

Håvard Hamarland

Effekten av restitusjonsdrikken Smartfish og vitamin C og E på hypertrofisignalering etter en styrketreningsøkt

Masteroppgave i idrettsvitenskap
Seksjon for fysisk prestasjonsevne
Norges idrettshøgskole, 2011

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet på resultater fra prosjektet "SARA" som i regi av seksjon for fysisk prestasjonsevne ble gjennomført i perioden 2010-2011 ved Norges idrettshøgskole.

Det har vært en lang, tidkrevende og ikke minst lærerik prosess. Det er mange som har vært med på å gjøre det mulig å gjennomføre denne masteren og som fortjener en stor takk:

Jeg vil først og fremst takke Gøran for god veiledning og oppfølging gjennom et spennende prosjekt!

Takk til Truls for tid til gode tips selv om du alltid egentlig skulle vært et annet sted.

Takk til Rasmus for et godt samarbeid under gjennomføringen av studien og for godt humør i skriveperioden.

Takk til resten av kontoret, Camilla, Hege og Laura for god stemning både på kontor og lab.

Takk til de andre masterstudentene og ansatte ved seksjonen for hjelp når man trenger det og for at dere bidrar til at seksjonen er et så trivelig sted å være.

Takk til alle forsøkspersonene, som stilte opp med blod, svette, muskelbiter, for upåklagelig innsats og godt humør gjennom studien.

Jeg vil takke mamma og pappa for at dere alltid er der og støtter meg, uansett hva.

En siste takk til Evy. Selv om dagene har vært lange og tunge har jeg alltid kunnet glede meg til å komme hjem til deg.

Denne oppgaven er til Morfar, for at du med oppmuntring og inspirasjon var med på å vekke min interesse for fysisk aktivitet i de første årene av livet. Takk!

Oslo, Mai 2011

Håvard Hamarsland

Sammendrag

Innledning: Inntak av kosttilskudd med proteiner og antioksidanter kan påvirke den akutte aktiveringen av signaleringsproteiner i muskelcellene og restitusjon etter en styrketreningsøkt. Gjennom disse mekanismene kan slike tilskudd derfor også påvirke de langsiktige adaptasjonene til styrketrening. Stort inntak av antioksidanter kan imidlertid også teoretisk hindre adaptasjon til styrketrening gjennom å ved redusere virkningen av frie radikaler, som synes å være viktige i aktiveringen av signaleringsproteiner i muskelceller som respons på treningsstimuli.. Hensikten med denne studien var derfor å teste ut effekten av et antioksidanttilskudd (vitamin C + E) og et tilskudd som inneholdt protein, omega-3 og beta-alanin (Smartfish) på den akutte effekten av en styrketreningsøkt og på den langvarige effekten av en periode med styrketrening.

Metode: I denne delen av studien ble 15 godt trente kvinner (6) og menn (9) rekrutterte fra den større SARA-studien ved NIH. Det var fem forsøkspersoner fra hver av de tre gruppene i studien: Smartfish, Vitamin C+ E og Placebo. Forsøkspersonene gjennomførte en intensiv styrketreningsøkt for knestrekkerne. Det ble tatt to biopsier før og 100 og 150 minutter etter økten. Prestasjonstester ble gjennomført før, rett etter, 160 minutter og 24 timer etter økten. Muskelbiopsiene ble analysert for aktivering (fosforylering/defosforylering) av signaleringsproteinene p70S6K, RPS6 og eEF-2 (westernblot). I tillegg ble effekten av 10 uker med styrketrening målt som endring i styrke i knestrekkerne og som endring i fettfri masse i beina.

Resultater: Styrkeøkten medførte økt fosforylering av p70S6K for alle forsøkspersonene samlet. Det var ingen gruppeforskjeller i aktiveringen av p70S6K og RPS6 eller i restitusjonstiden. For eEF-2 tenderte vitaminingruppen mot en økt aktivering (defosforylering), mens det ikke var noen endringer i de andre gruppene. Det var en tendens til at økningen i fettfri masse i beina var større i Smartfish og Vitamin C+E gruppene enn i placebogruppen, men det var ingen forskjell mellom gruppene i økningen i styrke.

Diskusjon: Proteinsupplementering er tidligere vist å øke hypertrofisignalering og påskynde restitusjonsprosessen. Smartfish ga imidlertid ingen målbar effekt utover placebo i dette restitusjonsforøket. Dette kan skyldes for lav proteinmengde i Smartfishdrikken (7 g). Vitaminenes effekt på eEF-2 var uventet, da det er i strid med

hypotesen om redusert signalering, men samtidig var det også en tendens til mindre aktivering av p70S6K som er i tråd med hypotesen.

Konklusjon: Styrketreningsøkten medførte økt aktivering av p70S6K, men det var ingen forskjell mellom gruppene. Smartfish fremmet derfor ikke signalering eller restitusjonsprosessen. Trass i få deltagere og relativt stor individuell variasjon finner vi en tendens til effekt av vitamin C+E på eEF-2. Dette tyder på en positiv effekt av disse vitaminene og bør undersøkes videre. Effekten på treningstilpasninger over tid er usikker basert på disse resultatene, da det var en tendens til større muskelvekst i Smartfish gruppen og i Vitamin C+E gruppen, men ingen forskjell mellom gruppene i økning i muskelstyrke. Flere forsøkspersoner må inkluderes i disse analysene før vi kan trekke noen sikrere konklusjoner.

Innhold

Forord	3
Sammendrag	4
Innhold	6
1. Innledning	8
2. Teori	10
2.1 Frie radikaler	11
2.1.1 RONS; et nødvendig onde?	11
2.1.2 RONS; et viktig signal!	12
2.2 Antioksidanter; vitamin C og E er sentrale eksogene antioksidanter	14
2.3 Transduksjon, amplifisering, distribusjon, modulering; signalering!	15
2.3.1 p70S6K	17
2.3.2 RPS6	17
2.3.3 eEF-2	18
2.4 Antioksidanters og restitusjon; virker, virker ikke?	20
2.5 Proteiner og signalering; uten protein å drikke duger helten ikke?	23
2.6 Oppsummering	27
3. Metode	28
3.1 Rekruttering og inklusjon	28
3.2 Inndeling i grupper	29
3.3 Treningsprotokollen	29
3.4 Supplementering	30
3.5 Forsøksprotokoll	31
3.5.1 Pilot	31
3.5.2 Restitusjonsforsøket	31
3.5.3 Muskelbiopsier	32
3.5.4 Prestasjonstester	33
3.5.5 Økten	33
3.6 Western blot	33
3.6.1 Homogenisering	34
3.6.2 Proteinmåling	34
3.6.3 Western blot	34
3.7 Statistikk	35

4.	Resultater	37
4.1	Treningsmotstand	37
4.2	Tid fra inntak av supplement til test og biopsi.....	37
4.3	Prestasjonstest	38
4.4	Reduksjon i MVC etter arbeidet.	38
4.5	Signalering, fosforylering av signalproteiner	40
4.5.1	P70	40
4.5.2	RPS6	41
4.5.3	eEF-2.....	41
4.6	Totalproteiner	42
4.6.1	p70	42
4.6.2	RPS6	42
4.6.3	eEF-2.....	42
4.7	Ratio	42
4.7.1	P70	42
4.7.2	RPS6	43
4.7.3	eEF-2.....	43
4.8	Endring i styrke fettfri masse i treningsperioden	44
5.	Diskusjon	45
5.1	Tretthet, restitusjon og signalerering etter en styrketreningsøkt.....	45
5.1.1	p70	46
5.1.2	RPS6	50
5.1.3	eEF-2.....	51
5.1.4	Totalproteiner	52
5.1.5	Ratio mellom fosforylerte proteiner og total proteinmengde	53
5.1.6	p70S6K	54
5.1.7	RPS6	54
5.1.8	eEF-2.....	55
5.2	Fremgang i muskelmasse og muskelstyrke.....	55
6.	Konklusjon.....	58
7.	Referanser.....	58
8.	Vedlegg 1	69
9.	Vedlegg 2	71

1. Innledning

Styrketrening blir i dag brukt i store deler av samfunnet, av idrettsutøvere, mosjonister, personer i gjenopptrening og de siste årene i større grad av eldre som ønsker å opprettholde funksjonen i dagliglivet. Selv om målene er svært forskjellige er det de samme fysiologiske prinsippene som ligger til grunn for adaptasjonen vi ønsker å inducere. En bedre forståelse av mekanismene som ligger til grunn for styrketrening vil gjøre det mulig å utvikle effektive treningsprogram for sengeliggende, atleter og den generelle befolkningen. Ved styrketrening vil man gjennom å øke proteinsyntesen etter hver økt (Burd, Tang, Moore, & Phillips, 2009) kunne akkumulere muskelmasse over tid (Phillips, 2000; Wernbom, Augustsson, & Thomee, 2007). Muskelmasse er bestemmende for kraftutviklingen (Fukunaga et al., 2001) som vil påvirke både prestasjon og funksjon i hverdagen (Raastad, Paulsen, Refsnes, Rønnestad, & Wisnes, 2010). Inntak av proteiner i forbindelse med styrketrening har vist seg å aktivere flere signalproteiner (p70S6K, RPS6 eEF-2) som medvirker til økt proteinsyntese og hypertrofi (Moore 2011, Reitelseder 2010, Apro, Hulmi). Evidens viser også at proteinsupplementering kan redusere restitusjonstiden etter styrkeøkten (Buckley et al., 2010; Cockburn, Hayes, French, Stevenson, & St Clair Gibson, 2008; Etheridge, Philp, & Watt, 2008; Nosaka, Sacco, & Mawatari, 2006; Shimomura et al., 2006); (Hartman et al., 2007). Disse observasjonene peker mot en økt adaptasjon ved inntak av proteiner i forbindelse med styrketrening og støttes opp av flere longitudinelle studier (Andersen et al., 2005; Hartman et al., 2007).

Stadig mer evidens tyder på at det konstant forhøyede oksidative stresset i eldre og sengeliggende personer bidrar til atrofi (Powers, Kavazis, & DeRuisseau, 2005; Powers, Kavazis, & McClung, 2007). Paradoksal vil også en frisk person utsettes for et oksidativt stress under trening (Bailey, 2003), men slike kortvarige perioder med økt oksidativt stress synes derimot å drive flere av de muskulære treningstilpasningene, som mitokondrie biogenese og oppregulering av endogene antioksidantsystemer (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow et al., 2009). Detaljene i disse cellulære prosessene er imidlertid ikke kartlagt ennå (Allen 2008, Niess 2007, Sachdev 2008). In vitro studier på cellekulturer har vist at forbigående eksponeringen for moderate mengder av frie radikaler kan aktivere flere signalproteiner involvert i hypertrofi (Bae 1999 og Kefaloyianni). Denne effekten kan også motvirkes

med tilførsel av antioksidanter (Bae 1999, huang 2002, Ding, jung 2003). Enkelte studier på adaptasjon til utholdenhet har vist en negativ effekt av tilskudd med antioksidanter (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow et al., 2009), mens andre ikke viser noen effekt (Yfanti et al., 2009), mens studier av restitusjon etter noe ”ekstreme” protokoller med eksentrisk muskelarbeid viser hovedsakelig ingen effekt av antioksidanter. Effekten av antioksidanttilskudd ved styrketrening hos unge friske individer er imidlertid ikke tidligere undersøkt.

Studien har følgende problemstilling:

Hvilken effekt har tilskudd med vitamin C og E og multitolkuddet Smartfish på:

- *signaleringen til signaleringsproteinene p70, RPS6 og eEF-2 og restitusjonstiden i styrketrente personer etter en styrkeøkt?*
- *total fremgang i fettfri masse i beina og styrke i kneekstensjon etter 11 uker med styrketrening?*

Studien har følgende hypoteser:

Tilskudd med Smartfish vil:

- *øke signaleringen i signaleringsproteinene RPS6 og p70 og forkorte restitusjonstiden etter en styrketreningsøkt.*
- *økte adaptasjonen til trening over 11 uker med styrketrening.*

Tilskudd med vitamin C og E vil:

- *hemme aktiveringen av signaleringsproteinene p70S6K, RPS6 og eEF-2 og forlenge restitusjonstiden etter en styrketreningsøkt.*
- *redusere adaptasjonen til trening over 11 uker med styrketrening.*

2. Teori

Frie radikaler har lenge vært kjent for sine destruktive egenskaper i biologiske systemer. På den andre siden står antioksidantene som beskytter oss mot de frie radikalene og gjenoppretter skaden. Under fysisk aktivitet øker produksjonen av frie radikaler og det oksidative stresset øker. Denne økningen har blitt satt i sammenheng med tretthet og det spekuleres i om inntak av antioksidanter vil kunne motvirke dette og bedre både prestasjon og restitusjon.

Videre er det vist at inntak av proteiner kan øke aktivitet i signalveier som fører til økt proteinsyntese. Det er gjort flere studier på hvorvidt denne effekten også er gjeldene etter styrketrening, og om den kan adderes til effekten av styrketreningen for å oppnå en økt effekt på muskelvekst. Samtidig har man også vist at inntak av protein kan påvirke restitusjonen.

Virkingen av frie radikaler, antioksidanter og proteiner går alle gjennom et meget sammensett signalveisystem i muskelcellene (i denne oppgavens tilfelle). Det i dag fortsatt store huller i forståelsen av disse systemene.

I dette teorikapittelet vil jeg først gi en kort gjennomgang av frie radikaler, deres produksjon under trening og deres rolle i intracellulær signalering i forhold til muskelvekst. Deretter følger en liten gjennomgang av antioksidanter med fokus på vitamin C og E. Så en introduksjon til intracellulær signalering, før jeg til slutt går gjennom tilgjengelig empiri om antioksidanter og proteiners effekt på restitusjon og anabol signalering etter en styrkeøkt.

2.1 Frie radikaler

De siste 30 årene har man oppdaget et stadig mer intrikat forhold mellom fysisk aktivitet og frie radikaler. Fokuset har flyttet seg fra å undersøke de potensielle negative effektene av treningsindusert oksidativt stress til å innse at frie radikaler utøver viktige roller i cellers respons gjennom redokssensitive signalveier og gener som fører til adaptasjon (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006).

Oksidativt stress er en tilstand hvor balansen mellom produksjonen av frie radikaler og deres reduksjon via antioksidantsystemene forskyves i favør av et prooksidativt miljø (Halliwell & Cross, 1994). Et fritt radikal er et molekyl som kan eksistere med et eller flere uparede elektroner (Halliwell, 1991). I levende organismer er det oksygenbaserte (ROS) og nitrogenbaserte (RNS) frie radikaler som er av størst betydning (Bogdan, Rollinghoff, & Diefenbach, 2000). Både radikalene selv og deres ikke-radikale derivater samles alle under betegnelsen RONS (Valko et al., 2007).

De to viktigste frie radikalene i biologiske systemer er superoksid (O_2^-) og nitrogenoksid (NO^*) (Droge, 2002). Superoksid utøver ikke i noen særlig grad direkte regulering av cellulære funksjoner, men gjør det indirekte gjennom sine reaktive derivater som hydrogenperoksid (H_2O_2) som igjen kan bli hydroksyl-radikal ($\bullet OH$). NO kan også omgjøres til andre reaktive nitrogener som nitrosoniumkation (NO^+), nitroksylanion (NO^-) eller peroksnitrit ($ONOO^-$) (Droge, 2002).

2.1.1 RONS; et nødvendig onde?

En stadig voksende litteratur viser at det produseres RONS under fysisk aktivitet, men mekanismene og konsekvensene er fortsatt uklare (Allen, Lamb, & Westerblad, 2008; Niess & Simon, 2007; Sachdev & Davies, 2008). Frie radikaler kan være lunefulle og vanskelig å påvise da de ofte er svært reaktive (Sachdev 2008). At RONS danner kaskader som for eksempel superoksid \rightarrow hydrogenperoksid \rightarrow hydroksylradikal gjør det vanskelig å vite spesifikt hvilken frie radikal som gjør hva (Allen et al., 2008).

Man har lenge hatt tilgang på indirekte metoder som antydte en produksjon av RONS ved trening (Alessio, Goldfarb, & Cutler, 1988; Lovlin, Cottle, Pyke, Kavanagh, &

Belcastro, 1987). Senere har også studier med direkte måling av RONS underbygget disse resultatene (Ashton et al., 1998; Bailey et al., 2003). Spørsmålet om hvor RONS produseres under fysisk aktivitet debatteres. Det er foreslått mange muligheter som NADPH-oksidaser lokalisert ved plasmamembranen og NO-syntase (Pattwell, McArdle, Morgan, Patridge, & Jackson, 2004), NADPH-oksidaser assosiert med sarkoplasmatiske retikulum (Xia, Webb, Gnall, Cutler, & Abramson, 2003) og transverse tubuli (Hidalgo, Sanchez, Barrientos, & Aracena-Parks, 2006). Mitokondriene var lenge ansett som storprodusenten av RONS og tidlige estimeringer viste at 1-5 % av O₂-elektronfluksen i mitokondriene hadde en elektronlekkasje som førte til dannelse av superoksid (Abramson & Salama, 1989). Senere har den antatte betydningen av RONS-produksjonen i mitokondriene blitt kraftig redusert, helt ned i 0,15 % av O₂-elektronfluksen (St-Pierre, Buckingham, Roebuck, & Brand, 2002).

Vi ser dermed at mye fortsatt er ubesvart når det gjelder hvor RONS produseres under fysisk aktivitet og at det er flere potensielle åsteder for RONS-produksjon. Det er ikke usannsynlig at RONS kan produseres flere steder både i og utenfor cellen under fysisk aktivitet. Hvis dette er tilfellet vil trolig også produksjonsstedet være av betydning, da RONS i større eller mindre grad (avhengig av sin reaktivitet) vil reagere med sine umiddelbare omgivelser (Allen et al., 2008).

2.1.2 RONS; et viktig signal!

Oppfatningen om at RONS ene og alene var skadelig for muskulatur var ikke helt ubegrunnet. Flere studier har vist økte nivåer av RONS under inaktivitet og det har blitt konkludert med at dette er en medvirkende faktor til inaktivitetsatrofi (Powers et al., 2005; Powers et al., 2007). Som sagt tidligere viser stadig flere studier at dette bare er en side av saken. Stadig flere studier avdekker RONS som et viktig intracellulært signal for adaptasjon (Gomez-Cabrera et al., 2008; Hamilton et al., 2003; Ristow et al., 2009), og at det i denne sammenheng ikke fremmer atrofi. Det finnes flere etablerte redoxsensitive transkripsjonsfaktorer som regulerer en rekke viktige responser som vekst, differensiering (AP-1) og oppjustering av forsvarsmekanismer ved stress (HSF, NFκβ og Nrf2). Svaret på RONS motstående virkninger er ikke komplett, men en rekke

studier gjort de siste årene kan gi oss noen ideer om hvordan vi kan forklare denne tvetydige effekten av RONS.

