrerte i likhet med oss en reduksjon i LC3-II akutt etter en styrketreningsøkt, men reduksjonen var enda tydeligere i våre målinger, der de fleste

proteinbåndene forsvant fullstendig. Hverken Fry et al. (2012) eller Hentila et al. (2018) gjorde målinger i cytosolfraksjon. Økningen i LC3-I i vår studie var kun i cytosolfraksjon, og det kan godt tenkes at Fry et al. (2012) og Hentila et al. (2018) hadde funnet det samme hvis de også hadde gjort målinger i cytosolfraksjon. I motsetning til Fry et al. (2012) og Hentila et al. (2018) inntok deltakerne i vår studie et proteinsupplement i forbindelse med styrketreningsøkta, og dette kan ha hemmet LC3-I til LC3-II-konverteringen som videre kan forklare hvorfor LC3-I i cytosolfraksjon økte i vår studie, men ikke i deres studier. I Karim et al. (2007) sin studie ble det påvist en økning i LC3-I og en reduksjon i LC3-II hos yngre rotter, og dette kan være den samme responsen vi ser i vår studie.

Styrketrening sammen med proteinsupplement fører til en akutt økning i mTORC1 fosforylering (Areta et al., 2014). mTORC1 hindrer aktivering av ULK1 gjennom å fosforylere ULK^{ser757} som videre kan svekke AMPK sin evne til å aktivere ULK^{ser555} (J. Kim et al., 2011). Initieringsprosessen i autofagosomdannelsen blir med det inhibert, og resultatet av dette er etter hvert færre autofagosomer og en redusert mengde LC3-II i autofagosommembranen (J. Kim et al., 2011). Dette støttes av Klionsky et al. (2016) som påstår at en inhibering av mTORC1 fører til en økning i LC3-II. mTORC1 kan dessuten svekke lysosomal nedbrytning gjennom å fosforylere og hemme transkripsjonsfaktor EB som styrer ekspresjonen av hydrolaser i lysosomene (Martina, Chen, Gucek, & Puertollano, 2012). Hvis konverteringen fra LC3-I til LC3-II ble redusert som følge av mTORC1-aktivering kan dette muligens forklare hvorfor LC3-I økte i cytosolfraksjon hos ST+PRO, men ikke hos PRO. mTORC1 blir nemlig ytterligere stimulert når man kombinerer proteininntak med styrketrening (Drummond et al., 2008). Proteinsupplementet kan i tillegg ha gitt en insulinrespons som har hemmet LC3-I til LC3-II-konverteringen, siden mTORC1 også blir stimulert av insulin (Vendelbo et al., 2014). Insulin har vist seg å føre til en fosforylering av ULK1 sammen med en reduksjon i LC3-II/LC3-I-ratioen (Fritzen et al., 2016). Vi kan med dette ikke utelukke at den økte aminosyretilgjengeligheten sammen med en antatt insulinrespons er ansvarlig for reduksjonen i LC3-II.

Som følge av 10 uker med styrketrening var LC3-I og LC3-II uendret både i cytosol- og membranfraksjon. Dette er i overensstemmelse med Hentila et al. (2018) og Mejias-Pena et al. (2017), men i kontrast til en annen studie på rotter (Luo et al., 2013) som

registrerte en reduksjon i LC3-II/LC3-I-ratioen i cytosolfraksjon hovedsakelig som følge av redusert LC3-II. Det er åpenbart vanskelig å sammenligne våre resultater med en studie som denne, ikke bare fordi forsøkene deres ble gjennomført på rotter, men det er også problematisk å sammenligne selve treningen som ble gjennomført med tanke på at rottene i Luo et al. (2013) sin studie klatret trapper og våre deltakere trente i styrkeapparater. Vi skal også være veldig forsiktig med å sammenligne våre resultater med Mejias-Pena et al. (2017) sine målinger, siden analysene deres ble gjort på venøst blod og ikke på biopsier. Prøvene deres ble dessuten tatt 5-6 dager i forkant og etterkant av treningsperioden. Foreløpig kan vi oppsummere med at vår studie indikerer at hvilenivåene av autofagimarkørene LC3-I og LC3-II ikke endres som følge av en periode med styrketrening hos eldre.

5.6.2 p62

For å estimere aktiviteten i autofagiprosessen ble i tillegg p62 målt. p62 binder proteiner for nedbrytning og rekrutterer på den måten «avfall» til autofagosomene (Johansen & Lamark, 2011). Når autofagosomene i neste steg leverer avfallet til lysosomene blir p62 brutt ned (Johansen & Lamark, 2011). Sammen med LC3-I og LC3-II-resultatene er det dessuten lettere å tolke hvor i systemet det eventuelt foregår endringer, med tanke på at p62 fungerer som et bindeledd til LC3-I (Pankiv et al., 2007). Økt mengde p62 i cytosolfraksjon har vist seg å korrelere med redusert mengde LC3-II, og det antas dermed at en akkumulering av dette proteinet indikerer hemmet autofagi (Sakuma et al., 2016).

I denne studien var det ingen endring i p62 i hverken cytosol- eller membranfraksjon som følge av en akutt økt med styrketrening og proteinsupplement. Resultatet er i tråd med Hentila et al. (2018) sin studie som til vår kjennskap foreløpig er den eneste studien som har undersøkt hvordan styrketrening påvirker p62 akutt hos eldre mennesker. Mengden p62 i helhomogenat var i deres studie uendret en time etter økta, og var også uendret 48 timer senere. De yngre forsøkspersonene opplevde derimot en økning i p62 48 timer etter økta. Dette kan indikere en forsinket redusert nedbrytning av p62 i autofagosomene. I vår studie tok vi bare biopsi to og en halv time etter styrketreningsøkta, og kanskje hadde vi funnet noe annet hvis vi også hadde tatt en ny biopsi to døgn senere.

En senere studie av Duran et al. (2011) påpeker at p62 spiller en avgjørende rolle for aminosyreindusert aktivering av mTORC1. p62 interagerer med raptor, en subenhet i mTORC1-komplekset. Dessuten er p62 nødvendig for interaksjonen mellom mTOR og Rag GTPaser in vivo og for translokasjon av mTORC1 til lysosomene. Det siste er kritisk for aktiveringen av mTORC1 gjennom aminosyreinntak. Dermed kan det hende at proteininntaket i forbindelse med akuttmålingene påvirket resultatet og er noe av bakgrunnen for den store variasjonen vi ser i respons mellom de ulike forsøkspersonene.

Mengden p62 i membranfraksjon endret seg signifikant mellom ST+PRO og PRO som følge av intervensjonen. ST+PRO hadde en trend mot reduksjon og PRO en trend mot økning. Dette kan indikere at aktiviteten i autofagisystemet økte som følge av 10 uker med styrketrening. Selv om den svake reduksjonen i p62 kun var synlig i membranfraksjon peker dette resultatet i samme retning som tidligere forskning som har påvist en reduksjon i p62 i cytosolfraksjon hos rotter (Luo et al., 2013) og i helhomogenat hos mennesker (Mejias-Pena et al., 2017). Som følge av intervensjonen var det samtidig en tendens til reduksjon i mengden p62 ($p < 0,1$) i cytosolfraksjon, noe som støtter hypotesen om at autofagien kan ha blitt stimulert av treningsperioden. Vi kan videre spekulere i at en mindre mengde p62 vil føre til redusert aktivering av mTORC1, og bryte ned ytterligere mer p62 (Komatsu, 2012). Effekten av dette er dog usikkert med tanke på at p62 muligens også kan brytes ned gjennom ubiquitin proteasom-systemet (Mizushima et al., 2010). Man er heller ikke helt sikker på at en akkumulering av p62 har sammenheng med redusert autofagihastighet. Vi vet at p62 binder seg til LC3-I i autofagosommembranen, og derfor skulle man tro at p62 i membranfraksjon øker når autofagien er stimulert (Mizushima & Yoshimori, 2007). Men en økning i p62 har i de fleste tilfeller vist seg å komme sammen med en reduksjon i LC3-II (Klionsky et al., 2016), og derfor ser det ut som en økning i p62 heller reflekterer en propp i systemet, der autofagosomdannelsen er svekket. Det er også viktig å merke seg at p62 har viktige funksjoner med tanke på blant annet celleoverlevelse og apoptose, og derfor kan p62 endre seg uavhengig av endringer i autofagisystemet (Kuusisto, Suuronen, & Salminen, 2001). Autofagiresponsen kan dessuten ha en mye kortere varighet enn for eksempel hypertrofiresponsen (Ogura et al., 2011), og derfor er det krevende å tolke kun én biopsi fra ett tidspunkt. I følge Bjorkoy et al. (2005) kan nedbrytningen av p62 være større på et senere biopsitidspunkt. For å få det fullstendige bildet av hvordan p62 påvirker autofagi, er man dessuten avhengig av å måle en rekke

