

Sigve Nyvik Aas

Effekten av ulike melkeproteinprodukter på hypertrofisignalering etter en styrketreningsøkt

Masteroppgave i idrettsvitenskap
Seksjon for fysisk prestasjonsevne
Norges idrettshøgskole, 2014

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet på resultater fra Myse-prosjektet, en studie gjennomført på seksjon for fysisk prestasjonsevne ved Norges idrettshøgskole høsten 2013.

Det har vært en erfaringsrik prosess, og det har vært spennende å få et innblikk i alle steg ved gjennomføringen av et forskningsprosjekt av denne størrelsen. Jeg har fått tatt del i hele prosessen; planlegging, rekruttering av forsøkspersoner, gjennomføring av testing og analyser av muskelprøver, og læringsutbyttet har følgelig vært stort. Mange har vært involvert i prosjektet, og det er derfor mange som fortjener en takk.

Takk til Truls for god veiledning, og en grundig gjennomgang av ethvert utkast. Takk til Håvard for tett samarbeid, faglige diskusjoner og demonstrasjon av de mange bruksområdene til flytende nitrogen. Takk til Ingrid og Hege for tips og triks på laben.

Takk til de andre masterstudentene ved seksjonen, som har sørget for at det har vært greit å tilbringe kvelder og helger på NIH. Takk til Anne Lene som har introdusert meg for 80-tallsmusikk på laben, og til Torstein som bidratt med diverse gjettekonkurranser (en gummihanske i str. medium rommer 3,74 liter vann).

Takk til alle forsøkspersoner for upåklagelig innsats og positiv innstilling, til tross for en tøff testprotokoll. En ekstra takk til Live og Markus, som tok seg tid til å stille som forsøkspersoner til tross for en hektisk masterhverdag.

Takk til mamma, pappa, søster og bror for at dere viste forståelse da påskeferien min ble tilbragt i Oslo. En spesiell takk til Dag Hildor, for muskelbiter og korrekturlesing. Du har ikke lest forordet, så skrivefeil her tas på min kappe.

Takk til Trude, som ved å reise hele høsten ga meg et påskudd til å samle krefter i Sørøst-Asia før oppstart av testing. Og takk for at du alltid er så støttende, selv om jeg ikke vet hva jeg skal bli når jeg blir stor.

Oslo - mai 2014

Sigve Nyvik Aas

Sammendrag

Innledning: Melkeprotein ser ut til å ha en større anabol effekt på muskelvev enn soyaprotein, og det ser også ut til å være forskjeller mellom melkeproteinfraksjonene myse og kasein; med en raskere anabol effekt etter inntak av myse. Det er imidlertid usikkert hvorvidt fremstillingsprosessen påvirker myseproteinets evne til å stimulere muskelproteinsyntesen. Hensikten med denne studien var derfor å undersøke hvorvidt myse fremstilt via en filtrasjonsteknikk (nativ myse) resulterte i større aktivering av signaleringsproteiner til økt proteinsyntese, enn det vanligste myseproduktet; WPC-80.

Metode: 22 yngre (19-36 år) og 15 eldre (70-84 år) kvinner og menn gjennomførte en styrketreningsøkt med beinpress og kneekstensjon, etterfulgt av proteininntak. Omtrent halvparten av forsøkspersonene gjennomførte protokollen to ganger; én gang med inntak av nativ myse og én gang med WPC-80 (n=17). De øvrige gjennomførte protokollen én gang, da med inntak av lettmelk (n=20). Muskelbiopsi fra *m. vastus lateralis* ble tatt én time før, samt én, tre og fem timer etter endt treningsøkt. Prøvene ble analysert for fosforylert og totalt nivå av p70S6K, eEF2 og p38 MAPK med western blot. Plasmaprøver ble analysert for konsentrasjon av leucin.

Resultater: Både for yngre og eldre resulterte inntak av nativ myse i en høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80, som igjen resulterte i en høyere leucinkonsentrasjon enn lettmelk. Det var en signifikant økning i fosforylering av p70S6K på alle tidspunkt etter økten, uansett alder og supplement. Hos de yngre var det en tendens til høyere aktivering etter inntak av nativ myse, sammenlignet med lettmelk (P=0,054). Denne forskjellen var signifikant dersom sammenligninger ble gjort uavhengig av alder. Det var ingen endring i eEF2-aktivering verken hos yngre eller eldre, uansett drikk. p38 MAPK var aktivert i tilsvarende grad i de tre gruppene hos de yngre, mens det var lavere aktivering i lettmelkgruppen hos de eldre.

Diskusjon: Forskjellene i leucinkonsentrasjon i plasma etter inntak av de ulike drikkene antas å skyldes ulikt leucininnhold i drikkene og forskjeller i fordøyelseshastighet. Forskjellen mellom nativ myse og lettmelk i p70S6K-aktivering kan derfor være relatert til forskjellig leucinkonsentrasjonen i plasma. Den fraværende effekten på eEF2 kan være relatert til forsøkspersonenes trenings- og næringsstatus. De minimale forskjellene i signalering mellom yngre og eldre antas å skyldes kombinasjonen av kraftige treningsstimuli og et høyt inntak av protein.

Konklusjon: Inntak av nativ myse ser ut til å resultere i høyere p70S6K-fosforylering, sammenlignet med inntak av lettmelk i etterkant av en styrketreningsøkt. Det ser ut til å være minimale forskjeller mellom yngre og eldre, samt kvinner og menn i aktivering av p70S6K, eEF2 og p38 MAPK.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG	4
INNHold	5
1.0 INNLEDNING	7
2.0 TEORI.....	9
2.1 SKJELETTMUSKULATURENS PROTEINBALANSE	9
2.1.1 Muskelproteinsyntese.....	9
2.1.2 Muskelproteinnedbrytning	10
2.1.3 Netto proteinbalanse.....	10
2.2 ULIK EFFEKT AV ULIKE PROTEINER	12
2.2.1 Melke- og soyaprotein	12
2.2.2 Myse og kasein.....	13
2.2.3 Ulike myseprodukter.....	14
2.2.4 Hva skiller de ulike proteinfraksjonene?	14
2.3 HYPERTROFISIGNALERING	16
2.3.1 p70S6K.....	16
2.3.2 eEF2.....	18
2.3.3 p38 MAPK.....	20
2.4 ØKENDE ALDER; REDUSERT ANABOL RESPONS?	23
2.4.1 Anabol resistens – potensielle mekanismer.....	26
2.5 MANN ELLER KVINNE; BESTEMMENDE FOR DEN ANABOLE RESPONSEN?	28
2.6 OPPSUMMERING.....	29
3.0 METODE	30
3.1 REKRUTTERING OG INKLUSJON.....	30
3.2 INNDELING I GRUPPER.....	31
3.3 FORSØKSPROTOKOLL.....	32
3.3.1 Treningsprotokoll.....	32
3.3.2 Tilvenning til treningsprotokollen	32
3.3.3 Ernæring.....	33
3.3.4 Muskelbiopsier	34
3.3.5 Styrke i knestrekkerne.....	35
3.3.6 Blodprøver	36

3.4 ANALYSER	36
3.4.1 Homogenisering	36
3.4.2 Proteinmåling	37
3.4.3 Western Blot	37
3.5 STATISTIKK	38
4.0 RESULTATER	40
4.1 TRENINGSMOTSTAND	40
4.2 REDUKSJON I MVC ETTER TRENINGSØKTEN	40
4.3 LEUCINKONSENTRASJON I PLASMA	41
4.4 INTRACELLULÆR SIGNALERING	43
4.4.1 p70S6K	43
4.4.2 eEF2	45
4.4.3 p38γ (gamma)	46
4.4.4 p38α (alpha)	47
5.0 DISKUSJON	49
5.1 LEUCINKONSENTRASJON I PLASMA	49
5.2 INTRACELLULÆR SIGNALERING	52
5.2.1 p70S6K	52
5.2.2 eEF2	54
5.2.3 p38 MAPK	56
5.3 YNGRE OG ELDRE	58
5.4 KVINNER OG MENN	60
5.5 HYPERTROFISIGNALERING, MUSKELPROTEINSYNTESE OG MUSKELVEKST	61
6.0 KONKLUSJON	63
REFERANSER	64
TABELLOVERSIKT	76
FIGUROVERSIKT	77
FORKORTELSER	79
VEDLEGG 1	80
VEDLEGG 2	81
VEDLEGG 3	87
VEDLEGG 4	92

1.0 Innledning

Skjelettmuskulaturen utgjør en betydelig del av kroppsvekten, og innehar en sentral rolle med tanke på å forhindre utvikling av fedme, hjerte- og karsykdom, samt type 2 diabetes (Wolfe, 2006b). Med økende alder ser man et gradvis tap av muskelmasse og muskelfunksjon, og dette vil øke risikoen for fall, skade og sykdom (Bouillanne et al, 2012). Strategier som har til hensikt å øke eller vedlikeholde muskelmassen, vil derfor kunne motvirke aldersrelatert muskelsvinn og redusere risikoen for mange metabolske sykdommer blant befolkningen i sin helhet. Også for idrettsutøvere spiller skjelettmuskulaturen en vital rolle, og det er følgelig enkelt å argumentere for at de fleste kan dra nytte av forskning med det formål å kartlegge effekten av styrketrening og proteininntak, alene eller i kombinasjon.

En rekke metoder benyttes for å studere muskulær adaptasjon til styrketrening og proteininntak. Ultralyd, MR (magnetresonanstomografi) og DXA (dual-energy X-ray absorptiometry) brukes ofte for å kartlegge muskelvekst som følge av treningsintervensjoner, mens akutte endringer i forbindelse med én enkelt styrkeøkt og påfølgende proteininntak ofte undersøkes ved hjelp av mer invasive metoder. Ved å ta muskelbiopsier vil man kunne si noe om hva som skjer inne i muskulaturen som respons på ulike anabole stimuli, og immunohistokjemi og western blot er to hyppig benyttede analysemetoder. Disse analysemetodene vil blant annet kunne si noe om lokalisering, forekomst og aktiveringsgrad av ulike proteiner. Muskelbiopsier i kombinasjon med infusjon av merkede aminosyrer gir også mulighet for å undersøke hvorvidt det foregår en akkumulering eller reduksjon av muskelvev innenfor et bestemt tidsrom, og er følgelig en metode som gir oss mye informasjon om den akutte responsen til trening og proteininntak.

Det er en del metodiske fellestrekk mellom akuttstudiene som er gjennomført. Mange av disse gjennomføres blant annet i svært kontrollerte og til dels kunstige omgivelser, og flere benytter eksempelvis forsøkspersoner som har fastet de siste 10-15 timene. Dette vil skape en unaturlig situasjon, og funnene i disse studiene kan derfor ikke direkte overføres til å gjelde i en mer naturlig setting. Mange benytter også utrente forsøkspersoner, og resultatene fra disse studiene vil ikke nødvendigvis gjenspeile det som skjer etter hver økt ved trening over tid. Mye av forskningen som er gjennomført på området, har også utelukkende benyttet menn som forsøkspersoner. Selv om det ikke ser ut til å være store kjønns spesifikke forskjeller i anabol respons etter en styrketreningsøkt og proteininntak (West et al., 2012), kan ikke resultatene

fra disse studiene direkte overføres til å gjelde også for kvinner. For å kunne si noe om en større del av befolkningen, har vi valgt å inkludere både yngre og eldre, samt kvinner og menn i vår studie. Våre forsøkspersoner hadde også erfaring med styrketrening, og inntok i tillegg en standardisert frokost da de møtte på hovedtestdagen. Alle disse valgene ble tatt i et forsøk på å i størst mulig grad ivareta den eksterne validiteten.

Effekten av ulike proteinprodukter, ulik mengde protein og timing av proteininntak i relasjon til styrketrening, er bare tre av de mange faktorene som ser ut til å være bestemmende for den anabole responsen. Det er også godt dokumentert at ulike grupper har forskjellig proteinbehov, og behovet vil blant annet avhenge av alder og hvor mye man trener. Det er følgelig ikke sikkert at det proteinproduktet som er best egnet for yngre, også er best egnet for eldre. Myseprotein trekkes av mange frem som en proteinfraksjon som resulterer i en hurtig og robust anabol respons, men det er viet lite oppmerksomhet til hvorvidt fremstillingsprosessen påvirker myseproteinets evne til å stimulere muskelproteinsyntesen. Hensikten med denne studien var derfor å sammenligne hvorvidt myse fremstilt via en filtrasjonsteknikk resulterte i større aktivering av signaleringsproteiner til økt proteinsyntese, sammenlignet med det myseproduktet som oftest benyttes; WPC-80.

Studien har følgende problemstilling:

Hvilken effekt har inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmelk etter en styrketreningsøkt på konsentrasjon av leucin i plasma og hypertrofisignalering?

Studien har følgende hypoteser:

Nativ myse og WPC-80 vil:

- *Resultere i høyere konsentrasjon av leucin i plasma enn lettmelk.*
- *Aktivere signalering til økt proteinsyntese i større grad enn lettmelk.*

Nativ myse vil:

- *Resultere i høyere konsentrasjon av leucin i plasma enn WPC-80.*
- *Aktivere signalering til økt proteinsyntese i større grad enn WPC-80.*

2.0 Teori

2.1 Skjelettmuskulaturens proteinbalanse

I løpet av en dag vil det være store svingninger i skjelettmuskulaturens proteinbalanse, med positiv proteinbalanse i etterkant av et måltid, og negativ proteinbalanse når det har gått noen timer siden forrige matinntak (Burd, Tang, Moore, & Phillips, 2009). Proteinbalansen vil også påvirkes av ulike treningsstimuli (Phillips, 2009), og det er netto proteinbalanse over tid som vil være bestemmende for om muskulaturen gjennomgår hypertrofi (blir større), atrofi (blir mindre) eller opprettholder en stabil masse. Proteinbalansen bestemmes av størrelsen på muskelproteinsyntesen (MPS) og muskelproteinnedbrytningen (MPN). Mens MPS har blitt målt i en rekke studier, er situasjonen en annen for MPN. Dette skyldes primært at det er forholdsvis enkelt å måle syntesehastighet ved hjelp av stabile isotoper, mens tilgjengelige metoder for å måle nedbrytningen baserer seg på mer kompliserte og indirekte tilnæringer (Attaix, Baracos, & Pichard, 2012). Som en følge av dette, er det en del uenighet om nedbrytningens bidrag til endringer i netto proteinbalanse. I de neste to underkapitlene vil muskelproteinsyntesen og muskelproteinnedbrytningen omhandles hver for seg, og studier som har undersøkt disse variablene i sammenheng med trening og næringsinntak vil trekkes frem. Avslutningsvis vil MPS og MPN sitt bidrag til netto proteinbalanse diskuteres.

2.1.1 Muskelproteinsyntese

Skjelettmuskulaturens proteinsyntese vil øke i etterkant av proteininntak (Atherton et al., 2010; Churchward-Venne, Burd, Mitchell, et al., 2012). Styrketrening vil også kunne øke muskelproteinsyntesen, selv i fravær av påfølgende inntak av protein (Burd, West, et al., 2010), og det ser ut til at MPS-responsen varierer, avhengig av styrketreningens volum og intensitet (Burd, West, et al., 2010; Holm et al., 2010). Dersom styrketrening kombineres med inntak av hele proteiner eller aminosyrer, vil dette stimulere muskelproteinsyntesen i større grad enn styrketrening eller proteininntak alene (Burke et al., 2012; Dideriksen et al., 2011; Pennings, Koopman et al., 2011). Muskelproteinsyntesen ser ut til å være forholdsvis lik hos trente og utrente i hvile (Phillips, Tipton, Ferrando, & Wolfe, 1999), men treningsstatus ser ut til å være bestemmende for proteinsynteseresponsen til en styrketreningsøkt med påfølgende proteininntak (Tang, Perco, Moore, Wilkinson, & Phillips, 2008). Selv om trente ser ut til å ha en større MPS-respons de første timene etter trening og inntak av protein, ser det ut til at utrente samlet sett har en større anabol respons, grunnet en mer vedvarende økning i proteinsyntesen (Tang et al., 2008).

Hos yngre ser muskelproteinsyntesen ut til å stimuleres maksimalt ved inntak av omtrent 20 gram protein (Symons, Sheffield-Moore, Wolfe, & Paddon-Jones, 2009; Witard et al., 2014). Inntak opp mot 40 gram ser ikke ut til å stimulere proteinsyntesen ytterligere, og resulterer i stedet i økt oksidering av aminosyrer og økt ureaproduksjon (Witard et al., 2014; Yang, Breen, et al., 2012). For eldre kan det derimot se ut til at det er behov for et proteininntak opp mot 30 gram (~15 gram essensielle aminosyrer) for å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt (Pennings et al., 2012).

2.1.2 Muskelproteinnedbrytning

Det er gjort færre studier på muskelproteinnedbrytning, sammenlignet med muskelproteinsyntese, men tilgjengelige data gir likevel sterke holdepunkter for at også MPN påvirkes av trening og inntak av næring. Under gjennomføringen av en styrketreningsøkt ser muskelproteinnedbrytningen ut til å være forholdsvis konstant (Durham et al., 2004). I fravær av næringsinntak vil proteinnedbrytningen oppreguleres i timene etter en styrketreningsøkt (Biolo, Maggi, Williams, Tipton, & Wolfe, 1995; Phillips, Tipton, Aarsland, Wolf, & Wolfe, 1997; Phillips et al., 1999), og kanskje i større grad hos utrente enn trente (Phillips et al., 1999). Dersom styrketreningsøkten etterfølges av protein- og karbohydratinntak ser situasjonen ut til å være en annen, og flere studier viser da til ingen endring i MPN (Louis et al., 2003; Tipton, Ferrando, Phillips, Doyle, & Wolfe, 1999; Tipton et al., 2001).

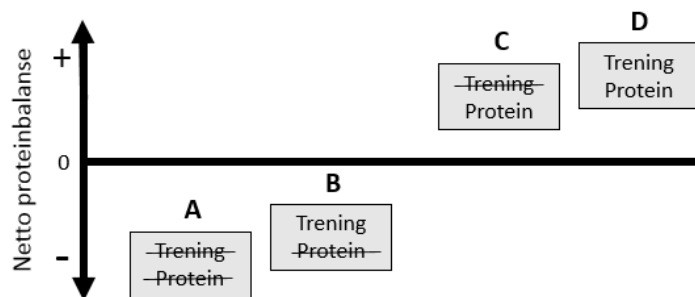
Som nevnt, ser det ut til at muskelproteinsyntesen stimuleres tilnærmet maksimalt ved et inntak på 20 gram protein (Witard et al., 2014), i alle fall hos yngre. Når det gjelder proteinnedbrytningen, ser det ikke ut til å gå en øvre grense ved inntak av denne mengden protein. Høyere inntak av protein og karbohydrat vil resultere i en større insulinrespons, som muligens vil bremse nedbrytningen ytterligere (Deutz & Wolfe, 2013; Dideriksen, Reitelseder & Holm, 2013). Insulinets sentrale rolle med tanke på å bremse nedbrytningen understrekes av flere (Borsheim et al., 2004; Chow et al., 2006).

2.1.3 Netto proteinbalanse

Det vil alltid være summen av syntesen og nedbrytningen som avgjør om muskelen er i netto positiv eller netto negativ proteinbalanse. Etter matinntak er endringer i MPS 3-5 ganger større enn endringer i MPN, og dette forteller oss at det primært er endringene i MPS som

påvirker svingningene i netto proteinbalanse (Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012). Men selv om endringer i MPS ser ut til å overgå endringer i MPN, er det viktig å erkjenne at man ikke kan trekke konklusjoner om endringer i netto proteinbalanse uten å måle begge de bestemte variablene.

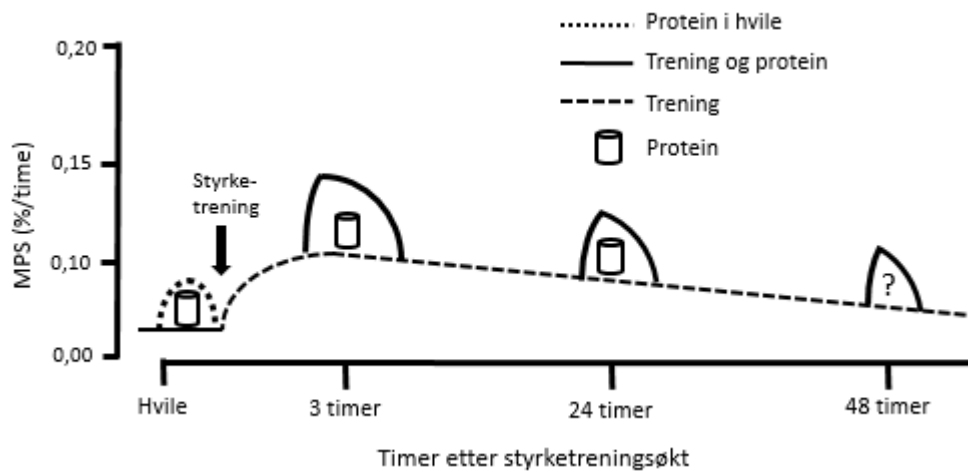
Kort oppsummert vil netto proteinbalanse være negativ i en postabsorptiv fase, ved at nedbrytningen overgår syntesen. Treningsstimuli vil forbedre proteinbalansen ved å øke proteinsyntesen, men uten inntak av protein og/eller karbohydrat vil netto proteinbalanse fortsatt være negativ (Biolo et al., 1995; Borsheim et al., 2004). Næringsinntak i fravær av treningsstimuli vil både øke syntesen og redusere nedbrytningen, slik at netto proteinbalanse blir positiv (Atherton et al., 2010; Wolfe, 2006a). Dersom man gjennomfører en styrkeøkt i forkant av proteininntak, vil proteinsyntesen stimuleres ytterligere (Burd et al., 2011), og kombinasjonen av styrketrening og protein ser også ut til å forhindre en økning i proteinnedbrytningen (Louis et al., 2003; Tipton et al., 1999; Tipton et al., 2001). Med andre ord vil kombinasjonen av styrketrening og matinntak resultere i en større anabol respons enn matinntak alene. Figur 2.1 gir en forenklet oversikt over hvordan muskelproteinbalansen ser ut til å variere i ulike situasjoner.



Figur 2.1: Netto proteinbalanse i postabsorptiv fase i fravær av treningsstimuli (A), etter styrketrening i postabsorptiv fase uten påfølgende inntak av protein (B), etter inntak av protein i fravær av treningsstimuli (C) og etter styrketrening med påfølgende inntak av protein (D).

Et viktig aspekt som så langt ikke har blitt diskutert er i hvilken grad ulike anabole stimuli ser ut til å vedvare over timer og døgn. Proteininntak i fravær av treningsstimuli resulterer i en stimulering av MPS som tilsynelatende avtar innen 5 timer, hvilket ikke er tilfellet dersom styrketrening gjennomføres i forkant av proteininntaket (Moore et al., 2009). Faktisk ser det ut til at den anabole effekten av en styrketreningsøkt vedvarer minst 48 timer etter endt treningsøkt (Miller et al., 2005; Phillips et al., 1997), i alle fall hos utrente. Hos trente kan det se ut til at den anabole effekten avtar noe raskere (Tang et al., 2008). Et sentralt poeng i denne

sammenhengen er at et proteininntak innenfor dette tidsrommet vil ha en adderende effekt til den allerede forhøyede treningsinduserte MPS-økningen (Burd et al., 2011), og dette understreker den positive effekten av å kombinere styrketrening og proteininntak (figur 2.2).



Figur 2.2: Effekt av styrketrening og proteininntak på muskelproteinsyntesen. Basert på figuren til Churchward-Venne, Burd, and Phillips (2012).

For å oppsummere, vil *mengden* protein som inntas være avgjørende for den anabole responsen (opp til et visst nivå), og også *når* proteinene inntas i relasjon til trening er av stor betydning. Så langt har ikke effekten av ulike proteiner blitt omhandlet i særlig grad, og dette vil derfor være hovedfokus i neste kapittel.

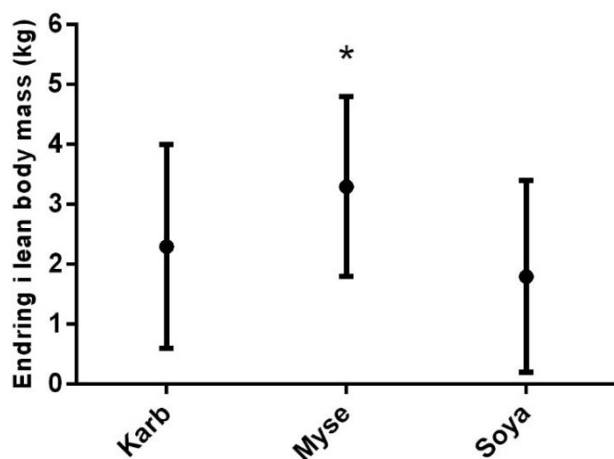
2.2 Ulik effekt av ulike proteiner

Mange studier har sammenlignet den anabole responsen etter inntak av soya, myse og kasein, både akutt og i forbindelse med treningsintervensjoner. I de påfølgende kapitlene vil flere av disse studiene trekkes frem, og avslutningsvis vil faktorer som kan være årsaken til at de ulike proteinfraksjonene stimulerer skjelettmuskulaturens proteinsyntese i ulik grad diskuteres.

2.2.1 Melke- og soyaprotein

Wilkinson et al. (2007) undersøkte muskelproteinsyntesen i etterkant av en styrketreningsøkt, og fant at MPS ble stimulert i større grad etter inntak av melkeprotein sammenlignet med soyaprotein. Hartman et al. (2007) gjennomførte en 12 ukers treningsintervensjon kombinert med inntak av melke- eller soyaprotein, og så at melkeprotein også ga størst muskelvekst. Det er også blitt vist at myse, som utgjør 20 % av melkeproteinene (Phillips, Hartman, & Wilkinson, 2005), stimulerer muskelproteinsyntesen i større grad enn soyaprotein, både i

hvile og i etterkant av en styrketreningsøkt hos eldre (Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009; Yang, Churchward-Venne, et al., 2012). Hos yngre ser det ut til at supplementering med myseprotein også gir en større økning i muskelmasse over 9 måneder med styrketrening, sammenlignet med soyaprotein-supplementering (figur 2.3) (Volek et al., 2013). Kort oppsummert virker melkeprotein å være bedre egnet med tanke på å stimulere skjelettmuskulaturens proteinsyntese sammenlignet med soyaprotein, og dette kommer til uttrykk både i akuttstudier og treningsintervensjoner.



Figur 2.3: Endringer i LBM (lean body mass) etter 9 måneder med styrketrening i kombinasjon med inntak av isokaloriske mengder av karbohydrat, myse- eller soyaprotein. Verdier viser gjennomsnitt \pm standardavvik. * indikerer signifikant forskjell fra karbohydrat og soyaprotein. Figur basert på resultater fra Volek et al. (2013).

2.2.2 Myse og kasein

Melkeprotein består av de to proteinfraksjonene myse og kasein. Myse fordøyes hurtigst av disse to proteinfraksjonene, og resulterer i en rask økning i konsentrasjonen av aminosyrer og insulin i plasma (Burd et al., 2012; Reitelseder et al., 2011; Tang et al., 2009; Tipton et al., 2004). Som en følge av dette stimuleres proteinsyntesen i større grad etter inntak av myse, sammenlignet med kasein de første 2-3 timene etter styrketrening og proteininntak (Reitelseder et al., 2011; Tang et al., 2009). Dersom man inkluderer ytterligere 2-3 timer i proteinsynteseberegningene, ser det ikke ut til å være noen forskjell mellom myse og kasein, i alle fall ikke for yngre personer (Reitelseder et al., 2011; Tipton et al., 2004). For eldre kan det derimot se ut til at den anabole responsen er større etter inntak av myse, sammenlignet med kasein (Burd et al., 2012; Dangin et al., 2003; Pennings, Boirie, et al., 2011), selv om enkelte heller ikke hos eldre finner forskjell i MPS-respons etter inntak av de to proteinfraksjonene (Dideriksen et al., 2011). Kort fortalt resulterer inntak av myseprotein i en kraftig, og raskt forbigående økning i MPS, mens kasein resulterer i en moderat, men mer

langvarig respons. Myse og kasein ser ut til å stimulere proteinsyntesen i tilsvarende grad hos yngre, mens myseprotein muligens resulterer i en større anabol respons enn kasein hos eldre.

2.2.3 Ulike myseprodukter

Myse kan fremstilles på flere måter, og det ser ut til at de ulike myseproduktene fordøyes med ulik hastighet (Laahne, 2013). Som et resultat av dette vil konsentrasjonen av de ulike aminosyrene i blodet avhenge av hvilket myseprotein som er konsumert. Blant annet ser det ut til at inntak av myse fremstilt via en filtrasjonsteknikk, heretter kalt nativ myse, resulterer i større leucinkonsentrasjon i plasma den første timen etter inntak, sammenlignet med det myseproduktet man sitter igjen med etter osteproduksjon; WPC-80¹ (Laahne, 2013).

Forskjellen på disse produktene er blant annet at proteinene i den filtrerte mysen er i sin native form, mens proteinene i WPC-80 er denaturert etter en prosess som inkluderer varme- og syrebehandling. Det kan videre tenkes at forskjellene i aminosyre- og insulinkonsentrasjon etter inntak av de ulike mysefraksjonene vil påvirke MPS og MPN i ulik grad, slik at netto muskelproteinbalanse også vil være forskjellig. Eventuelle forskjeller kan være et resultat av ulik leucinindusert stimulering av MPS og/eller insulinets inhibering av MPN.

2.2.4 Hva skiller de ulike proteinfraksjonene?

Inntak av ulike proteiner ser som nevnt ut til å ha ulik effekt på MPS, og denne forskjellen i respons kan være et resultat både av ulik aminosyresammensetning og forskjeller i fordøyelseshastighet mellom de ulike proteinfraksjonene (Tang et al., 2009). Myseprotein fordøyes hurtigere enn soyaprotein, som igjen fordøyes hurtigere enn kasein (Tang et al., 2009). Myse og kasein inneholder også en større andel av de forgreinede aminosyrene sammenlignet med soyaprotein (Bos et al., 2003), og spesielt er leucin-innholdet høyere. Det er også forskjeller i leucininnhold mellom myse og kasein, med en høyere andel i førstnevnte (Tang et al., 2009).