Flere in vitro studier har vist at H₂O₂ kan aktivere p70S6K (gjennom PI3K og mTOR), p90^{Rsk} og MAP kinasene ERK1/2, (Bae et al., 1999; Jung et al., 2003), p38 (Cully et al., 2010) og JNK (Kefaloyianni, Gaitanaki, & Beis, 2006). Bae et al. (1999) og Kefaloyianni et al. (2006) viste også at effekten på p70S6K var avhengig av dosering og tid, effekten forsvant ved høye doser H₂O₂. Et annet interessant studie av Wretman et al. (2001) så på aktivering av ERK1/2 og p38 ved eksentriske og konsentriske muskelarbeid i isolerte rottemuskler. De konkluderte med at strekk i form av eksentrisk arbeid aktiverte både ERK ½ og p38, mens forandringer i pH, metabolske og oksidative faktorer påvirket bare ERK1/2. Videre er både serin/treoninfosfataser og fosfotyrosinfosfataser sensitive for RONS (Powers, Duarte, Kavazis, & Talbert, 2010). Av spesiell betydning for skjelettmuskulatur er fosfatidylinositol 3-fosfatase PTEN som inaktiveres av RONS (Leslie et al., 2003). Når den er aktiv fosforylerer PTEN fosfatidylinositol (3,4,5)-trifosfat og hemmer en rekke signalveier, blant disse er Akt-signalveien (Leslie et al., 2003).

Vi ser av disse studiene at den forbigående og moderate økningen i RONS man ser under fysisk aktivitet, i motsetning til høyere doser over lengre tid, medfører mitogene responser (Jackson, 2008). Et annet poeng er som tidligere nevnt hvor RONS produseres. Hvis inaktivitet og aktivitet medfører RONS på forskjellige steder i cellen er det mulig å se for seg at det kan få forskjellige konsekvenser (Powers & Jackson, 2008). Noen argumenterer for at teorien om hormese også gjelder for RONS og at effekten er formet som en omvendt U-kurve med inaktivitet som ett endepunkt, overtrening som det andre og et optimalt område et sted der imellom (Radak, Chung, Koltai, Taylor, & Goto, 2008).

2.2 Antioksidanter; vitamin C og E er sentrale eksogene antioksidanter

Antioksidanter kan defineres som enhver substans som kan hindre eller forsinke oksidasjonen av et substrat (Halliwell & J., 2007). Antioksidanter kan deles inn i to hovedgrupper; endogene og eksogene antioksidanter. De endogene antioksidantene inngår i cellens egenproduserte antioksidantsystemer. De viktigste av disse er enzymene superoksid dismutase, glutation peroksidase og katalase, samt de ikkeenzymatiske antioksidantene glutation (GSH), urinsyre og bilirubin (Powers & Jackson, 2008). Det er vist at de endogene systemene oppjusteres som respons på trening (Ristow et al., 2009) og at inntak av eksogene antioksidanter kan hemme denne adaptasjonen (Gomez-Cabrera et al., 2005; Ristow et al., 2009). De eksogene antioksidantene får vi i oss gjennom maten, blant disse er vitamin C og E ansett som de viktigste og de mest undersøkte.

Vitamin E er en av de mest utbredte antioksidantene i naturen og er den primære antioksidanten i cellemembraner (Jackson, Pye, & Palomero, 2007; L. Packer, 1991) den er altså fettløselig. Det er imidlertid vist at ved mangel på andre antioksidanter til å redusere vitamin E kan det virke prooksidativt (Bowry, Mohr, Cleary, & Stocker, 1995). Studier på mennesker tyder på at vitamin E nivåene ikke påvirkes av aerob trening over tid (Tiidus, Pushkarenko, & Houston, 1996).

I motsetning til vitamin E er vitamin C vannløselig og befinner seg i cytosol i cellen (Ji, 1995). Vitamin C kan direkte motvirke superoksid, hydroksyl- og lipid- hydroperoksid-radikaler (Carr & Frei, 1999). Vitamin C er også kapabel til å redusere oksidert vitamin E (J. E. Packer, Slater, & Willson, 1979). Det dannes da vitamin C-radikal som er mindre reaktivt og omgjøres til vitamin C igjen av flere endogene antioksidantenzymmer (L. Packer, 1991). Det har blitt foreslått at siden vitamin C kan regenerere vitamin E vil kombinasjonen av vitamin C og E redusere effekten av vitamin C (Miller et al., 2005). En studie på vitamin C mangel og tilskudd viste at plasmakonsentrasjonen av vitamin C var fullmettet ved inntak på 1000 mg dag⁻¹ (Levine et al., 1996). Doser på 200 mg ble 100 % absorbert, mens doser på 500 mg hadde lavere biotilgjengelighet og opptak. Forfatterne konkluderer at inntak på over 400 mg dag⁻¹ ikke har betydelig effekt. En annen studie fant signifikant økte plasmaverdier for både vitamin E og vitamin C etter supplementering i 14 dager med 400 IU vitamin E og 1000 mg vitamin C dag⁻¹ (Bloomer,

Goldfarb, & McKenzie, 2006).

2.3 Transduksjon, amplifisering, distribusjon, modulering; signalering!

I alle former for levende organismer forekommer det signalformidling i og mellom cellene organismen består av. Dette er helt essensielt for at cellene og organismen skal kunne tilpasse seg og overleve i sine omgivelser. I mer avanserte organismer utgjør dette et meget komplekst system som kan påvirkes av en stor mengde faktorer. Her følger en overfladisk gjennomgang av generell intracellulær signalering med PKB-signalveien som eksempel.

Et helt sentralt konsept innen signalering generelt er signaltransduksjon. Det vil si å omforme signaler fra en form til en annen form som kan videreformidles inne i cellen. For at en muskel skal kunne respondere på et stimuli, som trening, må muskelcellene kunne oversette de opprinnelige signalene som strekk, metabolsk stress, vekstfaktorer og cellens ernæringsstatus til en hensiktsmessig respons, som i dette tilfellet kan være hypertrofi (Hay & Sonenberg, 2004; Miyazaki & Esser, 2009; Teleman, Hietakangas, Sayadian, & Cohen, 2008).

Da det finnes flere forskjellige reseptorer som responderer forskjellig på samme signal vil cellens reaksjon avhenge av om den har en reseptor for signalet og eventuelt hvilken type reseptorer den har, i tillegg til en rekke andre faktorer som påvirker den senere signaloverføringen. Reseptorer setter ofte i gang en såkalt signalkaskade som består av en rekke proteiner som slår på eller av det neste proteinet i signalveien. Proteiner kan slås på og av på to måter; de kan aktiveres eller deaktiveres ved fosforylering, eller de kan slås av og på avhengig av om de er bundet til guanosin trifosfat (GTP) eller guanosin difosfat (GDP). Proteiner som fosforylerer et annet protein kalles kinaser og proteiner som defosforylerer et annet protein kalles fosfataser. Signalkaskadene innehar ofte egenskaper som gjør at de oversetter et signal fra en form til en annen, de overfører signalet fra et sted til et annet, ofte blir signalet forsterket og gjerne distribuert over flere signalveier og hvert steg i signalveien kan moduleres av andre signalveier og faktorer (Alberts et al., 2004). En viktig egenskap for proteiner som påvirkes av flere andre proteiner og signalveier er at de har flere fosforyleringsseter som gjør det mulig for flere

proteiner å fosforylere eller defosforylere det aktuelle proteinet. De forskjellige fosforyleringssetene kan ha litt funksjon noe som igjen øker finkoordineringen og kompleksiteten i de intracellulære signalveiene

Det finnes flere typer membranreseptorer og intracellulære reseptorer, her vil insulinreseptoren bli brukt som eksempel. Den er en tyrosin kinase reseptor som er meget sentral for vekst og overlevelse (Alberts et al., 2004). Den kan binde flere vekstfaktorer og hormoner som insulin, insulin-like growth factor (IGF-1) og dens isoform mechano growth factor (MGF)(Cassano et al., 2009; Miyazaki & Esser, 2009) og oversette dette signalet til en kaskade av kinaser og fosfataser. Insulinreseptoren er med i den største familien av enzytbundne reseptorer kalt reseptor tyrosin kinaser (Alberts et al., 2004). Når reseptorene binder sitt signalmolekylet aktiveres deres kinaseaktivitet. Et generelt trekk for tyrosin kinaser er at de kan aktivere et signalezym kalt phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI 3-kinase), dette gjelder også insulinreseptoren (Alberts et al., 2004). PI 3-kinase fosforylerer og aktiverer inositol fosfolipider, som igjen aktiverer en rekke proteiner som for eksempel protein kinase B (PKB) (Cassano et al., 2009). PKB er et godt eksempel på hvordan signalet distribueres over flere signalveier, som mTOR (Inoki, Li, Zhu, Wu, & Guan, 2002; Potter, Pedraza, & Xu, 2002) og GSK-3 (Welsh, Miller, Loughlin, Price, & Proud, 1998), i tillegg til å virke hemmende på en av signalveiene for proteinnedbrytning, kalt FOXO-signalveien (Sandri et al., 2004). Et eksempel på et protein som deaktiveres ved fosforylering er tuberosclerose-kompleks 2 (TSC2) som fosforyleres av PKB og dermed translokeres til cytosol (Rosner, Freilinger, & Hengstschlager, 2007) hvor den ikke lenger kan utføre hemmende effekt på proteinet Rheb som er en GTPase (Lee, Inoki, & Guan, 2007). I GTP-bunden form er Rheb med flere andre proteiner (raptor) med på å aktivere mTOR (Lee et al., 2007). Det er stor grad av interaksjoner mellom en rekke av signalveiene. For eksempel virker ERK1/2, en MAP-kinase, positivt på proteinsyntesen ved å hemme TSC2 (Ma, Chen, Erdjument-Bromage, Tempst, & Pandolfi, 2005). Derimot vil energimangel i cellen gjennom økte nivåer av AMP formidles gjennom AMPK som øker TSC2-aktivitet på Rheb og dermed hemmer proteinsyntesen (Inoki et al., 2006; Inoki, Zhu, & Guan, 2003). mTOR er også et eksempel på et knutepunkt for integrering og modulering fra en rekke signalveier i cellen (Drummond, Dreyer, Fry, Glynn, & Rasmussen, 2009; Miyazaki & Esser, 2009; Spangenburg, 2009). Signalet går videre fra

mTOR til p70S6K som fosforylerer en rekke proteiner (Ruvinsky & Meyuhas, 2006). p70 og to av dens effektorer vil i det følgende bli presentert.

2.3.1 p70S6K

p70^{S6K} anses som den viktigste effektoren i PKB-signalveien ved blant annet treningsstimuli og finnes i to isoformer, p70S6K 1 og 2. Det har i senere tid blitt stilt spørsmål ved viktigheten av PKB-signalering for å aktivere p70S6K som respons på strekk (Spangenburg, Le Roith, Ward, & Bodine, 2008). Fosforylering av p70S6K kan skje på en rekke fosforylerings seter mediert av mTOR, men også andre proteiner (Jacinto & Lorberg, 2008). Treonin³⁸⁹ blir fosforylert av mTOR (Hornberger, Sukhija, Wang, & Chien, 2007) og dette som en fornuftig indikator for proteinsyntese og muskelvekst (Burd et al., 2010). Studier har vist at p70S6K^{-/-} mus har en mindre muskelfiberareal og at de har en hemmet respons på insulin og PKB-signalering (Ohanna et al., 2005). p70S6K^{-/-} mus viste imidlertid ingen hemming av polysomformasjon, generell proteinsyntese eller proteinnedbrytning (Mieulet et al., 2007). Det er vist en sammenheng mellom p70S6K^{thr389}-fosforylering og økning i muskelmasse over 12 uker med styrketrening (Terzis et al., 2008). PKB-signalveien virker gjennom p70S6K på eEF-2 kinase (Pende et al., 2004; Wang et al., 2001). Det samme gjør også MAPK/Rsk signalveiene, både gjennom p70 og uavhengig av p70 (Alessi, Caudwell, Andjelkovic, Hemmings, & Cohen, 1996; Wang et al., 2001). p70S6K kan også aktivere RPS6. S6K1;S6K2^{-/-} mus har sterkt redusert RPS6 fosforylering, noe som har blitt tolket dit hen at det i hovedsak er p70 som kontrollerer RPS6 (Wang et al., 2001).

2.3.2 RPS6

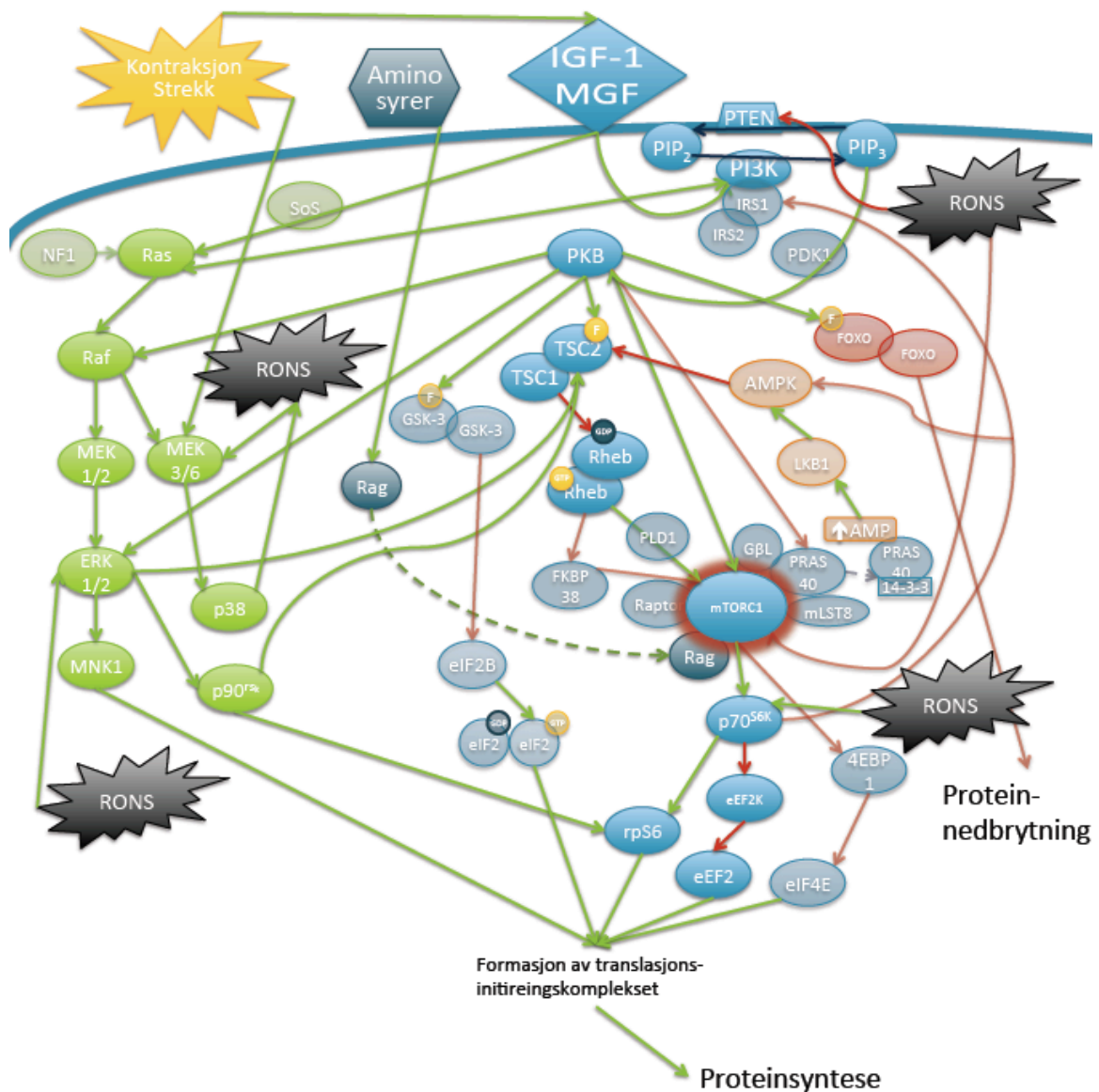
En av flere måter å øke cellevekst og celledeling på er å øke translasjonen av mRNA. RPS6 fosforyleres av p70S6K og aktiveringen har vist seg å korrelere med økt translasjon av mRNA som inneholder en oligopyrimidin trakt i sine 5' ikketranslaterte regioner (Peterson & Schreiber, 1998). Disse mRNA-transkriptene koder for proteiner involvert i cellyklus, ribosomale proteiner og elongeringsfaktorer som er nødvendige

for translasjon (Jefferies et al., 1997). Denne oppfatningen av RPS6 har lenge vært rådende, men det har blitt stilt spørsmål ved om den er riktig (Ruvinsky & Meyuhas, 2006). I sin review går Ruvinsky og Meyuhas (2006) så langt som å vurdere RPS6 som en negativ effektor på proteinsyntesen. Ved en knock-in studie av mus, hvor alle fosforylerbare seriner i RPS6 ble byttet ut med alaniner (RPS6^{P^{-/-}}). Disse musene utviste økt proteinsyntese, men var allikevel mindre enn RPS6^{P^{+/+}}-mus. Rapamycinbehandling hadde ingen effekt på RPS6^{P^{-/-}}-musene, noe som indikerer at RPS6 i hovedsak er styrt av mTOR (Ruvinsky et al., 2005). Dette står i kontrast til tidligere studier av p70S6K(1 og 2) knockout-studier som tydet på at verken p70S6K2 eller RPS6-fosforylering var involvert i vekst i skjelettmuskler (Pende et al., 2004; Volarevic et al., 2000). Pende et al. (2004) fant at RPS6 trengte begge isoformene av p70S6K for full aktivering, men at det i all hovedsak var p70S6K2 som aktiverte RPS6. De fant også at RPS6 kunne fosforyleres ved to seriner uten p70S6K2 og linket denne aktiveringen til en MAPK, trolig p90rsk. Dette ble bekreftet i en senere studie av (Roux et al., 2007) som fant at Ras/ERK signalering økte fosforyleringen av RPS6 via p90rsk. Denne fosforyleringen førte til samling av preinitieringskomplekset for translasjon og en aktivering av translasjonsmaskineriet. Det er dermed ikke helt klart hvilken rolle RPS6 spiller i proteinsyntesen (Ruvinsky & Meyuhas, 2006). RPS6 blir allikevel brukt i mange studier på signalering og proteinsyntese i forhold til både trening og proteininntak som en indikasjon på økt translasjon.