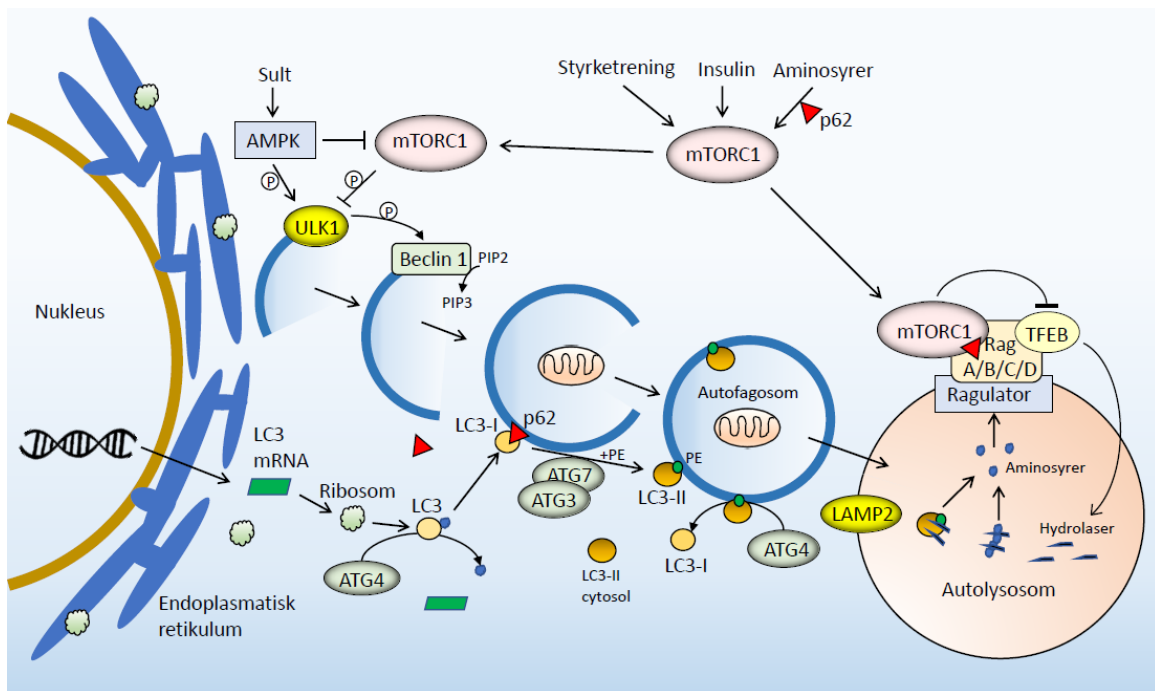
andre autofagimarkører (Rubinsztein et al., 2011). Studier har også vist at p62 reguleres transkripsjonelt under autofagi (He & Klionsky, 2009; Nakaso et al., 2004), og derfor hadde det vært en fordel å sammenligne resultatene med mRNA-data.

Luo et al. (2013) observerte en reduksjon i p62 i cytosolfraksjon etter 9 uker med motstandstrening hos eldre rotter. Reduksjonen i p62 kom sammen med en økning i LC3-II og Luo et al. (2013) konkluderte med at motstandstrening stimulerte autofagiprosessen. Igjen, dyrestudier er krevende å relatere til studier av mennesker, og dette er en logisk forklaring på hvorfor vi ikke var i stand til å påvise de samme resultatene, selv om det var en tendens til samme respons med hensyn til p62 i vår studie. Mejias-Pena et al. (2017) påviste videre en reduksjon i p62 hos eldre mennesker som følge av 8 uker med styrketrening, men disse målingene ble gjort på venøst blod. Ved å ta en nærmere titt på resultatene våre, er tendensen til reduksjon i p62 veldig liten, og det er vanskelig å vurdere hvorvidt denne endringen er av klinisk relevans.

5.6.3 Begrensninger

Det er viktig å påpeke at studien vår hadde få forsøkspersoner. Antall biopsier før og etter intervensjonen var lavt, hvilket øker sannsynligheten for type-II-feil. Når det gjelder akuttmålingene gir muskelbiopsien to og en halv time etter styrketreningsøkta og proteinsupplementet bare et øyeblikksbilde av autofagiprosessen. Hadde vi tatt flere biopsier, gjerne en umiddelbart etter styrketreningsøkta og en til en del timer senere, kunne vi fått mer informasjon om tidsforløpet for endringene i autofagimarkørene. Målinger av LC3-I, LC3-II og p62 gir videre et noe mangelfullt bilde av hvordan autofagiprosessen påvirkes av trening. Analyser av mRNA vil også bli gjennomført i forbindelse med prosjektet, men disse dataene var ikke tilgjengelige under skrivingen av denne oppgaven. En økt mengde mRNA vil indikere økt transkripsjon av genet for de aktuelle proteinene. På den måten kunne vi fått informasjon om hvor mye nytt protein som er i ferd med å syntetiseres, ikke bare hvilke som akkumuleres. mRNA-data hadde vært spesielt nyttig med hensyn til tolkningen av LC3-I-akkumuleringen i cytosol som følge av den akutte styrketreningsøkta. I tillegg ville målinger av andre autofagimarkører gitt mer innsikt i hvordan autofagisystemet eventuelt blir påvirket av trening hos eldre. Mer spesifikt ville for eksempel målinger av ULK1 og Beclin-1 gitt oss informasjon om initieringen av autofagiprosessen, og spesifikke ATG-proteiner kunne gitt oss informasjon om konverteringene mellom LC3, LC3-I og LC3-II. For å i

tillegg vite noe om hvor mye LC3-II som blir brutt ned i lysosomene hadde det vært interessant å måle proteiner som indikerer mengden lysosomer, og proteiner involvert i sammenspleisingen av autofagosomer og lysosomer. Det har blitt forsøkt å gjøre målinger av LAMP2 på laboratoriet vårt tidligere, men mangel på gode antistoff har satt en stopper for disse analysene. Dette proteinet er bundet til lysosommembranen og påvirker muligens sammenspleisingen av autofagosomet og lysosomet. Figur 5.1 illustrerer kompleksiteten i autofagisystemet og utfordringene med å tolke målinger av LC3-I, LC3-II og p62 uten ytterligere informasjon.



Figur 5.1: Autofagiprosessen med viktige regulatoriske steg. Figuren er basert på arbeidet til Lippai & Szatmari, 2017; Martinez-Lopez et al., 2015; Tanida, 2011 og Yu et al., 2011.)

5.7 Konklusjon

I denne studien ble det undersøkt hvordan markører for autofagi blir påvirket av styrketrening og proteinsupplement akutt og etter en 10 uker lang intervensjon hos eldre med lavt funksjonsnivå. I tillegg ble det gjennomført tester av maksimal muskelstyrke, muskeltverrsnitt og funksjonelle tester før og etter intervensjonen. Styrketrening hadde en positiv effekt på maksimal muskelstyrke, muskeltverrsnitt, muskelkvalitet og tid på stoltest, noe som indikerer at styrketrening er en effektiv strategi for å motvirke aldersrelatert tap av muskelstyrke og funksjonsevne.