Siden myse og kasein har ulik fordøyelseshastighet og aminosyresammensetning, vil konsentrasjonen av aminosyrer og insulin i blodet etter inntak avhenge av hvilket protein som konsumeres. Mens myse resulterer i en kraftig, men raskt forbigående økning av aminosyrekonsentrasjonen i sirkulasjonen, resulterer inntak av kasein i en mer moderat

¹ WPC-80 er det myseproduktet som er vanligst i mysebaserte proteintilskudd

konsentrasjonsøkning (Reitelseder et al., 2011). Inntak av essensielle aminosyrer er en kraftig stimulus til økt MPS, og stort sett ser man at proteinsynteseresponsen gjenspeiles i økningen av essensielle aminosyrer i plasma (Reitelseder et al., 2011; Tang et al., 2009).

Den forgreinede aminosyren leucin har fått mye oppmerksomhet i denne sammenhengen, og inntak av myse resulterer i en større økning av leucinkonsentrasjonen i plasma, sammenlignet med kasein (Churchward-Venne, Burd, & Phillips, 2012; Reitelseder et al., 2011; Tang et al., 2009). Leucin ser ut til å være den viktigste av de forgreinede aminosyrene med tanke på å stimulere MPS, og det ser ut til at leucin øker translasjonen ved å påvirke mTOR (mammalian target of rapamycin), et proteinkompleks som er tiltenkt en viktig rolle i forbindelse med signalering til muskelhypertrofi (Drummond, Dreyer, Fry, Glynn, & Rasmussen, 2009). Det er en del usikkerhet omkring hvordan leucin aktiverer mTOR, men flere studier peker på hVps34, MAP4K3 og/eller Rag GTPaser som mulige kandidater (figur 2.2) (Dodd & Tee, 2012; Drummond et al., 2009; Gulati et al., 2008; Kim, Goraksha-Hicks, Li, Neufeld, & Guan, 2008; Schriever, Deutsch, Adamski, Roscher, & Ensenauer, 2013). Av disse tre er det per dags dato funksjonen til Rag GTPasene som er best kartlagt. Fire små Ras-relaterte guanosin-trifosfater utgjør et Rag GTPase-kompleks, som aktiveres av aminosyrer. Etter aktivering binder dette komplekset seg til mTOR, hvilket resulterer i en translokasjon av mTOR til lysosomenes membran, der Rheb er lokalisert (Shaw, 2008). Denne translokasjonen legger med andre ord forholdene til rette for mTOR-aktivering (Sancak et al., 2008), og det spekuleres i om denne translokeringen må finne sted *før* mTOR kan aktiveres av insulin og vekstfaktorer (Kim et al., 2008). Det kan videre tenkes at myse, kasein og soyaprotein påvirker Rag GTPasene i ulik grad grunnet ulikt innhold av essensielle aminosyrer og leucin, og at dette kan være noe av årsaken til at de ulike proteinfraksjonene stimulerer muskelproteinsyntesen forskjellig.

Inntak av ulike proteiner har også vist seg å påvirke utskillelsen av hormoner. Kraemer et al. (2013) observerte en lavere testosteronrespons etter supplementering med soyaprotein sammenlignet med melkeprotein, samtidig som inntak av melkeprotein resulterte i en lavere kortisolrespons ved enkelte tidspunkt i etterkant av en styrketreningsøkt. Det kan tenkes at disse forskjellene i hormonrespons bidrar til at melkeprotein kommer bedre ut enn soyaprotein både i akuttstudier (Wilkinson et al., 2007; Yang, Churchward-Venne, et al., 2012) og i forbindelse med treningsintervensjoner (Hartman et al., 2007; Volek et al., 2013). Samtidig er det verdt å merke seg at muskelproteinsyntesen stimuleres i tilsvarende grad hos

kvinner og menn etter en styrketreningsøkt og proteininntak, til tross for markante forskjeller i sirkulerende testosteronnivå (West et al., 2012).

Det kan med andre ord være flere årsaker til at myse, kasein og soyaprotein påvirker muskelproteinsyntesen i ulik grad. Ulik fordøyelseshastighet og leucininnhold er med stor sannsynlighet to av årsakene, mens det er usikkert hvorvidt forskjellig testosteronrespons er en tredje.

2.3 Hypertrofisignalering

Ved å måle muskelproteinsyntese og -nedbrytning vil man få verdifull informasjon om hvorvidt det foregår en akkumulering eller reduksjon av muskelvev innenfor et bestemt tidsrom. Dersom man ønsker mer informasjon om mekanismene som ligger til grunn for endringene i MPS og MPN, er det behov for andre tilnærminger. Ulike stimuli, det være seg mekanisk drag, metabolsk stress, aminosyrer eller hormoner, vil utløse signaleringskaskader som til syvende og sist påvirker prosesser tilknyttet regulering av transkripsjon og translasjon. Ved å studere enkelte steg i disse signaleringskaskadene, vil man få et innblikk i mekanismene som er ansvarlige for svingningene i MPS og MPN.

Muskelproteinbalansen gir oss med andre ord informasjon om *hva som skjer*, mens den intracellulære signaleringen representerer *hvordan*. I de påfølgende kapitlene vil relevante signalveier for hypertrofi adresseres, og de proteinene som blir undersøkt i denne studien vil vies ekstra oppmerksomhet.

2.3.1 p70S6K

70-kD S6 protein kinase (p70S6K) er en seronin/threonin-kinase, og fosforylering av Thr229 og Thr389 ser ut til å være mest kritisk for kinasens funksjon (Pullen & Thomas, 1997). Fosforylering av Thr389-setet er nødvendig for at PDK-1 skal kunne fosforylere Thr229 (Alessi, Kozlowski, Weng, Morrice, & Avruch, 1998), og de fleste studier som undersøker fosforylering av p70S6K i forbindelse med trening og proteininntak, benytter antistoff spesifikt for Thr389-fosforylering.

Mammalian target of rapamycin (mTOR) er et sentralt reguleringstrinn i forbindelse med muskelhypertrofi (Coffey & Hawley, 2007), og er avgjørende i reguleringen av p70S6K sin

aktivitet. Oppstrøms for mTOR finner vi blant annet Akt, som kan aktiveres av ulike stimuli, deriblant muskelkontraksjoner og ulike vekstfaktorer (Schiaffino, Dyar, Ciciliot, Blaauw, & Sandri, 2013). mTOR kan som tidligere beskrevet også aktiveres indirekte av aminosyrer. mTOR er et stort molekyl med mange regulatoriske domener, og omfatter de to proteinkompleksene mTORC1 og mTORC2. mTORC1 fosforylerer 4E-BP1 og nevnte p70S6K (figur 2.4) (Drummond et al., 2009). Fosforylering av p70S6K resulterer i en videre fosforylering av rpS6 (ribosomalt protein S6), som er assosiert med økt translasjon av spesifikke mRNA (Blomstrand, Eliasson, Karlsson, & Kohnke, 2006). p70S6K fosforylerer også eEF2 kinase på et serinsete som inhiberer kinasens aktivitet. Som følge av dette vil ikke eEF2 kinase kunne fosforylere og inhibere eEF2. Med andre ord vil p70S6K legge forholdene til rette for eEF2-aktivering (Wang et al., 2001).

Mange studier har undersøkt p70S6K i forbindelse med trening og næringsinntak. Det ser ut til at fosforyleringen p70S6K oppreguleres etter inntak av protein, selv i fravær av treningsstimuli (Apro & Blomstrand, 2010; Deldicque et al., 2010; Greiwe, Kwon, McDaniel, & Semenkovich, 2001). Flere studier viser også økt fosforylering av p70S6K i etterkant av en styrketreningsøkt, selv om forsøkspersonene ikke har inntatt verken protein eller karbohydrat i etterkant av treningsøkten (Glover et al., 2008; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009; Kakigi et al., 2014; Terzis et al., 2010). Andre studier viser til ingen respons på p70S6K så lenge proteininntak er fraværende (Apro & Blomstrand, 2010; Farnfield, Breen, Carey, Garnham, & Cameron-Smith, 2012; Karlsson et al., 2004; Reitelseder et al., 2011), og det ser ut til at det primært er treningsvolum som er avgjørende for hvorvidt p70S6K aktiveres i fravær av proteininntak (Terzis et al., 2010). Dersom en styrketreningsøkt etterfølges av proteininntak, er resultatene mer entydige, og man ser da en kraftig p70S6K-respons (Glover et al., 2008; Moore, Atherton, Rennie, Tarnopolsky, & Phillips, 2011; Reidy et al., 2013; Reitelseder et al., 2011). Kort oppsummert viser enkelte studier at p70S6K kan fosforyleres uten proteininntak, men for å oppnå en maksimal og vedvarende respons, bør styrketreningen kombineres med inntak av protein (Hulmi, Kovanen, et al., 2009; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009; Kakigi et al., 2014).

Enkelte studier har undersøkt hypertrofisignalering i forbindelse med inntak av ulike proteiner (tabell 2.1). Reitelseder et al. (2011) viste økt fosforylering av p70S6K 60 og 210 minutter etter en styrkeøkt med påfølgende inntak av protein, men fant ingen forskjell mellom myse og kasein. Reidy et al. (2013) sammenlignet inntak av myse og en kombinasjon av myse, soya og

kasein. Tre timer etter økten var det ingen signifikant forskjell i respons etter inntak av de to drikkene, mens bare kombinasjonen av myse/soya/kasein resulterte i økt fosforylering fem timer etter økten. I sistnevnte studie var leucininnholdet i drikkene korrigert, slik at mengden var den samme i mysedrikken og kombinasjonsdrikken. Selv om få studier har sammenlignet hypertrofisignalering etter inntak av myse og kasein, tyder tilgjengelig data på at aktivering av p70S6K varierer i liten grad etter inntak av de to melkeproteinfraksjonene.

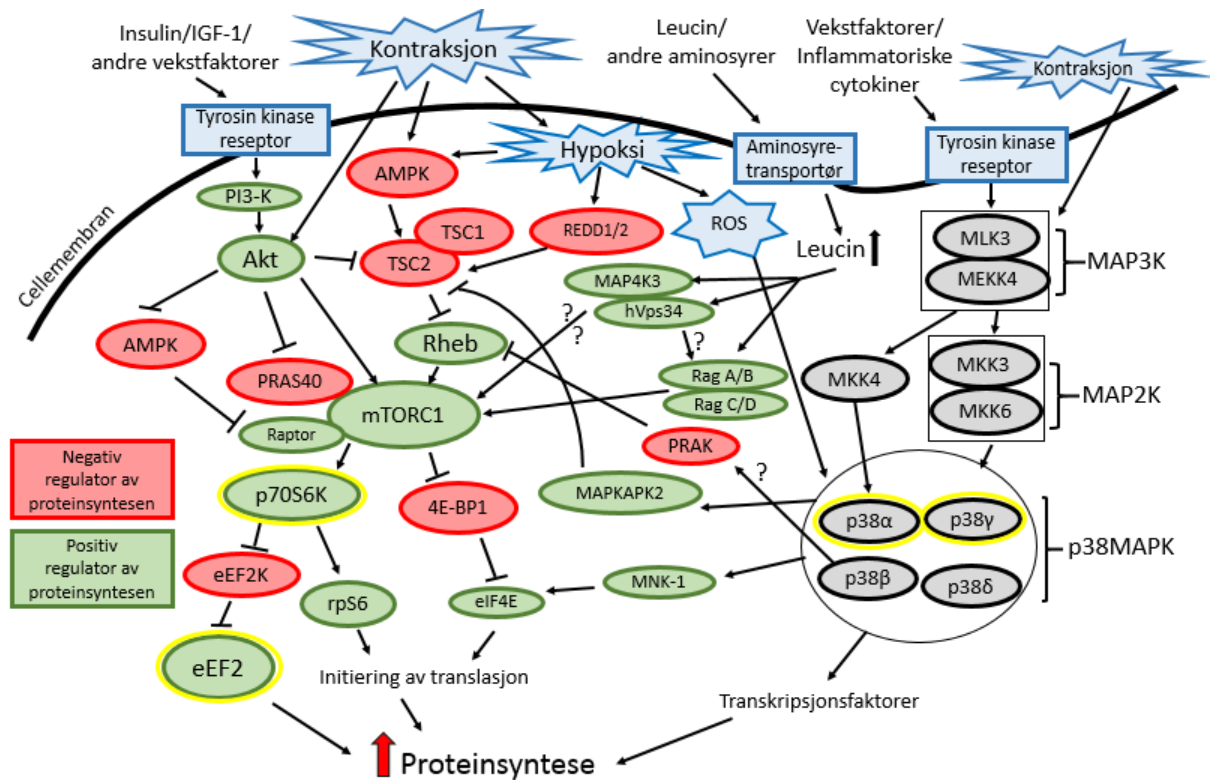
2.3.2 eEF2

Eukaryot elongeringsfaktor 2 (eEF2) spiller en sentral rolle i translasjonsprosessen, og dermed i reguleringen av muskelproteinsyntesen. eEF2 har som oppgave å katalysere translokasjonen av peptidyl-tRNA fra sete A til sete P på ribosomene (Hizli et al., 2013). Den eneste kjente mekanismen som regulerer eEF2 er fosforylering av thr56, som forhindrer eEF2 fra å binde seg til ribosomene (Ovchinnikov et al., 1990; Price et al., 1991). Fosforylering av dette bindingssetet utføres av eEF2 kinase (eEF2K) (Ryazanov, 1987), og vil resultere i en inhibering av eEF2 sin aktivitet (figur 2.4) (Ryazanov & Davydova, 1989).

Studier som har undersøkt aktivering av eEF2 i etterkant av en styrketreningsøkt viser både til redusert fosforylering (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2008; Fujita et al., 2009), ingen endring (Burd, West, et al., 2010; Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009; Kumar, Selby, et al., 2009), og økt fosforylering (Holm et al., 2010). Ved inntak av protein i fravær av treningsstimuli er situasjonen den samme; enkelte viser til en redusert fosforylering (Apro & Blomstrand, 2010; Drummond et al., 2008; Fujita, Dreyer, et al., 2007), mens andre viser til ingen endring (Moore et al., 2011). Heller ikke når styrketrening og inntak av protein kombineres er funnene entydige. Deldicque et al. (2010) fant signifikant redusert fosforylering av eEF2 etter styrketrening kombinert med inntak av protein og karbohydrat. Også andre har funnet reduserte nivåer av fosforylert eEF2 etter en styrketreningsøkt med påfølgende inntak av protein og karbohydrater, men i disse studiene så man en tilsvarende effekt av styrketrening alene (Apro & Blomstrand, 2010; Dreyer et al., 2008). Andre finner ingen endring i fosforylering av eEF2 etter styrketrening og inntak av protein (Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009). Kort oppsummert er forskningen noe sprikende når det gjelder eEF2 i forbindelse med trening og proteininntak. En oppsummering av studier som har undersøkt eEF2 og p70S6K i forbindelse med trening og/eller proteininntak kan ses i tabell 2.1.

Tabell 2.1: Studier som har undersøkt effekten av styrketrening og/eller inntak av protein på fosforylering av p70 S6K og eEF2 hos yngre og eldre. + indikerer signifikant økning, - indikerer signifikant reduksjon, = indikerer ingen endring, # indikerer signifikant forskjell mellom grupper. Tegn i parentes indikerer tendens til økning fra baseline (*), eller sterk tendens til forskjell mellom grupper (#). Alle biopsier fra m. vastus lateralis.

Forfatter	Design	Subjekter	Intervensjon	Protein	Effekt	
Apro og Blomstrand, 2010	RCT/cross-over	9 yngre, moderat aktive. 4 menn, 5 kvinner	Møtte fastende. Unilateral beinpress, 4X10-15R/60-80%/5min. Inntok BCAA eller placebo før/under/etter økt (til sammen omtrent 30 gram BCAA).	P-p70	BCAA	
					Placebo	
					0 t	+
Drumond et al, 2008	RCT	7 yngre, og 6 eldre menn	Møtte fastende. Bilateral kneekstensjon, 8X10/70%/3min. Inntok 20 gram essensielle aminosyrer rett etter endt økt.	P-p70	Yngre	
					Eldre	
					1 t	+
Farnfield et al, 2012	RCT	16 yngre menn, 15 eldre menn.	12 uker trening. Akuttidag før og etter. Unilateral kneekstensjon, 3X8RM/3 min pause. Myse (27 gram) eller placebo rett etter økt. Eldre (E), Yngre (Y), # sig. forskjell fra placebo innad i den respektive alderskategori	P-p70	Før treningsperiode	
					Myse	Placebo
					2 t	Y:+
Fry et al, 2011	RCT	16 yngre og 16 eldre, ♂ og ♀	Møtte fastende. Bilateral kneekstensjon, 8x10/70%/3min. Inntok <u>ikke</u> protein etter økt.	P-p70	Eldre	
					Yngre	
					3 t	+
Hulmi et al, 2009	RCT	18 yngre utrente menn	Fastet 3 timer før økt. Gjennomførte beinpress (5X10RM/2 min pause). 15 gram myse eller placebo like før og like etter økten.	P-p70	Myse	
					Placebo	
					1 t	+
Kakigi et al, 2014	RCT/cross-over	15 utrente menn	Møtte fastende. Unilateral isokinetisk kneekstensjon, 4X6RM. 10 og 20 gram myse rett etter økt, eller vann.	P-p70	V	
					M10	M20
					1 t	+
Karlsson et al, 2004	Cross-over	7 yngre menn, moderat trente	Møtte fastende. Bilateral kneekstensjon, 4X10RM/5min. Inntok BCAA eller placebo under og etter trening.	P-p70	Placebo	
					BCAA	
					0 t	=
Kumar et al, 2009	RCT	50 yngre og eldre menn. Moderat aktive	Møtte fastende. Unilateral kneekstensjon- og fleksjon. Fem ulike treningsbelastninger, samme volum. 5 i hver gruppe. Resultater for 60-90% av 1RM presenteres. <u>Ikke protein</u>	P-p70	Yngre	
					Eldre	
					10 m	=
Moore et al, 2011	RCT	7 fysisk aktive yngre menn	Møtte fastende. Unilateral beinpress og kneekstensjon, 5x8-10 RM. 2 min pause mellom sett. Inntok 25 gram myseprotein umiddelbart etter økten.	P-p70	Myse	
					Myse+Sty.	
					1 t	+
Reitelseder et al, 2011	RCT/cross-over	17 moderat aktive yngre menn	Møtte fastende. Unilateral kneekstensjon, 10x8R/80%/3 min. Inntok myse, kasein (ca. 20 gram protein) eller vann umiddelbart etter trening.	P-p70	Myse	
					Kasein	Vann
					1 t	+



Figur 2.4: Forenklet oversikt over signalveier tilknyttet p70S6K, eEF2 og p38 MAPK. Proteinene det er gjort analyser på i denne studien er merket med gul sirkel. Basert på flere artikler (Cuadrado & Nebreda, 2010; Drummond et al., 2009; Kimball & Jefferson, 2010; Kumar, Atherton, Smith, & Rennie, 2009; Miyazaki & Esser, 2009).

2.3.3 p38 MAPK

p38 MAPK, heretter omtalt p38, er en mitogenaktivert proteinkinase som er involvert i en rekke biologiske prosesser. p38 aktiveres av ulike stress-stimuli, vekstfaktorer og inflammatoriske cytokiner, og er blant annet involvert i proliferering, differensiering og translasjon (Cuadrado & Nebreda, 2010; Jones et al., 2005; Williamson, Gallagher, Harber, Hollon, & Trappe, 2003). Man har så langt identifisert fire isoformene uttrykkes i ulik grad i forskjellige vev (Cuadrado & Nebreda, 2010). p38 α (alpha) uttrykkes i de fleste celletyper, mens p38 β (beta) i stor grad uttrykkes i hjerneceller. p38 δ (delta) ser ut til å være viktig i endokrine kjertler, mens det er rikelig av p38 γ (gamma) i skjelettmuskulatur (Cuadrado & Nebreda, 2010). De fire isoformene ser ut til å ha både felles og separate funksjoner. Aktivering av p38 α og p38 β ser ut til å fremme differensiering av satellittceller (Jones et al., 2005), mens p38 γ ser ut til å gjøre det motsatte (Lassar, 2009). Selv om det kan virke paradoksalt at de to isoformene skal motarbeide hverandre, gir dette muligheten for nøyte regulering, og p38 ser ut til å fungere som en molekylær bryter for satellittcelleaktivering i skjelettmuskulatur (Jones et al., 2005).

De fire isoformene av p38 blir i hovedsak aktivert av MKK3 og MKK6, via samtidig fosforylering av ett tyrosin- og ett threoninsete, men p38 α kan også aktiveres av MKK4 (Cuenda & Rousseau, 2007). MKK3 og MKK6 aktiveres på sin side gjennom fosforylering av en MAPK kinase kinase (Cuenda & Rousseau, 2007), for eksempel MLK3 og MEKK4. Etter fosforylering kan p38 translokeres til cellekjernen, der den både direkte og indirekte utøver sin rolle ved å påvirke forskjellige proteins aktivitet. p38 er involvert i fosforyleringen av nedstrøms transkripsjonsfaktorer som p53, ATF2 og MEF2, samt proteinkinaser som MAPKAPK-2, MAPKAPK-3, MSK-1 (mitogen- and stress-activated protein kinase 1), MNK-1 og MNK-2 (MAPK-interacting serine/threonine kinase 1 og 2) (Cuenda & Rousseau, 2007). MNK-1 regulerer translasjonsprosessen gjennom fosforylering av eIF4E (eukaryot Initiating factor of translation-4E) (Williamson et al., 2003).

Det ser ut til å være interaksjon mellom signalveiene for p38 og mTOR. Som nevnt kan eIF4E aktiveres både via p38-regulert MNK-1-fosforylering og mTOR-regulert 4EBP-1-fosforylering (Drummond et al., 2009; Li, Inoki, Vaccratsis, & Guan, 2003). MAPKAPK-2 ser også ut til å fosforylere, og med det inhibere TSC2, hvilket vil fremme fosforylering av mTORC1 (Li et al., 2003; Wu et al., 2011). Samtidig ser det ut til at p38 β under energimangel kan aktivere PRAK (MK5), som videre kan inhibere Rheb, og dermed hemme mTOR (Wu et al., 2011). Cully et al. (2010) så at blokkering av MKK3 og MKK6, som er oppstrøms for p38, resulterte i en redusert aminosyrestimulert fosforylering av p70S6K og 4E-BP1 i *Drosophila melanogaster* (bananflue). I den samme studien så de ingen økning i p38-fosforylering ved behandling med insulin og aminosyrer, og sett i sammenheng indikerer disse funnene at aminosyrer og insulin ikke direkte aktiverer p38, men at en viss basalaktivitet er nødvendig for at proteinene nedstrøms for mTOR skal kunne aktiveres av de nevnte stimuli (Cully et al., 2010).

Det er gjennomført flere studier der man har sett på aktivering av p38 i etterkant av en styrketreningsøkt, og i et flertall av disse har man sett økt fosforylering av p38 som respons på slike treningsstimuli (Deldicque et al., 2008; Holm et al., 2010; Karlsson et al., 2004; Moller et al., 2013). Treningsbelastning ser ut til å påvirke graden av aktivering, og 5 x 10 RM resulterte i høyere p38 γ fosforylering sammenlignet med 15 x 1 RM med beinpress (Hulmi et al., 2012). For isoformen p38 α var aktiveringen lik for de to treningsbelastningene. Funnene til Hulmi et al. (2012) stemmer overens med resultatene fra Terzis et al. (2010), der fosforylering av p38 $\alpha/\beta/\delta$ var økt i tilsvarende grad ved ett, tre og fem serier med beinpress, mens det var

en tendens til høyere fosforylering av p38 γ ved 3 og 5 serier, sammenlignet med én serie. Trening med lav belastning (30 repetisjoner på 16 % av 1RM) ser ikke ut til å påvirke fosforyleringen av p38 (Holm et al., 2010).

Få studier har undersøkt p38 i forbindelse med styrketrening og påfølgende inntak av protein. Karlsson et al. (2004) sammenlignet inntak av forgreinede aminosyrer (BCAA) og placebo etter en styrketreningsøkt, og så en robust respons på p38 umiddelbart etter treningsøkten (før drikkene var inntatt). Én og to timer etter økten var fosforylert p38 tilbake til baseline, både i BCAA- og placebogruppen. Felles for mange av studiene som har undersøkt p38 i etterkant av en styrketreningsøkt er at den økte fosforyleringen som sees umiddelbart etter økten avtar hurtig (Deldicque et al., 2008; Holm et al., 2010; Karlsson et al., 2004; Moller et al., 2013). Aktiveringen av p38 ser ut til å være tilbake til baseline allerede én time etter endt styrketreningsøkt (Karlsson et al., 2004).

Det kan se ut til at MAPK-proteiner er aktivert i ulik grad hos yngre og eldre menn, både i hvile og i etterkant av en styrketreningsøkt. Williamson et al. (2003) fant en høyere aktivering av p38 hos eldre sammenlignet med yngre i hvile. Hos de eldre forsøkspersonene så de også en reduksjon i fosforylering etter styrketreningsøkten, mens det ikke var forskjell mellom pre- og postbiopsi for de yngre (Williamson et al., 2003). Som nevnt viser de fleste studier til en robust økning i p38 umiddelbart etter en styrketreningsøkt, og det at man ikke så en økning i fosforylering verken hos de yngre eller eldre i Williamson et al. (2003) sin studie kan muligens tilskrives en mindre utmattende treningsprotokoll, sammenlignet med for eksempel Deldicque et al. (2008) (3x10/70% vs. ~10x10/80%).

De fleste studier viser altså til økt fosforylering av p38 umiddelbart etter en styrketreningsøkt (Deldicque et al., 2008; Holm et al., 2010; Hulmi et al., 2012; Moller et al., 2013).

Fosforyleringen ser ut til å avta hurtig etter trening (~45 min), uavhengig av forsøkspersonenes energistatus (Karlsson et al., 2004). Aktivering av p38 er også muligens forskjellig hos yngre og eldre, både i hvile og i etterkant av en styrketreningsøkt (Williamson et al., 2003). En oppsummering av studier som har undersøkt aktivering av p38 i forbindelse med trening og/eller proteininntak kan ses i tabell 2.2.

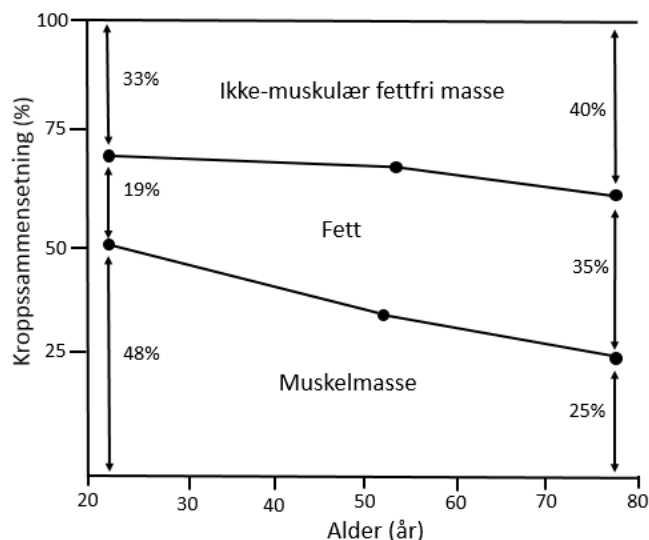
Tabell 2.2: Studier som har undersøkt effekten av styrketrening og/eller inntak av protein på fosforylering av p38. + indikerer signifikant økning fra baseline, - indikerer signifikant reduksjon fra baseline, = indikerer ikke-signifikant endring. # indikerer signifikant høyere fosforylering sammenlignet med alle andre grupper. Samtlige studier har tatt biopsier fra m. vastus lateralis.

Forfatter/År	Design	Subjekter	Intervensjon	Protein	Effekt
Deldicque et al, 2008	Placebo-gruppe fra en større studie	9 utrente yngre menn	Møtte fastende. Bilateral kneekstensjon, 10X10R/80% av 1RM/2,5min pause mellom serier. P-p38 ble målt både i kjernen og cytosol.	P-p38	Cytosol Kjerne 0 t + 24 t =
Holm et al, 2010	RCT	20 utrente menn	10 gjennomførte protokollen fastende, og 10 med næringsinntak (karbohydrat, protein, fett). Ulik treningsprotokoll for hvert bein: 16% av 1RM, 36 reps (LB) og 70% av 1RM, 8 reps (HB). HB: høy belastning, LB: lav belastning, F: fastende, N: næringsinntak	P-p38	F/LB F/HB N/LB N/HB 0,5 t = + 3 t = = 5,5 t = =
Hulmi et al, 2012	Cross-over	8 utrente yngre menn	Standardisert drikk 3 timer før testen. Bilateral beinpress. To ulike treningsprotokoller ved to anledninger. 5X10RM/2min pause og 15X1RM/3min pause.	P-p38α P-p38γ	5X10RM 15X1RM 0,5 t + 0,5 t + #
Karlsson et al, 2004	Cross-over	7 yngre menn, moderat trente	Møtte fastende. Bilateral kneekstensjon, 4X10RM/5min pause. Inntok BCAA eller placebo under og etter av treningsøkten.	P-p38	Placebo BCAA 0 t + 1 t = 2 t =
Møller et al, 2013	RCT	20 utrente yngre menn	Møtte fastende. Gjennomførte en styrkeøkt (n:7) en utholdenhetsøkt (n:7) eller ingen trening (n:6) Styrkeøkt: 4x12RM i beinpress, lårcurl og kneekstensjon.	P-p38	Styrke Uthold. Kontr. 0 t + # = 2,5 t - # = 5 t - # = 22 t = =
Terzis et al, 2010	Cross-over	8 utrente menn	Møtte fastende. Gjennomførte beinpress, 1X6RM, 3X6RM og 5X6RM. 2 min pause.	P-p38α/β P-p38γ	1X6 3X6 5X6 0,5 t + + + 0,5 t + + +
Williamson et al, 2003	RCT	16 utrente menn (8 yngre, 8 eldre)	Møtte fastende. Gjennomførte bilateral kneekstensjon, 3X10/70% av 1RM/3 min pause mellom hvert sett. Biopsi ble tatt før og umiddelbart etter treningsøkten.	P-p38	Yngre Eldre Pre # + # 0 t = -

2.4 Økende alder; redusert anabol respons?