2.3.3 eEF-2

Eukariot elongeringsfaktor 2 (eEF-2) er en monomer som binder GTP. Den har som funksjon å mediere translokeringssteget i elongeringen hvor ribosomet flyttes et kodon i forhold til mRNA og peptidyl-tRNA fra A-setet til P-setet (Jorgensen, Merrill, & Andersen, 2006). eEF-2 har bare ett fosforyleringssete på treonin 56 (Redpath, Price, Severinov, & Proud, 1993) og fosforylering av dette hindrer interaksjonen med ribosomet og inaktiverer dermed eEF-2 (Carlberg, Nilsson, & Nygard, 1990). Fosforyleringen skjer ved hjelp av eEF-2 kinase som vanligvis er helt avhengig av Ca⁺⁺ og kalmodulin (CaM) for fosforylering (Palfrey, Nairn, Muldoon, & Villereal, 1987). eEF-2 kinase kan imidlertid også fosforyleres og aktiveres av protein kinase A (PKA) som respons på økte nivåer av cAMP (Diggle et al., 2001). Økte cAMP-nivåer er en

generell respons på stress eller energimangel. Som sagt kan både Ca^{++} og PKA hemme aktiviteten i eEF-2 og det spekuleres i om dette er måter å kontrollere energiforbruket under for eksempel kontraksjon, da elongeringen er den mest energikrevende prosessen i translasjonen (Proud, 2007). eEF-2 kinase kan i tillegg fosforyleres av både P70S6K (Ser³⁶⁶), p90^{RSK} (Alessi et al., 1996; Wang et al., 2001), p38 MAPK og TNF- α på (Ser³⁵⁹) (Knebel, Haydon, Morrice, & Cohen, 2002), noe som vil føre til aktivering av eEF-2.



Figur 1: Forenklet oversikt over de viktigste signalveiene som påvirker p70S6K og dens effekter.

2.4 Antioksidanters og restitusjon; virker, virker ikke?

Studier har vist en effekt av forskjellige antioksidanter på utviklingen av tretthet i varierende grad, avhengig av temperatur og grad av aktivering under arbeidet (Moopanar & Allen, 2005; Reid et al., 1992; Reid, Stokic, Koch, Khawli, & Leis, 1994; Shindoh, DiMarco, Thomas, Manubay, & Supinski, 1990). Dette ser ut til å skje gjennom å hemme RONS negative virkning på Na^+ - K^+ - pumpen og ionebalansen (McKenna et al., 2006; Sandiford et al., 2005), samt forandringer i Ca^{++} -frigjøring fra SR og Ca^{++} -sensitivitet (se Allen 2008 for review). Antioksidanter så imidlertid ikke ut til å påvirke restitusjonen in vitro (Shindoh, DiMarco, Thomas, Manubay, & Supinski, 1990). Det råder allikevel en tro på at antioksidanter vil kunne assistere restitusjonen og det er gjort en rekke studier for å undersøke effekten av antioksidanter på restitusjon etter ulike former for trening.

I tabell 1 Presenteres en oversikt over de mest aktuelle og sammenlignbare for studien som har blitt gjennomført i denne oppgaven. Studiene har gitt vitamin C og E enten alene eller i kombinasjon, gjennomført muskelaksjoner med maksimal innsats og målt prestasjon, samt indikatorer på restitusjon og oksidativt stress før og etter arbeidet. Flertallet finner ingen effekt av vitamin C og E på restitusjonen (Avery et al., 2003; Beaton, Allan, Tarnopolsky, Tiidus, & Phillips, 2002; Bloomer, Falvo, Schilling, & Smith, 2007; Bloomer, Goldfarb, McKenzie, You, & Nguyen, 2004; Bryer & Goldfarb, 2006) en finner positiv effekt (Shafat, Butler, Jensen, & Donnelly, 2004), mens ingen studier viser negativ effekt. Supplementeringen har vart mellom 14 og 37 dager med 500 mg til 3 g vitamin C og 400 IU til 1200 IU med vitamin E. Vi ser at bare studiene som har fortsatt supplementeringen etter økten fant virkning på noen av effektmålene sine (Bloomer et al., 2004; Bryer & Goldfarb, 2006; Shafat et al., 2004). Safat et al. (2004) gjennomførte den mest ekstreme studien med 300 maksimale eksentriske muskelaksjoner. Denne typen belastning er mye større enn den man ser i vanlig trening og vil trolig ha medført større muskelskade og inflammasjon enn de resterende studiene med unntak av Beaton et al. (2002). Disse responsene kan være mer påvirkelige enn de man ser etter mer normalt muskelarbeid. Beaton et al. (2002) gjennomførte imidlertid nesten like mange eksentriske repetisjoner, men avsluttet supplementeringen etter arbeidet. Shafat et al. (2004) fortsatte supplementeringen i syv dager etter arbeidet, denne forskjellen kan ha vært utslagsgivende. Begge studiene undersøkte mm. quadriceps. Shafat et al. (2004) hadde imidlertid et bevegelingsutslag som var 10° lengre

i ytre del av muskelens bevegelsesbane enn Beaton et al. (2002). Dette er en faktor som kan ha ført til større skade i Shafat et al. (2004) forsøk enn det de så i Beaton et al. (2002) forsøk, da muskelens lengde under arbeidet påvirker belastningen (Raastad et al., 2010). Av de fire resterende har tre også gjennomført rent eksentrisk arbeid, to av disse også med forholdsvis stor belastning (Bloomer et al., 2004; Bryer & Goldfarb, 2006), mens en har en belastning som tilsvarer en vanlig styrketreningsøkt (Avery et al., 2003). Ingen av disse fant en effekt av antioksidanter på restitusjonen. Tre av studiene finner en effekt på CK (Bloomer et al., 2004; Bryer & Goldfarb, 2006; Shafat et al., 2004), men denne markøren for muskelødeleggelse er omdiskutert i denne sammenheng og det legges ikke for mye i disse resultatene (Warren, Lowe, & Armstrong, 1999). (Bloomer et al., 2004; Bryer & Goldfarb, 2006) finner også en effekt på stølhet, men det er vist av andre at stølhet ikke korrelerer med prestasjon og er en dårlig indikator på restitusjon (Warren et al., 1999).

Det er en utfordring å skulle tolke resultatene i de overnevnte studiene med tanke på betydningen av antioksidanter for regelmessig trening. Det trengs både studier av hvordan antioksidanter påvirker trening over tid. Dette bør skje ved bruk av protokoller som i større grad representerer de responsene man ser ved regelmessig trening. Det er heller ingen studier som har sett på effekten av antioksidanter på restitusjon med signalering og proteinsyntese som effektmål. En studie som undersøker en eller flere av de disse spørsmålene vil kunne bringe ny verdifull kunnskap om mekanismene bak restitusjon og faktorer som påvirker den.

Tabell 1: Studier på effekten av inntak av antioksidanter på restituasjon etter muskelaksjoner med maksimal innsats. + indikerer økning, - ingen endring, ÷ reduksjon i forhold til kontroll.

Forfatter	Ar	Design	Antioksidant g/dag	Deltakere	Muskel	Intervensjon	Utfallsmål	Effekt
Bloomer et al.	200	RCT, dobbelt blindet	1 g vitamin C og 378 mg tocopheroler (vit E)	36 styrketrente menn	M. pectoralis major	Supplementering 14 dager før 10x10/70 % 1RM eksentriske muskelaksjoner. Posttester rett etter, 24 og 48 timer etter økten.	Isometrisk styrke Støilhet Plasma CK	- - -
Bryer & Goldfarb	200	RCT	Vitamin C, 3 g	18 unge utrente menn	M. triceps	Supplementering i 14 dager før og 4 dager etter 70 eksentriske muskelaksjoner med armstrekkerne. Posttester rett etter, 4, 24, 48 og 96 timer etter økten.	Isometrisk styrke Bevegelsesutslag Støilhet Plasma CK	- + + (+)
Bloomer et al.	200	RCT, dobbel blindet	400 IU (268 mg) vitamin E, 1 g vitamin C og 90 µg selenium.	18 unge kvinner, ikke styrketente	M. biceps brachii	Supplementering i 14 dager før og 3 dager etter 4x12 maksimale eksentriske muskelaksjoner. Posttester 0, 2, 6, 24, 48, 72, 96 timer og 14 dager etter økten.	Isometrisk styrke Bevegelsesutslag Støilhet Plasma CK	- - + +
Safat et al.	200	RCT, enkel blindet	500 mg vitamin C og 1200 IU alpha-tokoferol	12 unge menn	Mm. quadriceps	Supplementering i 30 dager før og 7 dager etter 300 maksimale eksentriske muskelaksjoner. Posttester rett etter, 1, 3 og 7 dager etter økten.	Isometrisk styrke 20:50 Hz ratio Støilhet	+ + -
Avery et al.	200	RCT, dobbel blindet	Vitamin E, 1200 IU	18 unge utrente menn	Hele kroppen	Supplementering i 31 dager. Helkroppstrening og prestasjonstester rett etter, 2, 6, 24, 48, 72 og 96 timer etter økten.	Prestasjon Støilhet Plasma CK Plasma MDA	- - (+) -
Beaton et al.	200	RCT, dobbelt blindet	1200 IU vitamin E	18 unge menn	Mm. quadriceps	Supplementering i 30 dager før 240 maksimale eksentriske muskelaksjoner. Posttester rett etter økten og 2, 4, og 7 dager etter økten.	Isometrisk styrke Isokinetisk styrke Muskeldeleggelse Støilhet	- - - -

2.5 Proteiner og signalering; uten protein å drikke duger helten ikke?

Flere in vitro studier har de siste årene vist at proteinsyntesen kan stimuleres av proteininntak, og da spesielt av aminosyren leucin, som alene kan aktivere maskineriet i proteinsyntesen (Anthony et al., 2000; Atherton, Smith, Etheridge, Rankin, & Rennie, 2010). Man trodde først at aminosyrenes effekt var mediert gjennom PI3K og PKB, men dette har senere blitt motbevist og man har nå studier som tyder på at signaleringen i stedet går andre signalveier, som gjennom klasse III phosphatidylinositol kinasen hVps34 (Byfield, Murray, & Backer, 2005; Nobukuni et al., 2005). En annen studie tyder på en involvering av en MAP3K, blant annet kalt MAPK/ERK kinase kinase kinase 3, som aktiverer mTOR. En tredje potensiell kandidat er en familie av små GTPaser kalt Ragproteiner som gjennom å translokere mTOR til deler av cellen hvor Rheb befinner seg kan bidra til økt proteinsyntese (Sancak et al., 2008).

Det er vanlig å bruke aktivering av forskjellige signaleringsproteiner som er assosiert med økt proteinsyntese, blant annet p70S6K, RPS6 og eEF-2) som markører for proteinsyntese. Det er gjort flere studier på hvordan trening med og uten proteiner påvirker signalering i p70S6K, eEF-2 og RPS6 (se tabel 2). Studiene inkludert i tabell 2 undersøker alle m. vastus lateralis. De finner en effekt av trening og proteiner på p70S6K og RPS6, og at aktiveringen blir størst når man kombinerer de to, i alle fall for p70S6K (Apro & Blomstrand, 2010; Glover et al., 2008; Hulmi et al., 2009; Moore, Atherton, Rennie, Tarnopolsky, & Phillips, 2011). Resultatene for RPS6 viser derimot at trening kan øke aktiveringen av RPS6 over det man ser med bare matinntak (Glover et al., 2008), mens proteininntak ikke ser ut til å kunne øke aktiveringen av RPS6 over den man ser ved trening alene (Apro & Blomstrand, 2010; Hulmi et al., 2009; Moore et al., 2009). Biopsitidspunktet kan være av betydning i denne sammenheng, da Glover ikke tok noen biopsi før etter seks timer. Biopsiene i de andre studiene ble tatt rett etter økten, en time og fire timer etter økten. Det er mulig at Aktiveringen av RPS6 er større etter seks timer. Et annet poeng er at Glover et al. (2008) også gir karbohydrater (41 g) og fett (4 g) sammen med proteinene (10 g) i tre omganger før biopsien. Inntaket av protein varierer fra 5 gram til ca 30 gram. Det ser ut til at 5-10 g er nok til å stimulere proteinsyntesen over det man så ved trening med placebo (Moore et al., 2009).

Variasjonen i sett, repetisjoner varierer fra 4 til 10 sett og 8 til 15 repetisjoner. Belastningen beregnes i prosent av 1RM (65 % - 80 % av 1RM) i noen av studiene, mens andre bruker XRM (8-10 RM) for å måle belastningen. Treningsbelastningen i disse studiene er nok noe høyere enn hva mosjonister gjennomfører av trening på m. quadriceps i løpet av en økt, men er trolig innenfor hva man kan forvente av utøvere innen forskjellige kraftkrevende idretter. Vi ser at 4x10 RM er nok til både å aktivere p70S6K og RPS6 hos styrketrente forsøkspersoner (Glover et al., 2008). Man må imidlertid huske på at dette studiet hadde tre måltider med 10 g protein i hvert fordelt i perioden mellom økten og biopsien, som ble tatt seks timer etter økten. Man kan dermed påstå at denne studien innfører en større ”fordel” for gruppen som får protein enn de andre studiene som ikke lar placebogruppen gå fastende like lenge etter treningsøkten.

Tidspunktene for biopsiene varierer fra rett etter økten til 48 timer etter, med alle unntatt ett studie mellom 0 og 6 timer etter økten. p70s6k og RPS6 ser ut til å respondere raskt på trenings- og protein-stimuli og være aktivert i hvert fall fire timer for RPS6 (Reitelseder et al., 2011) og i hvert fall fem til seks timer for p70S6K (Glover et al., 2008; Moore et al., 2011) etter økten. Hulmi et al. (2009) viser at både p70S6K og RPS6 er tilbake til utgangspunktet etter 24 timer.

Flere studier har konkludert med en positiv effekt på restitusjonstiden etter krevende muskelaksjoner ved inntak av protein på unge forsøkspersoner (Buckley et al., 2010; Cockburn et al., 2008; Etheridge et al., 2008; Hoffman et al., 2010; Nosaka et al., 2006; Shimomura et al., 2006). To av disse har ikke benyttet prestasjon for å måle restitusjonen og dette er en stor svakhet (Hayes et al., 2008; Nosaka et al., 2006). Av de som har målt prestasjon er det bare Cockburn et al. (2008) og Hoffman et al. (2010) som har benyttet en protokoll med styrketrening, begge fant en raskere restitusjon i gruppene som inntok protein over gruppene som inntok karbohydrater for henholdsvis utrente og godt styrketrente forsøkspersoner. Disse resultatene ble tillagt effekten av proteininntaket.

Det er imidlertid ingen av de overnevnte studiene på proteiner som har undersøkt forholdet mellom signalering i p70S6K, RPS6 og eEF-2 og restitusjon av prestasjonen

etter en styrkeøkt med supplementering. En slik studie kan gi ny innsikt i mekanismene bak restitusjon og faktorer som påvirker den.

Tabell 2: Studier på effekten av styrketrening og inntak av proteiner på fosforylering av p70S6K, eEF-2 og RPS6. Treningsbelastning er forklart for henholdsvis belastning som prosent av 1RM og som RM-verdier: sett x repetisjoner / belastning og sett/antall RM. 1RM = en repetisjon maksimum. + indikerer økning, - ingen endring, ÷ reduksjon i forhold til baseline. # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene.

Forfatter	År	Studiedesign	Subjekter	Intervensjon	Utfall	Effekt
Moore et al.	2011	RCT	7 fysisk aktive menn	Møtte fastende. Unilateral beinpress og kneekstønsjon, 5x8-10RM 2 min pause mellom sett. Inntok 25 g myseprotein rett etter økten. Biopsier ble tatt før og 1, 3 og 5 timer etter økten.	P70s6k	Protein + 1t + 3t - 5t - 1t - 3t - 5t -
Reitelseder et al.	2010	RCT, enkel blindet	17 fysisk aktive menn, ikke styrketrente	Møtte fastende. Styrketrening med ettbeins kneekstønsjon. 10x8/80% av 1RM med 3 min pause. Inntok drikk med myse (Mys), kasein (Kas) (ca 20 g protein) eller vann (K) rett etter økten. Biopsier ble tatt før og 1, 3, 5 og 6 timer etter økten.	eEF-2	Mys + Kas + K -
Apro og Blomstrand	2010	RCT, dobbel blind crossover	4 menn og 5 kvinner. Mosjonister, men ikke styrketrente	Møtte fastende. 4x10/80% av 1RM etterfulgt av 4x15/65% av 1RM, 5 min pause mellom sett. Inntok 85mg BCAA kg ⁻¹ eller placebo før oppvarming, før økten, under økten, rett etter økten og 15 og 45 minutter etter økten (til sammen ca 30 g). Biopsier ble tatt før og rett etter økten og 1 t etter økten.	P70s6k	Protein + 0t + 1t + 1t + 0t + 1t +
Moore et al.	2009	RCT, dobbelt blindet, 5 repeterte målinger	6 styrketrente menn	Gikk på lik diett to siste dager før forsøkene. 4x8-10 1RM i beinpress, kneekstønsjon og lårkrøll. 2 min pause. Inntok 0, 5, 10, 20 og 30 g egg protein. Biopsier ble tatt 1 og 4 timer etter økten.	P70s6k Rps6	Protein + 0t + 1t + Alle grupper, begge tidspunkt -
Hulmi et al.	2009	RCT, dobbelt blindet	29 utrente menn	Møtte fastende. Styrkeøkt bestående av 5x10/75% 1RM i beinpress, 2 min pause. Inntak av 15g whey eller placebo uten energi før og etter økten. Biopsi før og 1 og 48 timer etter økten.	p70s6k eEF-2 rps6	Protein + 1t + 24t - 1t - 24t - 1t + 24t -
Glover et al.	2008	RCT, counter-balanced	9 fysisk aktive menn, erfaring med styrketrening	Møtte fastende og fikk enten et måltid med 10 g protein, 41 g karbohydrat og 4 g fett 90, 180 og 270 minutter etter økten, eller ingenting. Forsøkspersonene gjennomførte unilaterale kneekstønsjoner med 4x10 RM, i positiv og negativ energibalans med to ukers mellomrom. Biopsier ble tatt 6 timer etter økten.	P70s6k RPS6	Hvile - Trening + E+ - E- - E+ - E- +

2.6 Oppsummering

Betydningen av frie radikaler har vist seg å være mer sammensatt enn før antatt. Dette fører igjen til at antioksidantenes betydning heller ikke er like ensartet som man før antok. Det ser ut til at den gyldne middelvei kan være svaret og at balansen må være riktig. Hvor middelveien ligger er det imidlertid ingen som vet enda. Det ser ikke ut til at oralt inntak av antioksidantene vitamin C og E påvirker restitusjon etter uvante eksentriske muskelaksjoner med maksimal innsats, men dette bør også undersøkes med tanke på regelmessig trening. Det mangler også studier på eventuelle signaleringsmekanismer i denne sammenheng.

Inntak av proteiner ser ut til å kunne påvirke signalering og proteinsyntese etter styrketrening. Om denne økte signaleringen og proteinsyntesen er av betydning er imidlertid fortsatt et åpent spørsmål da det trengs flere studier på restitusjon og mer langvarige adaptasjoner ved inntak av protein i sammenheng med styrketrening.

3. Metode

Resultatene i denne oppgaven kommer fra et større studie kalt SARA som ble gjennomført vinteren 2010/2011 ved Norges idrettshøgskole. SARA-studien hadde til hensikt å undersøke effekten av store doser antioksidanter (vitamin C og E), restitusjonsdrikken Smartfish og astaxanthin (bare for utholdenhet) på restitusjon etter en treningsøkt og adaptasjonen etter separate treningsperioder med styrke- og utholdenhets-trening. Studien av adaptasjonen var en prospektiv randomisert kontrollert studie. Restitusjonsstudien var randomisert, kontrollert og dobbelt blindet. Den ble gjennomført med forsøkspersoner fra styrketreningsstudien midtveis i hovedstudien.