Før intervensjonen var hypotesen vår at 10 uker med styrketrening og proteinsupplement ville øke autofagien i hvile gjenspeilet av økt nivå av LC3-II og redusert nivå av p62. Hverken LC3-I, LC3-II eller p62 endret seg signifikant som følge av intervensjonen, noe som svekket hypotesen vår. Samtidig endret p62 seg signifikant mellom gruppene i membranfraksjon med en trend til reduksjon i p62, noe som peker i samme retning som tidligere funn. Derimot observerte vi en reduksjon i LC3-II akutt som følge av styrketrening og proteinsupplement, og proteinsupplement alene, både i cytosol- og membranfraksjon, hvilket styrket den andre hypotesen vår. Reduksjonen i LC3-II akutt indikerer færre autofagosomer og redusert aktivitet i denne delen av autofagisystemet to og en halv time etter en styrketreningsøkt og inntak av proteinsupplement. LC3-I ble samtidig akkumulert akutt som følge av styrketrening og proteinsupplement, muligens på grunn av redusert konvertering til LC3-II. Framtidige studier som kan kartlegge en større del av autofagiprosessen kan gi oss ytterligere innsikt i hvordan styrketrening og proteinsupplement kan påvirke proteinnedbrytningen hos eldre og hvilken effekt dette kan ha på muskelkvalitet og funksjonsevne.

Referanser

- 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. doi:10.1007/s004210050027
- Areta, J. L., Burke, L. M., Camera, D. M., West, D. W., Crawshay, S., Moore, D. R., . . . Coffey, V. G. (2014). Reduced resting skeletal muscle protein synthesis is rescued by resistance exercise and protein ingestion following short-term energy deficit. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *306*(8), E989-E997.
- Attaix, D., Baracos, V. E., & Pichard, C. (2012). Muscle wasting: a crosstalk between protein synthesis and breakdown signalling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *15*(3), 209-210. doi:10.1097/MCO.0b013e328352b80c
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., . . . Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*, *171*(4), 603-614. doi:10.1083/jcb.200507002
- Bodine, S. C., & Baehr, L. M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *307*(6), E469-E484.
- Brook, M. S., Wilkinson, D. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2016). The metabolic and temporal basis of muscle hypertrophy in response to resistance exercise. *Eur J Sport Sci*, *16*(6), 633-644. doi:10.1080/17461391.2015.1073362
- Brown, A. B., McCartney, N., & Sale, D. G. (1990). Positive adaptations to weight-lifting training in the elderly. *J Appl Physiol (1985)*, *69*(5), 1725-1733. doi:10.1152/jappl.1990.69.5.1725

- Burd, N. A., Gorissen, S. H., & van Loon, L. J. (2013). Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exercise and sport sciences reviews*, 41(3), 169-173.
- Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2009). Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *J Appl Physiol* (1985), 106(5), 1692-1701.
doi:10.1152/jappphysiol.91351.2008
- Burd, N. A., West, D. W., Staples, A. W., Atherton, P. J., Baker, J. M., Moore, D. R., . . . Baker, S. K. (2010). Low-load high volume resistance exercise stimulates muscle protein synthesis more than high-load low volume resistance exercise in young men. *PloS one*, 5(8), e12033.
- Burgos, S. A., Dai, M., & Cant, J. P. (2010). Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Dairy Sci*, 93(1), 153-161.
doi:10.3168/jds.2009-2444
- Cermak, N. M., Res, P. T., de Groot, L. C., Saris, W. H., & van Loon, L. J. (2012). Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 96(6), 1454-1464. doi:10.3945/ajcn.112.037556
- Chale, A., Cloutier, G. J., Hau, C., Phillips, E. M., Dallal, G. E., & Fielding, R. A. (2013). Efficacy of whey protein supplementation on resistance exercise-induced changes in lean mass, muscle strength, and physical function in mobility-limited older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(6), 682-690.
doi:10.1093/gerona/gls221
- Delmonico, M. J., Harris, T. B., Visser, M., Park, S. W., Conroy, M. B., Velasquez-Mieyer, P., . . . Goodpaster, B., H. (2009). Longitudinal study of muscle

strength, quality, and adipose tissue infiltration–. *The American journal of clinical nutrition*, 90(6), 1579-1585.

Deutz, N. E., & Wolfe, R. R. (2013). Is there a maximal anabolic response to protein intake with a meal? *Clin Nutr*, 32(2), 309-313. doi:10.1016/j.clnu.2012.11.018

Devries, M. C., & Phillips, S. M. (2015). Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey. *J Food Sci*, 80 Suppl 1, A8-a15. doi:10.1111/1750-3841.12802

Dias, C. P., Toscan, R., de Camargo, M., Pereira, E. P., Griebler, N., Baroni, B. M., & Tiggemann, C. L. (2015). Effects of eccentric-focused and conventional resistance training on strength and functional capacity of older adults. *Age (Dordr)*, 37(5), 99. doi:10.1007/s11357-015-9838-1

Dickinson, J. M., Reidy, P. T., Gundermann, D. M., Borack, M. S., Walker, D. K., D'Lugos, A. C., . . . Rasmussen, B. B. (2017). The impact of postexercise essential amino acid ingestion on the ubiquitin proteasome and autophagosomal-lysosomal systems in skeletal muscle of older men. *J Appl Physiol (1985)*, 122(3), 620-630. doi:10.1152/jappphysiol.00632.2016

Dideriksen, K. J., Reitelseder, S., Petersen, S. G., Hjort, M., Helmark, I. C., Kjaer, M., & Holm, L. (2011). Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals. *Scand J Med Sci Sports*, 21(6), e372-383. doi:10.1111/j.1600-0838.2011.01318.x

Donati, A., Cavallini, G., Paradiso, C., Vittorini, S., Pollera, M., Gori, Z., & Bergamini, E. (2001). Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 56(9), B375-383.

Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Pennings, B., Fry, C. S., Dhanani, S., Dillon, E. L., . . . Rasmussen, B. B. (2008). Skeletal muscle protein anabolic response to

- resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging. *J Appl Physiol* (1985), 104(5), 1452-1461. doi:10.1152/jappphysiol.00021.2008
- Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., . . . Diaz-Meco, M. T. (2011). p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell*, 44(1), 134-146. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.038
- Evans, W. (1997). Functional and metabolic consequences of sarcopenia. *The Journal of nutrition*, 127(5), 998S-1003S.
- Ferri, A., Scaglioni, G., Pousson, M., Capodaglio, P., Van Hoecke, J., & Narici, M. (2003). Strength and power changes of the human plantar flexors and knee extensors in response to resistance training in old age. *Acta Physiologica*, 177(1), 69-78.
- Fiatarone, M. A., O'Neill, E. F., Ryan, N. D., Clements, K. M., Solares, G. R., Nelson, M. E., . . . Evans, W. J. (1994). Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*, 330(25), 1769-1775. doi:10.1056/nejm199406233302501
- Fragala, M. S., Kenny, A. M., & Kuchel, G. A. (2015). Muscle quality in aging: a multi-dimensional approach to muscle functioning with applications for treatment. *Sports Medicine*, 45(5), 641-658.
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., . . . Burke, G. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(3), M146-M157.
- Fritzen, A. M., Frosig, C., Jeppesen, J., Jensen, T. E., Lundsgaard, A. M., Serup, A. K., . . . Kiens, B. (2016). Role of AMPK in regulation of LC3 lipidation as a marker of autophagy in skeletal muscle. *Cell Signal*, 28(6), 663-674. doi:10.1016/j.cellsig.2016.03.005

- Frontera, W. R., Meredith, C. N., O'Reilly, K. P., Knuttgen, H. G., & Evans, W. J. (1988). Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *Journal of Applied Physiology*, *64*(3), 1038-1044.
- Frontera, W. R., Suh, D., Krivickas, L. S., Hughes, V. A., Goldstein, R., & Roubenoff, R. (2000). Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *279*(3), C611-C618.
- Fry, C. S., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2012). Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, *68*(5), 599-607.
- Gaffney-Stomberg, E., Insogna, K. L., Rodriguez, N. R., & Kerstetter, J. E. (2009). Increasing dietary protein requirements in elderly people for optimal muscle and bone health. *J Am Geriatr Soc*, *57*(6), 1073-1079. doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02285.x
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, *221*(1), 3-12.
- Glynn, E. L., Fry, C. S., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., Dhanani, S., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2010). Excess leucine intake enhances muscle anabolic signaling but not net protein anabolism in young men and women. *J Nutr*, *140*(11), 1970-1976. doi:10.3945/jn.110.127647
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, *426*(6968), 895.
- Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., Schwartz, A. V., . . . Newman, A. B. (2006). The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *The*

Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences,
61(10), 1059-1064.