Hos unge og friske personer holder muskelmassen seg forholdsvis konstant, gitt at de inntar like mye energi som de forbruker, gitt at aktivitetsnivået ikke endres, og gitt at en tilstrekkelig mengde av næringsinntaket består av proteiner. Dette ser ut til å være tilfellet selv om man ikke bedriver styrketrening, og skyldes at netto proteinbalanse over tid holdes konstant (Burd, Gorissen, & van Loon, 2013). Med økende alder ser man en gradvis reduksjon i muskelmasse

og muskelstyrke (figur 2.5) (Goodpaster et al., 2006; Harbo, Brincks, & Andersen, 2012; Metter, Conwit, Tobin, & Fozard, 1997), og dette vil potensielt kunne få store konsekvenser for funksjon i hverdagen. Den aldersrelaterede reduksjonen i muskelmasse omtales som sarkopeni (Cruz-Jentoft et al., 2010), og det er en del uenighet om hvilke mekanismer som ligger til grunn. I de neste avsnittene vil studier som sammenligner yngre og eldre i forbindelse med styrketrening og næringsinntak trekkes frem, og avslutningsvis vil mekanismer som antas å være involvert i den anabole resistensen hos eldre diskuteres.



Figur 2.5: Endring i kroppssammensetning med økende alder. Figur basert på data fra Balagopal, Rooyackers, Adey, Ades, and Nair (1997).

Det ser ut til at muskelproteinsyntesen og -nedbrytningen er lik hos yngre og eldre personer i hvile (Fry et al., 2013; Katsanos, Kobayashi, Sheffield-Moore, Aarsland, & Wolfe, 2006; Kumar, Selby, et al., 2009; Pennings, Koopman, et al., 2011; Symons, Sheffield-Moore, Mamerow, Wolfe, & Paddon-Jones, 2011). Etter en styrketreningsøkt (uten påfølgende næringsinntak) virker MPS-responsen å være høyere hos yngre sammenlignet med eldre, uavhengig av treningsbelastning (Fry et al., 2011; Kumar, Selby, et al., 2009). Ved inntak av protein i fravær av treningsstimuli, fant Cuthbertson et al. (2005) en lavere proteinsynteserespons hos eldre sammenlignet med yngre, både ved inntak av 10 og 20 gram essensielle aminosyrer (Cuthbertson et al., 2005), og data tyder på at eldre er avhengig av et høyere proteininntak enn yngre for å stimulere proteinsyntesen maksimalt i fravær av treningsstimuli (Pennings et al., 2012; Witard et al., 2014; Yang, Breen, et al., 2012). Det kan likevel se ut til at den reduserte anabole responsen ved lave proteininntak hos eldre kan «reddes», ved å øke andelen leucin (Katsanos et al., 2006; Wall et al., 2013). Det ser også ut til at MPS hos eldre stimuleres i større grad etter inntak av 20 gram myseprotein,

sammenlignet med 20 gram kasein, og det er mulig denne forskjellen til dels kan tilskrives et høyere leucininnhold i mysen (Burd et al., 2012). Ved inntak av større mengder protein (>30 gram essensielle aminosyrer), viser enkelte studier at proteinsyntesen hos eldre stimuleres i like stor grad som hos yngre (Symons et al., 2011), mens andre også ved høye inntak ser størst synteserespons hos yngre (Cuthbertson et al., 2005).

Kombinasjon av styrketrening og proteininntak trekkes av mange frem som en potensielt hensiktsmessig strategi for å motvirke eller bremse aldersrelatert muskelsvinn (Burd et al., 2013; Pennings, Koopman, et al., 2011). Ved gjennomføring av en styrketreningsøkt med påfølgende inntak av under 10 gram essensielle aminosyrer ser det ut til at eldre har en lavere anabol respons sammenlignet med yngre (Katsanos, Kobayashi, Sheffield-Moore, Aarsland, & Wolfe, 2005). Dersom styrketreningsøkten etterfølges av et inntak over 15 gram essensielle aminosyrer ser situasjonen ut til å være en annen, og muskelproteinsyntesen ser da ut til å stimuleres i like stor grad hos eldre som hos yngre (Drummond et al., 2008; Symons et al., 2011). I én studie var responsen hos yngre og eldre også lik etter styrketrening og inntak av 20 gram kasein (hvorav ~7 gram essensielle aminosyrer) (Pennings, Koopman, et al., 2011).

Selv om proteinsyntesen hos yngre og eldre ser ut til å stimuleres i like stor grad i etterkant av styrketrening og påfølgende inntak av >15 gram essensielle aminosyrer, kan det se ut til at eldre har en noe forsinket respons. I studien til Drummond et al. (2008) hadde yngre høyere syntesehastighet enn eldre 1-3 timer etter økten, mens det motsatte var tilfellet 3-6 timer etter økten. Over fem timer var MPS lik hos yngre og eldre (Drummond et al., 2008). Det kan også se ut til at eldre har et mindre «anabolt vindu» for inntak av næring/protein i forbindelse med en styrketreningsøkt. For yngre er det foreslått at proteininntak bør skje innen 2 timer etter endt styrketreningsøkt (Rasmussen, Tipton, Miller, Wolf, & Wolfe, 2000). For eldre kan det derimot se ut til at protein bør inntas innen 1 time etter endt treningsøkt for å best mulig legge forholdene til rette for muskelvekst (Esmarck et al., 2001).

Kort oppsummert ser det ut til at eldre i fravær av treningsstimuli har behov for et forholdsvis høyt proteininntak (>15 gram essensielle aminosyrer) for å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt, og det er usikkert om responsen er den samme som hos yngre, selv ved høye proteininntak (Cuthbertson et al., 2005; Symons et al., 2011). Ved lavere inntak kan det for den eldre delen av befolkningen være hensiktsmessig å øke andelen leucin (Katsanos et al., 2006). Dersom styrketrening og proteininntak kombineres, ser det ut til at eldre kan oppnå

samme respons som yngre, selv ved et lavere inntak av protein (10-15 gram essensielle aminosyrer) (Drummond et al., 2008; Pennings, Koopman, et al., 2011), selv om eldre muligens har en noe forsinket respons (Drummond et al., 2008).

2.4.1 Anabol resistens – potensielle mekanismer

Årsaken til at eldre har en lavere anabol respons enn yngre ved lave proteininntak, både i hvile og i etterkant av en styrketreningsøkt, er med stor sannsynlighet sammensatt. I de neste avsnittene vil noen potensielle mekanismer trekkes frem.

Fra proteiner inntas til aminosyrene kan stimulere muskelproteinsyntesen er det en rekke steg som må passeres, og den reduserte anabole responsen hos eldre kan i teorien skyldes problemer i ett eller flere av disse stegene. Selve fordøyelsen av proteinene vil være avgjørende for hvor stor andel av aminosyrene som vil bli tatt opp i sirkulasjonen, og som videre vil bli gjort tilgjengelige for skjelettmuskulaturen. Enkelte funn peker mot at en større andel av aminosyrene som inntas blir benyttet i splanchnic ekstraksjon hos eldre, enn hva tilfellet er hos yngre (Volpi, Mittendorfer, Wolf, & Wolfe, 1999). Økt splanchnic ekstraksjon betyr at en større andel av aminosyrene benyttes av indre organer som lever, bukspyttkjertel, milt og tarm. Andre ser derimot ingen forskjell i splanchnic ekstraksjon mellom yngre og eldre (Koopman et al., 2009), selv om det er verdt å merke seg at forsøkspersonene i sistnevnte studie var noe yngre sammenlignet med Volpi et al. (1999) (64 vs. 71 år). Til tross for forskjeller i splanchnic ekstraksjon, så Volpi et al. (1999) bare minimale forskjeller i aminosyrekonsentrasjon i blodet etter inntak av 40 gram essensielle aminosyrer, og heller ingen forskjeller i MPS og MPN. Selv om splanchnic ekstraksjon muligens er høyere hos eldre, ser det altså ikke ut til at dette får store konsekvenser for den anabole responsen ved høye proteininntak. Det er usikkert hvorvidt situasjonen er den samme ved lave proteininntak.

I flere studier har man sett høyere konsentrasjon av sirkulerende aminosyrer hos eldre enn yngre i timene etter proteininntak (Drummond et al., 2008; Pennings, Koopman, et al., 2011). Sett i sammenheng med lavere proteinsynteserespons i flere studier kan dette være et tegn på problemer i forbindelse med transporten av aminosyrene fra blodet til muskelcellene (arterier → kapillærer → ekstracellulærvæske → cytosol). I enkelte studier har man sett økt proteinsyntese hos eldre ved bruk av sodium nitroprusside, som er en vasodilator (Dillon et al., 2011; Timmerman et al., 2010), og dette bygger opp under en teori om at redusert

blodstrøm kan være en av faktorene som bidrar til Eldres «anabole resistens». Det spekuleres i om den reduserte blodstrømmen skyldes at eldre har en redusert produksjon eller sensitivitet til NO (nitrogenmonoksid) (Dillon et al., 2011). Det ser også ut til at eldre har lavere kapillærtetthet rundt skjelettmuskulatur enn yngre (Groen et al., 2014), og det er mulig dette også har en innvirkning på aminosyreleveransen.

I forbindelse med styrketrening og påfølgende proteininntak ser man også en økning i mRNA-ekspressjon av aminosyretransportører som LAT1 og SNAT2 (Reidy et al., 2014). Dickinson, Drummond, Coben, Volpi, and Rasmussen (2013) fant at yngre og eldre menn hadde en tilsvarende økning i mRNA-ekspressjon av LAT1 og SNAT2 etter styrketrening og inntak av essensielle aminosyrer, men det var aldersspesifikke forskjeller i selve genekspressjonen av aminosyretransportørene. Mens nivåene av SNAT2 var høyest hos yngre, var det omvendte tilfellet for LAT1. Det er enighet om at det er et samspill mellom LAT1 og SNAT2 for å øke leveransen av leucin og andre aminosyrer til muskelcellene (Baird et al., 2009), og det kan se ut til at SNAT2 innehar en spesielt viktig rolle (Hyde, Cwiklinski, MacAulay, Taylor, & Hundal, 2007). Evans et al. (2007) så at inhibering av SNAT2 resulterte i redusert fosforylering av mange proteiner nedstrøms for mTOR. Det kan være at aldersspesifikke forskjeller i ekspressjon av LAT1, SNAT2 eller andre aminosyretransportører resulterer i ulik aminosyretransport, slik at hypertrofisignalering og dermed proteinsyntese stimuleres i ulik grad.

Dersom eldre har en redusert transport av aminosyrer til muskelcellene, grunnet en eller flere av de ovennevnte mekanismer, kan det tenkes at disse forskjellene vil gjenspeiles i ulik hypertrofisignalering. Cuthbertson et al. (2005) viste til lavere mTOR-signalering hos eldre sammenlignet med yngre ved inntak av 10 gram essensielle aminosyrer, og Drummond et al. (2008) så en tendens til det samme en time etter styrketrening og inntak av 20 gram essensielle aminosyrer. Tre og seks timer etter økten tenderte derimot eldre til å ha høyest p70S6K-aktivering (Drummond et al., 2008), og sistnevnte funn støttes av Farnfield et al. (2012), som så høyere p70S6K-aktivering hos utrente eldre enn hos utrente yngre to timer etter en styrketreningsøkt og påfølgende inntak av 27 gram myseprotein. Tilgjengelig data gir dermed ikke noe klart bilde av hvorvidt hypertrofisignaleringen er ulik hos eldre og yngre, og det ser ut til at treningsstatus er vel så bestemmende for signaleringsresponsen som alder (Farnfield et al., 2012).

For å oppsummere, er det flere faktorer som kan bidra til den anabole resistensen sett hos eldre ved lave proteininntak. I teorien kan problemer med fordøyelsen, opptak av aminosyrer til blodet, transport av aminosyrer til musklene, og musklenes evne til å respondere på aminosyrene alle være involvert, i større eller mindre grad.

2.5 Mann eller kvinne; bestemmende for den anabole responsen?

Menn har generelt en større muskelmasse og lavere fettprosent enn kvinner (Mingrone et al., 2001), og forskjellen i kroppssammensetning antas å skyldes forskjeller i sirkulerende nivå av ulike kjønnshormoner. Testosteron har en anabol effekt på skjelettmuskulatur (Isidori et al., 2005), og menn produserer 20 ganger mer testosteron enn kvinner (Southren et al., 1967). Men til tross for store forskjeller mellom kvinner og menns testosteronproduksjon, ser det ikke ut til å være kjønnsspesifikke forskjeller i basal muskelproteinsyntese eller -nedbrytning hos yngre personer (Dreyer et al., 2010; Fujita, Rasmussen, Bell, Cadenas, & Volpi, 2007; Smith et al., 2009). Det ser heller ikke ut til å være forskjeller i mTOR-signalering mellom yngre kvinner og menn i hvile (Smith et al., 2009). Proteinsynteseresponsen ser også ut til å være lik etter en styrketreningsøkt uten påfølgende inntak av protein, og lik MPS gjenspeiles i lik aktivering av p70S6K og eEF2 (Dreyer et al., 2010). West et al. (2012) sammenlignet den anabole responsen hos yngre kvinner og menn etter en styrketreningsøkt med påfølgende inntak av 25 gram myseprotein. Til tross for store forskjeller i sirkulerende testosteron, var muskelproteinsyntesen lik i de to gruppene mellom én og fem, samt mellom 24 og 28 timer etter treningsøkten (West et al., 2012). Også i denne studien var fosforylering av p70S6K lik hos kvinner og menn på alle tidspunkt.

For eldre kan det se ut til at det er enkelte kjønnsspesifikke forskjeller. Etter menopausen har kvinner tilsynelatende ~20-30 % høyere basal proteinsyntese enn menn (Henderson et al., 2009; Smith et al., 2008), men en lavere respons til matinntak (Smith et al., 2008). I sistnevnte studie var det følgelig kun menn som hadde økt fosforylering av 4E-BP1 og eIF4E etter matinntak, mens aktivering av p70S6K og eEF2 var lik i begge grupper (Smith et al., 2008). Kumar, Atherton, et al. (2009) spekulerer i om forskjellen i MPS mellom eldre kvinner og menn skyldes hormonelle endringer med økende alder, spesielt som følge av kvinnenes menopause.

Kort oppsummert ser det ut til at yngre kvinner og menn har tilsvarende muskelproteinsyntese og hypertrofisignalering i hvile, og det ser heller ikke ut til å være kjønns spesifikke forskjeller i den anabole responsen etter en styrketreningsøkt, verken med eller uten påfølgende proteininntak. For eldre er det enkelte kjønns spesifikke forskjeller, men disse ser ikke ut til å gjenspeiles i ulik aktivering av p70S6K og eEF2.

2.6 Oppsummering

Styrketrening etterfulgt av proteininntak har en særdeles positiv effekt på muskelproteinbalansen, både som følge av økt muskelproteinsyntese, og redusert muskelproteinnedbrytning. Netto positiv muskelproteinbalanse over tid vil resultere i målbare endringer i muskelmasse. Ulike proteiner ser ut til å ha ulik anabol effekt på muskelvev, og dette sees både i akuttstudier og treningsintervensjoner. Melkeprotein ser ut til å ha en større anabol effekt enn soyaprotein, og det ser også ut til å være forskjeller mellom de to melkefraksjonene myse og kasein. Forskjeller mellom de ulike proteinene antas å skyldes flere faktorer, deriblant ulik fordøyelseshastighet og aminosyresammensetning. Den forgreinede aminosyren leucin er tiltenkt en viktig rolle med tanke på å stimulere proteinsyntesen, og leucininnholdet varierer avhengig av proteinkilde (myse > kasein > soya). Det ser også ut til å være forskjeller mellom yngre og eldres respons til styrketrening og proteininntak, og tilgjengelig data tyder på at eldre har behov for et høyere proteininntak enn yngre for å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt, både i hvile og i etterkant av en styrketreningsøkt.

3.0 Metode

Denne masteroppgaven benytter resultater fra en større studie, der både muskelproteinsyntese og muskelproteinnedbrytning ble målt i forbindelse med inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmelk i etterkant av én enkelt styrketreningsøkt. Prosjektet finansieres av Norges Forskningsråd og TINE SA, og er et samarbeid mellom Norges idrettshøgskole, Universitetet i Oslo (avdeling for ernæringsvitenskap) og Høgskolen i Oslo og Akershus (HiOA). Denne studien ble gjennomført som en dobbelt blindet placebo-kontrollert studie, med delvis cross over-design. I den påfølgende metodebeskrivelsen vil i hovedsak informasjon og analyser med relevans for min problemstilling omhandles.

3.1 Rekruttering og inklusjon

I denne studien ble menn og kvinner fra to aldersgrupper benyttet som forsøkspersoner. Den yngre gruppen besto av personer mellom 19 og 36 år, mens den eldre gruppen besto av personer over 70 år. Totalt ble 38 forsøkspersoner inkludert, derav 22 yngre og 16 eldre. Én av de eldre forsøkspersonene trakk seg underveis, og er bare inkludert i blod- og restitusjonsdata.

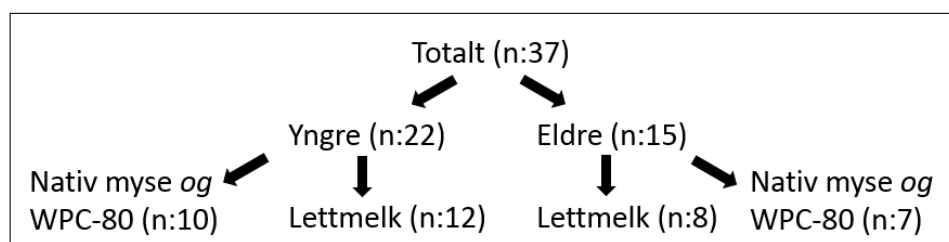
Forsøkspersoner til den yngre gruppen ble rekruttert ved hjelp av plakater, informasjon på studentmail, sosiale medier og lignende. Alle som meldte sin interesse fikk utdelt informasjonsskriv, og det ble også holdt to informasjonsmøter. For å inkluderes som forsøksperson (FP) i den yngre gruppen måtte man ha drevet med styrketrening på beina minst en gang per uke det siste halve året (tabell 3.1). Forsøkspersoner til den eldre gruppen ble også rekruttert ved hjelp av plakater, men for å nå ut til denne gruppen ble det også satt inn en avisannonse, i tillegg til at vi informerte om studien på diverse gruppetreningstimer for eldre. Før oppstart målte vi blodtrykk, kolesterol- og glukosenivå hos de eldre forsøkspersonene, i tillegg til at beinmineraltetthet ble kartlagt ved hjelp av DXA-målinger. Bare personer med tilfredsstillende resultater på disse testene ble tatt med som forsøkspersoner (tabell 3.1). Personer med melkeallergi ble ekskludert fra studien, siden proteinpreparatene var melkebaserte. En fullstendig oversikt over inklusjon- og eksklusjonskriterier er oppsummert i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Inklusjon- og eksklusjonskriterier for yngre og eldre

	Inklusjonskriterier	Eksklusjonskriterier
Yngre	Menn og kvinner mellom 18-45 år Styrke på bein minst 1 gang per uke siste 6 mnd.	Sykdom/skade i muskel- og eller skjelett Bruk av kosttilskudd Bruk av kortikosteroider siste 6 mnd. Melkeallergi
Eldre	Menn og kvinner over 70 år Friske og aktive	Sykdom/skade i muskel- og eller skjelett Bruk av kosttilskudd Blodtrykk > 140/90 BMD < 0,84 g/cm ² i L2-L4 Fastende glukose > 6 mmol Melkeallergi

3.2 Inndeling i grupper

Omtrent halvparten av forsøkspersonene i hver av de to aldersgruppene gjennomførte protokollen to ganger, den ene gangen med inntak av nativ myse og den andre med WPC-80. Den andre halvdel i hver aldersgruppe gjennomførte protokollen bare én gang, men da med kontrolldrinken lettmelk. Forsøkspersonene i hver aldersgruppe ble randomisert til en av de to gruppene. For bedre oversikt over studiedesign og inndeling i grupper, se figur 3.1. For bedre oversikt over forsøkspersonenes karakteristika, se tabell 3.2 og 3.3.



Figur 3.1: Oversikt over randomisering av forsøkspersoner til de ulike gruppene.

Tabell 3.2: Antropometriske data for de yngre forsøkspersonene.

	Yngre (myse)	Yngre (lettmelk)
Kjønnsfordeling	♂ = 5 ♀ = 5	♂ = 8 ♀ = 4
Alder	24,6 (1,5)	25,4 (4,4)
Vekt (kg)	70,0 (11,6)	72,8 (12,4)
BMI	23,7 (3,0)	22,9 (2,2)
Fettprosent	21,5 (6,4)	19,1 (7,2)

Tabell 3.3: Antropometriske data for de eldre forsøkspersonene

	Eldre (myse)	Eldre (lettmelk)
Kjønnsfordeling	♂ = 5 ♀ = 3	♂ = 5 ♀ = 2
Alder	72,6 (2,3)	76,1 (4,1)
Vekt (kg)	74,2 (11,3)	69,0 (8,5)
BMI	23,9 (2,5)	22,7 (1,7)
Fettprosent	25,4 (6,8)	26,5 (7,6)
Triglyserider (mmol/L)	1,03 (0,22)	1,10 (0,43)
Kolesterol (mmol/L)	5,63 (1,75)	6,30 (1,11)
Glukose (mmol/L)	5,39 (0,53)	5,16 (0,45)
HDL (mmol/L)	1,61 (0,55)	1,66 (0,39)
LDL (mmol/L)	3,49 (1,53)	3,87 (1,02)
VLDL (mmol/L)	0,45 (0,13)	0,54 (0,17)

Det var ingen signifikante forskjeller mellom forsøkspersonene i mysegruppen og lettmelkgruppen innad i de to alderskategoriene, verken med hensyn til kroppsvekt, BMI (body mass index) eller LBM (lean body mass). Hos de eldre, tenderte lettmelkgruppen til å ha høyere alder enn mysegruppen ($P=0,07$).

3.3 Forsøksprotokoll

3.3.1 Treningsprotokoll

Treningsprotokollen som ble gjennomført på hovedtestdagen besto av øvelsene beinpress og kneekstensjon. I begge øvelser trente forsøkspersonene på en vekt tilsvarende 8RM, beregnet på bakgrunn av tilvenningsøkter gjennomført i forkant av hovedtestdagen. For både beinpress og kneekstensjon ble det gjennomført fire serier på 8 repetisjoner, der nytt sett ble påbegynt hvert 3. minutt. Forsøkspersonene trente beinpress først, og det ble derfor også gjennomført to oppvarmingssett på denne øvelsen, med 10 repetisjoner på 70 og 90 % av 8RM-vekt. Forsøkspersonene avsto fra trening de siste to dagene før testing, slik at de skulle være uthvilte og fullt restituert til hovedtestdagen.

3.3.2 Tilvenning til treningsprotokollen

Forsøkspersonene i den yngre gruppen gjennomførte to tilvenningsøkter, mens de eldre gjennomførte opptil seks tilvenningsøkter, avhengig av treningsstatus. Hver tilvenningsøkt var i utgangspunktet lik den som ble gjennomført under hovedtestdagen, men for de eldre var det først under de siste tilvenningsøktene at treningsmotstanden faktisk tilsvarte 8RM. Flere av de

eldre var ikke vant med å trene med så tung motstand, og det var derfor hensiktsmessig å øke vektene gradvis. Ved hjelp av tilvenningsøktene ble forsøkspersonene gjort kjent med øvelsene som skulle gjennomføres under hovedtestdagen, 8RM ble kartlagt, i tillegg til at riktige innstillinger for apparatene ble registrert.

3.3.3 Ernæring

Forsøkspersonene fulgte en standardisert diett dagen før hovedtestdagen, under hovedtestdagen, og frem til den siste MVC-testen neste dag (isometrisk test som gir et mål på maksimal styrke i knestrekkerne). Mengde mat ble beregnet på bakgrunn av kroppsvekt. Forsøkspersonene møtte fastende mellom 07.00 og 08.00 på hovedtestdagen, tok en fastende blodprøve, før de fikk frokost bestående av havregrøt lagd av havregryn, vann og olje. Forsøkspersonene fikk også 2-4 t-skjeer sukker og valgfri mengde kanel. Frokosten ble inntatt 145 min før den første muskelbiopsien.

Umiddelbart etter treningsøkten inntok forsøkspersonene en av de tre proteindrikkene. I utgangspunktet skulle drikkene være identiske med hensyn til mengde protein, karbohydrat og fett, men som tabell 3.4 viser, var det noe forskjell mellom drikkene.

Tabell 3.4: Protein-, fett-, karbohydrat- og leucin-innhold i de tre drikkene.

Per servering:	Nativ myse	WPC-80	Lettmelk
Protein (g)	22,4	20,9	20,8
Fett (g)	6,9	6,7	6,3
Karbohydrat (g)	40,7	42,0	38,2
Leucin (g)	2,7	2,2	2,0

De to mysefraksjonene fremstilles på forskjellige måter. Mens den native mysen fremstilles via en ren filtrasjonsteknikk, er WPC-80 det man sitter igjen med etter osteproduksjon. Proteinene i WPC-80 er denaturert etter prosessering inkludert varme- og syrebehandling, og dette er ikke tilfellet ved fremstilling av den native mysen (Laahne, 2013). Når det gjelder proteinene i lettmelk, består disse av 80 % kasein, og bare 20 % myse (Phillips et al., 2005), og aminosyresammensetningen i kontrolldrinken var følgelig ulik fra de to mysedrikkene. Det var også forskjeller i aminosyresammensetning mellom de to mysedrikkene (tabell 3.5).

Tabell 3.5: Mengde av ulike aminosyrer i de tre drikkene, oppgitt i gram per drikk.

Mengde per drikk (g)	Nativ myse	WPC-80	Lettmelk
Alanin	1,08	1,01	0,66
Arginin	0,55	0,50	0,68
Asparaginsyre	2,54	2,21	1,56
Cystein	0,59	0,44	0,16
Fenylalanin	0,82	0,68	0,97
Glutaminsyre	3,80	3,56	4,24
Glycin	0,43	0,39	0,39
Histidin	0,45	0,40	0,55
Isoleucin	1,22	1,25	1,02
Leucin	2,73	2,15	1,98
Lysin	2,29	1,92	1,69
Metionin	0,48	0,44	0,51
Prolin	1,11	1,34	2,02
Serin	1,02	1,13	1,16
Treonin	1,12	1,47	0,91
Tyrosin	0,55	0,44	0,73
Valin	1,15	1,19	1,24
Tryptofan	0,48	0,35	0,27
Aminosyrer totalt	22,4	20,9	20,8
Protein totalt	21,2	19,7	20,5
Essensielle aminosyrer	11,3	10,4	9,8
Forgreinede aminosyrer	5,1	4,6	4,3

3.3.4 Muskelbiopsier

For hver testdag ble det tatt fire muskelbiopsier fra *m. vastus lateralis*. Den første muskelbiopsien ble tatt 30 min før treningsøkten startet, mens de øvrige ble tatt 1, 3 og 5 timer etter endt treningsøkt. De to første muskelbiopsiene ble tatt fra det samme snittet i venstre bein, mens de siste to ble tatt fra ett og samme snitt i det høyre beinet. Biopsinålen ble ført i henholdsvis distal og proksimal retning under biopsi én og to, og det samme var tilfellet for biopsi tre og fire. På denne måten unngikk man å ta flere muskelbiopsier fra samme

område i muskelen. Biopsitidspunkt ble i stor grad bestemt på bakgrunn av hva som var mest optimalt med tanke på proteinsyntesemålingene. Tidspunktene er også hensiktsmessige for å studere intracellulær signalering, kanskje med unntak av p38. For bedre oversikt over hovedtestdagen, se figur 3.2.

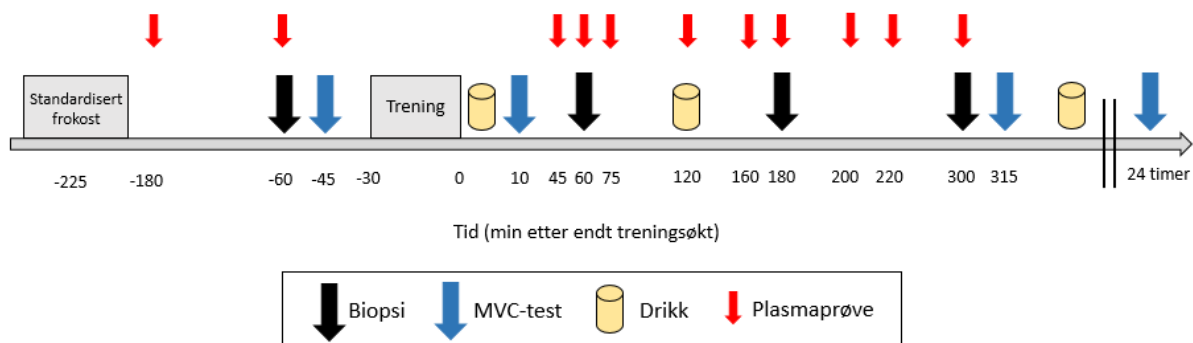
I forkant av snitting og påfølgende muskelbiopsi ble huden vasket med klorhexidin, før lokalbedøvelse (xylocain med adrenalin) ble satt i huden/muskelfascien (AstraZeneca, Södertälje, Sverige). Biopsiene ble tatt med en 6 mm Bergstrømnnål, og en vakuumpumpe ble benyttet for å «suge» muskelvevet inn i nåla. For hvert biopsitidspunkt ble omtrent 150 mg tatt ut, og dette krevde at man førte nåla inn 1-3 ganger. Vevet ble fordelt til ulike formål, før det ble fryst i flytende nitrogen og oppbevart i ultrafryser ved -80°C til videre analyser. Omtrent 50 mg ble benyttet til å måle fosforyleringsstatus av utvalgte proteiner. Øvrig muskelvev ble benyttet til andre analyser som proteinsyntese (50 mg), genekspressjon (20 mg), fraksjonering (50 mg) og immunhistokjemi.