Studien var godkjent av regional komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Sør-Øst-Norge.

3.1 Rekruttering og inklusjon

Informasjon om studien ble distribuert gjennom plakater på treningssenteret på NIH og Domus athletica i Oslo. Det ble også opprettet en side på facebook for prosjektet. Alle interesserte fikk utdelt skriftlig informasjon og det ble holdt to informasjonsmøter i forkant av studien. Signert samtykke og egenerklæring ble levert av alle forsøkspersoner. Studien startet opp med 45 forsøkspersoner.

Tabell 1: Inklusjons- og eksklusjons-kriterier for deltakelse i studien.

Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
Menn og kvinner mellom 18 og 45 år	Sykdom eller skader i muskel-skjelletapparatet
Erfaring med styrketrening (minst en trening per uke siste 6 mnd)	Bruk av kosttilskudd under studien
	Allergi mot lokalbedøvelse (xylocain)

3.2 Inndeling i grupper

Etter tilvenning og pretest av styrke og spenst, ble det gjennomført en stratifisert randomisering. Det ble stratifisert for kjønn og prestasjonene under styrketesten, og forsøkspersoner ble randomisert til en av tre grupper:

1. Smartfish
2. Vitamin C og E
3. Placebo

Åtte forsøkspersoner (fire kvinner og fire menn) fra hver gruppe ble tilfeldig trukket ut til å delta i restitusjonsstudien. Til slutt var det fem forsøkspersoner fra hver gruppe som takket ja til å delta i restitusjonsstudien (se tabell 4).

Tabell 2: Antropometriske data for forsøkspersonene (n=15). Dataene er presentert i gjennomsnitt (standardavvik i parentes).

	Smartfish	Placebo	Vitamin
Alder	26,4 (6,2)	24,8 (1,8)	24,0 (2,8)
Høyde (cm)	176,8 (15,6)	178,6 (8,2)	177,6 (10,2)
Vekt (kg)	77,5 (19,1)	72,7 (12,1)	75,0 (16,0)
Muskelmasse (kg)	36,1 (11,5)	35,5 (8,6)	36,1 (6,8)
Kjønnfordeling	♂ = 2 ♀ = 3	♂ = 3 ♀ = 2	♂ = 4 ♀ = 1

3.3 Treningsprotokollen

Treningen ble delt opp i to hovedfaser. Fase 1 startet etter innledende tilvenning og styrketester og varte 6-10 uker avhengig av når deltakerne ble rekruttert. I denne perioden trente deltakerne tre økter i uken med moderat belastning. Treningsfase 2 varte 11-12 uker og bestod av fire økter per uke med tung belastning (se vedlegg 1). Restitusjonsstudien ble gjennomført i uke syv og ni i treningsfase 2.

3.4 Supplementering

Supplementeringen startet de to siste ukene av treningsfase 1 og foregikk gjennom hele treningsfase 2. Alle deltakere inntok fire piller og to drikker hver dag. Pillene (to og to) og drikkene ble inntatt før og etter trening på treningsdager, eller morgen og kveld på treningsfrie dager. Pillene og drikkene kom i hvite bokser og kartonger og det var ikke mulig for deltakerne å se hvilket supplement de fikk. Testlederne var også uvitenende om gruppetilhørigheten til forsøkspersonene; altså, dobbelt blindet studiedesign.

Tabell 3: Innhold i tilskuddene og placebo brukt i studien.

Vitamin C og E	Placebo piller	Smartfish	Placebo drikk
Kapsler: Vitamin C: 250 mg Vitamin E: 88 IU	Kapsler: Cellulose Dikalsium-fosfat	700 mg Omega 3 (260 mg DHA og 260 mg EPA) 7 g myseisolat 1 g beta-alanin 1,3 µm vitamin D3 Juice (22 g karbohydrat) Total volum: 250 ml (530 kj)	Sukrose + smak (30 g)
To piller to ganger om dagen. Før og etter trening, eller morgen og kveld	To piller to ganger om dagen. Før og etter trening, eller morgen og kveld	To drikker per dag. Før og etter trening, eller morgen og kveld	To drikker per dag. Før og etter trening, eller morgen og kveld
<u>Dose per dag:</u> Vitamin C: 1 g Vitamin E: 350 IU		<u>Dose per dag:</u> 14 g protein 1,4 g Omega 3 2 g beta-alanin 2 µm vitamin D3	

3.5 Forsøksprotokoll

3.5.1 Pilot

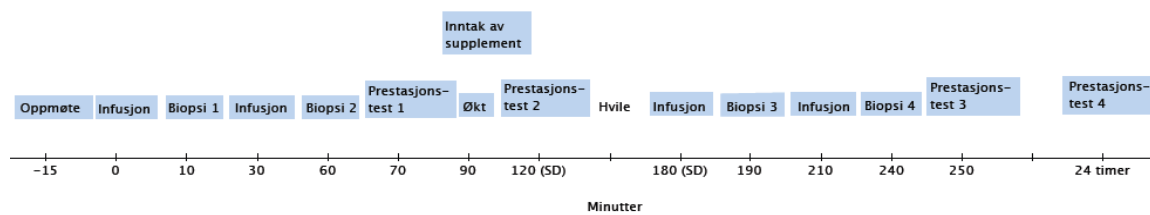
Basert på en pilot av restitusjonsstudien ble det laget et oversiktsark over testdagen for hver forsøksperson med mulighet for å notere tidspunkter, resultater og uregelmessigheter. Dette ble gjort for å i størst mulig grad kontrollere for variasjoner i faktorer som kan ha påvirket resultatene.

3.5.2 Restitusjonsforsøket

Forsøkspersonen inntok en standardisert frokost to timer før oppmøte. Frokosten var en drikk (Smartfish eller placebo) og havregrøt, bestående av 3 g havregryn per kilo kroppsvekt kokt opp i vann og 10 g sukker. Det minst anstrengende transportalternativet ble benyttet til NIH.

Forsøkspersonen lå i ryggleie og fikk plassert et venekateter i hver arm. Blodprøver ble tappet fra høyre arm og infusjon av stabile isotoper ble gjort i venstre arm. Blodprøvene og infusjonen av stabile isotoper brukes til analyser av antioksidantkapasitet og proteinsyntesemålinger, men er ikke en del av denne oppgaven.

Det ble tatt to biopsier med 50 minutters mellomrom før forsøkspersonen utførte prestasjonstester (isometrisk MVC). Deretter gjennomførte forsøkspersonen en styrkeøkt (se under). Prestasjonstestene ble gjentatt ca ti minutter etter treningsøkta og etterfulgt av to nye biopsier med 50 minutters mellomrom. Dagen ble avsluttet med en tredje runde med prestasjonstester. Neste dag møtte forsøkspersonen for prestasjonstester 24 timer etter økten (Figur xx). Biopsitidspunktene ble i stor grad diktet av hva som var optimalt for proteinsyntesemålingene som var basert på metoden brukt i (Symons, Sheffield-Moore, Chinkes, Ferrando, & Paddon-Jones, 2009).



Figur 2: Tidslinje for restitusjonsforsøket.

3.5.3 Muskelbiopsier

Alle biopsier ble tatt fra m. vastus lateralis. Det ble satt lokalbedøvelse (xylocain adrenalin, 10mg/ml + 5mirkog/ml) i huden og muskelfasien. Huden ble vasket med klorhexidin. Det ble laget et snitt i huden og muskelfasien (ca 1 cm bredt) og de to første biopsiene (pre 1 og pre 2) ble tatt fra denne inngangen til muskelen. Nålen ble imidlertid ført i forskjellig retning ved de to takningene, for å unngå å kutte i samme områder: Den første biopsien i et snitt ble tatt distalt, mens den andre ble tatt proksimalt. Etter treningsøkten ble det laget et nytt snitt, ca 3 cm proksimalt for det første snittet, og de to siste biopsiene (post 1 og post 2) ble tatt fra denne inngangen. Snittene ble tapet igjen med strips mellom uttakene.

Biopsiene ble tatt med en 6 mm Bergstrøm-nål. Biopsinåla var koblet til en 50 ml sprøyte for å gi undertrykk, dvs. suge muskelvevet inn i nåla før takning ("klipp"). Fremgangsmåten gir utbytte på 50-100 mg vev per klipp. For hvert takningstidspunkt ble nåla ført inn i muskelen 1-3 ganger for å få tilstrekkelig med vev.

Muskelbiopsiene ble vasket for blod i iskaldt, fysiologisk saltvann, og eventuelt bindevev og fett ble dissekert bort. Muskelvevet ble så fordelt: 10-30 mg til RNA-Later, ca 50 mg til proteinsyntesemålinger og ca 50 mg til homogenat. Vevet til proteinsyntese og homogenat ble fryst i isopentane nedkjølt på tørris. Alle prøvene lagret i ultrafryser ved -80°C.

3.5.4 Prestasjonstester

Alle forsøkspersonene hadde gjennomført prestasjonstestene fire ganger tidligere som en del av SARA-prosjektet, og kjente derfor testene relativt godt. Før alle prestasjonstestene, bortsett fra etter økten, varmet forsøkspersonen opp med 5 minutter sykling på ca 100 watt.

MVC for knestrekkerene (m. quadriceps) ble utført i et modifisert Gym2000 kne-ekstensjonsapparat. Individuelle innstillinger fra tidligere tester ble brukt; forsøkspersonen ble spent fast i stolen med en 4-punkts sele. Kneet var fiksert ved 90° fleksjon. Oppvarmingen bestod av tre ti sekunder lange kontraksjoner med økende kraft for hver kontraksjon (ca 30 %, 50 % og 80 %). Testene ble gjort på høyre bein med ett minutt mellom hvert forsøk. Det beste av tre forsøk ble notert som resultat. Forsøkspersonene ble bedt om å nå maksimalkraft så raskt som mulig og opprettholde kraften i 2-3 sekunder.

3.5.5 Økten

Økten besto av øvelsene beinpress og kneekstensjon. Innstillingene var de samme som forsøkspersonene brukte ved tester og i den daglige treningen. Det ble gjennomført 2 oppvarmingssett på ca 50 % og 80 % av utgangsvekten før arbeidssettene i begge øvelsene. Arbeidsvekten startet på ca 10 % over belastningen forsøkspersonene brukte under 9-11 repetisjonsperioden tidligere i studien. Målet var å ligge akkurat på 10RM og vekten ble justert i neste sett om den ble for lett eller for tung. Vekten ble ansett som for lett om forsøkspersonen kunne klart flere enn 10 repetisjoner og for tung hvis forsøkspersonen måtte ha hjelp på de to siste repetisjonene. Det var ett minutt pause mellom hvert sett og tre minutter pause mellom øvelsene. I pausen inntok forsøkspersonene en drikke og to piller.

3.6 Western blot

Vi fikk hjelp av Juha Hulmi til å utvikle western blot metoden for å måle fosforyleringsproteinene.

3.6.1 Homogenisering

Biopsiene ble oppbevart ved -80°C inntil de ble homogenisert på is. Ved homogeniseringen ble det brukt 1 ml T-PER[®] (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo scientific, Rockford, IL, USA), 20 μl Halt[™] Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) og 20 μl EDTA (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) per 50 μg muskel. Hver prøve ble homogenisert 2*3-5 sekunder, eller til alt muskelvevet var løst opp. Prøvene lå 10 sekunder på is mellom hver runde med homogenisering. Etter selve homogeniseringen lå prøvene 30 minutter ved svak risting ved 4°C . Etter risting ble det gjort proteinmålinger av alle prøvene før de ble alikvotert og lagt i fryser ved -80°C .

3.6.2 Proteinmåling

Proteininnholdet i prøvene ble bestemt med RC/DC Protein Assay kit fra BioRad (cat. no. 500-0121, Hercules, CA, USA) og bivariate γ -globulin som standardprotein, med et spekter fra 0,125 til 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Proteinstandardkurven og prøvene ble målt i triplikater og med en standardkurve $r^2 > 0,9$.

3.6.3 Western blot

Til elektroforesen ble XCell SureLocke[®] Mini Cell apparat og XCell II[™] Blot Modul fra Invitrogen (Carlsblad, CA, USA) brukt. Det ble applisert 25 μl protein i hver brønn.

Basert på proteinmålingene ble prøvene frotyntet med ultrarent vann og tilsatt Reducing Agent Buffer (Invitrogen Carlblad, CA, USA) og Sample Buffer (Invitrogen Carlblad, CA, USA), henholdsvis 3,5 μl og 7,5 μl i hver prøve med 15 μg protein.

Prøvene ble varmet opp til 70°C i 10 minutter for så å appliseres i NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12 % geler fra Invitrogen (Carlsblad, CA, USA). Prøvene fra en forsøksperson ble alltid applisert på samme gel.

Elektroforesen ble kjørt med 200 volt i 35 min. Blottet ble kjørt med 30 volt i 90 minutter. Gelene ble lagt i comassie (SimplyBlue[™] SafeStain, Invitrogen, Carlsblad, CA, USA) for å sjekke overføring og membranene ble inkubert i 5 % melkeløsning i 1 time i romtemperatur før de ble vasket 4x5 minutter i TBS-T. Inkuberingen med primærantistoff (se tabell 6) ble gjort over natt ved 4°C . Etter endt inkubering med

primærantistoff ble membranene vasket 4x5 min i TBS-T før de lå en time med sekundærantistoff (se tabell 6) i romtemperatur. Membranene ble så vasket 5x5 minutter i TBS-T. Før de ble inkubert med Chelimescent Substrate SuperSignal® WestDura (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) pakket i aluminiumsfolie i tre minutter. Bildene ble tatt med kodak image station 2000R. Båndene ble analysert ved bruk av ”region of interest” (ROI i 1D Image Analysis Software 3,6). Etter at tilfredsstillende bilder var tatt ble membranene strippet (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i 10 minutter for så å vaskes 5x1 minutt i ultrarent vann og 4x5 i TBS-T før de ble blokkert og inkubert med primærantistoff mot totalprotein. Prosedyren for totalproteinene var lik som for fosfoproteinene (For protokoll se vedlegg 2).

Tabell 4: primær- og sekundær-antistoffer benyttet i studien. * Sekundærantistoff

Antistoff	Produsent	Vert/opprinnelse	Fortynning
p70 S6 Kinase	Cell Signaling	Kanin, polyklonal	1:1000
Phospho-p70 S6 (Thr389)	Cell Signaling	Mus, monoklonal	1:1000
S6 Ribosomal Protein	Cell Signaling	Kanin, polyklonal	1:1000
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244)	Cell Signaling	Kanin, polyklonal	1:1000
eEF2	Cell Signaling	Kanin, polyklonal	1:5000
Phospho-eEF2 (Thr56)	Cell Signaling	Kanin, polyklonal	1:5000
Horseradish-conjugated goat-anti-mouse IgG *	Thermo Scientific	Geit	1:30000
Horesradish-conjugated goat-anti-rabbit IgG *	Thermo Scientific	Geit	1:30000

3.7 Statistikk

Endringer i MVC ble analysert med enveis ANOVA med post-hoc-tester (Bonferroni). Gjennomsnittet av de to første biopsiene ble brukt som baselineverdi kalt pre. Postverdiene ble både brukt som enkeltverdier (post 1 og post 2) og slått sammen til en gjennomsnittsverdi kalt post. Endringer mellom gruppene fra baseline til post 1 og post 2 for signalproteinene ble analysert med to-veis ANOVA med post-hoc-tester (Bonferroni). Endringer mellom enkelttidspunkter innad i en gruppe eller mellom

grupper ble gjort med henholdsvis parret t-test og uparret t-test. Forholdet mellom to variabler ble analysert ved bruk av pearsons korrelasjonstest. Statistisk signifikans var tilfredsstilt ved $P \leq 0,05$. Data er oppgitt som gjennomsnitt \pm standardavvik (SD). Det ble beregnet konfidensintervall (CI) og effektstørrelse (ES). Kalkuleringer ble gjort i Microsoft® excel 2011 og Prism® 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4. Resultater

4.1 Treningsmotstand

Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene for verken absolutt eller relativ treningsmotstand. Totalt treningsvolum (reps x serier x motstand) var heller ikke forskjellig mellom gruppene (data ikke vist).

Tabell 5: Gjennomsnittlig absolutt og relativ treningsmotstand under økten for de ulike gruppene i beinpress og kneekstensjon (standardavvik i parentes).

	Absoluttverdier (kg)		Relative verdier % av 10RM	
	Beinpress	Kneekstensjon	Beinpress	Kneekstensjon
Smartfish	133 (36)	60 (11)	127 (22)	115 (22)
Placebo	135 (55)	73 (15)	122 (25)	121 (51)
Vitamin	143 (36)	67,5 (13)	116 (18)	112 (11)
Total	137 (43)	65 (22)	122 (14)	117 (17)

4.2 Tid fra inntak av supplement til test og biopsi

Det var ingen signifikante forskjeller i tid fra avsluttet økt til prestasjonstest 2 mellom gruppene. Vitamin-gruppen tok i gjennomsnitt biopsi 3 25 minutter etter de to andre gruppene, forskjellen skyldes en person som tok biopsi 3 190 minutter etter inntak av piller og drikk. Forskjellene er ikke signifikante.

Tabell 6: tid fra avsluttet treningsøkt til prestasjonstest 2 og tid fra inntak av supplementer under treningsøkten til biopsi 3 (standardavvik i parentes).

	Tid fra økt til prestasjonstest 2 (minutter)	Tid fra inntak til biopsi 3 (minutter)
Smartfish	9,6 (2,1)	99 (13,9)
Vitamin	8,8 (1,3)	124 (41,6)
Placebo	9,2 (2,6)	98 (13,5)
Total	9,2 (1,9)	107 (27,5)

4.3 Prestasjonstest

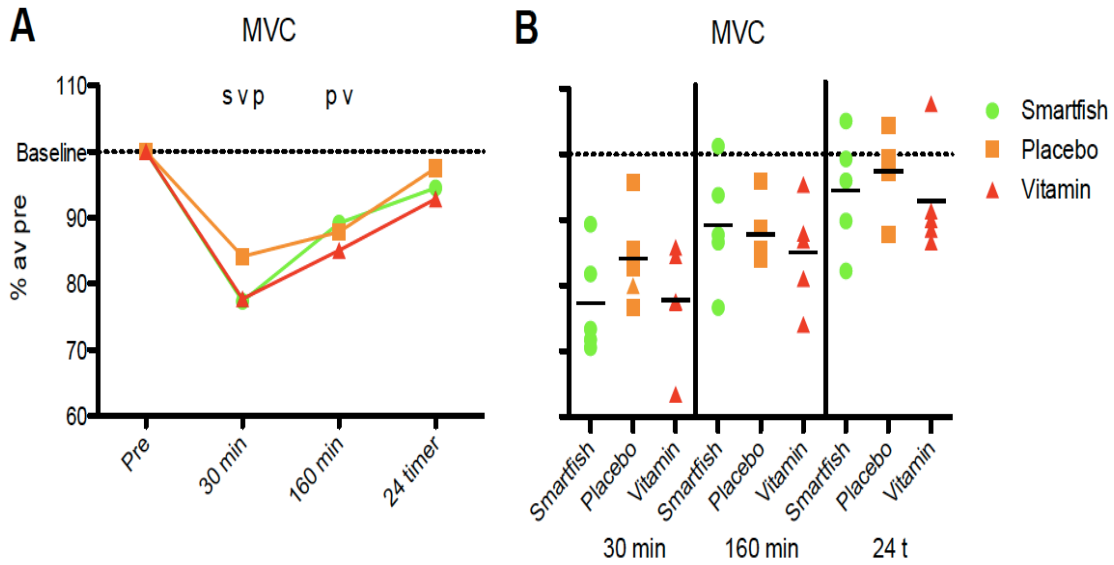
Det var ingen forskjeller mellom gruppene pre-verdier for noen av prestasjonstestene.