- Grune, T., Reinheckel, T., & Davies, K. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*, 11(7), 526-534.
- Hakkinen, K., Kallinen, M., Izquierdo, M., Jokelainen, K., Lassila, H., Malkia, E., . . . Alen, M. (1998). Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. *Journal of Applied Physiology*, 84(4), 1341-1349.
- Harridge, S. D., Kryger, A., & Stensgaard, A. (1999). Knee extensor strength, activation, and size in very elderly people following strength training. *Muscle & nerve*, 22(7), 831-839.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18(16), 1926-1945. doi:10.1101/gad.1212704
- He, C., Bassik, M. C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., . . . Levine, B. (2012). Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*, 481(7382), 511-515. doi:10.1038/nature10758
- He, C., & Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910
- Hentila, J., Ahtiainen, J. P., Paulsen, G., Raastad, T., Hakkinen, K., Mero, A. A., & Hulmi, J. J. (2018). Autophagy is induced by resistance exercise in young men but unfolded protein response is induced regardless of age. *Acta Physiol (Oxf)*, e13069. doi:10.1111/apha.13069

- Holm, L., van Hall, G., Rose, A. J., Miller, B. F., Doessing, S., Richter, E. A., & Kjaer, M. (2010). Contraction intensity and feeding affect collagen and myofibrillar protein synthesis rates differently in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(2), E257-269. doi:10.1152/ajpendo.00609.2009
- Hortobagyi, T., Lesinski, M., Gabler, M., VanSwearingen, J. M., Malatesta, D., & Granacher, U. (2015). Effects of Three Types of Exercise Interventions on Healthy Old Adults' Gait Speed: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*, 45(12), 1627-1643. doi:10.1007/s40279-015-0371-2
- Häkkinen, K., Pakarinen, A., Newton, R., & Kraemer, W. (1998). Acute hormone responses to heavy resistance lower and upper extremity exercise in young versus old men. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 77(4), 312-319.
- Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., . . . Castro, J. P. (2017). Happily (n) ever after: aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox biology*, 11, 482-501.
- Irving, B. A., Robinson, M. M., & Nair, K. S. (2012). Age effect on myocellular remodeling: response to exercise and nutrition in humans. *Ageing research reviews*, 11(3), 374-389.
- Ivey, F., Tracy, B., Lemmer, J., NessAiver, M., Metter, E., Fozard, J., & Hurley, B. F. (2000). Effects of strength training and detraining on muscle quality: age and gender comparisons. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(3), B152-B157.
- Jackman, R. W., & Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(4), C834-C843.

- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., & Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* (1985), 89(1), 81-88. doi:10.1152/jappl.2000.89.1.81
- Jiao, J., & Demontis, F. (2017). Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Current opinion in pharmacology*, 34, 1-6.
- Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296.
- Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular aspects of medicine*, 30(4), 191-296.
- Karim, M. R., Kanazawa, T., Daigaku, Y., Fujimura, S., Miotto, G., & Kadowaki, M. (2007). Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells. *Autophagy*, 3(6), 553-560.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., & Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*, 462(2), 245-253. doi:10.1016/j.abb.2007.03.034
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132.
- Kim, Y. A., Kim, Y. S., Oh, S. L., Kim, H.-J., & Song, W. (2013). Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(4), 697-705.
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., . . . Adeli, K. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 12(1), 1-222.

- Komatsu, M. (2012). Liver autophagy: physiology and pathology. *J Biochem*, *152*(1), 5-15. doi:10.1093/jb/mvs059
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., . . . Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, *441*(7095), 880-884. doi:10.1038/nature04723
- Kundu, M., Lindsten, T., Yang, C. Y., Wu, J., Zhao, F., Zhang, J., . . . Thompson, C. B. (2008). Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood*, *112*(4), 1493-1502. doi:10.1182/blood-2008-02-137398
- Kuusisto, E., Suuronen, T., & Salminen, A. (2001). Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *280*(1), 223-228. doi:10.1006/bbrc.2000.4107
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, *441*(2), 523-540. doi:10.1042/bj20111451
- Lenhare, L., Crisol, B. M., Silva, V. R. R., Katashima, C. K., Cordeiro, A. V., Pereira, K. D., . . . Ropelle, E. R. (2017). Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. *Exp Gerontol*, *97*, 17-21. doi:10.1016/j.exger.2017.07.009
- Lexell, J., & Taylor, C. C. (1991). Variability in muscle fibre areas in whole human quadriceps muscle: effects of increasing age. *Journal of anatomy*, *174*, 239.
- Lin, X., Li, S., Zhao, Y., Ma, X., Zhang, K., He, X., & Wang, Z. (2013). Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol*, *32*(5), 220-227. doi:10.1089/dna.2012.1915

- Lindle, R. S., Metter, E. J., Lynch, N. A., Fleg, J. L., Fozard, J. L., Tobin, J., . . . Hurley, B. F. (1997). Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. *J Appl Physiol (1985)*, *83*(5), 1581-1587.
doi:10.1152/jappl.1997.83.5.1581
- Lipinski, M. M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B. F., Ng, A., . . . Scherzer, C. R. (2010). Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(32), 14164-14169.
- Lippai, M., & Szatmari, Z. (2017). Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance. *Cell Biol Toxicol*, *33*(2), 145-168. doi:10.1007/s10565-016-9374-5
- Luo, L., Lu, A.-M., Wang, Y., Hong, A., Chen, Y., Hu, J., . . . Qin, Z.-H. (2013). Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Experimental gerontology*, *48*(4), 427-436.
- Lynch, N., Metter, E., Lindle, R., Fozard, J., Tobin, J., Roy, T., . . . Hurley, B. (1999). Muscle quality. I. Age-associated differences between arm and leg muscle groups. *Journal of Applied Physiology*, *86*(1), 188-194.
- Markofski, M. M., Dickinson, J. M., Drummond, M. J., Fry, C. S., Fujita, S., Gundermann, D. M., . . . Volpi, E. (2015). Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Exp Gerontol*, *65*, 1-7. doi:10.1016/j.exger.2015.02.015
- Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M., & Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, *8*(6), 903-914.
- Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., & Singh, R. (2015). Autophagy and aging. In *Longevity Genes* (pp. 73-87): Springer.

- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., . . . Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell metabolism*, *10*(6), 507-515.
- McMullen, C. A., Ferry, A. L., Gamboa, J. L., Andrade, F. H., & Dupont-Versteegden, E. E. (2009). Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle. *Experimental gerontology*, *44*(6-7), 420-425.
- Mejias-Pena, Y., Estebanez, B., Rodriguez-Miguel, P., Fernandez-Gonzalo, R., Almar, M., de Paz, J. A., . . . Cuevas, M. J. (2017). Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. *Aging (Albany NY)*, *9*(2), 408-418. doi:10.18632/aging.101167
- Mejias-Pena, Y., Rodriguez-Miguel, P., Fernandez-Gonzalo, R., Martinez-Florez, S., Almar, M., de Paz, J. A., . . . Gonzalez-Gallego, J. (2016). Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. *Age (Dordr)*, *38*(2), 33. doi:10.1007/s11357-016-9897-y
- Millward, D. J., Garlick, P. J., Stewart, R., Nnanyelugo, D., & Waterlow, J. (1975). Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochemical Journal*, *150*(2), 235.
- Misic, M. M., Rosengren, K. S., Woods, J. A., & Evans, E. M. (2007). Muscle quality, aerobic fitness and fat mass predict lower-extremity physical function in community-dwelling older adults. *Gerontology*, *53*(5), 260-266.
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., Cameron-Smith, D., & Phillips, S. M. (2015). What is the relationship between the acute muscle protein synthesis response and changes in muscle mass? *J Appl Physiol (1985)*, *118*(4), 495-497. doi:10.1152/jappphysiol.00609.2014
- Mizushima, N., & Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr*, *27*, 19-40. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749

- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326.
- Morse, C. I., Thom, J. M., Davis, M. G., Fox, K. R., Birch, K. M., & Narici, M. V. (2004). Reduced plantarflexor specific torque in the elderly is associated with a lower activation capacity. *Eur J Appl Physiol*, 92(1-2), 219-226.
doi:10.1007/s00421-004-1056-y
- Nagasawa, T., Kido, T., Yoshizawa, F., Ito, Y., & Nishizawa, N. (2002). Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *J Nutr Biochem*, 13(2), 121-127.
- Nakashima, K., Ishida, A., Yamazaki, M., & Abe, H. (2005). Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin-proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(2), 660-666.
doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.138
- Nakaso, K., Yoshimoto, Y., Nakano, T., Takeshima, T., Fukuhara, Y., Yasui, K., . . . Nakashima, K. (2004). Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms and the role in Lewy body formation in Parkinson's disease. *Brain research*, 1012(1-2), 42-51.
- Narici, M. V., & Maganaris, C. N. (2006). Adaptability of elderly human muscles and tendons to increased loading. *Journal of anatomy*, 208(4), 433-443.
- Narici, M. V., Maganaris, C. N., Reeves, N. D., & Capodaglio, P. (2003). Effect of aging on human muscle architecture. *J Appl Physiol (1985)*, 95(6), 2229-2234.
doi:10.1152/jappphysiol.00433.2003