3.3.5 Styrke i knestrekkerne

Maksimal voluntær kontraksjon (MVC) for knestrekkerne (*m. quadriceps femoris*) ble utført i et Gym2000 kneekstensjonsapparat, koblet til en kraftcelle (HBM U2AC2, Darmstadt, Tyskland). Kraftcellen var koblet til en arbeidsstasjon med analyseprogrammet Labwiew 8.2 (National instr., Austin, Texas). MVC-testene ble gjennomført like i forkant av treningsøkten under hovedtestdagen, omtrent 10 minutter etter endt treningsøkt, 5 timer etter endt treningsøkt, samt neste formiddag (omtrent 24 timer etter endt treningsøkt) (Figur 3.2). Individuelle innstillinger fra kneekstensionsstreningen ble benyttet, og testen besto av tre maksimale forsøk på hvert bein. Før de maksimale forsøkene gjennomførte forsøkspersonene to «oppvarmingskontraksjoner» med begge bein på 50 og 80 % av MVC. Oppvarmingskontraksjonene ble holdt i 5-10 sekunder. Under MVC-testen fikk forsøkspersonene beskjed om å yte maksimalt i 2-3 sekunder, og de ble også instruert til å komme så hurtig som mulig opp i maksimal kraft. Hvert bein fikk ett minuts pause mellom hvert forsøk. Ved å gjennomføre disse testene fikk vi informasjon om restitusjonsforløpet etter inntak av de ulike drikkene. MVC-testen som ble gjennomført etter treningsøkt og inntak av den første drikken, ble i gjennomsnitt gjennomført 10 (± 3) min etter endt økt, og det var ingen forskjell mellom gruppene i når testen ble gjennomført.

3.3.6 Blodprøver

Blodprøver ble tatt hyppig, både før og etter treningen (vedlegg 1). Når forsøkspersonene møtte på morgenen, ble det satt inn et venekater for å unngå mange stikk. Det ble i alt tatt 22 plasmaprøver på hovedtestdagen. Plasmaprøvene ble lagret i lithium heparin-rør, kjølt ned til 4°C, og deretter sentrifugert ved 4000 rpm i 10 minutter for å skille plasma fra røde blodceller. Det ble også tatt fem serumprøver i løpet av hovedtestdagen, samt en serumprøve neste formiddag. Serumprøvene sto i romtemperatur i minimum 20 minutter før de ble sentrifugert. Etter sentrifugering ble prøvene pipettert over i prøverør, og frosset ved -80°C. Plasmaprøvene ble analysert for insulinkonsentrasjon og fullt spekter av aminosyrer, og ble også benyttet i beregningen av muskelproteinnedbrytningen (resultater ikke klare). Blodprøveanalysene ble utført ved Først laboratorier (Oslo) og Arkansas Children's Hospital Research Institute (University of Arkansas, USA).



Figur 3.2: Tidskjema for hovedtestdag. Infusjon av stabile isotoper utelatt. Bare plasmaprøver benyttet i beregning av leucinkonsentrasjon er inkludert i tidskjemaet.

3.4 Analyser

3.4.1 Homogenisering

Muskelbiopsiene ble oppbevart på -80°C frem til de ble homogenisert. Under homogenisering 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. For muskelbiter i størrelsesordenen 40-60 µg ble disse mengdene tilsatt. Dersom bitene var under 40 µg eller over 60 µg ble mengden vi tilsatte justert deretter.

Hver muskelprøve ble homogenisert i 2*3-5 sekunder, eller til alt vev var løst opp. Etter homogeniseringen lå prøvene til risting i kjøleskap i 30 minutter. Deretter ble de sentrifugert

på 10000 G i 10 minutter ved 4°C. Supernatanten fra hver prøve ble så overført i 1,5 ml rør, før prøvene på nytt ble sentrifugert ved samme hastighet og temperatur. Supernatanten ble så pipettert over i ett nytt 1,5 ml rør, og fra dette røret ble prøven fordelt i 25 µl aliquouter i 0,2 ml rør. Etter aliquotering ble prøvene frosset ned i -80°C.

3.4.2 Proteinmåling

Totalt proteininnhold i prøvene ble bestemt ved hjelp av RC/DC Protein Assay kit fra BioRad (cat. no. 500-0121, Herkules, CA, USA). Som standardprotein ble bivariate y-globulin benyttet, med et spekter fra 0,125 til 1,5 µg/ml. Prøvene ble fortynnet 1:4, slik at proteinkonsentrasjonen skulle falle innenfor området definert av standardproteinene. Det ble pipettert triplikater á 5 µl av hver enkelt prøve i en 96-brønns mikroplate (Greiner Bio-one International AG, Kremsmünster, Tyskland). Etter å ha tilsatt prøvene, ble det tilsatt 25 µl reagens A*S og 200 µl reagens B i hver brønn. Prøvene sto deretter i et mørkt skap i minimum 15 minutter, før de ble avlest med ASYS Expert 96 fra Biochrom (Cambridge, UK). Proteinkonsentrasjonene (CV<10 %) ble beregnet i KIM Immunochemical Processing Software 32.

3.4.3 Western Blot

Prøvene ble tilsatt Sample Buffer (Invitrogen, Carlsblad, CA, USA), Reducing Agent Buffer (Invitrogen, Carlsblad, CA, USA) og ultrarent vann før videre analyser. Mengde Reducing Agent Buffer og Sample Buffer tilsvarte henholdsvis 3 og 7,5 µl per prøve, mens mengde vann ble justert på bakgrunn av det totale proteininnholdet i prøven. Prøvene ble deretter satt på varmeblokk ved 70°C i 10 minutter, før de ble applisert i NuPAGE Novex bis-tris 4-12% geler fra Invitrogen (Carlsblad, CA, USA). Prøvene fra én forsøksperson ble applisert på samme gel, og det ble satt duplikater for hvert biopsitidspunkt. Det ble applisert 30 µg protein i hver brønn.

Elektroforesen ble kjørt i 90 minutter på 200 volt (XCell SureLocke® MiniCell og XCell II™ Blot Modul, Invitrogen Carlsblad, CA, USA). For å hindre for høy temperatur sto elektroforesekammeret på is under hele kjøringen. Hensikten med å kjøre elektroforesen så lenge var å differensiere p70- og eEF2-båndene så mye som mulig, slik at klippingen av membranene i ettertid ville gå enklere. Blottingen ble kjørt på 30 volt i 90 minutter, og proteinene ble i dette steget overført fra gelen til en PVDF-membran (Cat#162-0177, Bio-Rad, CA, USA).

Etter blottingen ble membranene blokkert i 5 % melkeløsning i 2 timer i romtemperatur. Membranene ble videre kuttet slik at ulike deler av membranen kunne inkuberes i hvert sitt primære antistoff. Inkubering i primært antistoff for fosforylert p70, fosforylert eEF2 og fosforylert p38 ble gjort over natt ved 4°C og svak risting. Neste dag ble membranene vasket 15 min i TBS-T og deretter 3 x 5 min i TBS. Membranene ble deretter inkubert i sekundært antistoff i 1 time ved romtemperatur, etterfulgt av en ny vaskerunde. Bilder ble tatt med ChemiDoc™ MP Imaging System fra Bio-Rad (Hercules, CA, USA) etter at membranene hadde blitt inkubert med Chelimescent Substrate SuperSignal® WestDura (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) i 5 minutter.

Etter at tilfredsstillende bilder var tatt, ble membranene strippet i 10 minutter med Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Videre ble membranene vasket 5 x 1 min i TBS og 3 x 5 min i TBS. Membranene ble på nytt blokkert 2 timer i 5 % melkeløsning, for så å inkuberes i primært antistoff for total p70, total eEF2 og total p38 over natt ved 4°C. Prosessen videre var den samme som dagen i forveien, med unntak av at membranene ble frosset ned etter stripping og vasking. For en mer detaljert oversikt over prosedyren, se vedlegg 2. For oversikt over benyttede antistoffer, se tabell 3.6.

Tabell 3.6: Primær- og sekundærtantistoff benyttet i analysene.

Antistoff	Produsent	Vert	Fortynning	Kat.nr
P70S6 kinase	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#2708
Phospho p70S6 kinase (Thr 389)	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#9234
eEF2	Cell Signaling	Kanin	1:5000	#2332
Phospho eEF2 (Thr 56)	Cell Signaling	Kanin	1:5000	#2331
p38 MAPK	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#8690
Phospho p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	Kanin	1:1000	#4511
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Cell Signaling	Geit	1:3000	#7074

3.5 Statistikk

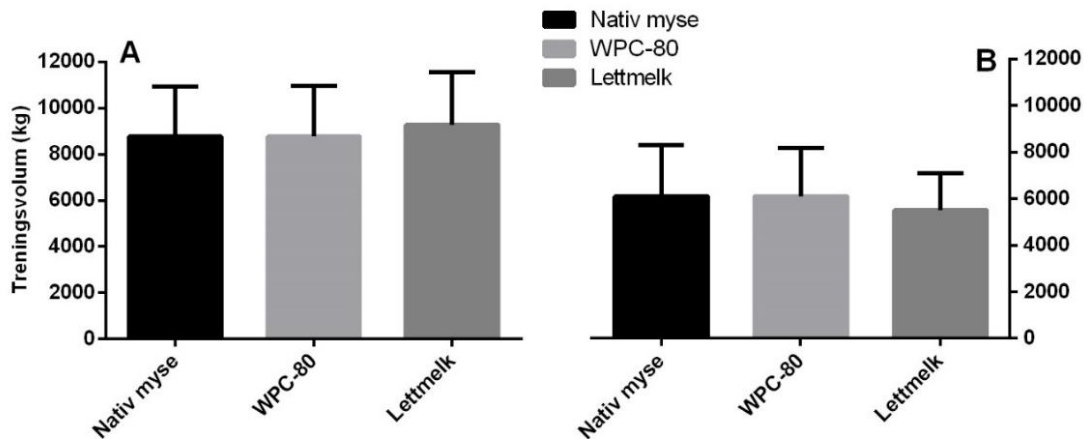
Endring i fosforyleringsstatus fra prebiopsi til øvrige biopsier innad i hver gruppe ble analysert med enveis ANOVA med post-hoc-tester (Dunnnett). Forskjeller i peak aktivering av p70S6K og eEF2 ble analysert med parret t-test i sammenligningen mellom nativ myse og WPC-80, mens sammenligninger mellom mysedrikkene og lettmelk ble gjort med uparret t-test. For p38 α og p38 γ ble drikkene sammenlignet med toveis ANOVA med post-hoc-tester (Sidak). For sammenligninger mellom yngre og eldre, samt kvinner og menn, ble det benyttet

uparret t-test på peakverdi for p70S6K og eEF2, og toveis ANOVA (Sidak) for p38 α og p38 γ . For p70S6K, p38 α og p38 γ ble alle data logtransformert med 10 som grunntall før statistiske beregninger ble gjort. Sammenligninger mellom drikkene for leucinkonsentrasjon ble analysert med toveis ANOVA og post-hoc-test (Tukeys), innad i de to alderskategoriene. Sammenligning mellom yngre og eldre post 60 og post 180 min ble gjort med uparret t-test. For MVC-data ble endring i kraftproduksjon fra pretest til øvrige tester innad i hver gruppe analysert med enveis ANOVA med post-hoc-tester (Dunnett). Sammenligninger mellom drikkene innad i hver alderskategori gjort med toveis ANOVA og post-hoc-tester (Tukeys). Statistisk signifikans var tilfredsstilt ved $P \leq 0,05$. Data er oppgitt som gjennomsnitt \pm standardavvik (SD). Beregninger ble gjort i Microsoft® excel 2011 og Prism® 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4.0 Resultater

4.1 Treningsmotstand

Det var ingen signifikante forskjeller i totalt treningsvolum (repetisjoner x serier x motstand) mellom de tre gruppene bestående av yngre forsøkspersoner, og heller ikke mellom de tre gruppene bestående av eldre (figur 4.1). De yngre hadde et signifikant høyere treningsvolum sammenlignet med de eldre, både for nativ myse, WPC-80 og lettmeik ($P < 0,05$)

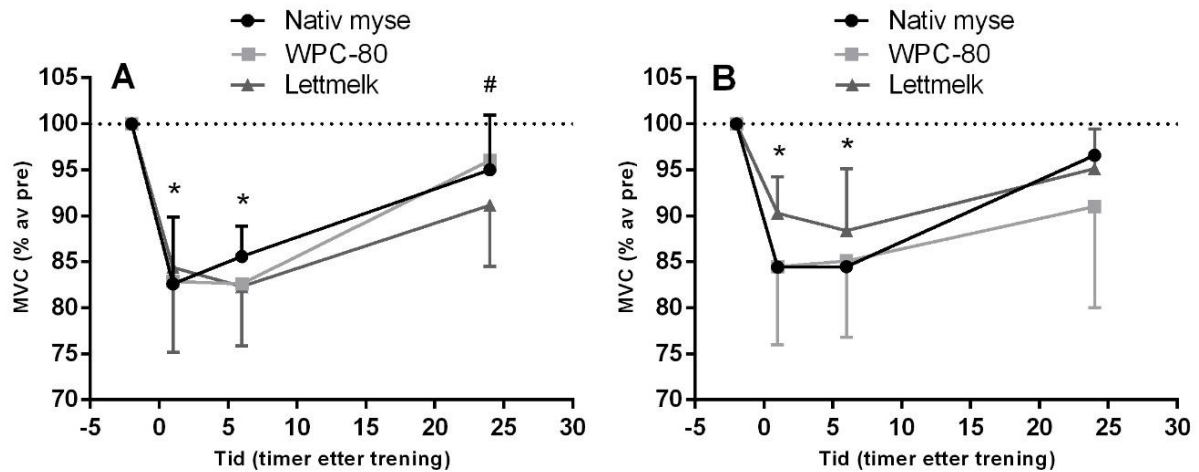


Figur 4.1: Gjennomsnittlig treningsvolum (repetisjoner x serier x motstand) på hovedtestdagen for yngre (A) og eldre (B). Feilfelt viser standardavvik.

4.2 Reduksjon i MVC etter treningsøkten

Både yngre og eldre hadde en signifikant redusert evne til maksimal kraftutvikling 10 minutter og fem timer etter treningsøkten, uansett drikk ($P < 0,05$, figur 4.2). For de yngre var dette også tilfellet 24 timer etter treningsøkten, etter inntak av lettmeik. Etter inntak av nativ myse og WPC-80 var det ingen signifikant forskjell mellom baseline og post 24 timer for de yngre forsøkspersonene. For de eldre var det ingen signifikant forskjell mellom resultatet ved baseline og post 24 timer, uansett drikk.

For de yngre var det ingen signifikante forskjeller i restitusjonsforløpet etter inntak av de tre drikkene. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom de tre gruppene bestående av eldre, men inntak av nativ myse tenderte til å være forskjellig fra WPC-80 post 24 timer ($P < 0,10$). Hos de eldre var det også en antydning til at lettmeikgruppen hadde et lavere kraftfall rett etter økten, sammenlignet med både nativ myse ($P = 0,13$) og WPC-80 ($P = 0,18$). Drikkene ble inntatt rett i forkant av denne MVC-testen, så forskjeller i maksimal voluntær kontraksjonskraft på dette tidspunktet kan ikke tilskrives supplementene.

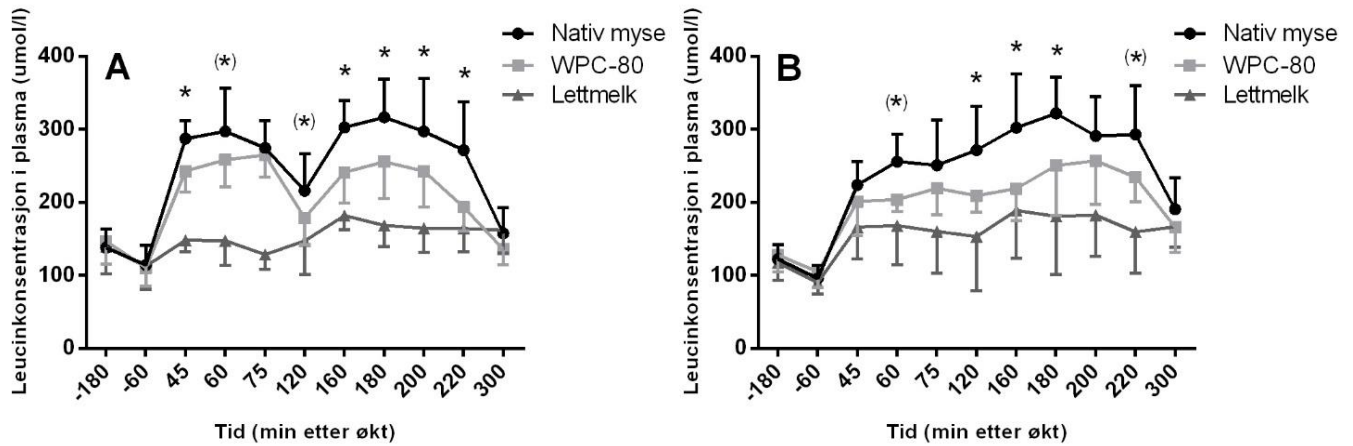


Figur 4.2: Prosentvis endring i maksimal voluntær kontraksjonskraft (MVC) for knestrekkerne etter styrketreningsøkten på hovedtestdagen for yngre (A) og eldre (B). Det er tatt gjennomsnitt av endringene målt for høyre og venstre bein. Stiplet linje viser baselinivå. * indikerer signifikant reduksjon fra baseline etter inntak av alle drikker. # indikerer signifikant forskjell fra baseline etter inntak av lettmelk. Verdier er gjennomsnitt ± standardavvik.

4.3 Leucinkonsentrasjon i plasma

Leucinkonsentrasjonen i blodet varierte avhengig av hvilken drikk som ble inntatt, både for yngre og eldre (figur 4.3). For de yngre resulterte inntak av nativ myse i en signifikant høyere leucinkonsentrasjon i plasma enn hva lettmelk gjorde på alle tidspunkt mellom 45 og 220 minutter etter endt treningsøkt, med unntak av post 120 min ($P < 0,05$, figur 4.3 A). Det samme var tilfellet ved inntak av WPC-80, med unntak av post 120 og 220 min ($P < 0,05$). Inntak av nativ myse resulterte også i signifikant høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80 post 45, 160, 180, 200, 220 min ($P < 0,05$), og tenderte til å være høyere post 60 og 120 min ($P < 0,10$).

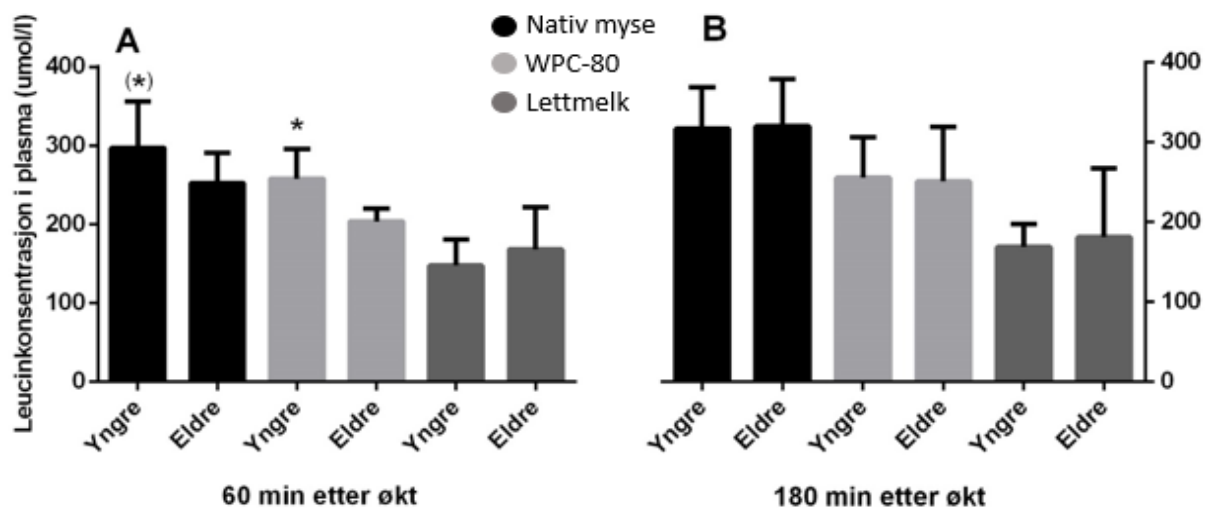
Også for de eldre resulterte inntak av nativ myse i en signifikant høyere leucinkonsentrasjon i plasma enn hva lettmelk gjorde på alle tidspunkt mellom 45 og 220 minutter etter endt treningsøkt ($P < 0,05$, figur 4.3 B). Inntak av WPC-80 resulterte i en signifikant høyere leucinkonsentrasjon enn lettmelk post 75, 180, 200 og 220 min ($P < 0,05$), og det var en tendens til det samme post 120 min ($P < 0,10$). Inntak av nativ myse resulterte også i signifikant høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80 post 120, 160 og 180 min, og tenderte til å resultere i en høyere konsentrasjon post 60 og 220 min ($P < 0,10$).



Figur 4.3: Endring i leucinkonsentrasjon i plasma etter en styrketreningsøkt og inntak av protein for yngre (A) og eldre (B). * indikerer signifikant høyere leucinkonsentrasjon etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 ($P < 0,05$). (*) indikerer tendens til høyere leucinkonsentrasjon etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 ($P < 0,10$). Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik.

Hos de yngre resulterte inntak av nativ myse og WPC-80 i to konsentrasjonsøkninger av leucin, og begge nådde tilsynelatende en topp én time etter inntak av protein. For de eldre var kinetikken noe annerledes, med en mer gradvis økning fra inntak av den første drikken til inntak av den andre. Hos de eldre var leucinkonsentrasjonen i plasma signifikant høyere post 180 min, sammenlignet med post 60 min etter inntak av nativ myse ($P < 0,05$). Det var også en antydning til det samme etter inntak av WPC-80 ($P = 0,14$). For de yngre var det ingen forskjell mellom leucinkonsentrasjonen post 60 min og post 180 min, uansett drikk.

Seksti minutter etter endt treningsøkt og inntak av WPC-80 var leucinkonsentrasjonen signifikant høyere hos de yngre sammenlignet med de eldre ($P < 0,05$), og det var en tendens til det samme etter inntak av nativ myse ($P = 0,10$, figur 4.4 A). Det var ingen forskjell mellom yngre og eldre etter inntak av lettmeik på samme tidspunkt, og heller ingen forskjell mellom yngre og eldre post 180 min, uansett drikk (figur 4.4 B).

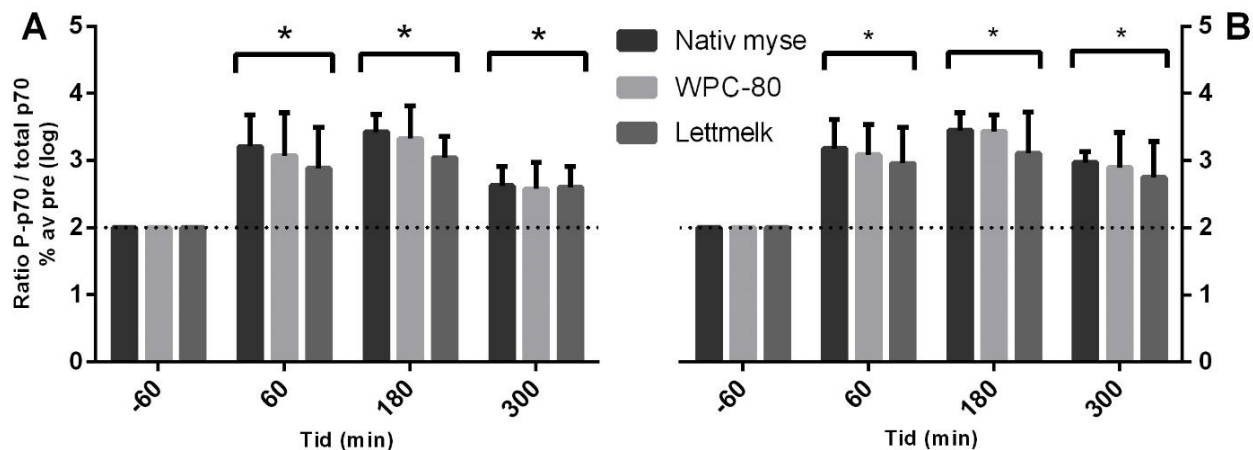


Figur 4.4: Konsentrasjon av leucin i plasma 60 (A) og 180 min (B) etter endt treningsøkt. * indikerer signifikant forskjell mellom yngre og eldre ved inntak av samme drikk ($P < 0,05$). (*) indikerer tendens til forskjell mellom yngre og eldre ved inntak av samme drikk ($P = 0,10$). Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik.

4.4 Intracellulær signalering

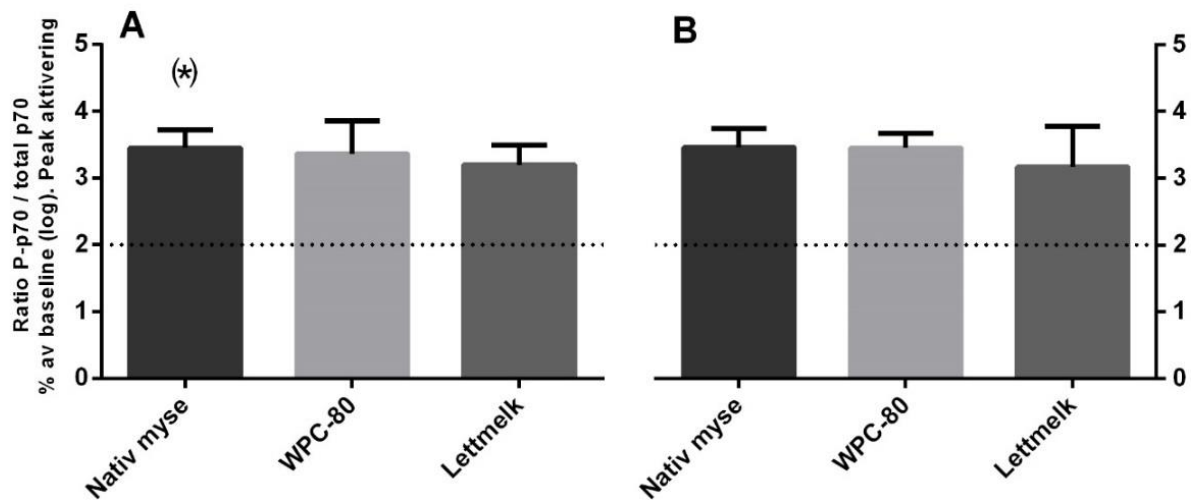
4.4.1 p70S6K

For begge aldersgrupper var det en signifikant økning i ratioen mellom fosforylert og total p70S6K én time, tre timer og fem timer etter økten, uansett drikk (figur 4.5)



Figur 4.5: Fosforyleringsstatus av p70S6K (thr389) én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant økning ($P < 0,05$) fra baseline. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

For de yngre var det en tendens til høyere fosforylering av p70S6K etter inntak av nativ myse, sammenlignet med lettmelk ($P=0,05$, figur 4.6 A). For de eldre var det ingen signifikante forskjeller i aktivering etter inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmelk (figur 4.6 B). Når sammenligninger mellom de tre supplementene ble gjort uavhengig av alder, resulterte inntak av nativ myse i en signifikant høyere peak aktivering av p70S6K, enn lettmelk ($P<0,05$).

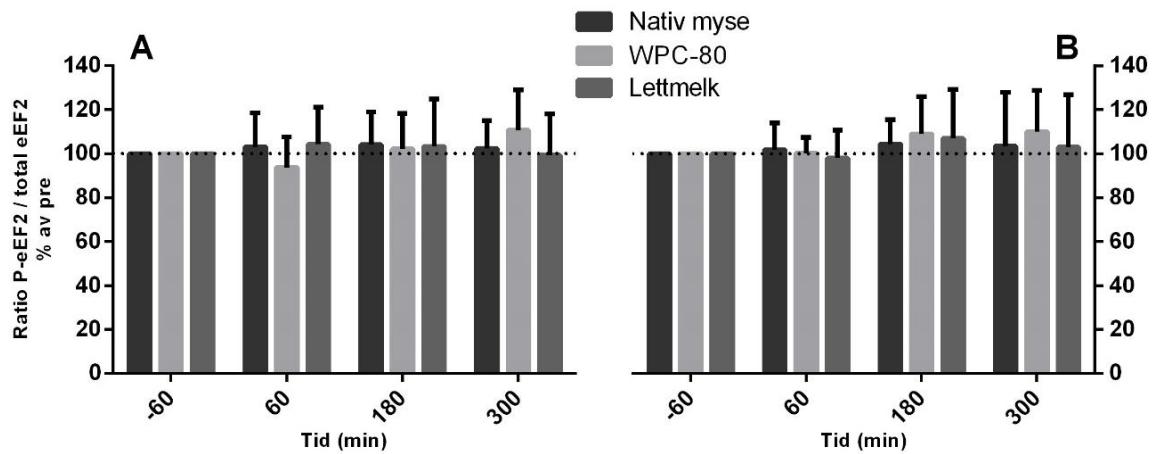


Figur 4.6: Peak aktivering av p70S6K (thr389) i de ulike gruppene for yngre (A) og eldre (B). (*) indikerer tendens til forskjell fra lettmelk i den respektive alderskategori ($P<0,10$). Prebiopsi satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. For hver enkelt FP er tidspunktet med høyest aktivering benyttet i beregningene. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

Det var ingen forskjell i peak aktivering av p70S6K når sammenligninger ble gjort mellom eldre og yngre, uansett drikk. For de yngre ble det heller ikke funnet noen forskjell i peak aktivering av p70S6K mellom kvinner og menn, verken for nativ myse, WPC-80 eller lettmelk. Grunnet færre forsøkspersoner i de eldre gruppene, og en overvekt av menn, ble sammenligninger mellom eldre kvinner og menn gjort uavhengig av drikk. Det var heller ikke her noen forskjell mellom kvinner og menn i peak aktivering av p70S6K.