Tabell 7: Preverdier for gruppene i maksimal voluntær kontraksjon (MVC) målt i newton (N) i en isometrisk kneektensjon (standardavvik i parentes).

	MVC (N)
Smartfish	522 (171)
Vitamin	486 (162)
Placebo	504 (108)
Total	504 (135)

4.4 Reduksjon i MVC etter arbeidet.

Vi fant en effekt ($p < 0,001$) av tid og alle gruppene viste en reduksjon ($p < 0,001$) i MVC ved post 1 i forhold til pre. Ved post 2 var placebogruppen og vitamigruppen redusert ($p < 0,05$) i forhold til pre, mens smartfishgruppen ikke var forskjellig fra pre. Ved post 3 var ingen av gruppene forskjellige fra pre.

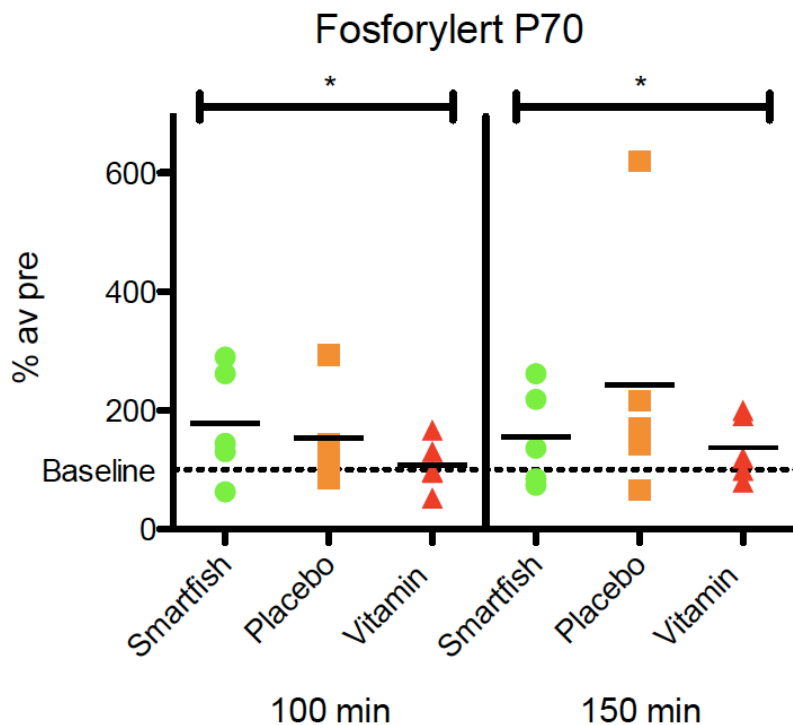


Figur 3: Tid er oppgitt i minutter fra starten av økten. A: Prosentvis forandring i maksimal voluntær kontraksjonskraft (MVC) etter en tung treningsøkt for knestrekkerne. Små bokstaver indikerer signifikant forskjell fra baseline; s for smartfishgruppen, p for placebogruppen og v for vitamingruppen $p=0,05$. B: Prosentvis forandring i MVC for hver forsøksperson ved post 1, post 2 og post 3 for i forhold til baseline.

4.5 Signalering, fosforylering av signalproteiner

4.5.1 P70

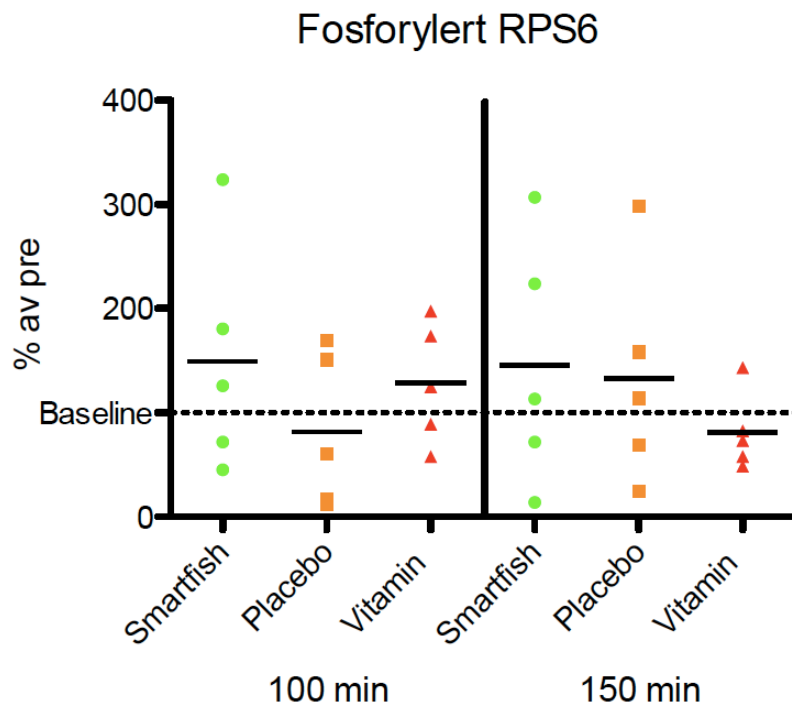
Vi fant en effekt av tid ($p=0,032$), men ingen forskjeller mellom gruppene. Det var en økning fra pre til post ($p=0,001$) samt fra pre til post 1 ($p=0,002$) og fra pre til post 2 ($p=0,003$) for forsøkspersonene som helhet, men ingen forskjell mellom gruppene. Differansen i forandring fra pre til post mellom placebogruppen og vitamigruppen var på 75 % (effektstørrelse (ES): $-0,71$, konfidensintervall (CI): $-1,92, 0,63$).



Figur 4: Prosentvis forandring i fosforylering av p70S6K ved post 1 (100 min etter økten) og post 2 (150 min etter økten) for hver forsøksperson i forhold til baseline. * indikerer signifikant forskjell fra pre, $p = 0,05$. Horisontal linje med endepunkter samler alle gruppene og tegn over disse gjelder alle gruppene.

4.5.2 RPS6

Det var stor individuell spredning i respons for RPS6 og det var ingen signifikante endringer i noen av gruppene. Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var en tendens til økning fra pre til post ($p=0,072$), og fra pre til post 1 ($p=0,08$) for forsøkspersonene som helhet.



Figur 5: Prosentvis forandring i fosforylering av p70S6K ved post 1 (100 min etter økten) og post 2 (150 min etter økten) for hver forsøksperson i forhold til baseline. Tidspunktene er antall minutter fra starten av styrketreningsøkten.

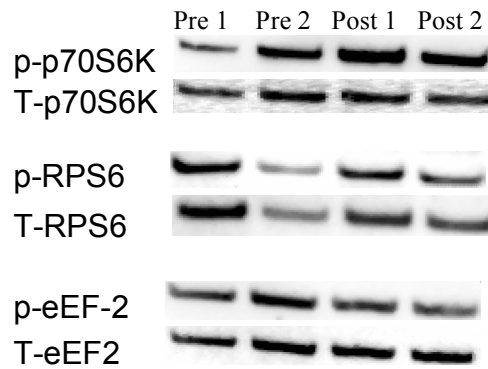
4.5.3 eEF-2

Vitamingruppen viste en signifikant ($p=0,047$) reduksjon fra pre til post, men det var ingen endring i de to andre gruppene. Det var ingen forskjell mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet. Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Differansen i forandring fra pre til post mellom placebogruppen og vitamingruppen var på 17 % (ES: -0,83, CI: -2, 0,53).

4.6 Totalproteiner

4.6.1 p70

Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var ingen forskjell mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet, eller for noen av de enkelte gruppene.



Figur 6: Blot av fosforylert og totalprotein for p70S6K, RPS6 og eEF-2

4.6.2 RPS6

Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var ingen forskjell mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet, eller for noen av de enkelte gruppene.

4.6.3 eEF-2

Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var ingen forskjeller mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet eller for de enkelte gruppene.

4.7 Ratio

4.7.1 P70

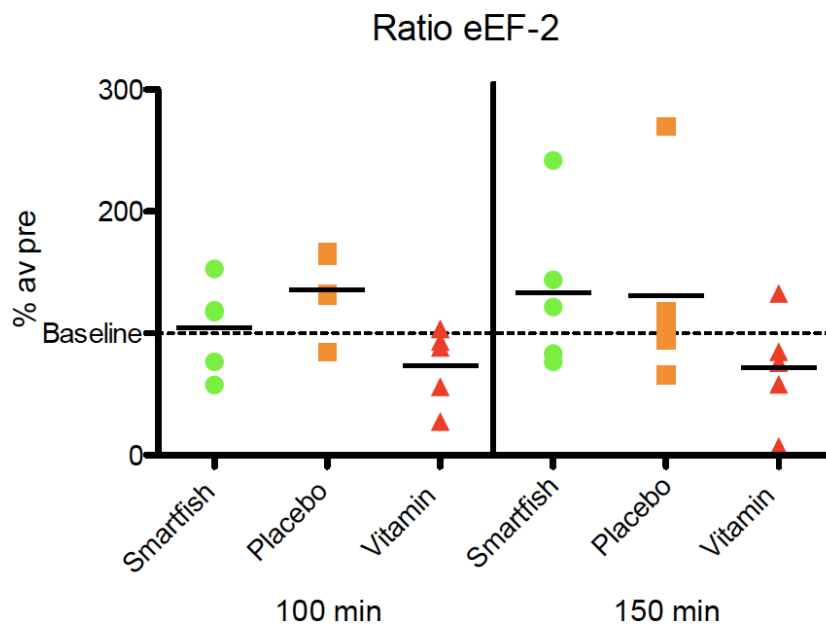
Vi fant en effekt av tid ($p=0,025$), men ingen forskjeller mellom gruppene. Det var en økning fra pre til post ($p=0,002$), pre til post 1 ($p=0,001$) og pre til post 2 ($p=0,005$) for forsøkspersonene som helhet, men ingen forskjell mellom gruppene. Differansen i forandring fra pre til post mellom placebogruppen og vitamigruppen var på 77 % (ES: 0,5, CI: -1,7 til 0,81).

4.7.2 RPS6

Vi fant ingen signifikant effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var en forskjell ($p=0,01$) mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet, men ingen forskjell for de enkelte gruppene.

4.7.3 eEF-2

Vi fant ingen effekt av tid og ingen forskjeller mellom gruppene. Det var ingen forskjeller mellom pre og post for forsøkspersonene som helhet eller for de enkelte gruppene. Vitamingruppen tenderte ($p = 0,063$) mot å være forskjellig fra placebo-gruppen. Differansen i forandring fra pre til post på 61 % mellom placebo-gruppen og vitamin-gruppen har en effektstørrelse på $-1,4$ (CI: $-2,6, 0,12$).



Figur 7: Prosentvis forandring i ratio for eEF-2 ved post 1 (100 min etter økten) og post 2 (150 min etter økten) for hver gruppe i forhold til pre (baseline). Tidspunktene er antall minutter fra starten av styrketreningsøkten.

4.8 Endring i styrke fettfri masse i treningsperioden

Det var en tendens ($p=0,09$) til effekt av gruppe i prosentvis fremgang i fettfri masse i beina og styrke målt i kneekstensjon. Beregning av effektstørrelse for fettfri masse i beina viste en henholdsvis sterk og moderat effekt av Smartfish (1,56, CI:0,03 til 2,8) og vitamin C og E (0,64, CI:-0,69 til 1,84) for differansen til placebo.

Tabell 8: Gjennomsnittlig fremgang i treningsperiode 2 for gruppene i total fettfri masse, fettfri masse i bein og styrke i kneekstensjon (standardfeil i parentes).

	% fremgang fettfri masse i bein	% fremgang kneekstensjon
Smartfish	4,15 (3,5)	11,9 (6,6)
Placebo	0,96 (2,8)	13,1 (7,8)
Vitamin	4,29 (3,3)	15,0 (15)
Total	3,1 (3,4)	13,3 (10,3)

5. Diskusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke hvordan aktiveringen av signaleringsproteinene p70S6K, RPS6 og eEF-2 og restitusjonstiden etter en styrkeøkt, og adaptasjonen til styrketrening over ti uker påvirkes av tilskudd med restitusjonsdrikken Smartfish eller store doser vitamin C og E. Kort oppsummert økte alle gruppene aktiveringen av p70S6K, men det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i aktiveringen av de undersøkte signaleringsproteinene.

Vitamingruppen tenderte imidlertid til å få noe mindre aktivering av p70 enn de to andre gruppene, men samtidig tenderte denne gruppen til å få litt større aktivering av eEF-2 enn de to andre gruppene. Det var ingen forskjell mellom gruppene i restitusjonstid. Fremgangen i muskelmasse i beina etter ti ukers trening på 4,2 %, 4,3 % og 1,0 % for henholdsvis Smartfish-, vitamin- og placebogruppen, tenderte mot å være større i Smartfish- og vitamin-gruppen sammenlignet med placebogruppen. Det var likevel ingen forskjell i fremgangen i styrke i kneekstensjon mellom gruppene.

Ingen av hypotesene kan bekreftes i denne studien, blant annet på grunn av få forsøkspersoner og stor spredning. Det ble imidlertid funnet interessante tendenser som burde undersøkes videre i studier med en større gruppe forsøkspersoner.

5.1 *Tretthet, restitusjon og signalering etter en styrketreningsøkt*

Treningsmotstanden (i % av 1RM) under styrkeøkten, tiden fra økten til måling av MVC og postbiopsiene, samt tiden fra inntak av supplement til postbiopsiene, var lik for de tre gruppene. Økten medførte et relativt stort fall i MVC for alle gruppene også spensttester gjort rett før MVC-testene viste samme trend (data ikke vist). Det var ingen forskjell mellom gruppene i restitusjonstid. Smartfishgruppen var i motsetning til de andre gruppene tilbake til utgangsverdier allerede ved post 2, men stor spredning og minimal forskjell mellom gruppene gjør det lite trolig at det ligger noe i denne forskjellen. Denne mangelen på forskjell samsvarer ikke med hva tidligere studier av proteininntak og restitusjon har konkludert. Dataene på restitusjon i denne studien tillater imidlertid ikke en konklusjon. At Smartfish inneholder flere komponenter gjør at

vi ikke kan utelukke at interaksjon mellom disse har påvirket resultatet. Innholdet av protein i Smartfishdrikken var ikke like stort som i tidligere studier (25-40 g) og det er mulig 7 g whey isolate ikke er tilstrekkelig til å gi samme respons på restitusjonen som større mengder protein.

Resultatene for vitaminingruppen samsvarer med tidligere studier på restitusjon etter muskelarbeid med maksimal kraftutvikling, som ikke finner noen effekt av antioksidanter (Avery et al., 2003; Beaton et al., 2002; Bloomer et al., 2007; Bloomer et al., 2004; Bryer & Goldfarb, 2006). Tidligere studier på effekten av antioksidanter for restitusjonsforløpet har stort sett benyttet “ekstreme” arbeidsprotokoller med eksentriske muskelaksjoner. Vi kan dermed ikke direkte sammenligne resultatene fra disse studiene med den foreliggende. Uvant eksentrisk muskelarbeid induserer typisk mye større skader enn en styrketreningsøkt som i vår studie (Paulsen, 2009). Restitusjonsprosessen i disse studiene har trolig involvert mye større grad av inflammasjon og reparasjon enn i vår studie. Disse mekanismene kan ha forskjellig grad av respons på tilførsel av antioksidanter. Vår studie representerer i mye større grad hva som skjer ved normal trening enn tidligere studier og tilfører dermed ny viten med en større ekstern validitet for alle som trener styrke regelmessig.

Man kan tenke seg at vitaminingruppen på grunn av økte antioksidantnivåer i cellen kunne trene noe hardere da RONS ser ut til å ha en plass i utviklingen av tretthet (Allen et al., 2008). Det samme gjelder smartfishgruppen som får tilført beta-alanin i drikken og dermed også potensielt kan utsette trettheten noe (Artioli, Gualano, Smith, Stout, & Lancha, 2010). En forskjell i treningsbelastning kunne fått konsekvenser for resultatene. Dette er trolig ikke tilfellet da treningsmotstanden (i % av 1RM) under økten var relativt lik mellom gruppene.

5.1.1 p70

Styrketreningsøkten medførte som forventet en økning i fosforylering av p70S6K for forsøkspersonene som helhet. Det var imidlertid ingen forskjell mellom gruppene for fosforyleringen av p70S6K. Vi observerte relativt stor spredning innad i gruppene, hvilket gjør det vanskelig å oppdage eventuelle forskjeller med kun fem forsøkspersoner

i hver gruppe. I placebogruppe har vi én forsøksperson som kan betraktes som en uteligger (600% økning). Problemer med et venekateter etter treningsøkta gjorde at postbiopsiene for denne forsøkspersonen ble tatt 90 minutter senere enn for de andre forsøkspersonene. Det er derfor en mulighet for at disse biopsiene ble tatt på et tidspunkt hvor p70S6K-fosforyleringen var økt ytterligere i forhold til biopsiene tatt 100 minutter etter økten. Hvis vi ser på andre lignende studier med flere biopsier i samme tidsrom ser det imidlertid ut til p70S6K-fosforyleringen holder seg relativt stabil i mellom én og fem timer etter en treningsøkt (Moore et al., 2011; Moore et al., 2009; Reitelseder et al., 2011). Vi har derfor valgt å ikke ekskludere denne forsøkspersonen. Hvis denne forsøkspersonen blir fjernet blir den prosentvise fremgangen på moderate 34 % ved post 1 og 23 % ved post 2 for placebo.

Vi fremstilte en hypotese om at smartfishgruppen skulle ha en større fosforylering av p70 på grunn av sitt innhold av proteiner. Dette har vi ikke klart å vise. Det er imidlertid ikke alle studier som har funnet en slik økning i fosforyleringen av p70 ved inntak av proteiner i tillegg til trening. I studien til Moore et al. (2009) var det ingen signifikant økning i aktiveringen av p70S6K etter inntak av mellom 5 og 40 g protein, og som i den foreliggende studien, var forsøkspersonene karakterisert som godt trente. De fleste studier viser likevel en høyere aktivering av p70S6K ved trening og proteininntak enn etter bare trening (Apro & Blomstrand, 2010; Hulmi et al., 2009; Moore et al., 2011; Reitelseder et al., 2011). Ingen av disse studiene har imidlertid hatt styrketrente forsøkspersoner. Moore et al. (2009) poengterer at deres resultater er i strid med tidligere funn og spekulerer i om treningsstatus kan være noe av årsaken til den manglende responsen. Et poeng i forhold til studiene som har blitt gjennomført i denne sammenheng er at de fleste benytter utrente forsøkspersoner. Dette medfører at treningsøkten som gjennomføres blir et uvant muskelarbeid. I vår studie var forsøkspersonene godt kjent med øvelsene og apparatene fra trening de foregående 13-18 ukene, samt at de var vant med treningsbelastningen og de forholdsvis korte pausene. Dette gir vår studie en sterkere ekstern validitet med tanke på å overføre resultatene til normal trening, som bør være hovedpoenget med disse studiene. Coffey et al. (2006) viste en betydelig forskjell i signaleringsresponsen for p70 for styrketrente og utholdenhetsrente (som man kan anse som utrente med tanke på styrketrening) forsøkspersoner etter en styrkeøkt. Tre timer etter en styrkeøkt var det bare utholdenhetsgruppen som utviste en økt p70S6K-fosforylering. Vi ser at det kan være

betydelige forskjeller i signaleringsresponsen mellom trente og utrente, men om dette også gjelder responsen på proteininntak etter styrketrening kan vi ennå bare spekulere i.

En annen faktor av stor betydning i studier av signaleringsproteiner er tidspunktet for biopsitakningen. Tidligere studier finner økt fosforylering av p70S6K mellom én og seks timer. Basert på dette er trolig tidspunktene benyttet i vår studie innenfor et tidsområde man forventer betydelig aktivering av p70S6K.

Mengden protein i Smartfish var lavere (7 g) enn hva de fleste andre studiene har brukt (20-30 g). Moore et al. (2009) fant at inntak på 5 g protein var nok til å stimulere proteinsyntesen. Maksimal stimulering av proteinsyntesen ble registrert ved 20 g protein. Fosforyleringen av p70S6K var som sagt ikke påvirket av proteininntaket i denne studien verken én eller fire timer etter økten. Av de andre studiene i tabell 2 er den laveste proteinmengden brukt 20 g, som ifølge Moore et al. (2009) skal gi maksimal aktivering av proteinsyntesen, og disse viser også en aktivering av p70S6K. Det er dermed trolig at vi ville fått en større p70S6K-aktivering for smartfishgruppen om proteininntaket var større.

Vi kan ikke se bort ifra at de andre komponentene i Smartfish også potensielt kan ha hatt en effekt på signaleringsproteinene. En studie av (You, Park, & Lee, 2010) fant en redusert restitusjonsrespons hos rotter som inntok fiskeolje i stedet for planteolje. Forskjellen ble forklart med en hemming av blant annet PKB og p70S6k i rottene som inntok fiskeolje. Samme gruppe viste også at fiskeoljer kunne motvirke inaktivitetsatrofi blant annet gjennom PKB og p70S6K (You, Park, Song, & Lee, 2010). Effekten av fiskeolje på signalering er dermed ikke entydig, den aktuelle studien minner imidlertid mest om restitusjonsstudien. Vi så ingen effekt restitusjonen men omega-3 fettsyrene i Smartfish kan potensielt ha hemmet p70S6K-aktiveringen og dermed motvirket en proteineffekt.

Ifølge hypotesen skulle vitamingrouppen hatt en lavere fosforylering av p70S6K enn de to andre gruppene. Vi fant imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom gruppene. Effektstørrelsen for placebogrupper mot vitamingrouppen er moderat og det kan være verdt å undersøke den mulige effekten videre. In vitro studier har vist at antioksidanter kan hemme p70S6K-responsen på RONS, men de har brukt andre antioksidanter en

vitamin C og E (Bae et al., 1999; Ding et al., 2002; Huang et al., 2002; Jung et al., 2003). Intervensjonsstudier har vist en negativ effekt av antioksidanter på adaptasjonen ved utholdenhetstrening (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow et al., 2009), andre har imidlertid ikke vist noen effekt (Yfanti et al., 2009). Om de samme effektene gjelder for styrketrening kan vi enda ikke si noe om. Det kan være snakk om meget små forandringer som akkumuleres over tid. Derfor må man være åpen for at forandringene er så små etter hver enkelt økt at vi med vårt begrensede antall forsøkspersoner og målemetoder ikke klarer å registrere store nok effekter og dermed begår en type II-feil. På den annen side går adaptasjonene til utholdenhetstrening gjennom andre signalveier som kan påvirkes annerledes enn signalveiene for styrke (Coffey & Hawley, 2007). At antioksidanter muligens påvirker adaptasjonen til utholdenhetstrening betyr ikke nødvendigvis at det også påvirker adaptasjonen til styrketrening. Vi har ingen målinger på produksjonen av RONS under økten i vår studie, men på bakgrunn av tidligere studier er det grunnlag til å tro at det var økt produksjon av RONS under økten (Bailey et al., 2003).

Volumet i en treningsøkt har vist seg å påvirke graden av aktivering av p70S6K (Burd et al., 2010; Hulmi et al., 2010; Terzis et al., 2010). Det var ingen forskjell i totalt volum løftet under treningsøkten mellom de forskjellige gruppene i vår studie. Det er heller ingen klar trend for treningsvolum og aktivering i studiene i tabell 2 . Dette kan skyldes at volumet i alle studiene er relativt høyt og at alle dermed i stor grad klarer å aktivere p70S6K maksimalt.

Aktiveringen av p70 er noe lavere i vår studie enn i de fleste andre lignende studier (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010; Hulmi et al., 2009). Dette kan også være en effekt av treningstilstand, men forskjeller i matinntak kan også ha spilt en rolle. I motsetning til tidligere studier, hvor forsøkspersonene møtte fastende, inntok våre forsøkspersoner en standardisert frokost på testdagen. Selv om vi forsøkte å holde proteinnivået på et lavt nivå kan dette ha medført en økt fosforylering av p70S6K og dermed gitt oss en forhøyet baselineverdi i forhold til andre studier med fastende forsøkspersoner. Differansen i aktivering før og etter treningen blir dermed ikke så stor som den ville blitt med fastende forsøkspersoner. Med mindre differanse blir det vanskeligere å finne forskjeller og risikoen for type II-feil øker. For p70S6K er pre 2 verdiene 20 % høyere enn pre 1 verdiene ($p=0,03$). Dette kan tyde på at fosforyleringen

av p70S6K fortsatt er stigende som respons på frokosten. Denne økningen er hovedsakelig drevet av Smartfishgruppen som inntok en frokost med større mengde protein (havregrøt + Smartfish istedenfor havregrøt og placebo) enn de andre gruppene og har en økning på 45 %, men forskjellen er ikke signifikant for Smartfishgruppen alene. Denne observasjonen viser at tid fra matinntak til første biopsi kan være av betydning for resultatene. Jeg vil derfor argumentere for at vår studie har en større ekstern validitet når det gjelder signalering etter en styrkeøkt i det daglige, fordi vi ikke har fastende forsøkspersoner.

Det er usikkert hvor mye og hvor ofte fluktuasjoner i signaleringsproteiner forandrer seg. Ved å bruke to hvilemålinger til å danne en baseline øker vi sikkerheten i resultatene i forhold til tidligere studier som bare har målt én hvileverdi, og dermed risikerer å i større grad påvirkes av variasjoner i hvileaktiveringen av proteinene.

5.1.2 RPS6

Det var ingen effekt av tid for aktivering av RPS6, men tendenser til økning fra pre til post og pre til post 1 for forsøkspersonene som helhet. Variasjonen for RPS6 er enda større enn for p70 og eEF-2. Alle gruppene har flere negative verdier både ved post 1 og post 2. Vi forventet at treningsøkten skulle gi en mer uniform økning slik man har observert i tidligere studier (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010; Glover et al., 2008; Hulmi et al., 2009). Det er mulig at treningstilstand også påvirker responsen til RPS6.

Vi fremstilte en hypotese om at smartfishgruppen skulle vise en økt fosforylering av RPS6, men det var ingen forskjell mellom gruppene. I motsetning til for p70S6K er det flere studier som ikke finner en økt effekt av protein på RPS6 etter styrketrening (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010; Glover et al., 2008; Hulmi et al., 2009; Moore et al., 2009).

Vi ser imidlertid at styrketrening i flere studier effektivt øker fosforyleringen av RPS6 (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010; Glover et al., 2008; Hulmi et al., 2009), men ikke alle finner dette (Moore et al., 2009). I vår studie er det bare en tendens til en

økning for fosforyleringen av RPS6. Responsen i andre studier ser ut til å være rask (Apro & Blomstrand, 2010) og å være forhøyet i hvert fall én time etter treningen (Apro & Blomstrand, 2010)(Hulmi et al., 2009). Biopsitidspunktene i vår studie ser dermed ikke ut til å forklare en noe svak respons.

Frokostinntaket i vårt studie kan også ha spilt en rolle for RPS6-resultatene, men trenden for økning fra pre 1 og pre 2 er ikke like klar for RPS6 som for p70S6K. Smartfishgruppen har en ikke signifikant økning fra pre 1 til pre 2 på 84 %, mens placebogruppen har en reduksjon ($p=0,002$) på 32 % og vitamingrouppen holder seg stabil. Økningen i smartfishgruppen stemmer godt med økningen vi så for p70S6K for samme gruppe, muligens som en respons på frokosten og inntaket av en smartfishdrikk. Reduksjonen i placebogruppen er vanskeligere å forklare da placebo- og vitamingrouppa inntok samme frokost. Vi kan ikke se bort i fra at inntaket av C- og E-vitaminene hadde innvirkning på signaleringsproteiner oppstrøms for RPS6, og dermed hindret reduksjon i fosforyleringsnivået.

Studier har vist at fosforylering av RPS6 ikke påvirkes i samme grad av volumet i en treningsøkt som p70S6K (Burd et al., 2010; Hulmi et al., 2010; Terzis et al., 2010). Responsen på volum ser uansett ut til å i størst grad skje gjennom fosforyleringssteder vi ikke har undersøkt (RPS6^{ser235/236});(Hulmi et al., 2010).

Mengden protein vil også teoretisk spille inn på aktiveringen av RPS6, men det ser ikke ut til at størrelsen på proteininntaket er av så stor betydning for fosforyleringen av RPS6 etter styrketrening (Moore et al., 2009).

5.1.3 eEF-2

For eEF-2 var det ingen forskjell mellom baseline, post 1 og post 2 for alle gruppene samlet. Dette samsvarer med resultatene fra (Hulmi et al., 2009; Moore et al., 2011) som tyder på at eEF-2 ikke øker aktiveringen ved trening og inntak av proteiner. At aminosyrer ikke øker aktiveringen av eEF-2 støttes også av en in vitro studie av forskjellige aminosyrers effekt på signalering i C2C12 muskelceller som ikke fant noen effekt av aminosyrer på aktiveringen av eEF-2 (Atherton et al., 2010). For

vitamingruppen fant vi imidlertid en signifikant økt aktivering av eEF-2 (defosforylering = aktivering). (Apro & Blomstrand, 2010) fant en redusert aktivering av eEF-2 i gruppen som fikk protein og en økt aktivering i placebogruppen en time etter en styrkeøkt. En annen studie på signalering uten inntak av proteiner viste også redusert fosforylering av eEF-2 én og to timer etter en styrkeøkt (Dreyer et al., 2010).

I de overnevnte treningsstudiene var volumet relativt stort, men det var studiene med det største volumet som fant en økt aktivering i eEF-2 (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010). Både p70S6K (Hulmi et al., 2009; Terzis et al., 2010) og MAP kinasene ERK1/2 og p38 (Hulmi et al., 2009; Terzis et al., 2010) har vist seg å respondere på volumet i en treningsøkt. Det skal nevnes at sammenhengen ble funnet for økter med lavere volum enn øktene i de overnevnte studiene. Vår studie hadde et relativt stort volum, men vi finner bare aktivering av eEF-2 i vitamingruppen. Forskjeller i volum kan derfor ikke forklare gruppeforskjellene i vår studie. In vitro studier har vist at RONS kan aktivere både PKB-signalveien og flere MAPK som er vist å regulere eEF-2 (Knebel et al., 2002; Pende et al., 2004; Wang et al., 2001). Antioksidanter ble vist å kunne hemme denne responsen. Basert på disse studiene skulle man forvente motsatt effekt av det vi fant, nemlig en reduksjon i aktiveringen av eEF-2 ved antioksidantsupplmentering. Det er likevel en mulighet at vitamin C og E supplement kan ha en positiv effekt på aktiveringen av eEF-2 gjennom disse signalveiene, eller helt andre signalveier. Mekanismene bak eEF-2 respons på vitaminene C og E i kombinasjon med styrketrening er fortsatt uklare.

5.1.4 Totalproteiner

For alle totalproteinene var det noe variasjon i målingene. For RPS6 fikk vi en uventet stor økning på 159 % ved post 1 i smartfishgruppen. Hva som ligger bak denne store økningen, som ikke vedvarer til neste tidspunkt, er vanskelig å si. Det er imidlertid ikke en signifikant endring for smartfishgruppen alene, men for alle gruppene som helhet er det en endring i totalprotein fra pre til post ($p=0,029$). Endringene i vitamingruppen og placebogruppen er mindre enn økningen i smartfishgruppen og blir ikke signifikant uten smartfishgruppen. Den store økningen skjer hos tre av fem forsøkspersoner i smartfishgruppen. Grunnen til at gjennomsnittet for ratio holder seg så stabilt er at de to

andre forsøkspersonene har en stor reduksjon i RPS6-totalverdiene sine. Få studier rapporterer resultatene fra totalprotein, om de i det hele tatt måler det. Hulmi et al. (2009; ”personlig kommunikasjon”) og (Mayhew, Kim, Cross, Ferrando, & Bamman, 2009) fant ingen økning i total mengde RPS6 etter en styrketreningsøkt. Dette tyder på at det kan være noe galt med resultatet for dette tidspunktet. Vi kan ikke utelukke at den høye verdien skyldes metodiske feil. Siden ratioverdiene baserer seg på fosforyleringsverdiene og totalverdiene, får denne feilmålingen også innvirkning på ratioverdien ved post 1 for smartfishgruppen. Ratioverdien for smartfishgruppen ved post 1 ville vært betydelig høyere om totalverdien på samme tidspunkt hadde samsvart med de andre totalverdiene for smartfishgruppen i større grad.

5.1.5 Ratio mellom fosforylerte proteiner og total proteinmengde

Selv om graden av fosforylering av p70S6K og RPS6 er den bestemmende faktoren for cellens respons, kan det også ha en hensikt å måle ratioverdier. I motsetning til fosforyleringsresultatene, som bare angir mengden fosforylert protein, kan ratioverdiene anses som et mål på graden av aktivering da de sier noe om mengden fosforylert protein mot den totale mengden protein. Vi kan kalle det absolutt og relativ aktivering. En person med større mengde totalprotein kan oppnå samme totale aktivering som en person med mindre totalprotein ved en mindre relativ aktivering. Hvor store variasjonene er i totalprotein for de aktuelle proteinene er usikkert. Det store spørsmålet angående de aktuelle totalproteinene er imidlertid om disse kan oppjusteres som respons på trening. Oppjustering av totalprotein er en del av adaptasjonen for mange proteiner (Alberts et al., 2004). I løpet av den akutte perioden som ble undersøkt i denne studien bør man ikke forvente en økning i de aktuelle totalproteinene. Om lengre perioder med styrketrening kan ha en slik effekt er usikkert. Hulmi et al. (2009) fant riktig nok ingen økning for p70S6K og RPS6 etter 21 uker med styrketrening med og uten proteiner.

Det er ingen av studiene i tabell 2 som oppgir resultater i form av ratio mellom fosforylert og total protein av samme protein. Moore et al. (2011) oppgir resultatene som ratio mellom det fosforylerte proteinet og mengden aktin i prøven. Å presentere mengden fosforylerte proteiner relative til et såkalt husholdningsprotein kontrollerer for mengden protein i hver prøve, men ikke endringer i totalprotein for det aktuelle

signaleringsproteinet. Hulmi et al. (2009) måler totalprotein, men bruker det ikke i beregningen av resultatene. Andre studier benytter bare fosforylert protein (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2010; Glover et al., 2008; Hulmi et al., 2009; Reitelseder et al., 2011). Dette gir mening for proteiner som aktiveres ved fosforylering, da det viktigste for cellens respons er mengden aktivert protein. For proteiner som aktiveres av defosforylering er saken en annen når man faktisk måler mengden av det fosforylerte proteinet. For eEF-2 er det den ufosforylerte andelen som registreres av cellen og som er av betydning. Denne andelen har vi ikke målt direkte, men estimert ved å beregne en ratio mellom totalprotein og fosforylert protein. For eEF-2 bør dette gi et riktigere mål på aktiveringen enn å måle bare mengden fosforylert protein. Det er imidlertid liten grunn til å forvente store forandringer i totalprotein i løpet av den akutte perioden etter en økt, og forutsatt at totalprotein holder seg stabilt, vil graden av fosforylering kunne brukes til å gi et bilde av proteinets aktivitet. Vi ser av våre målinger at total eEF-2 ikke ser ut til å variere mye fra før til etter økten.

5.1.6 p70S6K

For p70S6K viste ratioresultatene samme trend som fosforyleringsresultatene med en økning som respons på styrkeøkten. Korrelasjonen mellom total og relativ aktivering av p70S6K var (0,97 $p < 0,001$). Dette bekrefter at målingene av fosforylering og totalprotein har hatt tilfredsstillende kvalitet.

5.1.7 RPS6

Ratioverdiene for RPS6 viste samme trend som fosfoverdiene, men forskjellene mellom gruppene ble større og tendensen til forskjell mellom pre og post er signifikant for ratioverdiene. En logisk forklaring kan være at totalproteinmålingene har vært feil i forhold til faktisk proteininnhold i noen alikvoter, og derfor gir mer ustabile fosforesultater. Ved å gjøre fosfoverdiene relative til totalproteinmålingene justerer vi for denne feilen, noe som i dette tilfellet bidrar til at verdiene blir signifikante. Det er ingen korrelasjon mellom fosforesultatene og ratioresultatene. Dette kan skyldes den store spredningen og noen litt ”usikre” totalproteinmålinger.

5.1.8 eEF-2

Ratioverdiene for eEF-2 viser noe av den samme trenden som fosforesultatene. Det er en korrelasjon (0,62, $p=0,013$) mellom fosforyleringsverdiene og ratioverdiene for eEF-2. Dette indikerer at målingene ikke har hatt helt optimal kvalitet. Forskjellen mellom gruppene er større for ratioresultatene enn fosforyleringsresultatene og det kan se ut som om fosforyleringen av eEF-2 øker i smartfishgruppen og placebogruppen. Dette skyldes i stor grad to forsøkspersoner, en i smartfishgruppen og en i placebogruppen, med høye verdier ved post 2. Disse personene drar gjennomsnittet for disse gruppene fra omkring 0 % til 30 % økning. I samsvar med fosforyleringsresultatene ser det dermed ut til at smartfish- og placebo-gruppen ikke har noen betydelig økt aktivering av eEF-2. Vi ser også at forskjellen mellom disse gruppene og vitaminingruppen er større i ratioresultatene enn for fosforyleringsresultatene og at vitaminingruppen nå tenderer mot å være forskjellig fra placebo.

Ved nærmere tolkning av konfidensintervallene til differansen mellom gjennomsnittsverdiene for vitamin- og placebo-gruppen ved post 2 ($M_{diff} = -60\%$ CI: -139 til 20, $p = 0,19$) indikerer at det er en betydelig sannsynlighet for at vitaminingruppen har en større reduksjon i ratio for eEF-2 enn placebo. Siden konfidensintervallet krysser null i disse tilfellene, vil ikke en t-test bli signifikant. Ved et større antall deltakere vil konfidensintervallet bli mindre, og forutsatt at gjennomsnittsverdiene ikke forandrer seg vil en t-test vise en signifikant forskjell mellom gruppene i dette tilfellet. Ved å fullstendig akseptere nullhypotesen basert på p-verdien risikerer vi å gjøre en type II-feil, denne tendensen bør derfor undersøkes grundigere.

Å finne mekanismene for hvordan vitamin C og vitamin E alene eller sammen potensielt kan påvirke eEF-2 er utenfor målet i denne oppgaven og heller ikke mulig å gjøre på bakgrunn av de resultatene som er inkludert i oppgaven, men bør undersøkes nærmere.

5.2 Fremgang i muskelmasse og muskelstyrke

Det er en relativt stor forskjell i fremgang i fettfri i smartfishgruppen og vitaminingruppen i forhold til placebogruppen. Differansen tenderer mot å være forskjellig for gruppene. Dette underbygges videre av effektstørrelsene, særlig for smartfishgruppen. Smartfish- og vitamin-gruppen øker ca. like mye i fettfri masse. Fremgangen i fettfri masse i

placebogruppen er betydelig lavere enn man ville forvente med denne typen treningsprogram over 10 uker (Kvamme, 2005). Kombinert med at det ikke er noen forskjeller i fremgangen i styrke i kneekstensjon og at forskjellene mellom gruppene blir mindre om vi ser på total fettfri masse i stedet for bare i beina (data ikke vist) tyder dette på at det vi skal være forsiktige med å trekke noen konklusjon. Siden total muskelmasse i lårene innebefatter mer enn bare mm. quadriceps kan økt muskelvekst i for eksempel hamstrings føre til at disse resultatene ikke samsvarer med styrken i kneekstensjon.

At vi ikke finner noen effekt av Smartfish på signaleringsproteinene og at de allikevel viser så stor fremgang gjennom treningsstudien viser hvor utfordrende det kan være å beskrive forandring over tid basert på målinger over et svært kort tidsrom. Vi vet ikke hvilken effekt komponentene i Smartfish har i det daglige som kan påvirke treningsadaptasjonen. Det ser imidlertid ikke ut til at beta-alanin påvirker adaptasjonen til styrketrening over en tilsvarende tidsperiode som den aktuelle studien (Kendrick et al., 2008). Vitamingruppen viste en økt aktivering av eEF-2 som kan ha bidratt til den fremgangen vi ser gjennom studien.

En utfordring for mange av studiene som har undersøkt effekten av supplementer på styrketrening er at de hovedsakelig benytter seg av indirekte mål på fremgang, som signalering og proteinsyntesemålinger. For at konklusjonene skal være riktig er man avhengig av at de indirekte målene på fremgang faktisk representerer endringene vi ønsker å si noe om, i vårt tilfelle økt muskelmasse og styrke. For p70S6K fant Terzis et al. (2008) en sammenheng mellom aktivering av signalproteiner etter en styrkeøkt og fremgang i styrke og muskelvekst etter tolv ukers trening. I denne studien er det ingen korrelasjon mellom aktiveringen av signalproteinene og fremgang i styrke eller muskelmasse gjennom treningsperioden. Hulmi et al. (2009) fant heller ingen sammenheng mellom signalering etter en økt og fremgang etter en treningsperiode.

Det trengs flere studier på styrketrening og restitusjon som undersøker og verifiserer responsene (signalering) mot de kortsiktige (proteinsyntese) og langsiktige utfallene (muskelvekst). Kombinert med studier av mekanistiske forhold, gjennom for eksempel ”knock out” og overekspressjon, vil slike studier kunne bringe mye ny kunnskap og

forståelse av hvordan man optimaliserer fysiologisk adaptasjon til for eksempel styrketrening.

6. Konklusjon

Studiens hypoteser om en gunstig effekt av Smartfish, men hemmende effekt av Vitamin C og E på hypertrofisignalering og restitusjonstid etter en styrkeøkt, kan ikke bekreftes.

Styrkeøkten induerte en økning i aktivering (fosforylering) av p70S6k for alle gruppene, med en tendens til lavere aktivering i vitamigruppen. Det var ingen forskjell mellom Smartfish og placebo, noe som strider med tidligere funn fra proteinsupplementering etter styrketreningsøkter og kan skyldes at forsøkspersonene i vår studie, i motsetning til tidligere studier, var godt trente og inntok frokost på testdagen. Det er også sannsynlig at mengden protein i Smartfish var for liten til å gi en målbar effekt. Alternativt kan "proteineffekten" ha blitt blokkert av øvrige komponenter i Smartfishdrikken. Resultatene for RPS6 var sprikende og vi fant ingen endringer som effekt av styrketreningen eller mellom gruppene. Vitamigruppen viste en tendens til å aktivere (defosforylere) eEF-2 etter styrkeøkten, mens det ikke var noen forskjell i de andre gruppene. Denne effekten bør undersøkes nøyere i kommende studier.

Det var ingen forskjell mellom gruppene i restitusjonstid. Dette står i kontrast til tidligere studier av proteintilskudd og kan skyldes at mengden protein i Smartfish er mindre enn mengden som har hatt effekt i tidligere studier. Resultatet samsvarer imidlertid med tidligere studier på effekten av vitamin C og E på restitusjon.

Fremgangen i muskelmasse i beina etter ti ukers trening på 4,2 %, 4,3 % og 1,0 % for henholdsvis smartfish-, vitamin- og placebogruppen, tenderte mot å være større i smartfish- og vitamin-gruppen sammenlignet med placebogruppen. Det var likevel ingen forskjell i fremgangen i styrke i kneekstensjon mellom gruppene.

Antallet forsøkspersoner inkludert i denne oppgaven er lavt og medfører en lav statistisk styrke, og vi må derfor være svært forsiktige med å trekke noen endelige konklusjoner. Effektene av store doser med vitamin C (1000 mg pr dag) og E (235 mg pr dag), eller inntak av restitusjonsdrikken Smartfish synes uansett ikke å være dramatiske, verken på restitusjon eller adaptasjon til styrketrening.

7. Referanser

- Abramson, J. J., & Salama, G. (1989). Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr*, 21(2), 283-294.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Jonhnsen, A., Lewis, J., Raff, M., et al. (2004). *Essential Cell Biology* (Second ed.). New York.
- Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A., & Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 399(3), 333-338.
- Alessio, H. M., Goldfarb, A. H., & Cutler, R. G. (1988). MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol*, 255(6 Pt 1), C874-877.
- Allen, D. G., Lamb, G. D., & Westerblad, H. (2008). Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev*, 88(1), 287-332.
- Andersen, L. L., Tufekovic, G., Zebis, M. K., Cramer, R. M., Verlaan, G., Kjaer, M., et al. (2005). The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. *Metabolism*, 54(2), 151-156.
- Anthony, J. C., Yoshizawa, F., Anthony, T. G., Vary, T. C., Jefferson, L. S., & Kimball, S. R. (2000). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr*, 130(10), 2413-2419.
- Apro, W., & Blomstrand, E. (2010). Influence of supplementation with branched-chain amino acids in combination with resistance exercise on p70S6 kinase phosphorylation in resting and exercising human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 200(3), 237-248.
- Artoli, G. G., Gualano, B., Smith, A., Stout, J., & Lancha, A. H., Jr. (2010). Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc*, 42(6), 1162-1173.
- Ashton, T., Rowlands, C. C., Jones, E., Young, I. S., Jackson, S. K., Davies, B., et al. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 77(6), 498-502.
- Atherton, P. J., Smith, K., Etheridge, T., Rankin, D., & Rennie, M. J. (2010). Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids*, 38(5), 1533-1539.
- Avery, N. G., Kaiser, J. L., Sharman, M. J., Scheett, T. P., Barnes, D. M., Gomez, A. L., et al. (2003). Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *J Strength Cond Res*, 17(4), 801-809.
- Bae, G. U., Seo, D. W., Kwon, H. K., Lee, H. Y., Hong, S., Lee, Z. W., et al. (1999). Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J Biol Chem*, 274(46), 32596-32602.

- Bailey, D. M., Davies, B., Young, I. S., Jackson, M. J., Davison, G. W., Isaacson, R., et al. (2003). EPR spectroscopic detection of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *J Appl Physiol*, *94*(5), 1714-1718.
- Beaton, L. J., Allan, D. A., Tarnopolsky, M. A., Tiidus, P. M., & Phillips, S. M. (2002). Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc*, *34*(5), 798-805.
- Bloomer, R. J., Falvo, M. J., Schilling, B. K., & Smith, W. A. (2007). Prior exercise and antioxidant supplementation: effect on oxidative stress and muscle injury. *J Int Soc Sports Nutr*, *4*, 9.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., & McKenzie, M. J. (2006). Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med Sci Sports Exerc*, *38*(6), 1098-1105.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., McKenzie, M. J., You, T., & Nguyen, L. (2004). Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, *14*(4), 377-388.
- Bogdan, C., Rollingshoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, *12*(1), 64-76.
- Bowry, V. W., Mohr, D., Cleary, J., & Stocker, R. (1995). Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem*, *270*(11), 5756-5763.
- Bryer, S. C., & Goldfarb, A. H. (2006). Effect of high dose vitamin C supplementation on muscle soreness, damage, function, and oxidative stress to eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, *16*(3), 270-280.
- Buckley, J. D., Thomson, R. L., Coates, A. M., Howe, P. R., DeNichilo, M. O., & Rowney, M. K. (2010). Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle force-generating capacity following eccentric exercise. *J Sci Med Sport*, *13*(1), 178-181.
- Burd, N. A., Holwerda, A. M., Selby, K. C., West, D. W., Staples, A. W., Cain, N. E., et al. (2010). Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men. *J Physiol*, *588*(Pt 16), 3119-3130.
- 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*, *106*(5), 1692-1701.
- Byfield, M. P., Murray, J. T., & Backer, J. M. (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, *280*(38), 33076-33082.
- Carlberg, U., Nilsson, A., & Nygard, O. (1990). Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *Eur J Biochem*, *191*(3), 639-645.
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*, *13*(9), 1007-1024.

- Cassano, M., Quattrocchi, M., Crippa, S., Perini, I., Ronzoni, F., & Sampaolesi, M. (2009). Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J Muscle Res Cell Motil*, 30(7-8), 243-253.
- Cockburn, E., Hayes, P. R., French, D. N., Stevenson, E., & St Clair Gibson, A. (2008). Acute milk-based protein-CHO supplementation attenuates exercise-induced muscle damage. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(4), 775-783.
- Coffey, V. G., & Hawley, J. A. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports Med*, 37(9), 737-763.
- Cully, M., Genevet, A., Warne, P., Treins, C., Liu, T., Bastien, J., et al. (2010). A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1. *Mol Cell Biol*, 30(2), 481-495.
- Diggle, T. A., Subkhankulova, T., Lilley, K. S., Shikotra, N., Willis, A. E., & Redpath, N. T. (2001). Phosphorylation of elongation factor-2 kinase on serine 499 by cAMP-dependent protein kinase induces Ca²⁺/calmodulin-independent activity. *Biochem J*, 353(Pt 3), 621-626.
- Ding, M., Li, J., Leonard, S. S., Shi, X., Costa, M., Castranova, V., et al. (2002). Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction. *Mol Cell Biochem*, 234-235(1-2), 81-90.
- Dreyer, H. C., Fujita, S., Glynn, E. L., Drummond, M. J., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2010). Resistance exercise increases leg muscle protein synthesis and mTOR signalling independent of sex. *Acta Physiol (Oxf)*, 199(1), 71-81.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Fry, C. S., Glynn, E. L., & Rasmussen, B. B. (2009). Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol*, 106(4), 1374-1384.
- Etheridge, T., Philp, A., & Watt, P. W. (2008). A single protein meal increases recovery of muscle function following an acute eccentric exercise bout. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33(3), 483-488.
- Fukunaga, T., Miyatani, M., Tachi, M., Kouzaki, M., Kawakami, Y., & Kanehisa, H. (2001). Muscle volume is a major determinant of joint torque in humans. *Acta Physiol Scand*, 172(4), 249-255.
- Glover, E. I., Oates, B. R., Tang, J. E., Moore, D. R., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2008). Resistance exercise decreases eIF2Bepsilon phosphorylation and potentiates the feeding-induced stimulation of p70S6K1 and rpS6 in young men. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2), R604-610.
- Gomez-Cabrera, M. C., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L., & Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567(Pt 1), 113-120.

- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., Romagnoli, M., Arduini, A., Borrás, C., Pallardo, F. V., et al. (2008). Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, 87(1), 142-149.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*, 91(3C), 14S-22S.
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 10, 5-12.
- Halliwell, B., & G. J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Hamilton, K. L., Staib, J. L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S. L., & Powers, S. K. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 34(7), 800-809.
- Hartman, J. W., Tang, J. E., Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Lawrence, R. L., Fullerton, A. V., et al. (2007). Consumption of fat-free fluid milk after resistance exercise promotes greater lean mass accretion than does consumption of soy or carbohydrate in young, novice, male weightlifters. *Am J Clin Nutr*, 86(2), 373-381.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18(16), 1926-1945.
- Hidalgo, C., Sanchez, G., Barrientos, G., & Aracena-Parks, P. (2006). A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J Biol Chem*, 281(36), 26473-26482.
- Hoffman, J. R., Ratamess, N. A., Tranchina, C. P., Rashti, S. L., Kang, J., & Faigenbaum, A. D. (2010). Effect of a proprietary protein supplement on recovery indices following resistance exercise in strength/power athletes. *Amino Acids*, 38(3), 771-778.
- Hornberger, T. A., Sukhija, K. B., Wang, X. R., & Chien, S. (2007). mTOR is the rapamycin-sensitive kinase that confers mechanically-induced phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70(S6k). *FEBS Lett*, 581(24), 4562-4566.
- Huang, C., Li, J., Ke, Q., Leonard, S. S., Jiang, B. H., Zhong, X. S., et al. (2002). Ultraviolet-induced phosphorylation of p70(S6K) at Thr(389) and Thr(421)/Ser(424) involves hydrogen peroxide and mammalian target of rapamycin but not Akt and atypical protein kinase C. *Cancer Res*, 62(20), 5689-5697.
- Hulmi, J. J., Tannerstedt, J., Selanne, H., Kainulainen, H., Kovanen, V., & Mero, A. A. (2009). Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men. *J Appl Physiol*, 106(5), 1720-1729.
- Hulmi, J. J., Walker, S., Ahtiainen, J. P., Nyman, K., Kraemer, W. J., & Hakkinen, K. (2010). Molecular signaling in muscle is affected by the specificity of resistance exercise protocol. *Scand J Med Sci Sports*.

- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., & Guan, K. L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4(9), 648-657.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126(5), 955-968.
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577-590.
- Jacinto, E., & Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J*, 410(1), 19-37.
- Jackson, M. J. (2008). Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med*, 44(2), 132-141.
- Jackson, M. J., Pye, D., & Palomero, J. (2007). The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102(4), 1664-1670.
- Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., & Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J*, 16(12), 3693-3704.
- Ji, L. L. (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 23, 135-166.
- Jorgensen, R., Merrill, A. R., & Andersen, G. R. (2006). The life and death of translation elongation factor 2. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 1), 1-6.
- Jung, D. K., Bae, G. U., Kim, Y. K., Han, S. H., Choi, W. S., Kang, H., et al. (2003). Hydrogen peroxide mediates arsenite activation of p70(s6k) and extracellular signal-regulated kinase. *Exp Cell Res*, 290(1), 144-154.
- Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal*, 18(12), 2238-2251.
- Kendrick, I. P., Harris, R. C., Kim, H. J., Kim, C. K., Dang, V. H., Lam, T. Q., et al. (2008). The effects of 10 weeks of resistance training combined with beta-alanine supplementation on whole body strength, force production, muscular endurance and body composition. *Amino Acids*, 34(4), 547-554.
- Knebel, A., Haydon, C. E., Morrice, N., & Cohen, P. (2002). Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem J*, 367(Pt 2), 525-532.
- Kvamme, N. H. (2005). *Effekt av styrketrening med ein og tre seriar på satellittceller og muskelvekst*. Norwegian School of Sport Sciences, Oslo.
- Lee, C. H., Inoki, K., & Guan, K. L. (2007). mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 443-467.

- Leslie, N. R., Bennett, D., Lindsay, Y. E., Stewart, H., Gray, A., & Downes, C. P. (2003). Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J*, 22(20), 5501-5510.
- Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R. W., Washko, P. W., Dhariwal, K. R., et al. (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3704-3709.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., & Belcastro, A. N. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 56(3), 313-316.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Pandolfi, P. P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*, 121(2), 179-193.
- Mayhew, D. L., Kim, J. S., Cross, J. M., Ferrando, A. A., & Bamman, M. M. (2009). Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans. *J Appl Physiol*, 107(5), 1655-1662.
- McKenna, M. J., Medved, I., Goodman, C. A., Brown, M. J., Bjorksten, A. R., Murphy, K. T., et al. (2006). N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol*, 576(Pt 1), 279-288.
- Mieulet, V., Roceri, M., Espeillac, C., Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Oorschot, V., et al. (2007). S6 kinase inactivation impairs growth and translational target phosphorylation in muscle cells maintaining proper regulation of protein turnover. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(2), C712-722.
- Miller, E. R., 3rd, Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., & Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*, 142(1), 37-46.
- Miyazaki, M., & Esser, K. A. (2009). Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals. *J Appl Physiol*, 106(4), 1367-1373.
- Moopanar, T. R., & Allen, D. G. (2005). Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. *J Physiol*, 564(Pt 1), 189-199.
- Moore, D. R., Atherton, P. J., Rennie, M. J., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2011). Resistance exercise enhances mTOR and MAPK signalling in human muscle over that seen at rest after bolus protein ingestion. *Acta Physiol (Oxf)*, 201(3), 365-372.
- Moore, D. R., Robinson, M. J., Fry, J. L., Tang, J. E., Glover, E. I., Wilkinson, S. B., et al. (2009). Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *Am J Clin Nutr*, 89(1), 161-168.
- Niess, A. M., & Simon, P. (2007). Response and adaptation of skeletal muscle to exercise--the role of reactive oxygen species. *Front Biosci*, 12, 4826-4838.

- Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., et al. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), 14238-14243.
- Nosaka, K., Sacco, P., & Mawatari, K. (2006). Effects of amino acid supplementation on muscle soreness and damage. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 16(6), 620-635.
- Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., et al. (2005). Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*, 7(3), 286-294.
- Packer, J. E., Slater, T. F., & Willson, R. L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 278(5706), 737-738.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr*, 53(4 Suppl), 1050S-1055S.
- Palfrey, H. C., Nairn, A. C., Muldoon, L. L., & Villereal, M. L. (1987). Rapid activation of calmodulin-dependent protein kinase III in mitogen-stimulated human fibroblasts. Correlation with intracellular Ca²⁺ transients. *J Biol Chem*, 262(20), 9785-9792.
- Pattwell, D. M., McArdle, A., Morgan, J. E., Patridge, T. A., & Jackson, M. J. (2004). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 37(7), 1064-1072.
- Paulsen, G. (2009). *Exercise-induced muscle damage in humans: Heat shock proteins and inflammation in recovery, regeneration and adaptation*. Norwegian School of Sport Sciences, Oslo.
- Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., et al. (2004). S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol*, 24(8), 3112-3124.
- Peterson, R. T., & Schreiber, S. L. (1998). Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr Biol*, 8(7), R248-250.
- Phillips, S. M. (2000). Short-term training: when do repeated bouts of resistance exercise become training? *Can J Appl Physiol*, 25(3), 185-193.
- Potter, C. J., Pedraza, L. G., & Xu, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol*, 4(9), 658-665.
- Powers, S. K., Duarte, J., Kavazis, A. N., & Talbert, E. E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol*, 95(1), 1-9.
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4), 1243-1276.
- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & DeRuisseau, K. C. (2005). Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(2), R337-344.

- Powers, S. K., Kavazis, A. N., & McClung, J. M. (2007). Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol*, 102(6), 2389-2397.
- Raastad, T., Paulsen, G., Refsnes, P. E., Rønnestad, B. R., & Wisnes, A. R. (2010). *Styrketrening - i teori og praksis* (Vol. 1). Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS.
- Radak, Z., Chung, H. Y., Koltai, E., Taylor, A. W., & Goto, S. (2008). Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 7(1), 34-42.
- Redpath, N. T., Price, N. T., Severinov, K. V., & Proud, C. G. (1993). Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *Eur J Biochem*, 213(2), 689-699.
- Reid, M. B., Haack, K. E., Franchek, K. M., Valberg, P. A., Kobzik, L., & West, M. S. (1992). Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol*, 73(5), 1797-1804.
- Reid, M. B., Stokic, D. S., Koch, S. M., Khawli, F. A., & Leis, A. A. (1994). N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest*, 94(6), 2468-2474.
- Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I. C., Lund, P., Kristensen, N. B., et al. (2011). Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 300(1), E231-242.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., et al. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8665-8670.
- Rosner, M., Freilinger, A., & Hengstschlager, M. (2007). Akt regulates nuclear/cytoplasmic localization of tuberlin. *Oncogene*, 26(4), 521-531.
- Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., et al. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem*, 282(19), 14056-14064.
- Ruvinsky, I., & Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 31(6), 342-348.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., et al. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 19(18), 2199-2211.
- Sachdev, S., & Davies, K. J. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*, 44(2), 215-223.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., et al. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 320(5882), 1496-1501.
- Sandiford, S. D., Green, H. J., Duhamel, T. A., Schertzer, J. D., Perco, J. D., & Ouyang, J. (2005). Muscle Na-K-pump and fatigue responses to progressive exercise in normoxia and hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(2), R441-R449.

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., et al. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, *117*(3), 399-412.

Shafat, A., Butler, P., Jensen, R. L., & Donnelly, A. E. (2004). Effects of dietary supplementation with vitamins C and E on muscle function during and after eccentric contractions in humans. *Eur J Appl Physiol*, *93*(1-2), 196-202.

Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura, N., et al. (2006). Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *J Nutr*, *136*(2), 529S-532S.

Shindoh, C., DiMarco, A., Thomas, A., Manubay, P., & Supinski, G. (1990). Effect of N-acetylcysteine on diaphragm fatigue. *J Appl Physiol*, *68*(5), 2107-2113.

Spangenburg, E. E. (2009). Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Appl Physiol Nutr Metab*, *34*(3), 328-335.

Spangenburg, E. E., Le Roith, D., Ward, C. W., & Bodine, S. C. (2008). A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol*, *586*(1), 283-291.

St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J., & Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, *277*(47), 44784-44790.

Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D. L., Ferrando, A. A., & Paddon-Jones, D. (2009). Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. *J Appl Physiol*, *107*(1), 34-38.

Teleman, A. A., Hietakangas, V., Sayadian, A. C., & Cohen, S. M. (2008). Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metab*, *7*(1), 21-32.

Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., et al. (2008). Resistance exercise-induced increase in muscle mass correlates with p70S6 kinase phosphorylation in human subjects. *Eur J Appl Physiol*, *102*(2), 145-152.

Terzis, G., Spengos, K., Mascher, H., Georgiadis, G., Manta, P., & Blomstrand, E. (2010). The degree of p70 S6k and S6 phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the training volume. *Eur J Appl Physiol*, *110*(4), 835-843.

Tiidus, P. M., Pushkarenko, J., & Houston, M. E. (1996). Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am J Physiol*, *271*(4 Pt 2), R832-836.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, *39*(1), 44-84.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, *160*(1), 1-40.

Volarevic, S., Stewart, M. J., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., et al. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science*, 288(5473), 2045-2047.

Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R., & Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J*, 20(16), 4370-4379.

Warren, G. L., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*, 27(1), 43-59.

Welsh, G. I., Miller, C. M., Loughlin, A. J., Price, N. T., & Proud, C. G. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett*, 421(2), 125-130.

Wernbom, M., Augustsson, J., & Thomee, R. (2007). The influence of frequency, intensity, volume and mode of strength training on whole muscle cross-sectional area in humans. *Sports Med*, 37(3), 225-264.

Xia, R., Webb, J. A., Gnall, L. L., Cutler, K., & Abramson, J. J. (2003). Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(1), C215-221.

Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., Nielsen, A. R., Mounier, R., Mortensen, O. H., et al. (2009). Antioxidant Supplementation Does Not Alter Endurance Training Adaptation. *Med Sci Sports Exerc*.

You, J. S., Park, M. N., & Lee, Y. S. (2010). Dietary fish oil inhibits the early stage of recovery of atrophied soleus muscle in rats via Akt-p70s6k signaling and PGF2alpha. *J Nutr Biochem*, 21(10), 929-934.

You, J. S., Park, M. N., Song, W., & Lee, Y. S. (2010). Dietary fish oil alleviates soleus atrophy during immobilization in association with Akt signaling to p70s6k and E3 ubiquitin ligases in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 35(3), 310-318.

8. Vedlegg 1

Treningsprogram del 1

Uke 1-5

ØKT 1			ØKT 2		
Motstand: 9-11RM			Motstand: 9-11RM		
Pause: 1 min			Pause: 1 min		
Øvelser økt 1	Serier	Kommentar	Øvelser økt 2	Serier	Kommentar
Benkpress	3		Knebøy	3	
Flyes med hantler (decline)/cabel-kryss	3		Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 15RM)
Skulderpress m/hantler stående	3		Kneekstensjon	2+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Triceps, pushdown	2+1+1	Begge armer + én og én arm	Strake markløft	3	ca 12RM
Sittende roing, smalt grep	3		Tåhev	3	
Nedtrekk foran nakken, bredt grep	3		Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				

Uke 1-5

ØKT 3			ØKT 4		
Motstand: 9-11RM			Motstand: 9-11RM		
Pause: 1 min			Pause: 1 min		
Øvelser økt 3	Serier	Kommentar	Øvelser økt 4	Serier	Kommentar
Skråbenk (ca 45 grader)	3		Markløft	3	ca 12RM
Pullover	3	ca 12RM	Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 15RM)
Sidehev	3		Beinpress	3	
Nedtrekk, smalt grep	3		Hamstrings curl	2+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Stående, foroverbøy roing, overtak	3		Tåhev	3	
Biceps, Scott curl	2+1+1	Begge armer + én og én arm	Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				

Treningsprogram del 2

Uke 6-8

ØKT 1			ØKT 2		
Motstand: 6-8RM			Motstand: 6-8RM		
Pause: 1.5 min			Pause: 1.5 min		
Øvelser økt 1	Serier	Kommentar	Øvelser økt 2	Serier	Kommentar
Benkpress	3		Knebøy	3	
Flyes med hantler (decline)/cabel-kryss	3		Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 10RM)
Skulderpress m/hantler stående	3		Kneekstensjon	3+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Triceps, pushdown	3+1+1	Begge armer + én og én arm	Strake markløft	4	ca 10RM
Nedtrekk foran nakken, bredt grep	4		Tåhev	3	
Sittende roing, smalt grep	4		Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				

Uke 6-8

ØKT 3			ØKT 4		
Motstand: 6-8RM			Motstand: 6-8RM		
Pause: 1.5 min			Pause: 1.5 min		
Øvelser økt 3	Serier	Kommentar	Øvelser økt 4	Serier	Kommentar
Skråbenk (ca 45 grader)	3		Markløft	3	ca 10RM
Pullover	4	ca 10RM	Utfall	3 (6)	Ett og ett ben (ca 10RM)
Sidehev	3		Beinpress	4	
Nedtrekk, smalt grep	3		Hamstrings curl	3+1+1	Begge ben + ett og ett ben
Stående, foroverbøy roing, overtak	4		Tåhev	3	
Biceps, Scott curl	3+1+1	Begge armer + én og én arm	Valgfri bukøvelse	3	
Bukøvelse ("rulla"/redcord)	3				

9. Vedlegg 2

Western blot: protokoll

Hva	Hvordan	Tips
Forberedelse til elektroforese		
Tin prøvene på is		
Totalprotein	Fra tidligere målinger, målt samme dag eller dagen før	
Beregn og skriv ut proteinloading	Proteinkonsentrasjonen føres inn i "sample preparation mal" og volumene beregnes. Load 15 µg protein og 25 µL prøve i hver brønn.	Hvis proteinmengden er liten, må det et større volum til for å komme opp på 15 µg.
Lag pippeteringsskjema	Prøver som skal sammenlignes må på samme gel	
Merk rør		
Sjekk evt. lag buffere	<p><u>Mes SDS Running buffer</u> 200 mL til indre kammer: 10 mL running buffer + 190 mL vann + 500 µL antioxidant (antioxidant tilsettes rett før bruk). Sett i kjøleskap</p> <p><u>Transfer buffer</u> 50 mL transfer buffer + 100 mL metanol + 849 mL vann + 1 mL antioxidant (antioxidant tilsettes rett før bruk) Sett i kjøleskap</p>	Merk godt Hva Dato Hvem sin
Sett på varmeblokk		Sjekk temp!
Prøvefortynning		
Fortynn prøvene	Tilsett prøve, vann, sample buffer og reducing agent i hht Sample Preparation malen	
Inkuber prøvene	10 min ved 70 °C på varmeblokk	Husk å slå av varmeblokka etter bruk!
Rist og spinn prøvene		
Mens prøvene inkuberes		
Finn	<p>4 geler (NuPage bis-tris 4-12 %) Running buffer 200 + 500 mL Antioxidant Bench Mark Ladder (1 aliquot a 5 µL per gel) Magic marker: 2,5 µL (ved etablering) Pipetter: 5 µL, 30 µL og 500 µL</p>	Gjør dette mens prøvene står til varming.

Gel montering og applisering		
Monter geler	Klipp av plast og tørk av gelen	
	Ta av tapen og fjern kammen ved å skyve oppover	Pass på at kammen skyves jevnt oppover slik at brønnene ikke ødelegges.
	Sett gelene i holderen med teksten ut	
	Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen	
Fyll running buffer i <u>indre kammer</u>	Tilsett 500 µL antioxidant i 200 mL Running buffer og fyll indre kammer	Sjekk at det ikke lekker buffer ut i ytre kammer
	Skyll brønnen	Trekk opp og ned over hver brønn med en pipette
Appliser prøvene	Husk bench mark (og magic).	Unngå bobler. Kryss av i pipetteringsskema for hver prøve!
Fyll Running buffer i <u>ytre kammer</u>	Tilsett ca 500 mL Running buffer (uten antioxidant) 2/3 opp i ytre kammer	
Start elektroforese	Sett på lokket, monter ledningene, slå på og still inn volt. Start og ta tida: 200 V og 35 min	Pass på at elektrodene sitter i sporene slik de skal. Sjekk at strømmen "lager" bobler i indre buffer-kammer.
Mens elektroforesen kjører		
Klipp til 8 filterpapir	Bruk mal	
Klipp til 4 PVDF-membraner	Bruk mal. Merk med Bic-penn.	Merk med forsøksperson og membran nr.
Aktiver PVDF-membranene	30 s metanol 30 s H ₂ O 1-2 min i nytt H ₂ O 10-15 min i transfer buffer	Bruk et filterpapir for å hindre at membranene flyter opp
Gjør klar 10 pads	15 min i transfer buffer	Klem ut vannet først. Klem ut luftbobler, mens padsene ligger i transfer buffer
Filterpapir	30 s i transfer buffer	Like før pakking
Blotting		
Etter elektroforese	Slå av, trekk ut ledningene, ta ut en gel av gangen	
Løsne gel	Tørk av gelen	
	Løsne platen med kniv på alle kanter	
	Dra den øvre platen oppover mot brønnen	Brønnene må ikke falle inn på gelen

	Kutt av brønnene	
Gjør gelen klar fro pakking	Legg vått filterpapir på gelen og snu slik at filterpapiret er ned i hånda	Fjern luftbobler mellom filter og gel
	Sett kniven i sporet og løsne den fra plata	Gelen løsner fra platen
	Trekk platen forsiktig oppover slik at gelen ligger på filterpapiret i hånda og skjær vekk kanten	Jobb raskt så gelen ikke tørker
Pakke geler og membran	2 pads Filterpapir Gel 1 Membran 1 Filterpapir Pad Filterpapir Gel 2 Membran 2 Filterpapir 2 pads	Jobb i boks for å unngå søl. Pass på at riktig gel og membran ligger sammen i riktig rekkefølge. Sørg for god kontakt og fjern alle luftbobler.
	Vask elektroforesekammeret i dH ₂ O	
Monter	Sett på lokket og sett blottmodulen i kammeret, trykk godt ned og lukk klemmen	Pass på at blottmodulen blir tett, at elektrodene går inn i sporet og at blottmodulen sitter ordentlig.
	Fyll indre kammer med transferbuffer til kant på pad/membran/gel	Ikke overfyll. Pass på at det ikke lekker
	Fyll ytre kammer 2/3 med dH ₂ O	
	Sett på lokket, monter ledningene, slå på og still inn volt - 30 V. Start og ta tida - 90 min ved geltykkelse 1.0mm.	Pass på at elektrodene sitter i sporene slik de skal. Sjekk strømstyrken(A) ved start og etter 90 min., skal være likt fra gang til gang-avh. av antall geler. Temp. kan også sjekkes, skal ikke bli varmt.
Etter blotting		
Lag blokkeringsløsning	5 % skummet melk (melkepulver + TBS-T)	Mengde tilpasses antall membraner og kuttinger Gjør dette mens blottet går
Etter blotting	Slå av, trekk ut ledningene, ta ut blottmodulen	
	Åpne blottmodulen	
	Legg padsene i H ₂ O	NB! Ikke kontakt med deconex!
	Kast filtrene	
Farg gelene	Legg gelene i Coomassie Blue	10 min på Gyrorocker (65) i RT
Se på gelene på lyskasse	Gelene skal være blanke. Ingen proteinbånd.	Gelene kan evt. fotograferes med synlig lys.

		Gelene kastes i gul bøtte
Ponceau S farging (bare ved etablering av metode)		
Farg membranene	Legg membranene i Ponceau S 10 min på Gyrorocker (65) i RT	
Skyll membranene	Skyll i dH ₂ O til vannet er klart	
Ta bilde	Åpne kodak 1D File – new IS2000R capture Velg innstillingen klat comassie Lukketid: 0,05sek	Husk platen over membranen
Blokkering		
Blokker i 5% melk	1t på gyrorocker (10) ved romtemperatur	Husk lokk
Lag 1 % skummetmelk	0,5g skummetmelk + 50ml TBS-T	Gjør dette under blokkeringen
Lag 1Ab løsning	P70: 1:1000 Rps6: 1:000 eEF-2: 1:5000	5ml holder til de små boksene
Vask	Skyll 4x5 i TBS-T	På gyrorocker (65)
Kutting		
Kutting	Legg membranene på plate med proteinsiden opp. Kutt membranen ved passende molekylvekt med en skalpell	Hell på litt TBS-T slik at membranen ikke blir tørr.
Merk membranene	Bruk en myk blyant	Merk med Fp nr og protein
Inkubering med fosfo 1Ab		
Inkubering med 1Ab	Legg i kjøleskap ved svak risting over natt	Husk lokk
Vasking	4x5 i TBS-T	På gyrorocker (65)
Inkubering med fosfo 2Ab		
Lag 1 % skummetmelk	0,5g skummetmelk + 50ml TBS-T	Gjør dette mens du vasker
Lag 2Ab løsning	1µl 2Ab i 30ml 1 % skummetmelk	1:30 000
Vask	Skyll 5x5 i TBS-T	På gyrorocker (65)
Fremkalling		
Lag substratløsning	500ml A + 500ml B i eppendorfrør	Pakk i alu-papir og legg mørkt Gjør dette under vasking
Finn frem	Glassplater Pipette 1000ml	Gjør dette under vasking

Klargjøring av membran	Legg på substrat i lokket og overfør membranen med proteinsiden ned	Jobb raskt så membranen ikke tørker Fjern alle luftbobler
	Inkuber i 3 min	Under lokk til høyre i Kodak
Ta bilde	Åpne Kodak 1D	
	File – new IS2000R capture	
	Velg luminescense Sett tid og binning: P70 og eEF-2 trenger ca 5 min Rps6 trenger ca 20 min	Økt tiden og x-binning om du ikke får gode bilder
	Trykk preview	
	Legg membranene med proteinsiden ned	Hvis du forventer samme intensitet på båndene kan flere membraner legges på sammen
	Rull over med en glasspipette	Fjern bobler
	Trykk done	
	Trykk expose	
	Lagre	Ta ut membranene så raskt som mulig og legg i TBS i kjøleskap.
Gode blider?		
Ja! Fortsett til stripping		Nei?! Pust dypt 5 ganger og gå tilbake til start
Stripping		
Stripp membranene	Legg membranene 10 min i strippingbuffer	
Vask	5x1 min i ultrarent vann	
	4x5 min i TBS-T	
Gå tilbake til blokkering og følg prosedyren, men denne gangen uten kutting og med Ab for totalproteiner.		