- Ogura, Y., Iemitsu, M., Naito, H., Kakigi, R., Kakehashi, C., Maeda, S., & Akema, T. (2011). Single bout of running exercise changes LC3-II expression in rat cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, *414*(4), 756-760.
doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.152
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., . . . Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, *282*(33), 24131-24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, *20*(3), 460-473.
doi:10.1089/ars.2013.5371
- Pennings, B., Groen, B., de Lange, A., Gijsen, A. P., Zorenc, A. H., Senden, J. M., & van Loon, L. J. (2012). Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *302*(8), E992-999. doi:10.1152/ajpendo.00517.2011
- Peterson, M. D., Rhea, M. R., Sen, A., & Gordon, P. M. (2010). Resistance exercise for muscular strength in older adults: a meta-analysis. *Ageing research reviews*, *9*(3), 226-237.
- Peterson, M. D., Sen, A., & Gordon, P. M. (2011). Influence of resistance exercise on lean body mass in aging adults: a meta-analysis. *Medicine and science in sports and exercise*, *43*(2), 249.
- Philippe, A. G., Py, G., Favier, F. B., Sanchez, A. M., Bonnieu, A., Busso, T., & Candau, R. (2015). Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *Biomed Res Int*, *2015*, 914860. doi:10.1155/2015/914860
- Phillips, S. M. (2009). Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and

exercise dose effects). *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3), 403-410.
doi:10.1139/h09-042

Phillips, S. M., Tipton, K. D., Aarsland, A., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1997). Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 273(1), E99-E107.

Pinto, R. S., Correa, C. S., Radaelli, R., Cadore, E. L., Brown, L. E., & Bottaro, M. (2014). Short-term strength training improves muscle quality and functional capacity of elderly women. *Age (Dordr)*, 36(1), 365-372. doi:10.1007/s11357-013-9567-2

Ravikumar, B., Duden, R., & Rubinsztein, D. C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*, 11(9), 1107-1117.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., . . . Rubinsztein, D. C. (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 36(6), 585-595. doi:10.1038/ng1362

Rea, S. L., Majcher, V., Searle, M. S., & Layfield, R. (2014). SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res*, 325(1), 27-37. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.020

Rubinsztein, D. C., Marino, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell*, 146(5), 682-695. doi:10.1016/j.cell.2011.07.030

Rudrappa, S. S., Wilkinson, D. J., Greenhaff, P. L., Smith, K., Idris, I., & Atherton, P. J. (2016). Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol*, 7, 361. doi:10.3389/fphys.2016.00361

- Sakuma, K., Aoi, W., & Yamaguchi, A. (2015). Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(2), 213-229.
- Sakuma, K., Kinoshita, M., Ito, Y., Aizawa, M., Aoi, W., & Yamaguchi, A. (2016). p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 7(2), 204-212.
- Sandri, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS letters*, 584(7), 1411-1416.
- Schoenfeld, B. J. (2010). The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 24(10), 2857-2872.
- Schot, P. K., Knutzen, K. M., Poole, S. M., & Mrotek, L. A. (2003). Sit-to-stand performance of older adults following strength training. *Res Q Exerc Sport*, 74(1), 1-8. doi:10.1080/02701367.2003.10609123
- Schutz, Y. (2011). Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81(2), 101.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., . . . Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347), 337.
- Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., & Nair, K. S. (2004). Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 286(1), E92-E101.

- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., . . . Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, *458*(7242), 1131-1135. doi:10.1038/nature07976
- Smith, G. I., & Mittendorfer, B. (2015). Sexual dimorphism in skeletal muscle protein turnover. *Journal of Applied Physiology*, *120*(6), 674-682.
- Stewart, V. H., Saunders, D. H., & Greig, C. A. (2014). Responsiveness of muscle size and strength to physical training in very elderly people: a systematic review. *Scand J Med Sci Sports*, *24*(1), e1-10. doi:10.1111/sms.12123
- Till, A., Lakhani, R., Burnett, S. F., & Subramani, S. (2012). Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes. *Int J Cell Biol*, *2012*, 512721. doi:10.1155/2012/512721
- Toffolo, G., Foster, D. M., & Cobelli, C. (1993). Estimation of protein fractional synthetic rate from tracer data. *Am J Physiol*, *264*(1 Pt 1), E128-135. doi:10.1152/ajpendo.1993.264.1.E128
- Tracy, B., Ivey, F., Hurlbut, D., Martel, G., Lemmer, J., Siegel, E., . . . Hurley, B. (1999). Muscle quality. II. Effects of strength training in 65-to 75-yr-old men and women. *Journal of Applied Physiology*, *86*(1), 195-201.
- Treuth, M. S., Ryan, A. S., Pratley, R. E., Rubin, M. A., Miller, J. P., Nicklas, B. J., . . . Hurley, B. F. (1994). Effects of strength training on total and regional body composition in older men. *J Appl Physiol (1985)*, *77*(2), 614-620. doi:10.1152/jappl.1994.77.2.614
- Van Abbema, R., De Greef, M., Craje, C., Krijnen, W., Hobbelen, H., & Van Der Schans, C. (2015). What type, or combination of exercise can improve preferred gait speed in older adults? A meta-analysis. *BMC Geriatr*, *15*, 72. doi:10.1186/s12877-015-0061-9

- Vendelbo, M. H., Møller, A. B., Christensen, B., Nellesmann, B., Clasen, B. F. F., Nair, K. S., . . . Møller, N. (2014). Fasting increases human skeletal muscle net phenylalanine release and this is associated with decreased mTOR signaling. *PloS one*, *9*(7), e102031.
- von Haehling, S., Morley, J. E., & Anker, S. D. (2010). An overview of sarcopenia: facts and numbers on prevalence and clinical impact. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *1*(2), 129-133.
- Welle, S., Totterman, S., & Thornton, C. (1996). Effect of age on muscle hypertrophy induced by resistance training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *51*(6), M270-275.
- White, Z., Terrill, J., White, R. B., McMahon, C., Sheard, P., Grounds, M. D., & Shavlakadze, T. (2016). Voluntary resistance wheel exercise from mid-life prevents sarcopenia and increases markers of mitochondrial function and autophagy in muscles of old male and female C57BL/6J mice. *Skelet Muscle*, *6*(1), 45. doi:10.1186/s13395-016-0117-3
- Wohlgemuth, S. E., Seo, A. Y., Marzetti, E., Lees, H. A., & Leeuwenburgh, C. (2010). Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise. *Experimental gerontology*, *45*(2), 138-148.
- Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., & Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*, *23*(1), 33-42.
- Yan, X., Sun, Q., Ji, J., Zhu, Y., Liu, Z., & Zhong, Q. (2012). Reconstitution of leucine-mediated autophagy via the mTORC1-Barkor pathway in vitro. *Autophagy*, *8*(2), 213-221. doi:10.4161/auto.8.2.18563
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, *22*(2), 124-131.