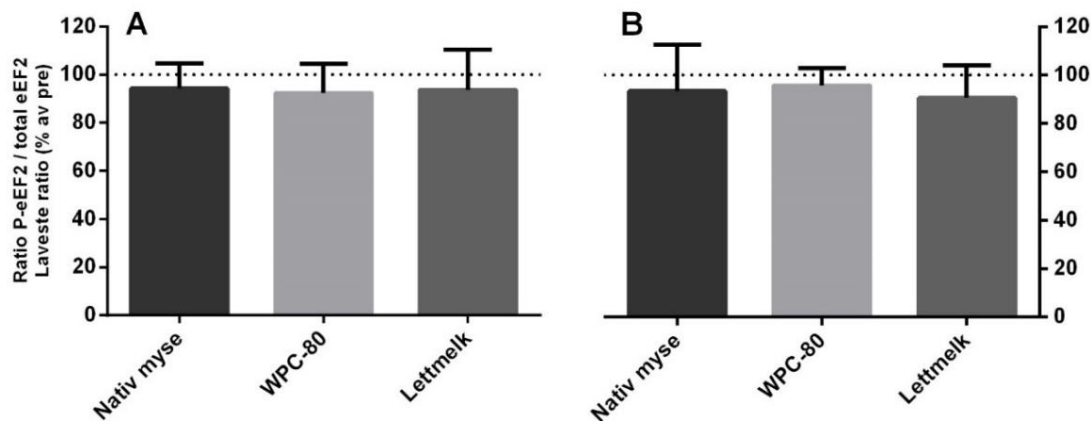
4.4.2 eEF2

Det var ingen endring i ratioen mellom fosforylert og total eEF2 etter inntak av nativ myse, WPC-80 eller lettmelk, verken hos yngre eller eldre (figur 4.7).



Figur 4.7: Fosforyleringsstatus av eEF2 (thr56) én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

eEF2 fremmer proteinsyntesen når den er defosforylert, og derfor ble sammenligner mellom drikkene basert på lavest målte fosforylering for hver FP. Det ble ikke funnet noen forskjell mellom drikkene, verken for de yngre eller de eldre forsøkspersonene (figur 4.8).



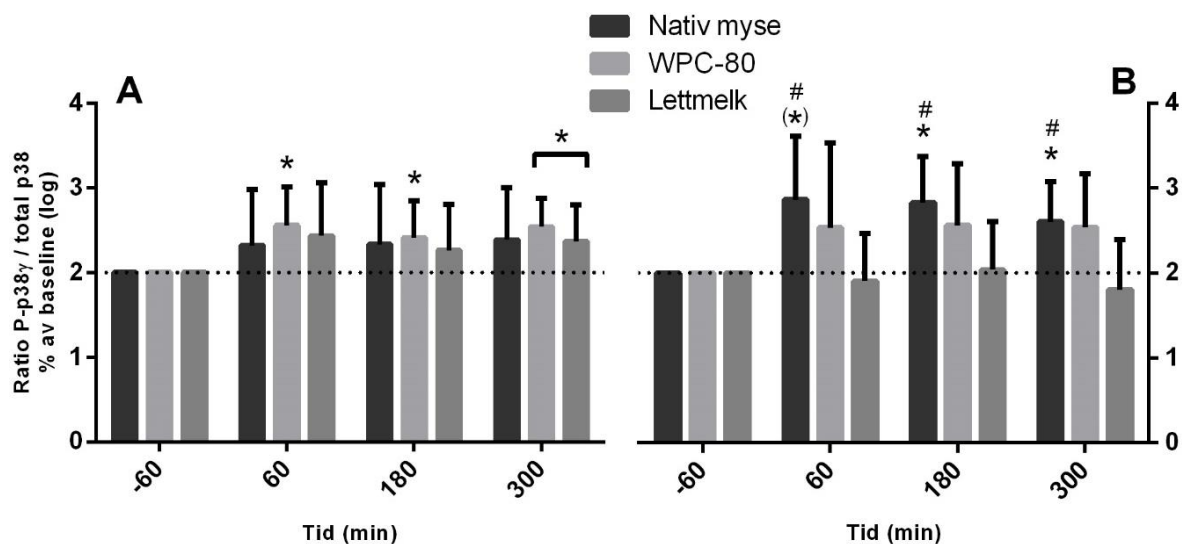
Figur 4.8: Peak aktivering av eEF2 (thr56) i de ulike gruppene for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %. For hver FP er det tidspunktet med lavest fosforylering benyttet i beregningene. Verdier viser gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

Det var ingen forskjell i laveste fosforylering av eEF2 når sammenligninger ble gjort mellom eldre og yngre, uansett drikk. Det var heller ingen forskjeller i aktivering av eEF2 mellom kvinner og menn, verken blant de yngre eller de eldre.

4.4.3 p38 γ (gamma)

For de yngre var det kun inntak av WPC-80 som resulterte i en signifikant økning i ratioen fosforylert/total p38 γ én og tre timer etter treningsøkten ($P < 0,05$, figur 4.9 A). 5 timer etter treningsøkten var det også en signifikant økning etter inntak av lettmelk ($P < 0,05$). For de yngre var det ingen signifikante forskjeller mellom de tre drikkene, uansett tidspunkt.

For de eldre var det kun inntak av nativ myse som resulterte i en signifikant økning i ratioen mellom fosforylert og total p38 γ . Inntak av nativ myse resulterte i signifikant økt p38 γ -aktivering både tre og fem timer etter treningsøkten ($P < 0,05$, figur 4.9 B). Det var også en tendens til økning én time etter økten ($P < 0,10$). Hos de eldre var det også forskjeller mellom de ulike drikkene, og inntak av nativ myse resulterte i signifikant høyere p38 γ -aktivering sammenlignet med lettmelkgruppen, både én time, tre timer og fem timer etter treningsøkten ($P < 0,05$).



Figur 4.9: Fosforyleringsstatus av p38 γ én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt, sammenlignet med baseline for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant økning ($P < 0,05$) fra baseline. (*) indikerer en tendens til økning fra baseline ($P < 0,10$). # indikerer signifikant forskjell fra lettmelk på samme tidspunkt ($P < 0,05$). Verdier viser gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

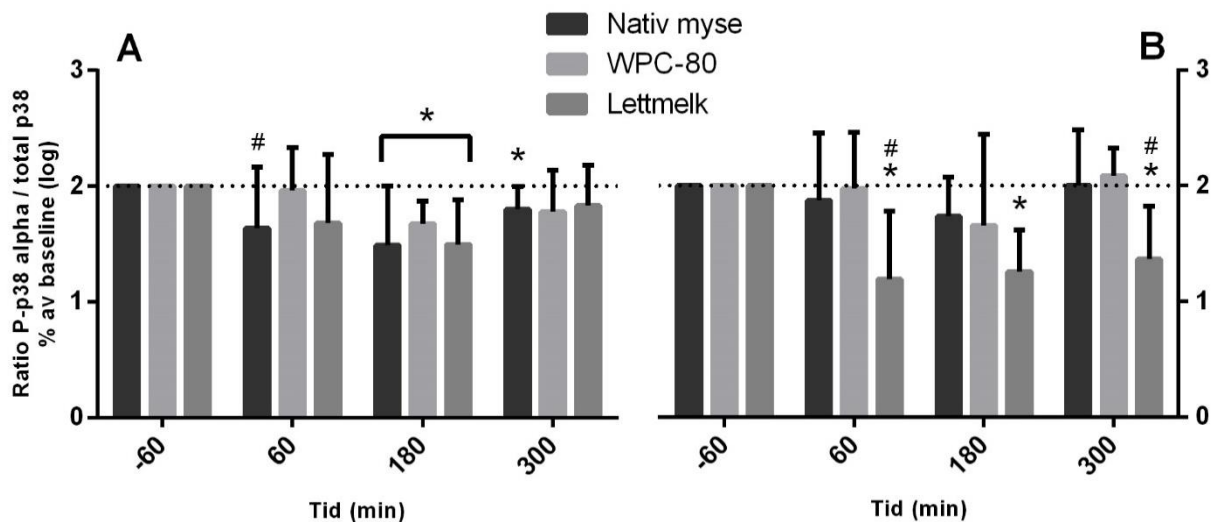
For p38 γ ble det funnet en tendens ($P < 0,10$) til at lavere fosforylering for eldre sammenlignet med yngre etter inntak av lettmelk 60 og 300 minutter etter styrketreningsøkten. Det ble ikke funnet noen forskjell i aktivering av p38 γ mellom kvinner og menn for noen av biopsitidspunktene, uansett drikk. Dette var tilfellet både for yngre og eldre.

4.4.4 p38 α (alpha)

For de yngre var det en signifikant redusert fosforylering av p38 α for alle de tre drikkene 3 timer etter økta ($P < 0,05$, figur 4.10 A), mens bare inntak av nativ myse også resulterte i signifikant redusert fosforylering fem timer etter økta ($P < 0,05$). Én time etter økta var fosforylert p38 α signifikant lavere etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 ($P < 0,05$). Utover dette var det ingen signifikante forskjeller mellom de tre drikkene for de yngre forsøkspersonene (figur 4.10 A).

For de eldre var det kun lettmelkgruppen som hadde en redusert aktivering av p38 α (figur 4.10 B), og dette var tilfellet både én, tre og fem timer etter treningsøkten ($P < 0,05$).

Lettmelkgruppen hadde også signifikant lavere p38 α -aktivering sammenlignet med både nativ myse og WPC-80, både én time og fem timer etter treningsøkten ($P < 0,05$, figur 4.10 B).

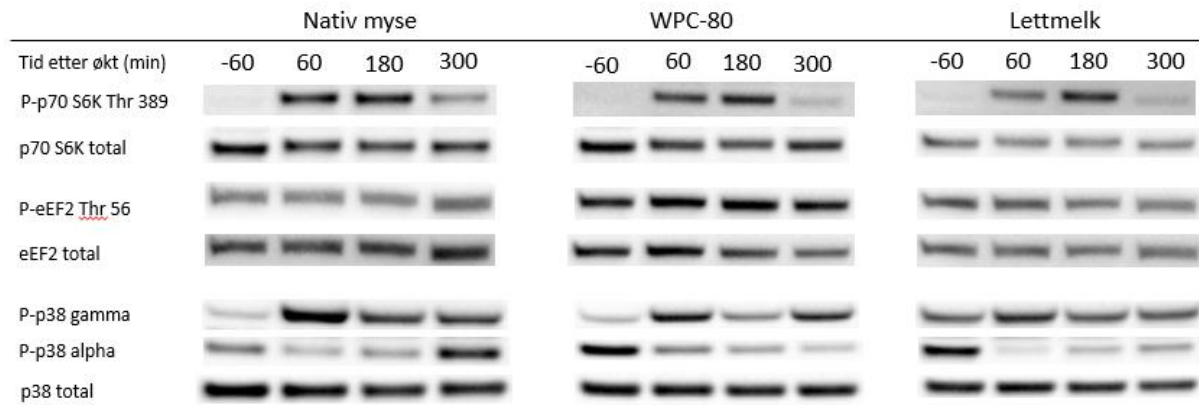


Figur 4.10: Fosforyleringsstatus av p38 α én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt, sammenlignet med baseline for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant reduksjon ($P < 0,05$) fra baseline. # i figur A indikerer signifikant forskjell fra WPC-80 på samme tidspunkt. # i figur B indikerer signifikant forskjell fra nativ myse og WPC-80 på samme tidspunkt ($P < 0,05$). Verdier viser gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.

For p38 α tenderte de eldre i lettmelkgruppen til å ha en lavere aktivering sammenlignet med yngre i samme gruppe én time og fem timer etter treningsøkten. Det var ingen forskjell i p38 α -aktivering mellom eldre og yngre på noen andre tidspunkt, uansett drikk.

Yngre kvinner hadde en høyere p38 α -aktivering enn menn én time etter treningsøkten etter inntak av WPC-80 ($P < 0,05$), samt en tendens til høyere aktivering etter inntak av nativ myse

på samme tidspunkt ($P < 0,10$). Det var ingen forskjell i p38 α -aktivering mellom kvinner og menn på noen andre tidspunkt, uansett drikk. Blant de eldre var det ingen forskjell i aktivering av p38 α mellom kvinner og menn.



Figur 4.11: Representative western blot for proteinene som ble studert.

5.0 Diskusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke aktivering av signaleringsproteinene p70S6K, eEF2 og p38 hos yngre og eldre personer etter en styrketreningsøkt, med påfølgende inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmeik. Både for yngre og eldre resulterte inntak av nativ myse i en høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80, som igjen resulterte i en høyere leucinkonsentrasjon enn lettmeik. Videre var det en signifikant økning i fosforyleringsgrad av p70S6K både hos yngre og eldre én, tre og fem timer etter økten, uansett drikk. Blant de yngre var det en tendens til høyere aktivering etter inntak av nativ myse, sammenlignet med lettmeik ($P=0,054$). Dersom de tre drikkene ble sammenlignet uavhengig av alder, var aktivering av p70S6K signifikant høyere etter inntak av nativ myse, sammenlignet med lettmeik. Det var heller ingen endring i eEF2-aktivering verken hos yngre eller eldre, uansett drikk. Det var ingen forskjell mellom yngre og eldre, eller kvinner og menn, verken for p70S6K eller eEF2. For de yngre forsøkspersonene var det en tendens til økt p38 γ -aktivering, og redusert p38 α -aktivering på de fleste tidspunkt, med minimale forskjeller mellom de tre drikkene. For de eldre forsøkspersonene var fosforylering av både p38 α og p38 γ lavere i lettmeikgruppen, sammenlignet med mysegruppene.

5.1 Leucinkonsentrasjon i plasma

Leucinkonsentrasjonen i blodet varierte i stor grad avhengig av hvilken drikk som ble inntatt. Både for de yngre og de eldre forsøkspersonene resulterte inntak av nativ myse i en høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80, som på sin side resulterte i en høyere leucinkonsentrasjon sammenlignet med lettmeik.

Både for de yngre og de eldre forsøkspersonene økte konsentrasjonen av leucin i plasma frem til 45-60 min etter inntak, før den flatet ut, og dette var tilfellet ved inntak av alle supplementer. De fleste studier viser at konsentrasjonen av leucin i plasma når peak-verdi mellom 30 og 60 minutter etter inntak av myseprotein, og våre funn stemmer således godt overens med litteraturen (Burd et al., 2012; Pennings, Boirie, et al., 2011; Reitelseder et al., 2011; Tang et al., 2009). Leucinkonsentrasjonen for de yngre forsøkspersonene etter inntak av nativ myse og WPC-80 var henholdsvis ~ 300 og ~ 250 $\mu\text{mol/l}$, både en time etter inntak av den første drikk, og en time etter inntak av den andre. For de eldre var konsentrasjonen noe lavere etter inntak av den første drikk. Disse verdiene stemmer godt overens med funnene til Tang et al. (2009) og Burd et al. (2012), mens Reitelseder et al. (2011) og Pennings, Boirie,

et al. (2011) så en noe høyere leucinkonsentrasjon (~500 $\mu\text{mol/l}$). I alle de ovennevnte studier inntok forsøkspersonene omtrent 20 gram myseprotein. Hvorvidt forskjellene i leucinkonsentrasjon i de ulike studiene er reelle, eller et resultat av ulike analysemetoder/apparatur er ikke godt å si.

Hver supplementering med nativ myse, WPC-80 og lettmelk inneholdt henholdsvis 22.4, 20,9 og 20,8 gram protein, og 2.73, 2.15 og 1.96 gram leucin, og det var følgelig som forventet at leucinkonsentrasjonen i plasma gjenspeilet protein- og leucininnholdet i drikkene. Hver supplementering med nativ myse og WPC-80 inneholdt omtrent samme mengde av aminosyrene valin og isoleucin, og opptaket av disse var tilnærmet identisk etter inntak av de to mysedrikkene (resultater ikke presentert). Dette tyder på at det var små forskjeller i fordøyelseshastighet mellom nativ myse og WPC-80. Det er derfor rimelig å anta at den høyere leucinkonsentrasjonen etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 i all hovedsak skyldes ulik leucinmengde i drikkene. Forskjeller i leucinkonsentrasjon mellom inntak av mysedrikkene og lettmelk skyldes nok også til dels ulikt leucininnhold, men her spiller forskjeller i fordøyelseshastighet også en viktig rolle, hvilket man har sett i tidligere studier (Pennings, Boirie, et al., 2011; Tang & Phillips, 2009). I motsetning til myse, vil kasein klumpe seg i det sure miljøet i magesekken, og dermed fordøyes langsommere (Yang, Churchward-Venne, et al., 2012). Det er følgelig som forventet at inntak av lettmelk, som primært består av kasein, resulterer i en tregere konsentrasjonsøkning av leucin i plasma enn nativ myse og WPC-80.

Så langt stemmer våre leucindata forholdsvis godt overens med litteraturen, både med tanke på tid fra inntak til peak konsentrasjon, og også med tanke på forskjeller mellom mysedrikkene og lettmelk. Vi ser derimot forskjeller mellom yngre og eldre sin absorpsjonskinetikk, ved at yngre hadde en høyere leucinkonsentrasjon enn eldre én time etter inntak av den første drikken (med unntak av lettmelk). Volpi et al. (1999) så at en større andel av aminosyrene som ble inntatt ble benyttet i de indre organene hos eldre (høyere splanchnic ekstraksjon), men dette påvirket i liten grad opptaket av aminosyrer til blodet. Andre studier som har sammenlignet leucinkonsentrasjonen i plasma hos yngre og eldre etter inntak av protein, ser heller ingen forskjeller den første timen etter inntak, og konkluderer med at en eventuelt økt splanchnic ekstraksjon i liten grad påvirker mengden aminosyrer som tas opp i sirkulasjonen (Drummond et al., 2008; Koopman et al., 2009). Våre funn indikerer derimot at eldre bruker lengre tid på å fordøye og/eller ta opp aminosyrene etter inntak av mysedrikkene,

men om dette skyldes økt splanchnic ekstraksjon eller andre mekanismer tilknyttet fordøyelse/absorpsjon, er uvisst.

Et interessant funn i flere studier er at konsentrasjonen av aminosyrer i plasma, blant annet leucin, faller raskere hos yngre enn eldre fra en time etter proteininntak og utover (Drummond et al., 2008; Koopman et al., 2009; Pennings, Koopman, et al., 2011). Det spekuleres i om dette kan skyldes problemer i forbindelse med transporten av aminosyrene fra blodet til muskelcellene, og redusert blodstrøm som følge av redusert produksjon eller sensitivitet til nitrogenmonoksid er foreslått som en potensiell årsak (Dillon et al., 2011; Timmerman et al., 2010). Av våre resultater ser det ut til at eldre ikke har den samme reduksjonen i leucinkonsentrasjon som yngre, fra 75 til 120 minutter etter inntak av den første drikken. Dette stemmer godt overens med funnene til andre (Drummond et al., 2008; Koopman et al., 2009; Pennings, Koopman, et al., 2011), og det er ikke utenkelig at dette i større eller mindre grad er en konsekvens av redusert blodstrøm, og dermed leveranse av aminosyrer til muskelcellene. Samtidig må disse funnene sees i sammenheng med at eldre tilsynelatende har en tregere økning i leucinkonsentrasjon enn yngre etter inntak av den første drikken, og det kan dermed være at forskjellene hos yngre og eldre mellom 75 og 120 min skyldes tregere fordøyelse og eller absorpsjon hos de eldre forsøkspersonene. Man kunne også tenke seg at eldre har en mindre total muskelmasse å «fordele» aminosyrene på, og at dette kunne være en del av forklaringen på de ovennevnte funn, tatt i betraktning at vi ikke justerte proteinmengden i forhold til kroppsvekt eller LBM. DXA-resultatene viser riktignok små forskjeller i LBM (lean body mass) hos yngre og eldre i vår studie (51,1 vs. 55,2 kg), og det er følgelig tvilsomt at forklaringen ligger her.

Etter styrketrening og påfølgende proteininntak ser det ut til å være en forholdsvis god korrelasjon mellom peak konsentrasjon av leucin i plasma og proteinsynteseresponsen (Luiking, Deutz, Memelink, Verlaan, & Wolfe, 2014; Tang et al., 2009), og det er rimelig å anta at forskjellene vi ser i leucinkonsentrasjon etter inntak av de ulike drikkene i alle fall til en viss grad kan gjenspeile endringer i muskelproteinsyntesen.

5.2 Intracellulær signalering

5.2.1 p70S6K

Det var en signifikant økning i fosforyleringsgrad av p70S6K både hos yngre og eldre 1, 3 og 5 timer etter økten, uansett drikk. Studier som har undersøkt p70S6K i etterkant av en styrketreningsøkt med påfølgende proteininntak viser nesten utelukkende til økt fosforylering mellom én og fem timer etter endt treningsøkt (Kakigi et al., 2014; Karlsson et al., 2004; Moore et al., 2011; Reitelseder et al., 2011). Den robuste økningen i p70S6K-fosforylering i vår studie er følgelig som forventet. De fleste forsøkspersonene hadde høyest aktivering tre timer etter økten, og dette så ut til å være tilfellet både for yngre og eldre, uavhengig av drikk. Fem timer etter økten ser det ut til at aktiveringen var i ferd med å avta, og dette stemmer overens med funnene til Reitelseder et al. (2011), som ikke fant signifikant økt fosforylering av p70S6K seks timer etter endt treningsøkt, verken ved inntak av myse eller kasein. I vår studie inntok riktignok forsøkspersonene en ny proteindrikk to timer etter endt treningsøkt, og det er ikke utenkelig at p70S6K fortsatt hadde vært aktivert over baseline dersom vi hadde tatt en biopsi også seks timer etter endt treningsøkt.

Blant de yngre var det en tendens til høyere peak aktivering av p70S6K etter inntak av nativ myse, sammenlignet med lettmelk ($P=0,05$). MVC-resultatene viser tilnærmet identisk kraftfall i de tre gruppene rett etter treningsøkten, og dette antyder at belastningen i treningsøkten (og dermed stimuli fra treningsøkten) har vært likt. Forskjellen i p70S6K-aktivering kan derfor med stor sannsynlighet tilskrives forskjeller ved supplementene. Det var en antydning til forskjell mellom mysegruppene og lettmelk også for eldre forsøkspersonene, men forskjellen var ikke signifikant ($P<0,3$), muligens som følge av få forsøkspersoner og stor spredning i lettmelkgruppen. Reitelseder et al. (2011) er en av få som har sammenlignet aktivering av p70S6K etter inntak av myse og kasein, og de fant økt fosforylering i begge grupper 1 og 3,5 timer etter endt treningsøkt, men ingen forskjeller mellom myse og kasein. Lettmelk består av 80 % kasein og 20 % myseprotein, og aminosyresammensetningen i vår lettmelkdrikk og Reitelseder et al. (2011) sin kaseindrikk var følgelig forholdsvis lik. Leucininnholdet i deres myse- og kaseindrikk var henholdsvis 2,06 og 1,53 gram, mens hver supplementering med nativ myse, WPC-80 og lettmelk i vår studie inneholdt henholdsvis 2.73, 2.15 og 1.96 gram leucin. Som følge av ulikt leucininnhold og ulik fordøyeshastighet resulterte inntak av nativ myse og WPC-80 i høyere konsentrasjon av leucin i plasma, sammenlignet med lettmelk. Det er videre ikke utenkelig at forskjellen i leucintilgjengelighet

etter inntak av de tre supplementene resulterte ulik aktivering av Rag GTPasene. Som nevnt tidligere, ser det ut til at Rag GTPasene aktiveres av aminosyrer og translokerer mTOR til lysosommembranen, der Rheb er lokalisert. Det er fristende å spekulere i om forskjellen i p70S6K-aktivering etter inntak av nativ myse og lettmeik hos de yngre forsøkspersonene i alle fall til dels kan være et resultat av ulik leucin-indusert mTOR-aktivering, via Rag eller andre mekanismer.

Reidy et al. (2013) fant høyere aktivering av p70S6K 5 timer etter en treningsøkt ved inntak av en kombinasjon av myse, soya og kasein, sammenlignet med myse alene. Leucininnholdet i de to drikkene var justert slik at mengden var den samme i begge drikker. Identisk leucininnhold og ulik fordøyelseshastighet tatt i betraktning er det ikke veldig overraskende at kombinasjonen av de tre proteinfraksjonene resulterte i større p70S6K-aktivering fem timer etter treningsøkt og inntak, sammenlignet med myseprotein alene. Våre forsøkspersoner inntok supplement både umiddelbart etter, og to timer etter treningsøkten. Den siste drikken ble inntatt bare tre timer før siste biopsi, og når våre drikker i tillegg inneholdt ulik mengde leucin, er det som forventet at vi ikke finner høyere aktivering etter inntak av lettmeik, sammenlignet med nativ myse og WPC-80 på dette tidspunktet.

Årsaken til at det ikke ble funnet forskjeller i p70S6K-aktivering mellom de tre drikkene hos de eldre forsøkspersonene kan være sammensatt. Som nevnt var det færre forsøkspersoner i de eldre gruppene, i tillegg til at spredningen i lettmeikgruppen var stor. Eventuelle forskjeller mellom de tre drikkene var dermed vanskelige å oppdage. Enkelte studier har vist at myse har en større effekt på muskelproteinsyntesen enn kasein hos eldre (Burd et al., 2012; Pennings, Boirie, et al., 2011), mens de to proteinfraksjonene ser ut til å være mer likeverdige hos yngre (Reitelseder et al., 2011). Basert på disse funnene så vi det som mer sannsynlig at vi ville finne forskjeller i signalering mellom mysedrikkene og lettmeik hos de eldre forsøkspersonene, sammenlignet med de yngre, men dette var altså ikke tilfellet. Verken Burd et al. (2012) eller Pennings, Boirie, et al. (2011) undersøkte hypertrofisignalering i tillegg til muskelproteinsyntese, og det er følgelig vanskelig å vite hvorvidt endringene i MPS gjenspeilet forskjeller i fosforylering av for eksempel p70S6K i disse studiene. Også mengden protein inntatt (>40 gram) kan ha gjort det vanskelig å finne eventuelle forskjeller mellom drikkene. Selv om hver supplementering med nativ myse inneholdt mer leucin enn lettmeik, kan det være at den store mengden protein sørget for at også lettmeikgruppen inntok tilstrekkelig med leucin til å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt. Det er mulig at

eventuelle forskjeller mellom drikkene i større grad ville gjort seg gjeldende dersom forsøkspersonene hadde inntatt en lavere mengde protein, hvilket var tilfellet i Burd et al. (2012).

Noe som skiller vår studie fra flere andre studier, er at våre drikker i tillegg til protein inneholdt karbohydrat (ca. 40 g) og fett (ca. 6 g). Det ser riktignok ut til at 20 gram protein alene sørger for en tilstrekkelig insulinrespons til å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt (Apro & Blomstrand, 2010; Glynn et al., 2013; Koopman et al., 2007; Staples et al., 2011), og når forsøkspersonene i vår studie inntok til sammen >40 gram protein, er det tvilsomt om karbohydratene hadde stor påvirkning på mTOR-signaleringsveien. En større insulinrespons sett ved økt karbohydratinntak antas å spille en viktigere rolle med tanke på å bremse proteinnedbrytningen (Borsheim et al., 2004), men også i forbindelse med nedbrytning stilles det spørsmålsteget ved viktigheten av karbohydrater (Figueiredo & Cameron-Smith, 2013).

Kort oppsummert stemmer våre funn godt overens med litteraturen. Den robuste økningen i p70S6K skyldes antagelig kombinasjonen av kraftige treningsstimuli og et stort inntak av protein, og forskjellen vi observerte mellom nativ myse og lettmeik kan være relatert til ulik leucinkonsentrasjon i plasma etter inntak.

5.2.2 eEF2

Det var ingen endring i eEF2-aktivering verken hos yngre eller eldre, uansett drikk. Det er ikke enkelt å trekke frem særtrekk ved ulike studier som kan forklare hvorfor enkelte laboratorier konsekvent finner økt aktivering (Dreyer et al., 2008; Dreyer et al., 2010; Drummond et al., 2008), mens andre ikke gjør det (Hulmi, Tannerstedt, et al., 2009), men det kan se ut til at forsøkspersonenes energistatus ved oppstart av testprotokollen er av betydning (Deldicque et al., 2010). Deldicque et al. (2010) undersøkte hypertrofisignaleringsveien etter en styrketreningsøkt gjennomført fastende, eller etter en karbohydratrik frokost, og så lavere fosforylering av eEF2 før treningsøkningen i sistnevnte gruppe. Frokosten i deres studie ble inntatt én time og 30 minutter før prebiopsi. Forsøkspersonene i vår studie inntok også en standardisert frokost på hovedtestdagen, og denne ble inntatt to timer og 45 minutter før den første muskelbiopsien. Dette ble gjort for at resultatene i størst grad skulle være overførbare til en daglig situasjon, hvor trening sjelden gjennomføres fastende. Frokosten besto av

havregryn, sukker, olivenolje og kanel. Melk ble unngått for at proteininnholdet ikke skulle bli for høyt, og selv om havregryn inneholder noe protein (~10 %), kom mesteparten av næringen i frokosten fra karbohydrater. Basert på funnene til Deldicque et al. (2010) er det sannsynlig at frokosten i vår studie resulterte i en forholdsvis robust insulinrespons, som sammen med noe protein sannsynligvis påvirket hypertrofisignaleringen. Selv om denne responsen nok var i ferd med å avta to timer og 45 minutter etter inntak, er det ikke utenkelig at frokosten resulterte i høyere eEF2-aktivering ved baseline, enn hva tilfellet ville vært om forsøkspersonene ikke hadde inntatt frokost. Med andre ord var sannsynligheten for å finne endring i fosforylering av eEF2 muligens mindre i vår studie, sammenlignet med studier der prebiopsi tas fastende (Dreyer et al., 2008; Dreyer et al., 2010; Drummond et al., 2008). Det kan tenkes at dette er noe av årsaken til at vi ikke finner endringer i aktivering av eEF2 på noe tidspunkt, til tross for en hard treningsprotokoll og et stort proteininntak (>40 gram). Forsøkspersonene i studien til Hulmi, Tannerstedt, et al. (2009) fastet også bare tre timer før prebiopsi, og heller ikke i denne studien så man endring i fosforylering av eEF2. Det skal nevnes at Deldicque et al. (2010) fant redusert fosforylering av eEF2 etter en styrketreningsøkt, uavhengig av om forsøkspersonene hadde inntatt frokost eller ikke. Det er derfor sannsynlig at energistatus ikke er den eneste årsaken til at vi ikke ser noen endring i eEF2-aktivering i vår studie.