Tabelloversikt

Tabell 3.1: Styrketreningsprogrammet til ST+PRO.	34
Tabell 3.2: Oversikt over primære og sekundære antistoff.	36
Tabell 4.1: Oversikt over deltakerne i ST+PRO og PRO ved baseline. * indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$).	39
Tabell 4.2: Oversikt over resultatene for de ulike proteinene. \leftrightarrow =ingen endring. \uparrow =signifikant økning ($p < 0,05$). \downarrow =signifikant reduksjon ($p < 0,05$). \sphericalangle =Tendens til reduksjon ($p < 0,1$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0,05$).	47

Figuroversikt

Figur 2.1: Overblikk over autofagiprosessen. Figuren er basert på arbeidet til Lippai & Szatmari (2017), Martinez-Lopez et al. (2015), Rubinsztein, Marino og Kroemer (2011) og Tanida (2011).	20
Figur 3.1: Representative proteinbånd i cytosolfraksjon. Tallene indikerer biopsirekkefølge der 1 og 2 er fra akutt dag 1 mens 3 og 4 er fra akutt dagen etter intervensjonen.....	37
Figur 3.2: Representative proteinbånd i membranfraksjon. Tallene indikerer biopsirekkefølge der 1 og 2 er fra akutt dag 1 mens 3 og 4 er fra akutt dagen etter intervensjonen.....	37
Figur 4.1: Endring i 1 RM kneekstensjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	40
Figur 4.2: Endring i tverrsnitt av m. quadriceps som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	40
Figur 4.3: Korrelasjonsplott mellom endring i 1RM kneekstensjon og endring i tverrsnitt i m. quadriceps som følge av intervensjon hos ST+PRO.	41
Figur 4.4: Endring i muskelkvalitet som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	41
Figur 4.5: Endring i tid på stoltest som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. #=signifikant forskjell mellom gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	42
Figur 4.6: Endring i selvvalgt ganghastighet som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	42
Figur 4.7: Akutt respons for p62 i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO, og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.....	43
Figur 4.8: Akutt respons i LC3-I i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$). #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p<0,05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline.	43
Figur 4.9: Akutt respons i LC3-II i cytosolfraksjon i ST+PRO og PRO. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$).	44
Figur 4.10: Akutt respons i LC3-II i membranfraksjon i ST+PRO og PRO. *=signifikant forskjell fra pre ($p<0,05$).	44

- Figur 4.11:** Respons i p62 som følge av intervensjon i cytosolfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer baseline-nivå. 45
- Figur 4.12:** Respons i p62 som følge av intervensjonen i membranfraksjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. #=signifikant forskjell mellom gruppene ($p < 0.05$). Stiplet linje indikerer nivå ved baseline..... 45
- Figur 4.13:** Respons i LC3-I i membranfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline. 46
- Figur 4.14:** Respons i LC3-II i cytosolfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline. 46
- Figur 4.15:** Respons i LC3-II i membranfraksjon som følge av intervensjon i ST+PRO, PRO og % endring fra baseline innad i de to gruppene. Stiplet linje indikerer nivå ved baseline. 46
- Figur 5.1:** Autofagiprosessen med viktige regulatoriske steg. Figuren er basert på arbeidet til Lippai & Szatmari, 2017; Martinez-Lopez et al., 2015; Tanida, 2011 og Yu et al., 2011.) 59

Forkortelser

Akt	Proteinkinase B
AMPK	Adenosinmonofosfat-aktivert proteinkinase
ATG	Autophagy-related gene or protein
ATP	Adenosintrifosfat
Atrogin-1	Muscle atrophy F-box
Beclin-1	Coiled-coil moesin-like BCL2-interacting protein
BMI	Body mass index
CT	Computertomografi
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
FIP200	FAK-family interacting protein of 200 kDa
FOXO3a	Forkhead box O transcription factor 3
FSR	Fractional synthetic rate
IMVC	Maksimal isometrisk voluntær kontraksjon
LAMP2	Lysosomal associated membrane protein-2
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre
mTOR	Mammalian/mechanistic target of rapamycin
MuRF1	Muscle specific RING finger 1
MRI	Magnetresonanstomografi
p62/SQSTM1	Sequestosome 1
PE	Fosfatidyletanolamin
PI3P	Fosfatidylinositol 3-fosfat
PI3K	Fosfatidylinositid 3 kinase

RM	Repetition maximum
SPPB	Short Physical Performance Battery
STAS	Styrketrening, aldring og sarkopeni
UPS	Ubiquitin-proteasom-systemet
ULK1	Unc-51 like Autophagy Activating Kinase 1

Vedlegg 1



NORGES IDRETTSHØGSKOLE

FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKTET

STYRKETRENING FOR ELDRE MED LAV MUSKELSTYRKE

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt hvor vi ønsker å undersøke effekten av et enkelt og tidseffektivt styrketreningsopplegg sammen med proteinsupplementering på muskelmasse, muskelstyrke, muskelkvalitet og fysisk prestasjonsevne hos eldre med lavt funksjonsnivå.

Med økende alder ser man en gradvis reduksjon i både muskelmasse og muskelstyrke, men tapet av muskelstyrke er større enn tapet av muskelmasse. Som et resultat reduseres muskelkvaliteten med økende alder (definert som muskelstyrke/muskeltverrsnitt). Ved styrketrening er utviklingen den motsatte; muskelstyrken øker vesentlig mer enn muskelmassen, og muskelkvaliteten økes. Dette er spesielt tydelig hos eldre personer som i utgangspunktet har lav muskelstyrke. Vi vet likevel lite om det relative bidraget fra de ulike faktorene som kan tenkes å påvirke muskelkvaliteten ved styrketrening. Vi ønsker derfor å rekruttere eldre med lav muskelstyrke til en studie hvor vi undersøker endringer i muskelkvalitet som følge av styrketrening og proteinsupplementering. Norges idrettshøgskole er ansvarlig for gjennomføring av prosjektet, og de fleste tester vil gjennomføres her. All styrketrening gjennomføres på ditt sykehjem/dagsenter eller i nærheten av der du bor.

HVA INNEBÆRER PROSJEKTET?

Dette er en randomisert kontrollert studie. Det betyr at du trekkes tilfeldig til en av to grupper. Den ene gruppen skal gjennomføre styrketrening to ganger per uke i 10 uker, og innta en kartong Tine Styrk (0.33 l) daglig gjennom perioden. Den andre gruppen skal innta

samme mengde Tine Styrk, men ikke gjennomføre styrketrening. På denne måten kan vi sammenligne effekten av økt proteininntak alene og økt proteininntak i kombinasjon med styrketrening. Dersom du trekkes til treningsgruppen, vil all trening finne sted på ditt sykehjem, dagsenter, eller like i nærheten av der du bor. Før og etter intervensjonsperioden vil det gjennomføres ulike tester ved Norges idrettshøgskole.

Tester på sykehjemmet/omsorgsboligen

For å vurdere hvorvidt du kan inkluderes som forsøksperson i denne studien, vil vi gjennomføre noen tester der du holder til. Vi kommer til å måle høyde og vekt, blodtrykk og blodprofil (fingerstikk). I tillegg kommer vi til å gjennomføre ulike funksjonelle tester, hvor vi måler balanse, ganghastighet, og hvor raskt du kan reise deg opp fra en stol. Vi vil også gjennomføre en enkel test for å måle grepstyrke. Før du inkluderes som deltaker vil du også måtte besvare et spørreskjema omhandlende hjerteproblematikk, medisinbruk med mer. På bakgrunn av dine svar her vil vi vurdere hvorvidt en legeundersøkelse skal gjennomføres før du eventuelt inkluderes i studien. Vi vil også gjennomføre en test som evaluerer kognitiv funksjon (enkle tester på forståelse av ulike oppgaver). Både funksjonelle tester, kognitiv test, og en eventuell legesjekk vil avgjøre hvorvidt du kan inkluderes i studien eller ikke.

Tester på Norges idrettshøgskole

Dersom du blir inkludert i prosjektet skal du møte på Norges idrettshøgskole tre ganger før treningsperioden og to ganger etter treningsperioden. Vi vil bistå med transport. Hvert oppmøte vil vare i 2-5 timer, og en av disse dagene skal du møte fastende (ikke spise frokost før du ankommer). Tidspunkter for de ulike testdagene avtales individuelt. Felles for alle testdager er at du må avstå fra fysisk trening de siste to dagene før testing.

Testdag 1 gjennomføres den første gangen du kommer til Norges idrettshøgskole. Denne testdagen tar omtrent 3 timer å gjennomføre. Vi vil bistå med transport til og fra Norges idrettshøgskole.

- *DXA*: En DXA-analyse vil gjennomføres for å måle kroppssammensetningen din. Denne testen innebærer at man ligger stille i ca. 10 minutter.
- *Muskelfunksjonstest*: Gir et mål på styrke og eksplosivitet i musklene som strekker kneleddet.
- *Grad av muskelaktivering*: For å undersøke i hvor stor grad du greier å aktivere

muskulaturen når du tar i alt du kan.

- *1RM*: Maksimal styrke i øvelsen kneekstensjon.