I motsetning til mange av studiene som undersøker hypertrofisignalering i forbindelse med styrketrening og proteininntak, valgte vi å benytte forsøkspersoner som hadde erfaring med styrketrening. Dette ble gjort i et forsøk på å ivareta den eksterne validiteten, slik at resultatene i større grad skulle være overførbare til vanlig trening. Hos eldre ser det ut til at p70S6K fosforyleres i større grad hos utrente sammenlignet med trente etter en styrketreningsøkt og påfølgende inntak av myseprotein (Farnfield et al., 2012). Fosforylert p70S6K fremmer som nevnt eEF2-aktivering, og det er derfor mulig at treningsstatus også vil være bestemmende for eEF2-responsen etter en styrketreningsøkt med påfølgende inntak av protein, selv om Farnfield et al. (2012) ikke fant den samme forskjellen i p70S6K-signalering mellom trente og utrente *ynge* personer. I en studie gjort på rotter så man også at fosforylering av p70S6K i etterkant av en styrketreningsøkt i stor grad var avhengig av treningsstatus (Ogasawara et al., 2013). Det er med andre ord ikke utenkelig at forsøkspersonenes treningsstatus også er en del av forklaringen på at vi i motsetning til mange andre ikke finner redusert fosforylering av eEF2.

5.2.3 p38 MAPK

For de yngre forsøkspersonene var det en tendens til økt p38 γ -aktivering, og redusert p38 α -aktivering på de fleste tidspunkt, med minimale forskjeller mellom de tre drikkene. For de eldre forsøkspersonene var fosforylering av både p38 α og p38 γ lavere i lettmelkgruppen, sammenlignet med mysegruppene. Studier som har sett på aktivering av p38 umiddelbart etter en styrketreningsøkt, viser stort sett til en robust aktivering (Deldicque et al., 2008; Hulmi et al., 2012; Moller et al., 2013), men aktiveringen ser ut til å avta innen én time etter endt trening (Karlsson et al., 2004). p38 virker primært å aktiveres som respons på treningsstimuli, og i liten grad som følge av proteininntak (Karlsson et al., 2004). Tidligere studier tatt i betraktning, er det noe overraskende at vi finner endringer i aktivering av p38 α og p38 γ én, tre og fem timer etter endt treningsøkt, men det kan likevel se ut til at forklaringen er forholdsvis enkel.

I motsetning til mange andre har vi valgt å kvantifisere de to isoformene av p38 hver for seg. Holm et al. (2010) får også frem to isoformer av p38 (sannsynligvis p38 γ og p38 α), men kvantifiserer disse sammen. De finner ingen endring i fosforylering av p38 3 og 5,5 timer etter en styrketreningsøkt. Vi finner imidlertid generelt en økt fosforylering av p38 γ og redusert fosforylering av p38 α én, tre og fem timer etter endt treningsøkt. Dersom vi hadde beregnet aktivering for de to isoformene sammen, er det mulig den økte fosforyleringen av p38 γ ville utlignet den reduserte fosforyleringen av p38 α , og at våre funn da ville stemt bedre overens med andre studier, som antyder at den økte fosforyleringen av p38 avtar innen 1 time etter endt trening (Karlsson et al., 2004; Moller et al., 2013). Også Wernbom et al. (2013) får frem to isoformer av p38, og finner en økt fosforylering av begge én time etter en treningsøkt med redusert blodstrøm (okklusjon). Som nevnt, viser de fleste studier som har benyttet en mer tradisjonell styrketreningsprotokoll stort sett til ingen effekt én time etter trening. Funnene i ovennevnte studie er nok derfor et resultat av et mye større stress i form av hypoksi, som er vist å være en av de stimuli som aktiverer p38. Moller et al. (2013) får bare frem ett bånd for p38, og finner i likhet med de fleste andre økt fosforylering umiddelbart etter en styrketreningsøkt. Forfatteren av den nevnte studien spekulerer i om dette ene båndet representerer både p38 α , β og γ (Moller et al., 2013).

Det kan være flere årsaker til at enkelte laboratorier får frem to bånd når de gjør western blot-analyser på p38, mens andre bare får frem ett. I likhet med Wernbom et al. (2013) og Hulmi et al. (2012) kjørte vi elektroforesen i over 85 minutter, og det kan være at vi som følge av dette

oppnådde en separering av de to isoformene av p38. Det er ikke utenkelig at laboratorier som kjører elektroforesen kortere ikke oppnår denne separeringen, og i stedet får frem ett bånd som representerer flere isoformer. Verken Moller et al. (2013) eller Karlsson et al. (2004) oppgir hvor lenge de har kjørt elektroforesen eller hvilken volt de har benyttet, og om deres ene proteinbånd kan være et resultat av at de har kjørt elektroforesen kortere eller ved lavere volt, er derfor uvisst. Mange lab-metodiske valg kan bidra til at ulike laboratorier får frem et ulikt antall proteinbånd for p38. Valg av antistoff, proteingel, runningbuffer, tid og volt for elektroforesen er bare noen av mange potensielle faktorer som vil kunne ha en innvirkning på resultatene.

Hos de eldre var aktivering av både p38 α og p38 γ lavere i lettmelkgruppen, sammenlignet med mysegruppene. Av MVC-resultatene kan vi se at kraftfallet rett etter økten var omtrent 15 % i mysegruppene og omtrent 10 % i lettmelkgruppen. Selv om det ikke var signifikante forskjeller i kraftfall verken mellom lettmelk og nativ myse ($P=0,13$), eller lettmelk og WPC-80 ($P=0,18$), antyder disse målingene at lettmelkgruppen trente på en lavere relativ belastning. Det er videre ikke utenkelig at et ulikt treningsstimuli i større eller mindre grad kan være forklaringen på at aktiveringen av p38 α og p38 γ er lavest i lettmelkgruppen. For de yngre forsøkspersonene var det minimale forskjeller i p38-respons etter inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmelk, og MVC-resultatene for de yngre viser også et tilnærmet identisk kraftfall rett etter styrketreningsøkten. Tilgjengelig data indikerer at p38 i liten grad responderer på inntak av protein, selv om det kan se ut til at en viss basalaktivering er nødvendig for at mTOR-relaterte proteiner skal kunne aktiveres av aminosyrer (Volpi, Kobayashi, Sheffield-Moore, Mittendorfer, & Wolfe, 2003). Det ser derfor ut til at det primært er treningens volum og intensitet som er bestemmende for p38-aktivitet (Holm et al., 2010; Karlsson et al., 2004; Moller et al., 2013; Terzis et al., 2010), og dette støtter opp om at den lavere aktiveringen av p38 i lettmelkgruppen kan være et resultat av en lavere relativ treningsbelastning. Dersom forsøkspersonene i lettmelkgruppen ble utsatt for lavere treningsstimuli, kunne man tenke seg at dette også ville påvirket aktiveringen av p70S6K og eEF2, men som vist tidligere, var det ingen signifikante forskjeller mellom de tre gruppene for de eldre forsøkspersonene i aktivering av verken p70S6K eller eEF2. I motsetning til p38, responderer p70S6K også på inntak av protein (Moore et al., 2011), og enkelte ser også økt aktivering av eEF2 etter proteininntak (Wilson, Moulton, Garlick, Anthony, & Layman, 2012). Det kan derfor være at det store proteininntaket kamuflerte de eventuelle forskjellene i aktivering som følge av ulik

treningsbelastning. Det er med andre ord rimelig å anta at forskjeller i treningsstimuli vil ha større innvirkning på aktiveringen av p38, sammenlignet med aktivering av p70S6K og eEF2.

Williamson et al. (2003) fant at eldre hadde 15 % høyere aktivering av p38 i hvile, sammenlignet med yngre. I den samme studien så de redusert fosforylering av p38 hos eldre rett etter en styrketreningsøkt, men ingen endring hos yngre. Western blot-oppsettet benyttet i våre analyser tillater ikke direkte sammenligninger mellom eldre og yngre sin aktivering av p38 ved baseline, og vi kan derfor ikke vite om eldre hadde høyere aktivering av p38 enn yngre før treningsøkten. Det var en tendens til større reduksjon i fosforylering av både p38 γ og p38 α hos eldre sammenlignet med yngre etter inntak av lettmeik, og dette samsvarer med funnene til Williamson et al. (2003). Denne forskjellen kan som nevnt skyldes lavere treningsstimuli i den eldre lettmeikgruppen, men forklaringen kan også være en annen. p38 aktiveres som tidligere beskrevet av ulike stress-stimuli, og også av de inflammatoriske cytokinene TNF α (tumor necrosis factor α) og IL-1 (Interleukin-1). Nivå av TNF α og IL-1 er vist å være høyere hos eldre sammenlignet med yngre (Kirwan, Krishnan, Weaver, Del Aguila, & Evans, 2001; Paolisso et al., 1998), og kan således være en medvirkende årsak til at p38 tilsynelatende er fosforylert i større grad hos eldre enn yngre i hvile (Williamson et al., 2003). Med et ulikt utgangsnivå, er det ikke utenkelig at responsen til en stimulus vil være forskjellig, og det er følgelig en mulighet for at vi så ulik p38-respons hos yngre og eldre grunnet et ulikt fosforyleringsnivå i hvile. Det er likevel vanskelig å argumentere for hvorfor denne forskjellen skulle gjøre seg gjeldende etter inntak av lettmeik, men ikke nativ myse og WPC-80. Lettmeikgruppen tenderte riktignok til å ha høyere alder enn mysegruppen (76 vs. 73 år), men det er usannsynlig at denne aldersforskjellen vil ha stor effekt på nivå av inflammatoriske cytokiner og dermed aktivering av p38 i hvile. Ulik relativ treningsbelastning står derfor igjen som den mest sannsynlige årsaken til den lavere fosforyleringen av p38 γ og p38 α hos de eldre i lettmeikgruppen.

5.3 Yngre og eldre

Som nevnt, var det enkelte forskjeller mellom yngre og eldre i leucinkinetikk og p38-aktivering, og for disse dataene er aldersaspektet allerede blitt diskutert. Når det gjelder p70S6K og eEF2, som av mine analyser var de mest direkte målene for den anabole responsen, var det ingen forskjeller mellom eldre og yngre, uansett drikk og biopsitidspunkt.

Farnfield et al. (2012) fant vesentlig høyere aktivering av p70S6K etter en styrketreningsøkt og proteininntak hos utrente eldre, sammenlignet med utrente yngre. Etter 12 uker med styrketrening var denne forskjellen nesten borte. Våre forsøkspersoner var forholdsvis godt trent, og alle de yngre forsøkspersonene hadde trent styrke på beina minst en gang per uke det siste halve året. Også mange av de eldre drev med styrketrening, og så godt som alle var veldig aktive. De eldre gjennomførte også flere tilvenningsøkter enn de yngre forsøkspersonene, og dette sørget med stor sannsynlighet for at begge grupper var godt vant med arbeidet som skulle utføres. Funnene til Farnfield et al. (2012) indikerer at treningsstatus nok er viktigere enn alder hva hypertrofisignaler angår, og med tanke på at våre eldre forsøkspersoner var godt trent, er det ikke veldig overraskende at vi ikke finner aldersspesifikke forskjeller i p70S6K- og eEF2-aktivering.

Eldre ser som nevnt tidligere ut til å ha en lavere anabol respons sammenlignet med yngre ved lave proteininntak, selv om styrketrening gjennomføres i forkant av inntaket (Katsanos et al., 2005). Dersom styrketrening kombineres med høyere inntak av protein (>10-15 gram essensielle aminosyrer) viser de fleste studier til lik stimulering av MPS hos yngre og eldre (Drummond et al., 2008; Symons et al., 2011). Det at proteinsyntesen hos yngre og eldre ser ut til å stimuleres i like stort grad etter styrketrening og påfølgende inntak av over 10-15 gram essensielle aminosyrer, er også en indikasjon på at hypertrofisignaleren påvirkes i tilsvarende grad. Våre forsøkspersoner inntok én drikk umiddelbart etter, og en ny drikk to timer etter endt treningsøkt. Hver drikk inneholdt omtrent 20 gram protein, hvorav omtrent 10 gram essensielle aminosyrer. Forsøkspersonene våre inntok med andre ord over den mengden som ser ut til å være nødvendig for å stimulere muskelproteinsyntesen maksimalt etter en styrketreningsøkt, både hos yngre og eldre.

Man kunne tenke seg at forskjellene sett i leucinkinetikk hos yngre og eldre ville gi utslag i ulik aktivering av p70S6K og eEF2, men dette var altså ikke tilfellet. Det er likevel mulig at leveransen av leucin til musklene var noe lavere hos de eldre, men at den reduserte leveransen ikke var av en størrelsesorden som fikk konsekvenser for signaleringen. Som tidligere nevnt, så Drummond et al. (2008) at eldre hadde en noe forsinket proteinsynterespons etter styrketrening og inntak av protein, sammenlignet med yngre. Men til tross for forskjeller i MPS, hadde yngre og eldre en forholdsvis lik aktivering av p70S6K og eEF2 på alle tidspunkt. De fant riktignok en tendens til høyere p70S6K-fosforylering hos de yngre 1 time etter endt trening, og en antydning til det motsatte tre og seks timer etter økten, og således

kunne man kanskje forventet at flere av de eldre skulle oppnå peak aktivering av p70S6K på et senere tidspunkt enn de yngre i vår studie. Våre resultater viste imidlertid at de aller fleste forsøkspersonene oppnådde høyest aktivering av p70S6K tre timer etter endt treningsøkt, uavhengig av alder. Det er likevel viktig å være klar over at de eldre kan ha hatt peak aktivering av p70S6K på et senere tidspunkt enn de yngre, selv om det ikke kommer frem av våre analyser. Det kan for eksempel være at de yngre hadde høyest aktivering av p70S6K 2,5 timer etter økten, mens de eldre først nådde peak aktivering 3,5 timer etter endt treningsøkt.

Ved gjennomføring av studier der man benytter eldre forsøkspersoner, er det også utfordringer i forbindelse med selve treningsøkten. Selv om flere av de eldre hadde erfaring med styrketrening, var nok de færreste vant med den høye treningsmotstanden vi benyttet i vår studie. Det er nok en større utfordring å sørge for at eldre oppnår en motstand tilsvarende 8RM, enn hva tilfellet er for yngre. Flere tilvenningsøkter for de eldre forsøkspersonene var i så måte fornuftig, og MVC-resultatene tyder på at i alle fall forsøkspersonene i mysegruppene trente på omtrentlig lik relativ treningsbelastning.

Til tross for en noe ulik leucinkinetikk, var det altså ingen forskjeller i aktivering av p70S6K og eEF2 mellom yngre og eldre personer. Våre funn stemmer dermed forholdsvis godt overens med andre studier som har sett på aldersspesifikke forskjeller i signalering etter en styrketreningsøkt og påfølgende inntak av over 20 gram protein (Drummond et al., 2008; Farnfield et al., 2012).

5.4 Kvinner og menn

Det var ingen forskjell mellom kvinner og menn i aktivering av p70S6K og eEF2. De fleste studiene som har sammenlignet kvinner og menn i forbindelse med styrketrening og proteininntak, finner ingen kjønnsespesifikke forskjeller i anabol respons hos yngre. Dette gjelder både muskelproteinsyntese, -nedbrytning og hypertrofisignalering i forbindelse med akuttstudier (Dreyer et al., 2010; Fujita, Rasmussen, et al., 2007; Smith et al., 2009), og muskelvekst som følge av treningsintervensjoner (Abe, DeHoyos, Pollock, & Garzarella, 2000; Hubal et al., 2005). For eldre kan det se ut til at det er enkelte kjønnsespesifikke forskjeller, ved at eldre kvinner har en høyere basal proteinsyntese, men en lavere respons til matinntak (Smith et al., 2008). Det ser likevel ikke ut til at aktivering av p70S6K og eEF2 aktiveres i ulik grad hos eldre kvinner og menn (Smith et al., 2008). Det at vi ikke finner noen

kjønnsespesifikke forskjeller i aktivering av disse signaleringsproteinene verken hos yngre eller eldre, stemmer således godt overens med litteraturen.

Yngre kvinner hadde en høyere p38 α -aktivering enn yngre menn én time etter endt treningsøkt og inntak av WPC-80, samt en tendens til høyere aktivering etter inntak av nativ myse på samme tidspunkt. Meg bekjent, er det ingen som tidligere har sammenlignet aktivering av p38 hos kvinner og menn, verken i forbindelse med trening alene, eller trening i kombinasjon med proteininntak. Alle studiene som har undersøkt aktivering av p38 som er referert til i denne oppgaven, har utelukkende benyttet menn som forsøkspersoner. Kraftfallet rett etter økten var likt hos yngre kvinner og menn, og et ulikt treningsstimuli kan derfor med stor sannsynlighet utelukkes som en potensiell årsak til forskjellen i p38 α -aktivering. Når vi heller ikke har målt fosforyleringsgrad av noen proteiner oppstrøms for p38, er det vanskelig å spekulere i årsaken til denne kjønnsespesifikke forskjellen.

5.5 Hypertrofisignalering, muskelproteinsyntese og muskelvekst

Selv om økt aktivering av p70S6K, eEF2 og til dels p38 bidrar til økt proteinsyntese, er det viktig å erkjenne at man ikke kan si noe om endringer i muskelproteinsyntesen, uten faktisk å måle den. Og i neste steg, selv om muskelproteinsyntese og –nedbrytning gir oss informasjon om hvorvidt det foregår en akkumulering eller reduksjon av muskelvev innenfor et bestemt tidsrom, er det like fullt viktig å være klar over at de akutte endringene i MPS og MPN ikke nødvendigvis reflekterer de muskulære adaptasjonene som skjer over tid. Avslutningsvis i denne oppgaven vil jeg derfor trekke fram noen studier som har undersøkt sammenhengen mellom hypertrofisignalering, muskelproteinsyntese og muskelvekst, og fortløpende diskutere våre funn opp mot disse studiene.

Av de proteinene som ble analysert i vår studie, tyder tilgjengelige data på at det er fosforylering av p70S6K som i størst grad korrelerer med muskelproteinsyntesen. Kumar, Selby, et al. (2009) så en korrelasjon mellom fosforylering av p70S6K og MPS etter en styrketreningsøkt for yngre personer, men ikke for eldre. Atherton et al. (2010) viste også at aktivering av p70S6K i stor grad gjenspeilet muskelproteinsyntesen de første to timene etter proteininntak i fravær av treningsstimuli, men ikke de påfølgende tre timene. Også etter en styrketreningsøkt og påfølgende proteininntak ser det ut til at fosforylering av p70S6K korrelerer med proteinsynteseresponsen (Burd, Holwerda, et al., 2010). Det at de fleste

forsøkspersonene i vår studie har høyest aktivering av p70S6K tre timer etter endt treningsøkt, er dermed en indikasjon på at også muskelproteinsyntesen er større på dette tidspunktet, sammenlignet med én og fem timer etter treningsøkten. Terzis et al. (2008) fant at p70S6K-aktivering etter en styrketreningsøkt også i stor grad predikerte økning i muskelmasse og -styrke som følge av 14 uker med styrketrening. Det er likevel verdt å merke seg at andre ikke ser noen sammenheng mellom aktivering av p70S6K og muskelvekst (Mitchell et al., 2012), og Mitchell et al. (2014) fant heller ingen korrelasjon mellom økning i MPS etter en styrketreningsøkt, og økning i muskelmasse som følge av 16 uker med styrketrening hos de samme forsøkspersonene. At hypertrofisignaleringen ikke alltid reflekterer synteresresponsen kan være et resultat av flere faktorer. Blant annet kan det se ut til muskelproteinsyntesen kan stimuleres maksimalt, selv ved en submaksimal aktivering av p70S6K (Crozier, Kimball, Emmert, Anthony, & Jefferson, 2005). Sistnevnte studie ble riktignok gjennomført på rotter, men resultatene understreker likefullt at man ikke kan trekke konklusjoner om skjelettmuskulaturens proteinsyntese, utelukkende basert på fosforylering av proteinkinaser, elongeringsfaktorer og transkripsjonsfaktorer. Fraværet av sammenheng kan skyldes flere ting, og blant annet er det viktig å reflektere over hvorvidt 50 mg fra for eksempel *vastus lateralis* faktisk gjenspeiler det som skjer i resten av muskelen, muskelgruppen, eller for den saks skyld; andre muskler.

For å overføre de ovennevnte funnene til våre resultater, betyr dette at selv om vi finner forskjell i p70S6K-aktivering mellom nativ myse og lettmelk, er det likevel ikke sikkert muskelproteinsyntesen ble påvirket i ulik grad. Og selv om vi ikke ser endringer i fosforylering av eEF2, betyr naturligvis ikke dette at muskelproteinsyntesen ikke blir stimulert. Og på samme måte; selv om man finner forskjeller i den akutte MPS-responsen etter gjennomføring av ulike treningsprotokoller eller inntak av ulik type eller mengde protein, er det ikke sikkert disse forskjellene predikerer de muskulære tilpasningene som skjer over uker og år.

Resultater fra analyser på proteinsyntese og proteinnedbrytning fra denne studien vil foreligge i løpet av de neste månedene. Til høsten påbegynnes også en treningsintervensjon, der effekten av styrketrening i kombinasjon med supplementering av nativ myse og lettmelk skal undersøkes. Innen ett år vil vi dermed kunne si om de akutte endringene i leucin- og hypertrofisignalering presentert i denne oppgaven gjenspeiler endringer i muskelmasse og muskelfunksjon over tid.

6.0 Konklusjon

Hovedhensikten med denne studien var å undersøke aktivering av signaleringsproteinene p70S6K, eEF2 og p38 hos yngre og eldre personer etter en styrketreningsøkt, med påfølgende inntak av nativ myse, WPC-80 og lettmeik. Det var en signifikant økning i fosforyleringsgrad av p70S6K både hos yngre og eldre én, tre og fem timer etter økten, uansett drikk. Inntak av nativ myse resulterte i høyere aktivering av p70S6K, sammenlignet med lettmeik. Det var ingen endring i eEF2-aktivering verken hos yngre eller eldre, uansett drikk, og det var ingen forskjell mellom yngre og eldre, kvinner eller menn verken for p70S6K eller eEF2. Når det gjelder p38-fosforylering, var det for de yngre forsøkspersonene en tendens til økt p38 γ -aktivering, og redusert p38 α -aktivering på de fleste tidspunkt, med minimale forskjeller mellom de tre drikkene. For de eldre forsøkspersonene var fosforylering av både p38 α og p38 γ lavere i lettmeikgruppen, sammenlignet med mysegruppene.

Studiens hypotese om at inntak av nativ myse og WPC-80 ville resultere i høyere konsentrasjon av leucin i blodet sammenlignet med lettmeik kan bekreftes. Det samme gjelder hypotesen om at nativ myse ville resultere i høyere leucinkonsentrasjon enn WPC-80.

Hypotesen om at nativ myse ville aktivere signalering til økt proteinsyntese i større grad enn WPC-80, kan ikke bekreftes. Hypotesen om at nativ myse ville aktivere signalering til økt proteinsyntese i større grad enn lettmeik kan bekreftes, på bakgrunn av ulik p70S6K-aktivering.

Hvorvidt forskjellene i leucinkonsentrasjon og hypertrofisignalering etter inntak av de ulike drikkene gjenspeiler forskjeller i proteinsynteserespons er uvisst. For å stadfeste om de ulike proteinproduktene i ulik grad tilrettelegger for muskelvekst er det behov for studier som ser på effekten av styrketrening og inntak av de ulike proteinproduktene over tid. Funnene som er presentert i denne oppgaven gir likevel et innblikk i enkelte intracellulære mekanismer som antas å spille en rolle i forbindelse med musklens adaptasjon til styrketrening og proteininntak.

Referanser

- Abe, T., DeHoyos, D. V., Pollock, M. L., & Garzarella, L. (2000). *Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women*. Eur J Appl Physiol, 81(3), 174-180.
- Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., & Avruch, J. (1998). *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro*. Curr Biol, 8(2), 69-81.
- 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.
- Atherton, P. J., Etheridge, T., Watt, P. W., Wilkinson, D., Selby, A., Rankin, D., . . . Rennie, M. J. (2010). *Muscle full effect after oral protein: time-dependent concordance and discordance between human muscle protein synthesis and mTORC1 signaling*. Am J Clin Nutr, 92(5), 1080-1088.
- Attaix, D., Baracos, V. E., & Pichard, C. (2012). *Muscle wasting: a crosstalk between protein synthesis and breakdown signalling*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 15(3), 209-210.
- Baird, F. E., Bett, K. J., MacLean, C., Tee, A. R., Hundal, H. S., & Taylor, P. M. (2009). *Tertiary active transport of amino acids reconstituted by coexpression of System A and L transporters in Xenopus oocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 297(3), E822-829.
- Balagopal, P., Rooyackers, O. E., Adey, D. B., Ades, P. A., & Nair, K. S. (1997). *Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans*. Am J Physiol, 273(4 Pt 1), E790-800.
- Biolo, G., Maggi, S. P., Williams, B. D., Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (1995). *Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans*. Am J Physiol, 268(3 Pt 1), E514-520.
- Blomstrand, E., Eliasson, J., Karlsson, H. K., & Kohnke, R. (2006). *Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise*. J Nutr, 136(1 Suppl), 269S-273S.
- Borsheim, E., Cree, M. G., Tipton, K. D., Elliott, T. A., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2004). *Effect of carbohydrate intake on net muscle protein synthesis during recovery from resistance exercise*. J Appl Physiol (1985), 96(2), 674-678.
- Bos, C., Metges, C. C., Gaudichon, C., Petzke, K. J., Pueyo, M. E., Morens, C., . . . Tome, D. (2003). *Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans*. J Nutr, 133(5), 1308-1315.
- Burd, N. A., Gorissen, S. H., & van Loon, L. J. (2013). *Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging*. Exerc Sport Sci Rev, 41(3), 169-173.
- Burd, N. A., Holwerda, A. M., Selby, K. C., West, D. W., Staples, A. W., Cain, N. E., . . . Phillips, S. M. (2010). *Resistance exercise volume affects myofibrillar protein synthesis and anabolic signalling molecule phosphorylation in young men*. J Physiol, 588(Pt 16), 3119-3130.

- Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2009). *Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences*. *J Appl Physiol* (1985), 106(5), 1692-1701.
- Burd, N. A., West, D. W., Moore, D. R., Atherton, P. J., Staples, A. W., Prior, T., . . . Phillips, S. M. (2011). *Enhanced amino acid sensitivity of myofibrillar protein synthesis persists for up to 24 h after resistance exercise in young men*. *J Nutr*, 141(4), 568-573.
- Burd, N. A., West, D. W., Staples, A. W., Atherton, P. J., Baker, J. M., Moore, D. R., . . . Phillips, S. M. (2010). *Low-load high volume resistance exercise stimulates muscle protein synthesis more than high-load low volume resistance exercise in young men*. *PLoS One*, 5(8), e12033.
- Burd, N. A., Yang, Y., Moore, D. R., Tang, J. E., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2012). *Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men*. *Br J Nutr*, 108(6), 958-962.
- Chow, L. S., Albright, R. C., Bigelow, M. L., Toffolo, G., Cobelli, C., & Nair, K. S. (2006). *Mechanism of insulin's anabolic effect on muscle: measurements of muscle protein synthesis and breakdown using aminoacyl-tRNA and other surrogate measures*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(4), E729-736.
- Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., Mitchell, C. J., West, D. W., Philp, A., Marcotte, G. R., . . . Phillips, S. M. (2012). *Supplementation of a suboptimal protein dose with leucine or essential amino acids: effects on myofibrillar protein synthesis at rest and following resistance exercise in men*. *J Physiol*, 590(Pt 11), 2751-2765.
- Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., & Phillips, S. M. (2012). *Nutritional regulation of muscle protein synthesis with resistance exercise: strategies to enhance anabolism*. *Nutr Metab (Lond)*, 9(1), 40.
- Coffey, V. G., & Hawley, J. A. (2007). *The molecular bases of training adaptation*. *Sports Med*, 37(9), 737-763.
- Crozier, S. J., Kimball, S. R., Emmert, S. W., Anthony, J. C., & Jefferson, L. S. (2005). *Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle*. *J Nutr*, 135(3), 376-382.
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., . . . European Working Group on Sarcopenia in Older, P. (2010). *Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People*. *Age Ageing*, 39(4), 412-423.
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. *Biochem J*, 429(3), 403-417.
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1358-1375.
- Cully, M., Genevet, A., Warne, P., Treins, C., Liu, T., Bastien, J., . . . Downward, J. (2010). *A role for p38 stress-activated protein kinase in regulation of cell growth via TORC1*. *Mol Cell Biol*, 30(2), 481-495.

- Cuthbertson, D., Smith, K., Babraj, J., Leese, G., Waddell, T., Atherton, P., . . . Rennie, M. J. (2005). *Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle*. *FASEB J*, 19(3), 422-424.
- Dangin, M., Guillet, C., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Bouteloup-Demange, C., Reiffers-Magnani, K., . . . Beaufriere, B. (2003). *The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans*. *J Physiol*, 549(Pt 2), 635-644.
- Deldicque, L., Atherton, P., Patel, R., Theisen, D., Nielens, H., Rennie, M. J., & Francaux, M. (2008). *Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise*. *Eur J Appl Physiol*, 104(1), 57-65.
- Deldicque, L., De Bock, K., Maris, M., Ramaekers, M., Nielens, H., Francaux, M., & Hespel, P. (2010). *Increased p70s6k phosphorylation during intake of a protein-carbohydrate drink following resistance exercise in the fasted state*. *Eur J Appl Physiol*, 108(4), 791-800.
- Dickinson, J. M., Drummond, M. J., Coben, J. R., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2013). *Aging differentially affects human skeletal muscle amino acid transporter expression when essential amino acids are ingested after exercise*. *Clin Nutr*, 32(2), 273-280.
- Dideriksen, K. J., Reitelseder, S., Petersen, S. G., Hjort, M., Helmark, I. C., Kjaer, M., & Holm, L. (2011). *Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals*. *Scand J Med Sci Sports*, 21(6), e372-383.
- Dillon, E. L., Casperson, S. L., Durham, W. J., Randolph, K. M., Urban, R. J., Volpi, E., . . . Sheffield-Moore, M. (2011). *Muscle protein metabolism responds similarly to exogenous amino acids in healthy younger and older adults during NO-induced hyperemia*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(5), R1408-1417.
- Dodd, K. M., & Tee, A. R. (2012). *Leucine and mTORC1: a complex relationship*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(11), E1329-1342.
- Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Pennings, B., Fujita, S., Glynn, E. L., Chinkes, D. L., . . . Rasmussen, B. B. (2008). *Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(2), E392-400.
- 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.
- 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* (1985), 106(4), 1374-1384.
- Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Pennings, B., Fry, C. S., Dhanani, S., Dillon, E. L., . . . Rasmussen, B. B. (2008). *Skeletal muscle protein anabolic response to resistance exercise and essential amino acids is delayed with aging*. *J Appl Physiol* (1985), 104(5), 1452-1461.
- Durham, W. J., Miller, S. L., Yeckel, C. W., Chinkes, D. L., Tipton, K. D., Rasmussen, B. B., & Wolfe, R. R. (2004). *Leg glucose and protein metabolism during an acute bout of resistance exercise in humans*. *J Appl Physiol* (1985), 97(4), 1379-1386.

- Esmarck, B., Andersen, J. L., Olsen, S., Richter, E. A., Mizuno, M., & Kjaer, M. (2001). *Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans*. *J Physiol*, 535(Pt 1), 301-311.
- Evans, K., Nasim, Z., Brown, J., Butler, H., Kauser, S., Varoqui, H., . . . Bevington, A. (2007). *Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells*. *J Am Soc Nephrol*, 18(5), 1426-1436.
- Farnfield, M. M., Breen, L., Carey, K. A., Garnham, A., & Cameron-Smith, D. (2012). *Activation of mTOR signalling in young and old human skeletal muscle in response to combined resistance exercise and whey protein ingestion*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 37(1), 21-30.
- Figueiredo, V. C., & Cameron-Smith, D. (2013). *Is carbohydrate needed to further stimulate muscle protein synthesis/hypertrophy following resistance exercise?* *J Int Soc Sports Nutr*, 10(1), 42.
- Fry, C. S., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Dickinson, J. M., Gundersmann, D. M., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2011). *Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis*. *Skelet Muscle*, 1(1), 11.
- Fry, C. S., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Dickinson, J. M., Gundersmann, D. M., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2013). *Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 68(5), 599-607.
- Fujita, S., Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Cadenas, J. G., Yoshizawa, F., . . . Rasmussen, B. B. (2007). *Nutrient signalling in the regulation of human muscle protein synthesis*. *J Physiol*, 582(Pt 2), 813-823.
- Fujita, S., Dreyer, H. C., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2009). *Essential amino acid and carbohydrate ingestion before resistance exercise does not enhance postexercise muscle protein synthesis*. *J Appl Physiol* (1985), 106(5), 1730-1739.
- Fujita, S., Rasmussen, B. B., Bell, J. A., Cadenas, J. G., & Volpi, E. (2007). *Basal muscle intracellular amino acid kinetics in women and men*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E77-83.
- 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.
- Glynn, E. L., Fry, C. S., Timmerman, K. L., Drummond, M. J., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2013). *Addition of carbohydrate or alanine to an essential amino acid mixture does not enhance human skeletal muscle protein anabolism*. *J Nutr*, 143(3), 307-314.
- Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., Schwartz, A. V., . . . Newman, A. B. (2006). *The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61(10), 1059-1064.
- Greiwe, J. S., Kwon, G., McDaniel, M. L., & Semenkovich, C. F. (2001). *Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(3), E466-471.

- Groen, B. B., Hamer, H. M., Snijders, T., van Kranenburg, J., Frijns, D., Vink, H., & van Loon, L. J. (2014). *Skeletal muscle capillary density and microvascular function are compromised with aging and type 2 diabetes*. *J Appl Physiol* (1985), 116(8), 998-1005.
- Gulati, P., Gaspers, L. D., Dann, S. G., Joaquin, M., Nobukuni, T., Natt, F., . . . Thomas, G. (2008). *Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34*. *Cell Metab*, 7(5), 456-465.
- Harbo, T., Brincks, J., & Andersen, H. (2012). *Maximal isokinetic and isometric muscle strength of major muscle groups related to age, body mass, height, and sex in 178 healthy subjects*. *Eur J Appl Physiol*, 112(1), 267-275.
- Hartman, J. W., Tang, J. E., Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Lawrence, R. L., Fullerton, A. V., & Phillips, S. M. (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.
- Henderson, G. C., Dhatriya, K., Ford, G. C., Klaus, K. A., Basu, R., Rizza, R. A., . . . Nair, K. S. (2009). *Higher muscle protein synthesis in women than men across the lifespan, and failure of androgen administration to amend age-related decrements*. *FASEB J*, 23(2), 631-641.
- Hizli, A. A., Chi, Y., Swanger, J., Carter, J. H., Liao, Y., Welcker, M., . . . Clurman, B. E. (2013). *Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) by cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 regulates its inhibition by eEF2 kinase*. *Mol Cell Biol*, 33(3), 596-604.
- Holm, L., van Hall, G., Rose, A. J., Miller, B. F., Doessing, S., Richter, E. A., & Kjaer, M. (2010). *Contraction intensity and feeding affect collagen and myofibrillar protein synthesis rates differently in human skeletal muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(2), E257-269.
- Hubal, M. J., Gordish-Dressman, H., Thompson, P. D., Price, T. B., Hoffman, E. P., Angelopoulos, T. J., . . . Clarkson, P. M. (2005). *Variability in muscle size and strength gain after unilateral resistance training*. *Med Sci Sports Exerc*, 37(6), 964-972.
- Hulmi, J. J., Kovanen, V., Selanne, H., Kraemer, W. J., Hakkinen, K., & Mero, A. A. (2009). *Acute and long-term effects of resistance exercise with or without protein ingestion on muscle hypertrophy and gene expression*. *Amino Acids*, 37(2), 297-308.
- 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* (1985), 106(5), 1720-1729.
- Hulmi, J. J., Walker, S., Ahtiainen, J. P., Nyman, K., Kraemer, W. J., & Hakkinen, K. (2012). *Molecular signaling in muscle is affected by the specificity of resistance exercise protocol*. *Scand J Med Sci Sports*, 22(2), 240-248.
- Hyde, R., Cwiklinski, E. L., MacAulay, K., Taylor, P. M., & Hundal, H. S. (2007). *Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transceptor, by amino acid availability*. *J Biol Chem*, 282(27), 19788-19798.
- Isidori, A. M., Giannetta, E., Greco, E. A., Gianfrilli, D., Bonifacio, V., Isidori, A., . . . Fabbri, A. (2005). *Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 63(3), 280-293.

- Jones, N. C., Tyner, K. J., Nibarger, L., Stanley, H. M., Cornelison, D. D., Fedorov, Y. V., & Olwin, B. B. (2005). *The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell*. *J Cell Biol*, 169(1), 105-116.
- Kakigi, R., Yoshihara, T., Ozaki, H., Ogura, Y., Ichinoseki-Sekine, N., Kobayashi, H., & Naito, H. (2014). *Whey protein intake after resistance exercise activates mTOR signaling in a dose-dependent manner in human skeletal muscle*. *Eur J Appl Physiol*, 114(4), 735-742.
- Karlsson, H. K., Nilsson, P. A., Nilsson, J., Chibalin, A. V., Zierath, J. R., & Blomstrand, E. (2004). *Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(1), E1-7.
- Katsanos, C. S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2005). *Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids*. *Am J Clin Nutr*, 82(5), 1065-1073.
- Katsanos, C. S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2006). *A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(2), E381-387.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K. L. (2008). *Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response*. *Nat Cell Biol*, 10(8), 935-945.
- Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2010). *Control of translation initiation through integration of signals generated by hormones, nutrients, and exercise*. *J Biol Chem*, 285(38), 29027-29032.
- Kirwan, J. P., Krishnan, R. K., Weaver, J. A., Del Aguila, L. F., & Evans, W. J. (2001). *Human aging is associated with altered TNF-alpha production during hyperglycemia and hyperinsulinemia*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(6), E1137-1143.
- Koopman, R., Beelen, M., Stellingwerff, T., Pennings, B., Saris, W. H., Kies, A. K., . . . van Loon, L. J. (2007). *Coingestion of carbohydrate with protein does not further augment postexercise muscle protein synthesis*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(3), E833-842.
- Koopman, R., Walrand, S., Beelen, M., Gijsen, A. P., Kies, A. K., Boirie, Y., . . . van Loon, L. J. (2009). *Dietary protein digestion and absorption rates and the subsequent postprandial muscle protein synthetic response do not differ between young and elderly men*. *J Nutr*, 139(9), 1707-1713.
- Kraemer, W. J., Solomon-Hill, G., Volk, B. M., Kupchak, B. R., Looney, D. P., Dunn-Lewis, C., . . . Volek, J. S. (2013). *The effects of soy and whey protein supplementation on acute hormonal responses to resistance exercise in men*. *J Am Coll Nutr*, 32(1), 66-74.
- Kumar, V., Atherton, P., Smith, K., & Rennie, M. J. (2009). *Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise*. *J Appl Physiol* (1985), 106(6), 2026-2039.
- Kumar, V., Selby, A., Rankin, D., Patel, R., Atherton, P., Hildebrandt, W., . . . Rennie, M. J. (2009). *Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men*. *J Physiol*, 587(Pt 1), 211-217.

- Laahne, J. A. L. (2013). *Nativt myseprotein gir større og raskere økning av aminosyrer i blod enn behandlende mysefraksjoner og lettmelk, men ikke raskere restitusjon av muskelfunksjon.* (Master), Norwegian school of sport sciences, Oslo.
- Lassar, A. B. (2009). *The p38 MAPK family, a pushmi-pullyu of skeletal muscle differentiation.* J Cell Biol, 187(7), 941-943.
- Li, Y., Inoki, K., Vacratsis, P., & Guan, K. L. (2003). *The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3.* J Biol Chem, 278(16), 13663-13671.
- Louis, M., Poortmans, J. R., Francaux, M., Berre, J., Boisseau, N., Brassine, E., . . . Rennie, M. J. (2003). *No effect of creatine supplementation on human myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis after resistance exercise.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 285(5), E1089-1094.
- Luiking, Y. C., Deutz, N. E., Memelink, R. G., Verlaan, S., & Wolfe, R. R. (2014). *Postprandial muscle protein synthesis is higher after a high whey protein, leucine-enriched supplement than after a dairy-like product in healthy older people: a randomized controlled trial.* Nutr J, 13, 9.
- Metter, E. J., Conwit, R., Tobin, J., & Fozard, J. L. (1997). *Age-associated loss of power and strength in the upper extremities in women and men.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 52(5), B267-276.
- Miller, B. F., Olesen, J. L., Hansen, M., Dossing, S., Cramer, R. M., Welling, R. J., . . . Rennie, M. J. (2005). *Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise.* J Physiol, 567(Pt 3), 1021-1033.
- Mingrone, G., Marino, S., DeGaetano, A., Capristo, E., Heymsfield, S. B., Gasbarrini, G., & Greco, A. V. (2001). *Different limit to the body's ability of increasing fat-free mass.* Metabolism, 50(9), 1004-1007.
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., Parise, G., Bellamy, L., Baker, S. K., Smith, K., . . . Phillips, S. M. (2014). *Acute post-exercise myofibrillar protein synthesis is not correlated with resistance training-induced muscle hypertrophy in young men.* PLoS One, 9(2), e89431.
- Mitchell, C. J., Churchward-Venne, T. A., West, D. W., Burd, N. A., Breen, L., Baker, S. K., & Phillips, S. M. (2012). *Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men.* J Appl Physiol (1985), 113(1), 71-77.
- Miyazaki, M., & Esser, K. A. (2009). *Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals.* J Appl Physiol (1985), 106(4), 1367-1373.
- Moller, A. B., Vendelbo, M. H., Rahbek, S. K., Clasen, B. F., Schjerling, P., Vissing, K., & Jessen, N. (2013). *Resistance exercise, but not endurance exercise, induces IKKbeta phosphorylation in human skeletal muscle of training-accustomed individuals.* Pflugers Arch, 465(12), 1785-1795.
- 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., Tang, J. E., Burd, N. A., Rerich, T., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). *Differential stimulation of myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis with protein ingestion at rest and after resistance exercise.* J Physiol, 587(Pt 4), 897-904.

- Ogasawara, R., Kobayashi, K., Tsutaki, A., Lee, K., Abe, T., Fujita, S., . . . Ishii, N. (2013). *mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle*. *J Appl Physiol* (1985), 114(7), 934-940.
- Ovchinnikov, L. P., Motuz, L. P., Natapov, P. G., Averbuch, L. J., Wettenhall, R. E., Szyszka, R., . . . Hardesty, B. (1990). *Three phosphorylation sites in elongation factor 2*. *FEBS Lett*, 275(1-2), 209-212.
- Paolisso, G., Rizzo, M. R., Mazziotti, G., Tagliamonte, M. R., Gambardella, A., Rotondi, M., . . . D'Onofrio, F. (1998). *Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha*. *Am J Physiol*, 275(2 Pt 1), E294-299.
- Pennings, B., Boirie, Y., Senden, J. M., Gijsen, A. P., Kuipers, H., & van Loon, L. J. (2011). *Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men*. *Am J Clin Nutr*, 93(5), 997-1005.
- Pennings, B., Groen, B., de Lange, A., Gijsen, A. P., Zorenc, A. H., Senden, J. M., & van Loon, L. J. (2012). *Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(8), E992-999.
- Pennings, B., Koopman, R., Beelen, M., Senden, J. M., Saris, W. H., & van Loon, L. J. (2011). *Exercising before protein intake allows for greater use of dietary protein-derived amino acids for de novo muscle protein synthesis in both young and elderly men*. *Am J Clin Nutr*, 93(2), 322-331.
- Phillips, S. M. (2009). *Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects)*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 34(3), 403-410.
- Phillips, S. M., Hartman, J. W., & Wilkinson, S. B. (2005). *Dietary protein to support anabolism with resistance exercise in young men*. *J Am Coll Nutr*, 24(2), 134S-139S.
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Aarsland, A., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1997). *Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans*. *Am J Physiol*, 273(1 Pt 1), E99-107.
- Phillips, S. M., Tipton, K. D., Ferrando, A. A., & Wolfe, R. R. (1999). *Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover*. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 1), E118-124.
- Price, N. T., Redpath, N. T., Severinov, K. V., Campbell, D. G., Russell, J. M., & Proud, C. G. (1991). *Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes*. *FEBS Lett*, 282(2), 253-258.
- Pullen, N., & Thomas, G. (1997). *The modular phosphorylation and activation of p70s6k*. *FEBS Lett*, 410(1), 78-82.
- Rasmussen, B. B., Tipton, K. D., Miller, S. L., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (2000). *An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise*. *J Appl Physiol* (1985), 88(2), 386-392.
- Reidy, P. T., Walker, D. K., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2014). *Soy-Dairy Protein Blend and Whey Protein Ingestion After*

- Resistance Exercise Increases Amino Acid Transport and Transporter Expression in Human Skeletal Muscle.* J Appl Physiol (1985).
- Reidy, P. T., Walker, D. K., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Drummond, M. J., Timmerman, K. L., . . . Rasmussen, B. B. (2013). *Protein blend ingestion following resistance exercise promotes human muscle protein synthesis.* J Nutr, 143(4), 410-416.
- Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I. C., Lund, P., Kristensen, N. B., . . . Holm, L. (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.
- Ryazanov, A. G. (1987). *Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation of elongation factor 2.* FEBS Lett, 214(2), 331-334.
- Ryazanov, A. G., & Davydova, E. K. (1989). *Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation.* FEBS Lett, 251(1-2), 187-190.
- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). *The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1.* Science, 320(5882), 1496-1501.
- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B., & Sandri, M. (2013). *Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy.* FEBS J, 280(17), 4294-4314.
- Schriever, S. C., Deutsch, M. J., Adamski, J., Roscher, A. A., & Ensenauer, R. (2013). *Cellular signaling of amino acids towards mTORC1 activation in impaired human leucine catabolism.* J Nutr Biochem, 24(5), 824-831.
- Shaw, R. J. (2008). *mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal.* Trends Biochem Sci, 33(12), 565-568.
- Smith, G. I., Atherton, P., Reeds, D. N., Mohammed, B. S., Jaffery, H., Rankin, D., . . . Mittendorfer, B. (2009). *No major sex differences in muscle protein synthesis rates in the postabsorptive state and during hyperinsulinemia-hyperaminoacidemia in middle-aged adults.* J Appl Physiol (1985), 107(4), 1308-1315.
- Smith, G. I., Atherton, P., Villareal, D. T., Frimel, T. N., Rankin, D., Rennie, M. J., & Mittendorfer, B. (2008). *Differences in muscle protein synthesis and anabolic signaling in the postabsorptive state and in response to food in 65-80 year old men and women.* PLoS One, 3(3), e1875.
- Southren, A. L., Gordon, G. G., Tochimoto, S., Pinzon, G., Lane, D. R., & Stypulkowski, W. (1967). *Mean plasma concentration, metabolic clearance and basal plasma production rates of testosterone in normal young men and women using a constant infusion procedure: effect of time of day and plasma concentration on the metabolic clearance rate of testosterone.* J Clin Endocrinol Metab, 27(5), 686-694.
- Staples, A. W., Burd, N. A., West, D. W., Currie, K. D., Atherton, P. J., Moore, D. R., . . . Phillips, S. M. (2011). *Carbohydrate does not augment exercise-induced protein accretion versus protein alone.* Med Sci Sports Exerc, 43(7), 1154-1161.

- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Mamerow, M. M., Wolfe, R. R., & Paddon-Jones, D. (2011). *The anabolic response to resistance exercise and a protein-rich meal is not diminished by age*. *J Nutr Health Aging*, 15(5), 376-381.
- Symons, T. B., Sheffield-Moore, M., Wolfe, R. R., & Paddon-Jones, D. (2009). *A moderate serving of high-quality protein maximally stimulates skeletal muscle protein synthesis in young and elderly subjects*. *J Am Diet Assoc*, 109(9), 1582-1586.
- Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). *Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men*. *J Appl Physiol* (1985), 107(3), 987-992.
- Tang, J. E., Perco, J. G., Moore, D. R., Wilkinson, S. B., & Phillips, S. M. (2008). *Resistance training alters the response of fed state mixed muscle protein synthesis in young men*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(1), R172-178.
- Tang, J. E., & Phillips, S. M. (2009). *Maximizing muscle protein anabolism: the role of protein quality*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 12(1), 66-71.
- Terzis, G., Georgiadis, G., Stratakos, G., Vogiatzis, I., Kavouras, S., Manta, P., . . . Blomstrand, E. (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.
- Timmerman, K. L., Lee, J. L., Fujita, S., Dhanani, S., Dreyer, H. C., Fry, C. S., . . . Volpi, E. (2010). *Pharmacological vasodilation improves insulin-stimulated muscle protein anabolism but not glucose utilization in older adults*. *Diabetes*, 59(11), 2764-2771.
- Tipton, K. D., Elliott, T. A., Cree, M. G., Wolf, S. E., Sanford, A. P., & Wolfe, R. R. (2004). *Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise*. *Med Sci Sports Exerc*, 36(12), 2073-2081.
- Tipton, K. D., Ferrando, A. A., Phillips, S. M., Doyle, D., Jr., & Wolfe, R. R. (1999). *Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids*. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1), E628-634.
- Tipton, K. D., Rasmussen, B. B., Miller, S. L., Wolf, S. E., Owens-Stovall, S. K., Petrini, B. E., & Wolfe, R. R. (2001). *Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(2), E197-206.
- Volek, J. S., Volk, B. M., Gomez, A. L., Kunces, L. J., Kupchak, B. R., Freidenreich, D. J., . . . Kraemer, W. J. (2013). *Whey protein supplementation during resistance training augments lean body mass*. *J Am Coll Nutr*, 32(2), 122-135.
- Volpi, E., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Mittendorfer, B., & Wolfe, R. R. (2003). *Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults*. *Am J Clin Nutr*, 78(2), 250-258.

- Volpi, E., Mittendorfer, B., Wolf, S. E., & Wolfe, R. R. (1999). *Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction*. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 1), E513-520.
- Wall, B. T., Hamer, H. M., de Lange, A., Kiskini, A., Groen, B. B., Senden, J. M., . . . van Loon, L. J. (2013). *Leucine co-ingestion improves post-prandial muscle protein accretion in elderly men*. *Clin Nutr*, 32(3), 412-419.
- 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.
- Wernbom, M., Apro, W., Paulsen, G., Nilsen, T. S., Blomstrand, E., & Raastad, T. (2013). *Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle*. *Eur J Appl Physiol*, 113(12), 2953-2965.
- West, D. W., Burd, N. A., Churchward-Venne, T. A., Camera, D. M., Mitchell, C. J., Baker, S. K., . . . Phillips, S. M. (2012). *Sex-based comparisons of myofibrillar protein synthesis after resistance exercise in the fed state*. *J Appl Physiol* (1985), 112(11), 1805-1813.
- Wilkinson, S. B., Tarnopolsky, M. A., Macdonald, M. J., Macdonald, J. R., Armstrong, D., & Phillips, S. M. (2007). *Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage*. *Am J Clin Nutr*, 85(4), 1031-1040.
- Williamson, D., Gallagher, P., Harber, M., Hollon, C., & Trappe, S. (2003). *Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway activation: effects of age and acute exercise on human skeletal muscle*. *J Physiol*, 547(Pt 3), 977-987.
- Wilson, G. J., Moulton, C. J., Garlick, P. J., Anthony, T. G., & Layman, D. K. (2012). *Post-meal responses of elongation factor 2 (eEF2) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) to leucine and carbohydrate supplements for regulating protein synthesis duration and energy homeostasis in rat skeletal muscle*. *Nutrients*, 4(11), 1723-1739.
- Witard, O. C., Jackman, S. R., Breen, L., Smith, K., Selby, A., & Tipton, K. D. (2014). *Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise*. *Am J Clin Nutr*, 99(1), 86-95.
- Wolfe, R. R. (2006a). *Skeletal muscle protein metabolism and resistance exercise*. *J Nutr*, 136(2), 525S-528S.
- Wolfe, R. R. (2006b). *The underappreciated role of muscle in health and disease*. *Am J Clin Nutr*, 84(3), 475-482.
- Wu, X. N., Wang, X. K., Wu, S. Q., Lu, J., Zheng, M., Wang, Y. H., . . . Han, J. (2011). *Phosphorylation of Raptor by p38beta participates in arsenite-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation*. *J Biol Chem*, 286(36), 31501-31511.
- Yang, Y., Breen, L., Burd, N. A., Hector, A. J., Churchward-Venne, T. A., Josse, A. R., . . . Phillips, S. M. (2012). *Resistance exercise enhances myofibrillar protein synthesis with graded intakes of whey protein in older men*. *Br J Nutr*, 108(10), 1780-1788.

Yang, Y., Churchward-Venne, T. A., Burd, N. A., Breen, L., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2012). *Myofibrillar protein synthesis following ingestion of soy protein isolate at rest and after resistance exercise in elderly men*. *Nutr Metab (Lond)*, 9(1), 57.

Tabelloversikt

Tabell 2.1: Studier som har undersøkt effekten av styrketrening og/eller inntak av protein på fosforylering av p70S6K og eEF2 hos yngre og eldre. + indikerer signifikant økning, - indikerer signifikant reduksjon, = indikerer ingen endring, # indikerer signifikant forskjell mellom grupper. Tegn i parentes indikerer tendens til økning fra baseline (*), eller sterk tendens til forskjell mellom grupper (#). Alle biopsier fra m. vastus lateralis.S.19

Tabell 2.2: Studier som har undersøkt effekten av styrketrening og/eller inntak av protein på fosforylering av p38. + indikerer signifikant økning fra baseline, - indikerer signifikant reduksjon fra baseline, = indikerer ikke-signifikant endring. # indikerer signifikant høyere fosforylering sammenlignet med alle andre grupper. Samtlige studier har tatt biopsier fra m. vastus lateralis.S.23

Tabell 3.1: Inklusjon- og eksklusjonskriterier for yngre og eldre.S.31

Tabell 3.2: Antropometriske data for de yngre forsøkspersonene.S.31

Tabell 3.3: Antropometriske data for de eldre forsøkspersonene.S.32

Tabell 3.4: Protein-, fett-, karbohydrat- og leucin-innhold i de tre drikkene.S.33

Tabell 3.5: Mengde av ulike aminosyrer i de tre drikkene, oppgitt i gram per drikk.S.34

Tabell 3.6: Primær- og sekundærantistoff benyttet i analysene.S.38

Figuroversikt

Figur 2.1: Netto proteinbalanse i postabsorptiv fase i fravær av treningsstimuli (A), etter styrketrening i postabsorptiv fase uten påfølgende inntak av protein (B), etter inntak av protein i fravær av treningsstimuli (C) og etter styrketrening med påfølgende inntak av protein (D).S.11

Figur 2.2: Effekt av styrketrening og proteininntak på muskelproteinsyntesen. Basert på figuren til Churchward-Venne, Burd, and Phillips (2012).S.12

Figur 2.3: Endringer i LBM (lean body mass) etter 9 måneder med styrketrening i kombinasjon med inntak av karbohydrat, myse- eller soyaprotein. Verdier viser gjennomsnitt \pm standardavvik. * indikerer signifikant forskjell fra karbohydrat og soyaprotein. Figur basert på resultater fra Volek et al. (2013).S.13

Figur 2.4: Forenklet oversikt over signalveier tilknyttet p70S6K, eEF2 og p38 MAPK. Proteinene det er gjort analyser på i denne studien er merket med gul sirkel. Basert på flere artikler (Cuadrado & Nebreda, 2010; Drummond et al., 2009; Kimball & Jefferson, 2010; Kumar, Atherton, et al., 2009; Miyazaki & Esser, 2009).S.20

Figur 2.5: Endring i kroppssammensetning med økende alder. Figur basert på data fra Balagopal et al. (1997).S.24

Figur 3.1: Oversikt over randomisering av forsøkspersoner til de ulike gruppene.S.31

Figur 3.2: Tidskjema for hovedtestdag. Infusjon av stabile isotoper utelatt. Bare plasmaprøver benyttet i beregning av leucinkonsentrasjon er inkludert i tidskjemaet.S.36

Figur 4.1: Gjennomsnittlig treningsvolum (repetisjoner x serier x motstand) på hovedtestdagen for yngre (A) og eldre (B). Feilfelt viser standardavvik.S.40

Figur 4.2: Prosentvis endring i maksimal voluntær kontraksjonskraft (MVC) for knestrekkerne etter styrketreningsøkten på hovedtestdagen for yngre (A) og eldre (B). Det er tatt gjennomsnitt av endringene målt for høyre og venstre bein. Stiplet linje viser baselinivå. * indikerer signifikant reduksjon fra baseline etter inntak av alle drikker. # indikerer signifikant forskjell fra baseline etter inntak av lettmelk. Feilfelt viser standardavvik.S.41

Figur 4.3: Endring i leucinkonsentrasjon i plasma etter en styrketreningsøkt og inntak av protein for yngre (A) og eldre (B). * indikerer signifikant høyere leucinkonsentrasjon etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 ($P < 0,05$). (*) indikerer tendens til høyere leucinkonsentrasjon etter inntak av nativ myse, sammenlignet med WPC-80 ($P < 0,10$). Feilfelt viser standardavvik.S.42

Figur 4.4: Konsentrasjon av leucin i plasma 60 (A) og 180 min (B) etter endt treningsøkt. * indikerer signifikant forskjell mellom eldre og yngre ved inntak av samme drikk ($P<0,05$). (*) indikerer tendens til forskjell mellom eldre og yngre ved inntak av samme drikk ($P=0,10$). Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik.S.43

Figur 4.5: Fosforyleringsstatus av p70 S6K én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant økning ($P<0,05$) fra baseline. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.43

Figur 4.6: Peak aktivering av p70 S6K (thr389) i de ulike gruppene for yngre (A) og eldre (B). (*) indikerer tendens til forskjell fra lettmelk i den respektive alderskategori ($P<0,10$). Prebiopsi satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. For hver enkelt FP er tidspunktet med høyest aktivering benyttet i beregningene. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.44

Figur 4.7: Fosforyleringsstatus av eEF2 (thr56) én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi satt som 100 %, og verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.45

Figur 4.8: Peak aktivering av eEF2 (thr56) i de ulike gruppene for yngre (A) og eldre (B). For hver FP er det tidspunktet med lavest fosforylering benyttet i beregningene. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.45

Figur 4.9: Fosforyleringsstatus av p38 γ én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt, sammenlignet med baseline for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant økning ($P<0,05$) fra baseline. (*) indikerer en tendens til økning fra baseline ($P<0,10$). # indikerer signifikant forskjell fra lettmelk på samme tidspunkt. Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.46

Figur 4.10: Fosforyleringsstatus av p38 α (alpha) én, tre og fem timer etter endt styrketreningsøkt, sammenlignet med baseline for yngre (A) og eldre (B). Prebiopsi er satt som 100 %, og alle tall er logtransformert med 10 som grunntall. * indikerer signifikant reduksjon ($P<0,05$) fra baseline. # i figur A indikerer signifikant forskjell fra WPC-80 på samme tidspunkt. # i figur B indikerer signifikant forskjell fra nativ myse og WPC-80 på samme tidspunkt ($P<0,05$). Verdier er gjennomsnitt \pm standardavvik. Stiplet linje viser baselinenivå.S.47

Figur 4.11: Representative western blot for proteinene som ble studert.S.48

Forkortelser

BMD	bone mineral density
BMI	body mass index
DXA	dual X-ray absorptiometry
eEF2	eukaryot elongation factor 2
eIF4E	eukaryotic initiation factor of translation-4E
hVps34	human vacoular protein sorting 34
LAT1	large neutral amino acid transporter 1
LBM	lean body mass
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKAPK2/3	MAPK kinase activated protein kinase 2/3
MAP4K3	mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 3
MKK3/6	mitogen activated protein kinase kinase 3/6
MLK3	mitogen ativated protein kinase kinase kinase 11
MPS	muskelproteinsyntese
MPN	muskelproteinnedbrytning
MR	magnetic resonance imaging
MSK-1	mitogen- and stress-activated protein kinase 1
mTORC1/2	mammalian target of rapamycin complex 1/2
MVC	maximal voluntary contraction
NO	nitric oxide
PDK-1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
p70S6K	70-kD S6 protein kinase
Rag GTPase	ras-related guanosin-triphosphate
RCT	randomized controlled trial
Rheb	ras homolog enriched in brain
RM	repetition maximum
SNAT2	sodium coupled neutral amino acid transporter 2
Thr	threonine
TNF α	tumor necrosis factor alpha
tRNA	transfer ribo nucleic acid
TSC2	tuberous sclerosis 2
WPC-80	whey protein concentrate 80
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
p38 MAPK	38-kD mitogen activated protein kinase

Vedlegg 1

FP				
Idealtid	Tid fra økt	Faktisk tid fra økt	1 (07:00)	Kommentar
06:45			Oppmøte	
07:00			Plasma 1 + Serum 1	
07:05			Frokost	
07:30	00:00		Infusjon D5	
08:30	01:00		Plasma 2	
09:00	01:30		Gjøre klar biopsi	
09:30	02:00		Plasma 3 + Serum 2 + UIOserum 1 + PBMC 1 + Biopsi 1	
09:45	02:15		Oppvarm + MVC 1	
10:00	02:30		Økt	
10:30	00:05		Plasma 4	
10:30	00:06		Drikk 1	
10:30	00:05-10		MVC 2	
11:00	00:29		Gjøre klar biopsi	
11:15	00:45		Plasma 5	
11:30	00:59		Plasma 6 + Serum 3 + UIOserum 2 + PBMC 2+ Biopsi 2	
11:45	01:15		Plasma 7	
12:30	02:00		Drikk 2 + Plasma 8	
13:10	02:40		Plasma 9	
13:20	02:50		Bolus 13C	
13:25	02:55		Plasma 10	
13:30	03:00		Plasma 11 + Serum 4 + Biopsi 3	
13:35	03:05		Plasma 12	
13:40	03:10		Plasma 13	
13:49	03:19		Plasma 14	
13:50	03:20		Bolus 15N	
13:55	03:25		Plasma 15	
14:00	03:30		Plasma 16	
14:10	03:40		Plasma 17	
14:20	03:50		Plasma 18	
14:40	04:10		Plasma 19	
15:00	04:30		Plasma 20	
15:15	04:45		Plasma 21	
15:30	05:00		Plasma 22 + Serum 5 + UIOserum 3 + PBMC 3 + Biopsi 4	
15:35	05:05		Oppvarm + MVC 3	
12:30	26:00		Serum 6	

Vedlegg 2

WESTERN BLOT - PROTOKOLL

DAG 0

Running buffer: 200 mL MES running buffer + 3800 mL ultrarent vann

Transfer buffer: 100 mL transfer buffer + 200 mL metanol + 1700 mL ultrarent vann

TBS: 200 mL TBS + 1800 mL ultrarent vann

TBS-T: 200 mL TBS + 1800 mL ultrarent vann + 2 mL tween 20.

Ultrarent vann: 3 L

- Mengde beregnet for 4 bokser. Settes i kjøleskap over natt.

DAG 1

1. KLARGJØRING. BLANDE PRØVER

- Ta TBS og TBS-T ut av kjøleskapet.
- Sett varmeblokk på 60° C (faktisk temperatur: 70° C). Dobbeltsjekk at den faktisk er påslått, og at riktig blokk står i. Hent ut prøver fra fryseren.
- Bland prøve, vann, sample buffer og reducing agent i henhold til «sample preparation mal».
- «Sample preparation mal» finner man under *SFP group* -> *analyselab* -> *SOP-prosedyrer*.
- Print også ut «NuPAGE ELFO WB»-skjema.
- Bland all sample buffer og reducing agent i et felles 1,5 ml rør.
- Tilsett riktig mengde vann i hvert enkelt 0,2 ml rør. Tilsett deretter hver enkelt prøve.
- Sett merkede eppendorfrør på varmeblokk i 10 min ved 70°. Sett på stoppeklokke!

2. MENS PRØVEN STÅR PÅ VARMEBLOKK

- Finn fram: 2 geler til hver boks som skal kjøres, running buffer, antioksidant, elektroforeseboks og GeneOn markør
- Tilsett 2,5 mL antioksidant i 1 L running buffer i egen flaske.
- Husk prøvene på varmeblokka!
- Klipp opp plasten på gelene, og tørk av. Ta av hvit tape og fjern kammen.
- Bruk pasteur-pipette til å skylle brønnene med running buffer + antioksidant.
- Sett gelene i boksen med teksten ut. Dytt gelene godt ned og lukk igjen klemmen.

3. ELEKTROFORESE

- Fyll indre kammer med running buffer + antioksidant (sjekk at det ikke lekker i ytre kammer).
- Sett 5 uL markør i brønn 1 og 10 på begge sider (bruk 1-10 uL-pipette)
- Sett 30 uL prøve i de øvrige brønnene. (Bruk gul 10-100 uL-pipette)
- Pipettér i «motsatt rekkefølge». Før inn i skjema for «NuPAGE ELFO WB» fortløpende.
- Ytre kammer fylles 2/3 fullt med running buffer uten antioksidant.
- Sett på lokk, monter ledninger, slå på og still inn volt (200 V) og tid (90 min).
- Elektroforesen kjøres på ett Brett med is for å hindre for høy temperatur.
- Sjekk at strømmen lager bobler i indre bufferkammer. **40 min pause.**

4. MENS ELEKTROFORESEN GÅR – AKTIVERE PVDF-MEMBRANENE

- Tilsett 1 mL antioxidant i 1 L transfer buffer.
- Klipp opp 2 PVDF-membraner per elektroforese-kammer og legg disse i lyseblå boks. Skriv nummer øverst i høyre hjørne av membranen.
- Finn frem 4 filterpapir og 3 pads per elektroforese-kammer.
- Pads legges i transfer buffer + antioxidant i lilla boks i >15 min (klem ut luftbobler).
- PVDF-membraner aktiveres på følgende måte (i en tilstrekkelig romslig boks):
 - 30 sek i metanol
 - 30 sek i dH₂O
 - 1-2 min i nytt dH₂O
 - 10-15 min i transferbuffer + antioxidant
- Filterpapir legges i transferbuffer i lilla boks like før bruk.

5. BLOTTING

- Finn frem: blottedelen til boksene, lilla bokser, pinsett, spade, blyant, tørkepapir, rulle og gul avfallsboks.
- Slå av, trekk ut ledninger. Ta ut en gel om gangen, og tørk av. Ta ut den fremste gelen først.
- Knekk opp med en spade. Løft av den minste platen fra motsatt side av buen.
- Fjern brønnene. Legg vått filterpapir på gelen, og klem lett sammen.
- Snu opp ned, sett spaden ned i sporet og trykk lett slik at gelen løsner.
- Løft platen forsiktig opp, og se til at gelen nå sitter på filterpapiret.
- Skjær av nedre del av gelen, og lag sandwich:
 - Pad
 - Filterpapir + gel
 - Membran (bruk rulle for god kontakt)
 - Filterpapir
 - Pad
 - Filterpapir + gel
 - Membran (bruk rulle for god kontakt)
 - Filterpapir
 - Pad
- Skyll elektroforesekammer i dH₂O, og monter sandwichen i kammeret. Lukk klemmen.
- Fyll indre kammer med transferbuffer opp til de hvite skruene (sjekk at det ikke lekker).
- Fyll ytre kammer 2/3 fullt med kaldt dH₂O.
- Sett på lokk, monter ledninger. Sjekk at elektrodene sitter i sporene slik de skal.
- Blotting: 30 V, 90 min.

6. NÅR BLOTTING ER IGANGSATT

- Rydd det som kan ryddes.
- Lag 5 % melkeløsning: 20 g melkepulver + 400 mL TBS-T (røres med magnet)
- **60 min pause.**

7. NÅR BLOTNINGEN ER FERDIG: BLOKKERING

- Tøm 5 % melkeløsning i en lyseblå boks. Fyll dH₂O i en lilla boks.
- Slå av, trekk ut ledninger, ta ut og åpne blotmodulen over lilla plastboks.
- Legg pads i dH₂O (må ikke komme i kontakt med deconex). Filtrene kastes. Membraner legges i en boks med TBS.
- Dekk til med parafilm, og sett boksen på gyrorockeren i 2 timer (hastighet: 20).
- Finn glassplate, kniv, linjal, blyant, pasteurpipette, markørvektskjema, og boks med TBS.
- Finn fram rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- Vask elektroforese-kamrene.
- **1 time pause. Ta en treningsøkt!**

8. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- Skyll 2 x 2 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).

9. KUTTING

- Bruk pasteurpipette til å fukte glassplaten
- Legg membranen på glassplaten med proteinsiden opp, og bruk linjal og blyant for å tegne opp hvor det skal kuttes. Kutt på 120, på 82, rett under 62 og rett under 26.
- Skriv nytt navn til høyre på hver membrandel, og kutt i vei.

9. INKUBERING I PRIMÆRT ANTISTOFF (FOSFO-PROTEINER)

- Finn fram antistoff for de fosfoproteinene som skal studeres.
- Lag 1 % melkeløsning: Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T.
- Antistoff tines og spinnes ned.
 - Fosfo p70: #9234S, Fortynning 1:1000, 5 mL + 5 uL («fiskeslukboks»)
 - Fosfo eEF2: Fortynning 1:5000, 10 mL + 2 uL (rør)
 - Fosfo p38; Fortynning 1:1000, 5 mL + 5 uL (rør)
- Pipetter 5 mL 1 % melkeløsning i hvert rør, og pipetter primært antistoff i riktig rør.
- Ta membranene opp av TBS-T-løsningen og rull dem med proteinsiden inn (tallet inn).
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7).
- Sett TBS, TBS-T, dH₂O og 5 % melkeløsning i kjøleskap.
- **Ferdig for dagen!**

DAG 2

10. VASKING

- Ta TBS, TBS-T og melkeløsning ut av kjøleskapet (TBS og TBS-T røres og varmes).
- Bruk pinsett for å ta membranene ut av rørene. Ta vare på rørene med antistoffer (?).
- Legg membranene i lyseblå plastboks og skylt to ganger i TBS-T.
- 3 x 5 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

11. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF

- Lag 1 % melkeløsning: Bland 20 mL 5 % melkeløsning med 80 mL TBS-T med magnet.
- Tilsett 30 mL 1 % melkeløsning i forholdsvis liten plastboks, og tilsett 10 µL sekundært antistoff (goat-anti-rabbit, 1:3000 fortykning).
- Følgende membraner skal ha goat-anti-rabbit som sekundært antistoff: fosfo p70, fosfo eEF2, fosfo rpS6 og fosfo 4E-BP1.
- Legg membranene i løsningen med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- **60 min pause.**

12. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skylt 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- 3 x 5 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

13. BILDER

- Mens membranene vaskes: Finn fram et lite rør og pakk det inn i aluminiumsfolie.
- Bland substratvæske, vend på røret og sett i skap (omtrent 1 mL total mengde per bilde).
- Lag oppsett for billedtagningen. Velg: *new single channel* → *blots* → *chemi hi sensitivity*
- Ta bilder med proteinsiden opp. Velg et bilde og lagre.

14. STRIPPING, VASKING OG BLOKKERING

- Skylt membranene 2-3 ganger i TBS-T.
- Strip membranene med «Restore PLUS Western blot stripping buffer» i 10 min på gyrorocker
- Skylt membranene 5 x 1 min i dH₂O. Benytt ny plastboks.
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).
- Blokkér i 5 % melkeløsning i 2 timer.
- Bland 10 mL 5 % melkeløsning med 40 mL TBS-T (forberedelse til antistoff-inkubering)
- Finn fram rør for primært antistoff-løsning, og merk disse med antistoff, initialer og dato.
- **45 min pause.**

15. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skyll 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- Skyll 2 x 2 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).

16. INKUBERING I PRIMÆRT ANTISTOFF (TOTAL-PROTEINER)

- Finn fram antistoff for de total-proteiner som skal studeres.
- Antistoff tines og spennes ned.
 - Total p70: #2708S, 1:1000, 5 mL + 5 uL. («fiskeslukboks»)
 - Total eEF2: # 2332S, 1:5000, 10 mL + 2 uL (rør)
 - Total p38: 1:1000, 5mL + 5 uL (rør)
- Pipetter 5 mL eller 10 uL 1 % melkeløsning i hvert rør/boks, samt riktig primært antistoff.
- Ta membranene opp av TBS-T-løsningen og rull dem med proteinsiden inn (tallet inn).
- Legg rørene på roller mikser i kjøleskap over natt (hastighet: 7).
- Sett TBS, TBS-T og 5 % melkeløsning i kjøleskap.
- Rydd/vask!
- **Ferdig for dagen!**

DAG 3

17. VASKING

- Ta TBS, TBS-T og melkeløsning ut av kjøleskapet (TBS og TBS-T røres og varmes).
- Bruk pinsett for å ta membranene ut av rørene. Ta vare på rørene med antistoffer (?)
- Legg membranene i lyseblå plastboks og skylt to ganger i TBS-T.
- 3 x 5 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

18. INKUBERING I SEKUNDÆRT ANTISTOFF

- Lag 1 % melkeløsning: Bland 20 mL 5 % melkeløsning med 80 mL TBS-T med magnet.
- Tilsett 30 mL 1 % melkeløsning i forholdsvis liten plastboks, og tilsett 10 uL sekundært antistoff (goat-anti-rabbit, 1:3000 fortytning).
- Følgende membraner skal ha goat-anti-rabbit som sekundært antistoff: fosfo p70, fosfo eEF2, fosfo rpS6 og fosfo 4E-BP1.
- Legg membranene i løsningen med proteinsiden opp, og inkubér i 1 time på gyrorocker (hastighet: 20). Bruk lokk/parafilm.
- **60 min pause.**

19. VASKING

- Tøm ut melkeløsningen fra boksen med membranene.
- Skylt 2 ganger i romtemperert TBS-T.
- 3 x 5 min i TBS-T på gyrorocker (hastighet: 65).
- 3 x 5 min i TBS på gyrorocker (hastighet: 65).

20. BILDER

- Mens membranene vaskes: Finn fram et lite rør og pakk det inn i aluminiumsfolie.
- Bland substratvæske, vend på røret og sett i skap (omtrent 1,5 mL total mengde per bilde).
- Lag oppsett for billedtagningen. Velg: *new single channel* → *blots* → *chemi hi sensitivity*
- Ta bilder med proteinsiden opp. Velg et bilde og lagre.
- Membraner det skal gjøres flere analyser på, vaskes og fryses ned.
- Rydd/vask!

Vedlegg 3



Forespørsel om deltakelse som forsøksperson

Hvordan påvirker forskjellige melkeproteinfraksjoner muskelproteinbalanse hos eldre?

Dette skrevet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltakelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene: Du må være 70 år eller eldre, være normalt aktiv, og ellers kunne gjennomføre styrketrening på beina. Du kan ikke ha laktoseintoleranse eller melkeallergi. Du kan heller ikke bruke noen form for kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende); hvis du gjør det kan du likevel delta som forsøksperson ved at du slutter med tilskuddet senest to uker før prosjektstart. Du kan ikke delta om du er allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende det man får hos tannlegen).

Bakgrunn og hensikt med forsøket

Sarkopeni (aldersrelatert muskelsvinn) har de siste årene fått mye oppmerksomhet da det i tillegg til å redusere funksjon og livskvalitet i hverdagen også disponerer for flere livsstilssykdommer (bla. type II diabetes og osteoporose). Styrketrening og et økt inntak av proteiner har vist seg å kunne motvirke muskelsvinn. Inntak av proteiner har i seg selv en umiddelbar muskeloppbyggende effekt ved at proteinsyntesen øker; og kombinerer vi proteininntak med styrketrening får vi en vesentlig kraftigere effekt. Økningen i proteinsyntesen bestemmes i stor grad av mengden og kvaliteten på proteinet, samt hvor raskt proteinet tas opp i blodet. I tillegg til proteinsyntesen vil også proteinnedbrytningen til enhver tid spille inn på proteinomsetningen i muskulaturen. Sammenliknet med proteinsyntesen vet vi lite om hvordan proteinnedbrytningen påvirkes av proteininntak etter styrketrening. Ny kunnskap om dette kan gi oss bedre forutsetninger for å maksimere utbyttet av styrketrening, som vil være av stor interesse for eldre med tanke på livskvalitet og funksjon i hverdagen.

I denne studien ønsker vi å undersøke den umiddelbare effekten på proteinsyntesen og nedbrytningen av et nyutviklet myseprotein produsert av Tine®. Dette nye myseprotein vil sammenliknes med vanlig lett melk og WPC-80; myseprotein som oftest brukes i vanlig proteinpulver.

Dette er et dobbelt blindet, randomisert, kontrollert studie, som betyr at verken du eller forskerne du kommer i kontakt med vet hvilken drikk du inntar.

Gjennomføringen av forsøket

Forsøket går kort fortalt ut på at du gjennomfører én styrketreningsøkt og inntar deretter en drikk på 0,7 liter med myseprotein eller melk. Ulike tester og målinger vil gjennomføres før og etter treningsøkten. Du vil bli tilfeldig trukket (randomiseres) til én av to grupper som inntar enten melk eller myseproteinfraksjoner. Gruppen som inntar myseproteinfraksjoner må gjennomføre forsøket to ganger, en gang med hver mysefraksjon.

Før forsøket

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 6 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, måling av kroppssammensetning (DXA), og en legesjekk i ukene før forsøket. Hver seanse varer i ca. 2 timer. Tidspunkter avtales individuelt. I de tre siste dagene før forsøket må du avstå fra all krevende fysisk aktivitet (trening). Fra dagen før forsøket til forsøket er over (midt på dagen etter hoved-testdagen) skal du følge en standardisert diett laget av en ernæringsfysiolog.

Forsøket

Oppmøte på forsøksdagen vil variere fra kl 0700 til 0800. Du vil få en standardisert frokost før forsøket begynner. Måling av proteinsyntesen og –nedbrytingen gjøres ved veneinfusjon av aminosyrer (med stabile isotoper). Det er ingen kjent risiko med stabile isotoper; de forekommer naturlig i maten vi spiser og er ikke radioaktive. Det er en infeksjonsfare, men preparatet klargjøres under sterile forhold og infuseres gjennom et filter som ikke slipper mikrober igjennom. Infusjonen vil innebære at vi setter inn et venekateter i hver arm. Før vi gjennomfører treningsøkten vil vi ta en biopsi og gjennomføre en styrketest i et kneekstensjonsapparat. Treningsøkten vil bestå av 4 sett av 8 repetisjoner så tungt du klarer, et nytt sett starter hvert 3 minutt. Etter treningsøkten vil du innta en av de tre drikkene, og det vil bli tatt biopsier rett etter økten og etter 2,5 og 5 timer. Det vil også bli tatt blodprøver gjennom dagen og gjennomført styrketester rett etter økten, 5,5 og 24 timer etter treningsøkten, for å måle restitusjon. Dermed vil du måtte sette av en hel dag til testdagen (fra 0700 frem til ca. 1700) og 30 min til styrketesting dagen etter. Deltakere som tilfeldig velges til gruppen med myseproteinene må gå gjennom denne testrunden 2 ganger.

Tester

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

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

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

Biopsier: For gruppen som inntar melk blir det til sammen 4 biopsier, mens det for gruppen som inntar mysefraksjonene vil det bli 4 biopsier første runde og 5 biopsier i andre runde, altså 9 biopsier til sammen. Den ekstra biopsien i runde to må tas for å justere for de stabile isotopene som fortsatt kan være igjen i muskulaturen. Flere biopsier kan tas fra samme snitt i huden så det totale antall snitt blir bare 2 for gruppen som inntar melk og 4 for gruppen som inntar mysefraksjoner. Biopsiene tas ut på følgende måte:

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

Eventuelle ulemper ved å delta

Deltakelse i prosjektet vil kreve en del tid og oppmerksomhet. Du må møte ved NIH på totalt 8-10 dager.

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

Venekateter medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig.

Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet.

Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.

Personvern

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

Alle prøver vil analyseres "blindet", det vil si at forskerne som utfører den enkelte analysen ikke vet hvilken forsøksperson prøven kommer fra (verken forsøkspersonnummer eller gruppe). Prøver vil bli analysert ved NIH (biopsier), Universitet i Oslo (ernæringsinstituttet; biopsier og blod) og Universitetet i Arkansas, USA (biopsier og blod).

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Biobank

Biopsiene og blodprøvene vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser (vurdert av Regional Etisk Komite). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2028. Ansvarlig for biobanken er Dr. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved NIH. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til ernæringsinstituttet ved universitetet i Oslo og universitetet i Arkansas.

Innsynsrett og oppbevaring av materiale

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlende prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Informasjon om utfallet av studien

Etter at data er innsamlet og analysert vil vi avholde et møte for alle forsøkspersonene der vi presenterer resultatene fra studien.

Forsikring

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

Finansiering

Prosjektet er fullfinansiert av Tine® og Norges forskningsråd.

Publisering

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfelleverderte, tidsskrift. Du vil få tilsendt artiklene hvis du ønsker det.

Samtykke

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

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

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med Håvard Hamarsland

på tlf: 93 445 916, Gøran Paulsen på tlf: 93429420, eller Truls Raastad på tlf: 23 26 23 28 el. 913 68 896

Vennlig hilsen

Håvard Hamarsland (Stipendiat)
Gøran Paulsen (forsker)
Truls Raastad (Professor)

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

Vedlegg 4



Forespørsel om deltakelse som forsøksperson

Hvordan påvirker forskjellige melkeproteinfraksjoner muskelproteinbalanse hos yngre?

Dette skrivet er til alle potensielle forsøkspersoner. Vi ber om din deltakelse i prosjektet, så fremt du oppfyller kriteriene: Du må være i alderen 18-45 år, du skal ha drevet regelmessig styrketrening på hele kroppen under de siste 6 mnd (minst 1 gang per uke), og ellers være frisk og uten skader i muskelskjelettapparatet. Du kan ikke bruke noen form for medikamenter eller ha laktoseintoleranse eller melkeallergi. Du kan heller ikke bruke noen form for kosttilskudd (proteinpulver, vitaminer, kreatin eller lignende); hvis du gjør det kan du likevel delta som forsøksperson ved at du slutter med tilskuddet senest en uke før prosjektstart. Du kan ikke delta om du er allergisk mot lokalbedøvelse (tilsvarende det man får hos tannlegen).

Bakgrunn og hensikt med forsøket

Inntak av proteiner har i seg selv en umiddelbar muskeloppbyggende effekt ved at proteinsyntesen øker; og kombinerer vi proteininntak med styrketrening får vi en vesentlig kraftigere effekt. Økningen i proteinsyntesen bestemmes i stor grad av mengden og kvaliteten på proteinet, samt hvor raskt proteinet tas opp i blodet. I tillegg til proteinsyntesen vil også proteinnedbrytningen til enhver tid spille inn på proteinomsetningen i muskulaturen. Sammenliknet med proteinsyntesen vet vi lite om hvordan proteinnedbrytningen påvirkes av proteininntak etter styrketrening. Ny kunnskap om dette kan gi oss bedre forutsetninger for å maksimere utbyttet av styrketrening, som vil være av stor interesse for både mosjonister, idrettsutøvere og eldre med tanke på prestasjon i idrett og funksjon i hverdagen.

I denne studien ønsker vi å undersøke den umiddelbare effekten på proteinsyntesen og – nedbrytningen av et nyutviklet myseprotein produsert av Tine®. Dette nye myseprotein vil sammenliknes med vanlig lett melk og WPC-80; myseprotein som oftest brukes i vanlig proteinpulver.

Dette er et dobbelt blindet, randomisert, kontrollert studie, som betyr at verken du eller forskerne du kommer i kontakt med vet hvilken drikk du inntar.

Gjennomføringen av forsøket

Forsøket går kort fortalt ut på at du gjennomfører én styrketreningsøkt og inntar deretter en drikk på 0,7 liter med myseprotein eller melk. Ulike tester og målinger vil gjennomføres før og etter treningsøkten. Du vil bli tilfeldig trukket (randomiseres) til én av to grupper som inntar enten melk eller myseproteinfraksjoner. Gruppen som inntar myseproteinfraksjoner må gjennomføre forsøket to ganger, en gang med hver mysefraksjon.

Før forsøket

Du skal møte på Norges idrettshøgskole 4 ganger for tilvenning til tester og treningsøvelser, måling av kroppssammensetning (DXA), og en legesjekk i ukene før forsøket. Hver seanse varer i ca. 2 timer. Tidspunkter avtales individuelt. I de tre siste dagene før forsøket må du avstå fra all krevende fysisk aktivitet (trening). Fra dagen før forsøket til forsøket er over (midt på dagen etter hoved-testdagen) skal du følge en standardisert diett laget av en ernæringsfysiolog.

Forsøket

Oppstart på forsøksdagen vil variere fra kl 0700 til 0800. Du vil få en standardisert frokost før forsøket begynner. Måling av proteinsyntesen og –nedbrytingen gjøres ved veneinfusjon av aminosyrer (med stabile isotoper). Det er ingen kjent risiko med stabile isotoper; de forekommer naturlig i maten vi spiser og er ikke radioaktive. Det er en infeksjonsfare, men preparatet klargjøres under sterile forhold og infuseres gjennom et filter som ikke slipper mikrober igjennom. Infusjonen vil innebære at vi setter inn et venekateter i hver arm. Før vi gjennomfører treningsøkten vil vi ta en biopsi og gjennomføre en styrketest i et kneekstensjonsapparat. Treningsøkten vil bestå av 4 sett av 8 repetisjoner så tungt du klarer, et nytt sett starter hvert 3 minutt. Etter treningsøkten vil du innta en av de tre drikkene, og det vil bli tatt biopsier rett etter økten og etter 2,5 og 5 timer. Det vil også bli tatt blodprøver gjennom dagen og gjennomført styrketester rett etter økten, 5,5 og 24 timer etter treningsøkten, for å måle restitusjon. Dermed vil du måtte sette av en hel dag til testdagen (fra 0700 frem til ca. 1700) og 30 min til styrketesting dagen etter. Deltakere som tilfeldig velges til gruppen med myseproteinene må gå gjennom denne testrunden 2 ganger.

Tester

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

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

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

Biopsier: For gruppen som inntar melk blir det til sammen 4 biopsier, mens det for gruppen som inntar mysefraksjonene vil det bli 4 biopsier første runde og 5 biopsier i andre runde, altså 9 biopsier til sammen. Den ekstra biopsien i runde to må tas for å justere for de stabile isotopene som fortsatt kan være igjen i muskulaturen. Flere biopsier kan tas fra samme snitt i huden så det totale antall snitt blir bare 2 for gruppen som inntar melk og 4 for gruppen som inntar mysefraksjoner. Biopsiene tas ut på følgende måte:

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

Eventuelle ulemper ved å delta

Deltakelse i prosjektet vil kreve en del tid og oppmerksomhet. Du må møte ved NIH på totalt 6-8 dager.

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

Venekateter medfører en liten infeksjonsfare og det kan oppleves ubehagelig.

Vevsprøvetakninger (biopsier) medfører en liten infeksjonsfare, og ubehag/smerter kan oppleves under inngrepet. Du kan også oppleve lette til moderate smerter i 1-2 døgn etter inngrepet.

Du vil få et lite arr etter snittet i huden; arret vil sakte bli mindre tydelig. Enkelte personer vil kunne få en fortykning av huden i arrområdet.

Personvern

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

Alle prøver vil analyseres "blindet", det vil si at forskerne som utfører den enkelte analysen ikke vet hvilken forsøksperson prøven kommer fra (verken forsøkspersonnummer eller gruppe). Prøver vil bli analysert ved NIH (biopsier), Universitet i Oslo (ernæringsinstituttet; biopsier og blod) og Universitetet i Arkansas, USA (biopsier og blod).

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Biobank

Biopsiene og blodprøvene vil bli oppbevart i en forskningsbiobank uten kommersielle interesser (vurdert av Regional Etisk Komite). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også samtykke til at det biologiske materialet og analyseresultater inngår i biobanken. Prøvene vil bli lagret til år 2028. Ansvarlig for biobanken er Dr. Truls Raastad ved Seksjon for fysisk prestasjonsevne ved NIH. Det biologiske materialet kan bare brukes etter godkjenning fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Hvis du sier ja til å delta i studien, gir du også ditt samtykke til at prøver og aidentifiserte opplysninger utleveres til ernæringsinstituttet ved universitetet i Oslo og universitetet i Arkansas.

Innsynsrett og oppbevaring av materiale

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, kan du kreve å få slettet innsamlede prøver og opplysninger, med mindre opplysningene allerede er inngått i analyser eller brukt i vitenskapelige publikasjoner.

Informasjon om utfallet av studien

Etter at data er innsamlet og analysert vil vi avholde et møte for alle forsøkspersonene der vi presenterer resultatene fra studien.

Forsikring

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

Finansiering

Prosjektet er fullfinansiert av Tine® og Norges forskningsråd.

Publisering

Resultatene fra studien vil offentliggjøres i internasjonale, fagfelleverderte, tidsskrift. Du vil få tilsendt artiklene hvis du ønsker det.

Samtykke

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

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

Dersom du ønsker flere opplysninger kan du ta kontakt med Håvard Hamarsland

på tlf: 93 445 916, Gøran Paulsen på tlf: 93429420, eller Truls Raastad på tlf: 23 26 23 28 el. 913 68 896

Vennlig hilsen

Håvard Hamarsland (Stipendiat)
Gøran Paulsen (forsker)
Truls Raastad (Professor)

Samtykke til deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