Testdag 2 gjennomføres andre gang du møter på Norges idrettshøgskole. Denne dagen skal du gjennomføre de samme testene som du gjennomførte testdag 1, med unntak av DXA. I tillegg skal vi gjennomføre en ultralydundersøkelse av låret ditt denne dagen. Årsaken til at mange av testene gjennomføres to ganger er at noen av testene krever litt tilvenning/trening, og ved å gjennomføre disse to ganger er det større sannsynlighet for at resultatene blir riktige. Testdag 2 vil ta omtrent 3 timer å gjennomføre.

Testdag 3 gjennomføres også på Norges idrettshøgskole. Denne dagen skal du ta muskelbiopsier og blodprøver før og etter en styrketreningsøkt (dersom du trekkes til treningsgruppen). Dersom du trekkes til gruppen som bare får proteinsupplementering, skal du gjennomføre alle testene som er oppført nedenfor, med unntak av treningsøkten. Denne dagen skal du møte fastende, men i likhet med testdag 1 vil du få frokost etter å ha gjennomført de første testene. Nedenfor følger en oversikt over denne testdagen, som tar 4-5 timer å gjennomføre. Det vil bli gode pauser mellom de ulike testene, hvor det er mulighet for å hvile. Vi vil bistå med transport til og fra Norges idrettshøgskole.

- Blodprøve (fastende)
- Standardisert frokost (havregrøt)
- Muskelbiopsi fra ytre lårmuskel
- Styrketreningsøkt med øvelsen kneekstensjon (gjelder bare treningsgruppen)
- Inntak av 0,33 ml Tine Styrk
- Muskelbiopsi fra ytre lårmuskel

Du skal totalt ta to muskelbiopsier denne dagen, men begge biopsiene vil bli tatt fra det samme snittet i huden. Muskelbiopsiene tas ut på følgende måte:

- Huden og bindevevet lokalbedøves der vevsprøven skal tas.
- Et snitt på ca. 1-2 cm gjøres gjennom hud og bindevevet over muskelen.
- En nål med diameter på 6 mm føres inn (2-3 cm) og 1-3 små biter av muskulaturen tas ut (total 200-300 mg muskelvev).
- Snittet lukkes med tape (strips).

CT på Currato røntgen

I tillegg til testdagene på Norges idrettshøgskole, skal du gjennomføre en CT-undersøkelse

ved Currato røntgen (Oslo sentrum) både før og etter intervensjonsperioden. Hensikten med denne undersøkelsen er å måle tverrsnittet av lårmusklene dine. CT-bildene gir oss i tillegg muligheten til å undersøke grad av fettinfiltrering i muskulaturen. Denne undersøkelsen tar omtrent en halv time. Vi vil bistå med transport.

Muskelproteinnedbrytning

Vi ønsker å måle muskelproteinnedbrytning hos et utvalg av forsøkspersonene. Disse målingene gjøres ved hjelp av dobbeltmerket vann ($^2\text{H}_2\text{O}$), og forutsetter en ekstra muskelbiopsi mot slutten av intervensjonsperioden. Tre uker før intervensjonsperioden starter, skal du drikke en bestemt mengde dobbeltmerket vann (ca. 2 dl) utblandet i vanlig vann (ca. 2 dl). På denne måten vil muskelproteinene merkes, og vi vil i neste steg kunne måle nedbrytningshastigheten for muskelproteinene omtrent 80 dager senere. Bruken av dobbeltmerket vann er utbredt i forbindelse med forskning og diagnostikk.

Treningsperioden

Dersom du trekkes til treningsgruppen, skal du gjennomføre styrketrening i 10 uker. Treningsperioden starter når du har gjennomført alle testene. Du skal gjennomføre styrketrening to ganger i uken i grupper på to/tre deltakere. Hver enkelt økt vil ha en varighet på 20-40 minutter, og den vil gjennomføres der du bor (sykehjem, dagsenter, i tilknytning omsorgsbolig). Alle treningsøkter gjennomføres med oppfølging av en instruktør. Treningsprogrammet som skal gjennomføres består av beinpress, kneekstensjon (kneestrek) og to øvelser der du går opp på en kasse. Alle øvelser vil tilpasses den enkeltes funksjonsnivå. Treningsøvelsene som er valgt belaster muskler som innehar en viktig rolle i mange daglige gjøremål. Etter treningsperioden gjennomføres testdag 1 og testdag 3 og CT på Currato røntgen på nytt for å måle endringer.

Vi vil kun lagre informasjon om deg under ditt forsøkspersonnummer. Undervis i forsøket vil vi oppbevare en kodeliste med navn og forsøkspersonnummer. Denne kodelisten vil fysisk være låst inne, slik at det er kun forskerne tilknyttet studien som har adgang til den. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt. Innsamlet data vil bli anonymisert etter 15 år (kodelisten destrueres). Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Tidligere studier har vist at styrketrening har meget god effekt på muskelstyrke og fysisk funksjonsevne, spesielt for eldre som i utgangspunktet har et lavt funksjonsnivå.

Forsøkspersoner som trekkes til treningsgruppen vil derfor med stor sannsynlighet oppleve god fremgang i styrke og funksjonsnivå, og potensielt erfare at mange daglige oppgaver vil gå lettere etter treningsperioden. I tillegg vil du som deltaker få god innsikt i hvordan treningen drives slik at du vil være i stand til å fortsette slik trening etter avsluttet prosjekt. Dersom du trekkes til gruppen som bare skal innta protein, vil du få tilbud om treningsoppfølging etter at den første intervensjonsperioden er gjennomført. Denne treningen vil foregå i perioden januar-april i 2018. Du vil med andre ord få treningsoppfølging uansett hvilken gruppe du trekkes til, men du må vente til januar 2018 hvis du trekkes inn i kontrollgruppen.

Deltakelse i prosjektet vil kreve en del tid og oppmerksomhet. Det blir tre oppmøter på Norges idrettshøgskole før treningsperioden, og to oppmøter etter endt 10-ukersperiode. I tillegg skal du gjennomføre en CT-undersøkelse ved Currato Røntgen i Oslo sentrum både før og etter treningsperioden. Som tidligere nevnt vil vi bistå med transport i forbindelse med all testing dersom det er nødvendig, og for å begrense belastningen for hver enkelt forsøksperson vil en del av testene bare gjennomføres for et utvalg av forsøkspersonene. Dette vil riktignok ikke redusere antall oppmøter, men vil redusere antall tester per oppmøte.

Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare (minimal), og litt ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet. Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.

Voluntær muskelaktivering som gjennomføres under testdag 1 og testdag 2 kan oppleves litt ubehagelig, da lårmusklene ved denne testen aktiveres ved hjelp av strøm-elektroder. Denne testen er ikke invasiv, og elektrodene er "lapper" som festes på huden.

CT-undersøkelsen medfører at forsøkspersonene utsettes for stråling. For å begrense strålemengden, undersøkes bare det ene låret på tre steder.

Selve treningen skal gjennomføres med forholdsvis stor belastning, og vil medføre en viss risiko for skade og følelse av sårhet/stølhets i muskulaturen.

FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE SITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Dersom du trekker deg fra prosjektet, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner. Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte Sigve Nyvik Aas, tlf: 41499074, epost: s.a.nyvik@nih.no

HVA SKJER MED INFORMASJONEN OM DEG?

Informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert. Alle opplysningene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger gjennom en navneliste.

Prosjektleder har ansvar for den daglige driften av forskningsprosjektet og at opplysninger om deg blir behandlet på en sikker måte. Informasjon om deg vil bli anonymisert eller slettet senest femten år etter prosjektslutt.

HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Biopsiene og blodprøvene som tas av deg vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser (vurdert av Regional Etisk Komite). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2031. Ansvarlig for biobanken er Dr. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved NIH. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til universitetet i Padova (Italia) og København (Danmark).

FORSIKRING

Deltakere i prosjektet er forsikret dersom det skulle oppstå skade eller komplikasjoner som

følge av deltakelse i forskningsprosjektet. NIH er en statlig institusjon og er således selvassurandør. Dette innebærer at det er NIH som dekker en eventuell erstatning og ikke et forsikringsselskap.

UTLEVERING AV OPPLYSNINGER TIL ANDRE

Ved å delta i prosjektet, samtykker du også til at vevsprøver (muskelbiopsier og blodprøver) kan utleveres til utlandet. Koden som knytter deg til dine personidentifiserende opplysninger vil ikke bli utlevert.

OPPFØLGINGSPROSJEKT

Det kan være aktuelt med et oppfølgingsprosjekt innen fem år etter at dette prosjektet er gjennomført. Dersom du signerer samtykkeskjemaet, kan det derfor være at vi tar kontakt med deg innen fem år etter gjennomføring av dette prosjektet. Du vil naturligvis stå helt fritt til å avstå fra deltakelse i et eventuelt oppfølgingsprosjekt.

GODKJENNING

Prosjektet er godkjent av Regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, REK (2016/895).

SAMTYKKE TIL DELTAKELSE I PROSJEKTET

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

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

Med vennlig hilsen,

Sigve Nyvik Aas, Stipendiat (tlf: 414 99 074)

Truls Raastad, Professor (tlf: 23 26 23 28 / 91 36 88 96)

JEG ER VILLIG TIL Å DELTA I PROSJEKTET

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn med trykte bokstaver

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om prosjektet

Sted og dato

Signatur

Rolle i prosjektet

Vedlegg 2

Kriterium 1: Matlyst <u>JA</u> <u>NEI</u>	Se eget skjema Spørsmål 1) Alternativ: Spørsmål 2) Alternativ: Personer som oppgir alternativ 3 på begge spørsmål, oppfyller kriteriet.				
Kriterium 2: Håndgripsstyrke <u>JA</u> <u>NEI</u>	Håndgripsstyrke for dominant hånd (gjennomsnitt av tre målinger)				
	Resultat:	BMI/mann	Cut-off (kg)	BMI/kvinne	Cut-off (kg)
	#1:	≤24	≤29	≤23	≤17
	#2:	24-26	≤30	23-26	≤17.3
	#3:	26-28	≤30	26-29	≤18
	Gj.snitt:	>28	≤32	>29	≤21
Kriterium 3: Utmattelse <u>JA</u> <u>NEI</u>	Se eget skjema. Påstand 1) Alternativ: Påstand 2) Alternativ: Personer som oppgir alternativ 3 eller 4 på ett eller begge spørsmålene, oppfyller kriteriet "utmattelse".				
Kriterium 4: Ganghastighet <u>JA</u> <u>NEI</u>	Hentes fra SPPB. Cut-off tid på å gå 4 meter (statisk start)				
	Resultat:	Mann (cm)	Cut-offs (s)	Dame (cm)	Cut-offs (s)
	#1:	≤173	≥6.15 (0.65 m/s)	≤159	≥6.15 (0.65 m/s)
	#2:	>173	≥5.25 (0.76 m/s)	>159	≥5.25 (0.76 m/s)
	Gj.snitt:				
Kriterium 5: Aktivitetsnivå <u>JA</u> <u>NEI</u>	Se eget skjema. Spørsmål 1) Alternativ: Personer som oppgir alternativ 3 eller 4 oppfyller kriteriet "lavt aktivitetsnivå".				

Personer som oppfyller tre av kriteriene kan inkluderes.

Personer som oppfyller to av kriteriene kan inkluderes, gitt at to av kriteriene 2, 4 og 5 er oppfylt.

Kan personen inkluderes som deltaker? JA NEI

Vedlegg 3

Registreringsark

dd/mnd/år:

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

ID/navn:

<input type="text"/>

1. Balansetest

1.Samlede føtter 10 sekunder



1. sek



2.Semi-tandem 10 sekunder



2. sek



3.Tandem 10 sekunder



3. sek



Gå til gangtest

2. Gangtest



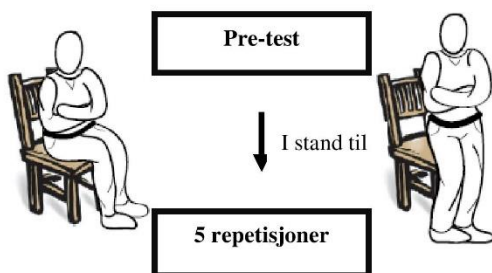
Ganghjelpemidler ved test (kryss av):

- uten
- krykke/stokk (er)
- rollator
- Annet (spesifiser) _____

Tid test 1: sek

Tid test 2: sek

3. Reise/ sette seg



Ikke i stand til → Avslutt

Setehøyde cm

Tid 5 repetisjoner uten armbruk: sek

Tester:

SCORING SPPB:

dd/mnd/år:

ID/navn:

1. Score statisk balanse

Hvis deltageren ikke har forsøkt eller mislyktes, kryss av hvorfor:

- Forsøkte, men ikke i stand til(0p)
- Deltageren kunne ikke holde stillingen uten hjelp(0p)
- Ikke forsøkt, tester følte det utrygg(0p)
- Ikke forsøkt, deltager følte seg utrygg(0p)
- Deltager tar ikke instruksjon(missing)
- Annet (spesifiser) _____
- Deltager nektet(missing)



**Samlede
føtter**

=10 sek = 1 p
<10 sek = 0 p



+

**Semi-
tandem**

=10 sek = 1 p
<10 sek = 0 p



+

Tandem

=10 sek = 2 p
3 - 9.99 sek = 1 p
< 3 sek = 0 p

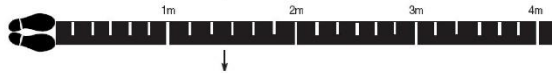
=

Sum poeng balanse:

2. Score 4m gangtest

Hvis deltageren ikke har forsøkt eller mislyktes, kryss av hvorfor:

- Forsøkte, men ikke i stand til(0p)
- Deltageren kunne ikke gå uten assistanse(0p)
- Ikke forsøkt, tester følte det utrygg(0p)
- Ikke forsøkt, deltager følte seg utrygg(0p)
- Deltager tar ikke instruksjon(missing)
- Annet (spesifiser) _____
- Deltager nektet(missing)



Deltager var ikke i stand til: = 0 poeng
Hvis tiden var > 8.7 = 1 poeng
Hvis tiden var 6.21 - 8.70 = 2 poeng
Hvis tiden var 4.82 - 6.20 = 3 poeng
Hvis tiden var < 4.82 = 4 poeng

Poeng ganghastighet (beste av to forsøk):

3. Score reise/sette seg x5

Hvis deltageren ikke har forsøkt eller mislyktes, kryss av hvorfor:

- Forsøkte, men ikke i stand til(0p)
- Deltageren kunne ikke reise seg uten hjelp(0p)
- Ikke forsøkt, tester følte det utrygg(0p)
- Ikke forsøkt, deltager følte seg utrygg(0p)
- Deltager tar ikke instruksjon(missing)
- Annet (spesifiser) _____
- Deltager nektet(missing)

Deltager var ikke istand til/brukte >60 sek = 0 poeng
Hvis tiden var ≥ 16.7 sek = 1 poeng
Hvis tiden var 13.7 - 16.69 sek = 2 poeng
Hvis tiden var 11.20 - 13.69 sek = 3 poeng
Hvis tiden var ≤ 11.19 sek = 4 poeng



Poeng reise/sette seg x5:

tester:

TOTAL SCORE SPPB 1.+2.+3.:

Vedlegg 4

Kartleggingsskjema - Helse

Kjenner du til at du har en hjertesykdom? Ja Nei Vet ikke

Evt. hvilken:

Har du pacemaker? Ja Nei Vet ikke

Kjenner du til at du har høyt blodtrykk? Ja Nei Vet ikke

Bruker du for tiden medisiner for høyt blodtrykk eller hjertesykdom? Ja Nei Vet ikke

Hvis ja på forrige spørsmål; hvilke medisiner?

Røyker du? Ja Nei Vet ikke

Kjenner du til om du har høyt kolesterolnivå i blodet? Ja Nei Vet ikke

Har du besvimt i løpet av de siste 6 måneder? Ja Nei Vet ikke

Har du sukkersyke/diabetes? Ja Nei Vet ikke

Er du allergisk mot melk/laktose? Ja Nei Vet ikke

Er du allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende den man får hos tannlege)? Ja Nei Vet ikke

Har du artrose/leddgikt i knær? Ja Nei Vet ikke

Har du artrose/leddgikt i hofte? Ja Nei Vet ikke

Kjenner du til noen annen grunn til at din deltakelse i prosjektet kan medføre helse- eller skaderisiko? Ja Nei Vet ikke

Evt. hva: