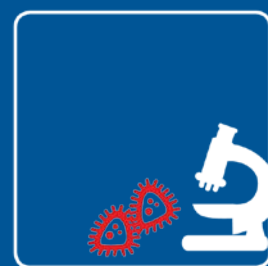


Hvilken type mælkeprotein er bedst til at øge muskelmassen når indtaget lige efter styrketræning i utrænede såvel som i eliteatleter?



AFSLUTNINGSRAPPORT TIL MEJERIBRUGETS FORSKNINGSFOND

PROJEKTTITEL

Hvilken type mælkeprotein er bedst til at øge muskelmassen når indtaget lige efter styrketræning i utrænede såvel som i eliteatleter

PROJEKTLEDER

Michael Kjær, professor, overlæge, dr.med., Institut for Idrætsmedicin, Bispebjerg Hospital, Bispebjerg Bakke 23, bygn. 8, 1. sal, 2400 København NV.

Telefon: (+45) 3531 2185 / telefax: (+45) 3531 2733, e-mail: michaelkjaer@sund.ku.dk

PROJEKTPERIODE

1. september 2006 – 31. august 2010

PROJEKTDELTAGERE

Lars Holm, ph.d., cand.scient.

Telefon: (+45) 3531 6662 / telefax: (+45) 3531 2733, e-mail: L.Holm.isotope@gmail.com

Søren Reitelseder, cand.scient.

Telefon: (+45) 3531 3164 / telefax: (+45) 3531 2733, e-mail: s.reitelseder@gmail.com

Institut for Idrætsmedicin, Bispebjerg Hospital,
Bispebjerg Bakke 23, bygn. 8, 1. sal, 2400 København NV.

FINANSIERINGSKILDER

Udover Mejeribrugets Forskningsfond:

- Region H (studieafgift)
- Bispebjerg Hospital
- Kulturministeriets Udvalg for Idrætsforskning
- Team Danmark
- Forskningsrådet for Sygdom og Sundhed
- Lundbeck Fonden

SAMMENDRAG

Introduktion. Skeletmuskulaturen er ansvarlig for generering af kraft og bevægelse, men tjener også en vigtig funktion i stofomsætningen. Derfor er vedligeholdelse af muskelmassen afgørende gennem livet for at forblive sund og funktionelt uafhængig. Muskelproteiner undergår en kontinuerlig omsætning og er påvirkelige af fysisk aktivitet og ernæring. Fordøjelses- og optagelsesraten af mælkeproteiner (valle er hurtigt, kasein er langsomt) er uafhængige faktorer i reguleringen af proteinomsætningen på et helkropsniveau, men på et muskelspecifikt plan er det anabole respons til mælkeproteiner indtaget i forbindelse med tung styrketræning mindre undersøgt.

Formål og hypoteser. Formålet med nærværende projekt var: 1) at berige mælkeproteiner med L-[1-¹³C]leucin i en komodel, og 2) at sammenligne det muskelspecifikke anabole respons til indtag af valle, kasein og en kaloriefri kontroldrik efter et enkeltstående tungt styrketræningspas. Vores hypotese var at tung styrketræning umiddelbart efterfulgt af indtag af valle ville inducere en hurtig, men forbigående anabol effekt sammenlignet med et indtag af kasein, som var tænkt at inducere en mere moderat, men længerevarende anabol effekt.

Resultater. Tre højtydende danske sortbrogede malkekøer blev infunderet med L-[1-¹³C]leucin i en 24-timers periode med malkninger hver ottende time i en total periode af 46 timer. Dette resulterede i cirka 700 g [¹³C]valle og cirka 5000 g [¹³C]kasein. Unge, moderat aktive, mandlige individer var rekrutteret og de akutte træningsforsøg gennemført. Den tunge styrketræning bestod af 10 sæt med 8 repetitioner af 80% 1RM. Proteindrikken var justeret til 0,30 g / kg fedtfri masse og var indtaget umiddelbart efter træningspasset. Plasma insulin- og aminosyrekoncentrationerne steg mest efter indtaget af valle sammenlignet med kasein, og muskelproteinsyntesen var ligeligt øget i den totale restitutionperiode (1-6 timer). Der var samtidig en tendens til at valle og kasein udviste et forskelligt respons i den tidlige (1-3½ time) og sene (3½-6 timer) periode efter træningen og proteinindtaget.

Konklusion. Det kan konkluderes at unge, moderat aktive mænd responderer ens efter et tungt styrketræningspas efterfulgt af et indtag af valle eller kasein når man kigger på den samlede muskelproteinsyntese i den samlede restitutionperiode. Resultaterne viser samtidig at valle inducerer et hurtigt og kraftigt, men kortvarigt respons, hvorimod kasein inducerer et mere moderat og længerevarende respons. Resultaterne bakkes op af de temporale forskelle i insulin- og aminosyrekoncentrationerne samt af leucin nettobalancen over benet. Derfor kan det konkluderes at fordøjelses- og optagelsesraterne af valle og kasein har betydning for de temporale forskelle i muskelproteinomsætningen efter tung styrketræning.

ENGLISH SUMMARY

Introduction. The skeletal muscle mass generates force and movements, but also serves important function as a major site of metabolism. Therefore, maintenance of muscle mass is beneficial during lifespan retaining health and functional autonomy. Muscle proteins are highly dynamic and are markedly affected by physical activity and nutritional interventions. On a whole-body level at rest the different digestion and absorption rates of milk proteins (whey being fast and casein slow) have been shown to be independent factors regulating protein kinetics. However, the muscle specific anabolic response to resistance exercise in combination with ingestion of milk proteins remains further investigation.

Aims and hypotheses. In the present project we aimed to: 1) enrich milk proteins with L-[1-¹³C]leucine in a cow model (PART I), and 2) compare the specific muscle anabolic responses of whey, casein, and a non-caloric control drink intake after a single bout of heavy resistance exercise (PART II). Measurements included were muscle protein turnover as measured with different stable isotope approaches and molecular signaling pathways downstream of the insulin / IGF-I receptor with Western blot and RT-PCR techniques. Our hypothesis was that heavy resistance exercise followed by a single bolus of whey would induce rapid but transient anabolic effects as compared to a bolus of casein, which was hypothesized to induce a moderate but long lasting response.

PART I. Three high-yielding Danish Holstein Friesian cows were infused with 100 g of L-[1-¹³C]leucine each during a 24-hr period with milkings of labeled milk each 8th hr during a total of 46 hrs. We gained a total of 298 kg enriched milk from three infused cows, which resulted in ~700 g [¹³C]whey and ~5000 g [¹³C]casein. Both whey and casein showed to have [1-¹³C]leucine enrichments of 10.0% (TTR). The proteins fully met our criteria with regard to amounts and enrichments and they were approved for human consumption.

PART II. Young, moderately active, male individuals were recruited and acute studies were performed with primed, continuous infusions of L-[1-¹³C]leucine and L-[ring-d₅]phenylalanine. The heavy resistance exercise bout consisted of 10 sets of 8 repetitions at 80% of 1RM. The protein bolus was adjusted to 0.30 g · kg LBM⁻¹ and were ingested immediately after the exercise session. Femoral arteriovenous blood and muscle tissue samples were obtained before the exercise and

nutrition intervention and in the following 6-hr recovery period. Plasma insulin and amino acid concentrations increased to a greater extent after ingestion of whey compared to casein, and with the direct incorporation model myofibrillar protein synthesis was equally increased 1-6 hrs, however, showing a tendency toward a temporal shift between the whey and casein induced responses in the early (1-3½ hrs) and late (3½-6 hrs) periods after exercise and ingestion of proteins. Indeed, temporal changes in leucine net balance and oxidation were observed in the early recovery period. Phosphorylations of Akt and p70 S6K were increased due to the intervention but no differences were observed between the protein types except for the total amount of 4E-BP1, which was higher after the whey intake than after the casein intake. In the recovery period IGF-IEa was higher after whey intake than after casein and control. FOXO1A and MuRF1 were up regulated at 60 and 210 min, and, in contrast, FOXO3 and Atrogin1 were down regulated at 210 and 360 min, but no differences were observed between groups.

Conclusion. We conclude that young, moderately active men do not respond differently following heavy resistance exercise and ingestion of either whey or casein when looking at muscle protein synthesis in the total 6-hr recovery period measurements. However, the data point out that whey induces fast, pronounced, but transient effects, whereas casein induces a more moderate but long lasting response. These results are supported by the temporal differences observed in insulin and amino acid concentrations and the leg leucine net balance in the 6-hr recovery period. Therefore, digestion and absorption properties of whey and casein have influence on the temporal pattern of muscle protein turnover following resistance exercise. Furthermore, we can conclude that the anabolic response pattern to ingestion of whey and casein measured as muscle protein turnover after heavy resistance exercise agree with previously observed changes in protein turnover on a whole-body level at rest. Looking at the cellular signaling mechanisms regulating protein turnover we primarily observed significant effects of time with only few differences between groups. Partly, the strong exercise stimuli are thought to overrule potential milk protein specific responses measured in the selection of targets. Taken together, these findings are relevant for the strength athlete and may have clinical relevance in situations like restitution from rehabilitating exercise following injury, disease or immobilization, or for elderly individuals challenging sarcopenia. In that aspect, the combinations of fast and slow protein types could likely be an optimal choice and should be the aim of further investigations.

BAGGRUND, FORMÅL OG HYPOTESER

Muskelproteinmetabolisme og effekterne af styrketræning og indtaget protein

Et akut træningspas har vist at have stor betydning for den efterfølgende muskulære proteinmetabolisme i op til 72 timer efter arbejdets afslutning (Cuthbertson *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 1997; Biolo *et al.*, 1995; Chesley *et al.*, 1992), og dette respons er ligeledes påvirket af det enkelte individs træningsstatus (Kim *et al.*, 2005; Short *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2002; Balagopal *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 1999). Tung styrketræning medfører muskelhypertrofi og øget styrke (Holm *et al.*, 2008; Aagaard *et al.*, 2001; Narici *et al.*, 1989), men den afgørende positive nettobalance mellem proteinsyntese og proteindegradation for muskelhypertrofi indtræder kun ved samtidig indtagelse af protein / aminosyrer eller ved infusion af aminosyrer i relation til et udøvet styrketræningspas (Levenhagen *et al.*, 2002; Rasmussen *et al.*, 2000; Tipton *et al.*, 1999; Biolo *et al.*, 1997). Derudover er det vist at timingen af proteinindtaget har afgørende betydning (Andersen *et al.*, 2005; Tipton *et al.*, 2001; Esmarck *et al.*, 2001; Levenhagen *et al.*, 2001). Overordnet er der således i litteraturen enighed om at træning og proteinindtag øger muskelproteinsyntesen, og at træning og proteinindtag kan agere synergistisk (Wolfe, 2001; Rennie & Tipton, 2000).

Mælkeproteiner er en naturlig kilde for proteinsupplementering og 1 kg mælk indeholder cirka 5 g valle og 26 g kasein. Typisk anvendes proteinet valle, hvorimod proteinet kasein er mindre undersøgt. I forlængelse heraf er det interessant at undersøge de forskellige mælkeproteiners effekt på proteinmetabolismen i relation til styrketræning, da det er vist at valle og kasein optages med forskellig hastighed og har forskellige aminosyreprofiler (Calbet & Holst, 2004). Den noget langsommere optagelseshastighed af kasein kan til dels tilskrives det faktum at kasein i modsætning til valle klumper sammen i mavesækken (Mahe *et al.*, 1996). I analogi med kulhydraters glykemiske index er valle blevet karakteriseret som ”fast” og kasein som ”slow” protein (Fruhbeck, 1998; Boirie *et al.*, 1997). Valle og kasein er undersøgt på et helkropsniveau ved hjælp af indre mærket protein, og det blev vist at proteinsyntese og -degradation var forskelligt påvirket i hvile (Boirie *et al.*, 1997), hvorimod protein nettobalancen over et ben udsat for et akut stykke arbejde var ens efter indtag af valle og kasein på trods af forskellige aminosyrekoncentrationer i blodet efter indtaget (Tipton *et al.*, 2004). Det kan tænkes at det forudgående styrketræningsarbejdes påvirkning af proteinmetabolismen kan have influeret på fordøjelse og optag af de respektive mælkeproteiner. Og netop fordøjelse og optag har vist at have en effekt på leucinafsætningen uafhængigt af det indtaget proteins aminosyreprofil (Dangin *et al.*, 2001).

Anvendelse af stabil isotop teknik til bestemmelse af omsætningen af kroppens bestanddele tager sin begyndelse i 1930'erne ved arbejder af Rudolf Schoenheimer (Schoenheimer, 1942) efter at nobelpristageren Harold C. Urey havde identificeret deuterium (^2H) (Urey *et al.*, 1932). Nærværende projekt gør ligeledes brug af stabil isotop teknik for at klarlægge mælkeproteiners og styrketræningsarbejdes effekt på proteinmetabolisme på et muskulært niveau.

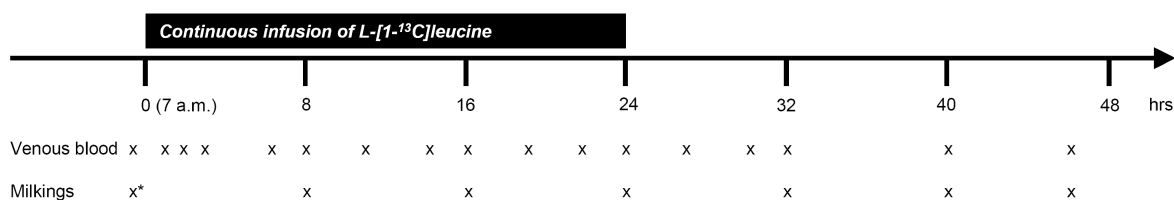
Studier der har undersøgt et proteinindtags betydning for proteinmetabolismen har af metodiske årsager været nødsaget til at give proteinet / aminosyren kontinuerligt som en infusion eller ved små gentagne doser. Der kan imidlertid opstilles tre grunde til at studere et samlet indtag i forhold til mange små: 1) Det er mere repræsentativt for normal indtag i forbindelse med træning og kan sammenlignes med træningsstudier (Andersen *et al.*, 2005; Esmarck *et al.*, 2001), 2) plasma aminosyrekoncentration og insulin responderer forskelligt ved et stort indtag i forhold til mange små indtag, og 3) dette kan påvirke proteinmetabolismen (Dangin *et al.*, 2002). Da en fri stabil isotop mærket aminosyre ikke repræsenterer aminosyrer indbygget i mælkeproteiner (Boirie *et al.*, 1996), kan kun indre mærket mælkeproteiner anvendes, da sporstoffet skal reagere som det man ønsker at undersøge med hensyn til mavetømmningshastighed, proteinnedbrydning og optag. Ved et indtag af indre mærket mælkeproteiner kan muskelproteinsynteseraten bestemmes på en metodisk solid måde. Derfor består nærværende projekt også af produktion af tilstrækkeligt store mængder af valle og kasein indre beriget med L-[1- ^{13}C]leucin til brug ved de humane forsøg. Denne produktion udføres ved infusion af store mængder af L-[1- ^{13}C]leucin i malkekøer og samtidig opsamling og videre bearbejdning af mælken (Boirie *et al.*, 1995).

Formål og hypoteser

Formålet med nærværende projekt var: 1) at berige mælkeproteiner med L-[1- ^{13}C]leucin i en komodel, og 2) at sammenligne det muskelspecifikke anabole respons til indtag af valle, kasein og en kaloriefri kontroldrik efter et enkeltstående tungt styrketræningspas. Inkluderede målinger var muskelproteinomsætning ved forskellige stabil isotop baserede modeller, insulin- og aminosyrekoncentrationer samt molekylære signaleringsveje nedstrøms for insulin / IGF-I receptoren ved Western blot og RT-PCR teknikker. Vores hypotese var at tung styrketræning umiddelbart efterfulgt af indtag af valle ville inducere en hurtig, men forbigående anabol effekt sammenlignet med et indtag af kasein, som var tænkt at inducere en mere moderat, men længerevarende anabol effekt.

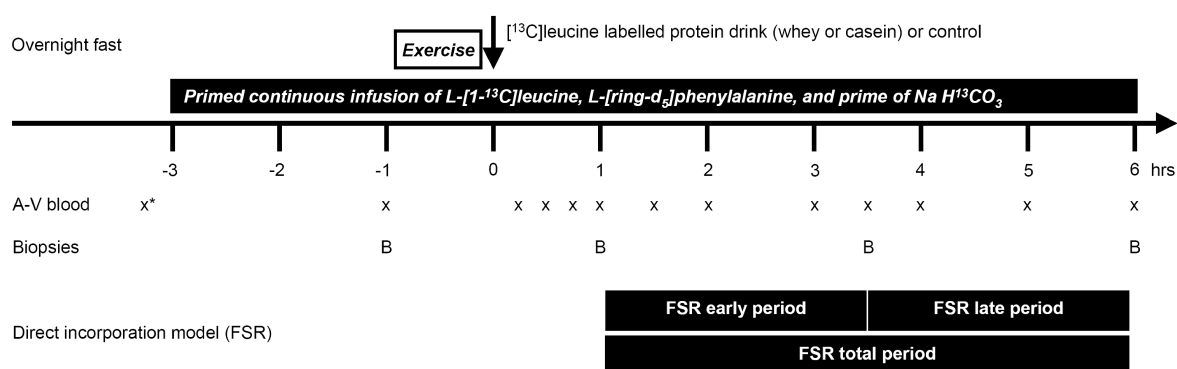
RESULTATER

Vi anvendte en 24 timers infusionsprotokol til at mærke mælkeproteinerne valle og kasein med [1-¹³C]leucin. Protokollen kan ses i figur 1. De tre infunderede køer blev malket hver ottende time og i alt opnåede vi 298 kg beriget mælk. Vi opnåede en passende mængde [1-¹³C]leucin mærket mælkeprotein (~700 g [¹³C]valle og ~5000 g [¹³C]kasein) til brug i vores humane studier.



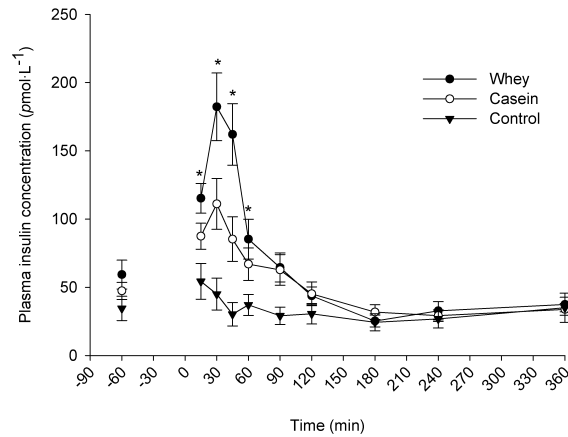
Figur 1. Koinfusionsprotokollen. Tre sortbrogede danske malkekøer blev infunderet med L-[1-¹³C]leucin over en 24-timers periode og malket hver ottende time. *Indikerer malkning af umærket mælk inden infusionen blev startet.

Unge, moderat aktive, mandlige individer var rekrutteret og de akutte træningsforsøg gennemført med primede, kontinuerlige infusioner af L-[1-¹³C]leucin og L-[ring-d₅]phenylalanin. Denne tunge styrketræning bestod af 10 sæt med 8 repetitioner af 80% 1RM. Proteindrikken var justeret til 0,30 g·kg fedtfri kropsmasse⁻¹ (svarende til ~17,5 g) og var indtaget umiddelbart efter træningspasset. Femorale arterie og venøse blodprøver samt muskeltvævsprøver blev opsamlet før trænings- og ernæringsinterventionen og i den følgende restitutionperiode over 6 timer (se figur 2).

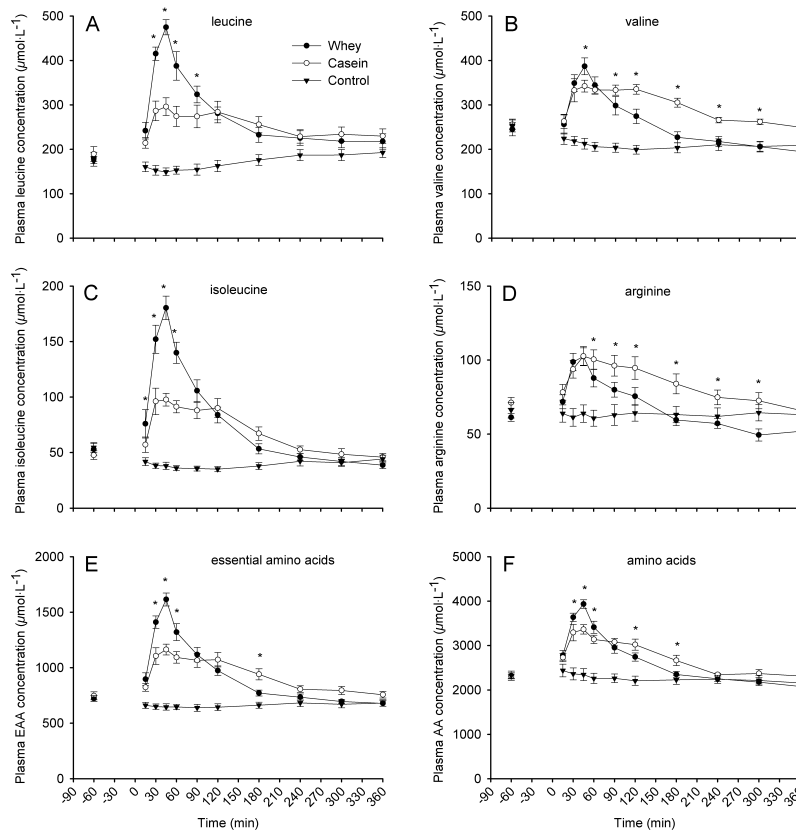


Figur 2. Den humane forsøgsprotokol. En 9-timers primet, kontinuerlig infusion af stabil isotop mærket leucin og phenylalanin samt femorale arterie- og veneblodprøver og muskelbiopsier gjorde det muligt at bestemme muskelproteinomsætningen efter akut udøvet styrketræning og indtag af valle eller kasein.

Plasma insulin- og aminosyrekoncentrationerne steg mest efter indtaget af valle sammenlignet med kasein (se figur 3 og 4).

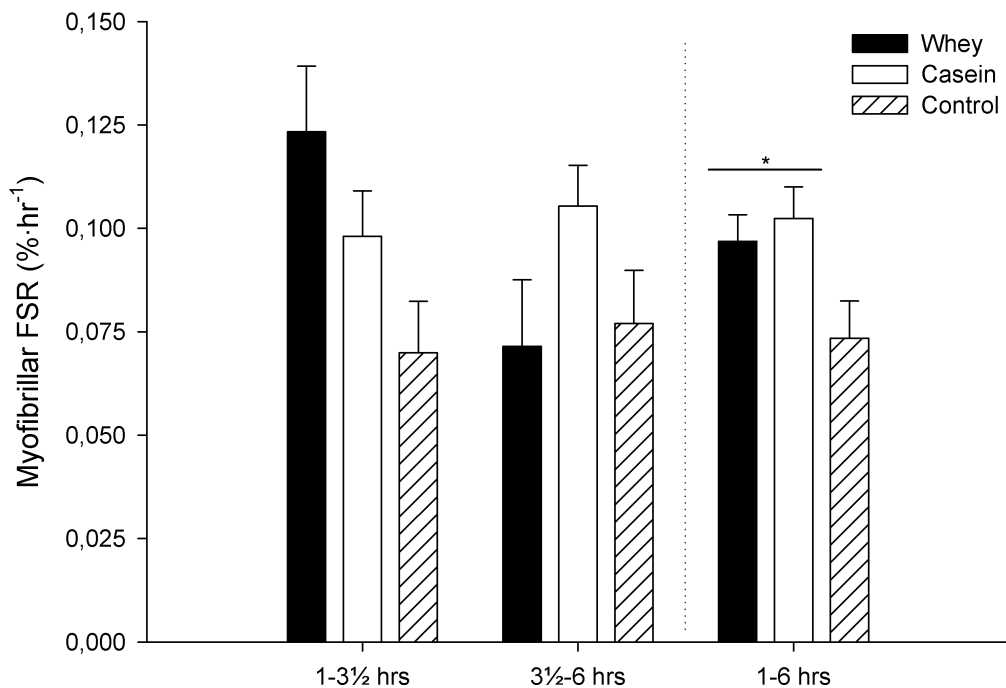


Figur 3. Plasma insulin koncentrationer før (-60 min) og efter interventionen. Der var en signifikant interaktion mellem valle- og kaseingrupperne ($p < 0,001$), og *signifikant forskel mellem valle og kasein ($p < 0,05$).



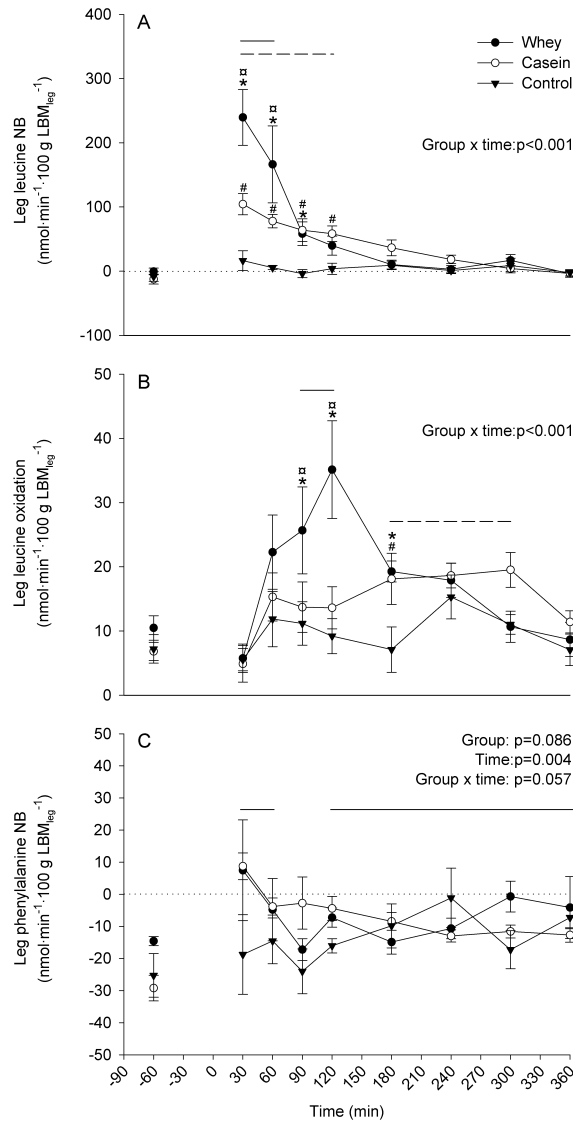
Figur 4. Plasma aminosyrekoncentrationer før (-60 min) og efter interventionen. For alle aminosyrer og grupper af aminosyrer fandtes der en signifikant interaktion ($p < 0,001$), og *signifikant forskel mellem valle og kasein ($p < 0,05$).

Målt med den direkte indbygningsmodel var den myofibrillære proteinsyntese ligeligt øget i den totale restitutionperiode (1-6 timer) (se figur 5). Der var samtidig en tendens til at valle og kasein udviste et forskelligt respons i den tidlige (1-3½ time) og sene (3½-6 timer) periode efter træningen og proteinindtaget (interaktion protein x periode: $p=0,106$).

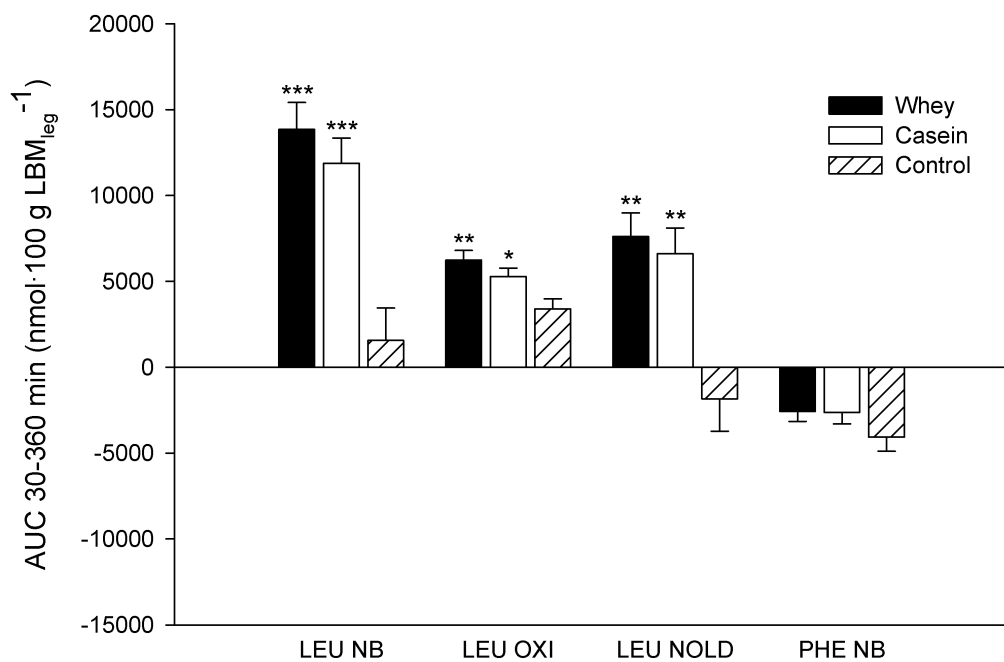


Figur 5. Muskelproteinsyntese målt som den fraktionelle syntese rate (FSR) af myofibrillære proteiner i perioden efter tung styrketræning og indtag af valle, kasein eller kontroldrik umiddelbart efter træningen. Resultaterne er delt op i den tidlige periode (1-3½ time) og den sene periode (3½-6 time) efter træningen samt den samlede periode fra 1-6 timer efter træningen. Interaktion mellem protein og perioder var $p=0,106$. I den samlede periode inducerede både valle og kasein en højere muskelproteinsyntese end den kaloriefrie kontroldrik ($p<0,05$).

Netto leucinbalancen og leucinoxidationen udviste i særdeleshed temporale forskelle i den tidlige restitutionperiode (se figur 6), men målt som areal under kurven var der ingen forskel mellem valle og kasein (se figur 7). Begge proteiner gav en signifikant højere leucin nettobalance end kontroldrikken.



Figur 6. Leucin nettobalance (A), leucin oxidation (B) og phenylalanin nettobalance (C) målt lokalt i det akut styrketrænede ben ved hjælp af arterie-vene blodprøver og mål for benets blodgennemstrømning. Basale målinger (-60 min) før styrketræningen og målinger fra 30 til 360 min indikerer temporale forskelle mellem valle og kasein. For leucin nettobalancen og oxidationen var der en signifikant interaktion (p<0,001), og fuldt optrukne linier (valle) og stiplede linier (kasein) indikerer at tidspunkterne var signifikant højere end basal (p<0,05). *Vallegruppen signifikant højere end kontrol, †signifikant højere end kasein og #kasein signifikant højere end kontrol, alle p<0,05. For phenylalanin nettobalance fandtes der kun en effekt af tid (p=0,004) og den fuldt optrukne linie indikerer at tidspunktet er højere end basal (p<0,05).



Figur 7. Arealer under kurverne for leucin nettobalance (LEU NB), oxidation (LEU OXI) og netto non-oxidative leucin disposal (LEU NOLD) samt phenylalanin nettobalance (PHE NB). Gruppoeffekter fandtes for leucin nettobalance ($p < 0,001$), leucin oxidation ($p = 0,007$) og netto non-oxidative leucine disposal ($p = 0,001$). *, **, *** indikerer signifikant forskel sammenlignet med kontrol på henholdsvis $p < 0,05$, $p < 0,01$ og $p < 0,001$.

Fosforylering af Akt og p70 S6K var øget som følge af interventionen, men der var ingen forskelle mellem proteintyperne undtagen for den totale 4E-BP1, som var højere efter valleindtaget end efter kaseinindtaget. I restitutionsperioden var IGF-IEa højere efter valleindtaget end efter indtag af både kaseinet og kontroldrikken. FOXO1A og MuRF1 var opreguleret ved 60 og 210 minutter, og modsætningsvis var FOXO3 og Atrogin1 nedreguleret ved 210 og 360 minutter i restitutionsperioden, der var dog ingen gruppeforskelle i nogen af disse faktorer.

KONKLUSION

Det kan konkluderes at unge, moderat aktive mænd responderer ens efter et tungt styrketræningspas efterfulgt af et indtag af valle eller kasein når man kigger på den samlede muskelproteinsyntese i den 6 timer lange restitutionsperiode. Resultaterne viser samtidig at valle inducerer et hurtigt og kraftigt, men kortvarigt respons, hvorimod kasein inducerer et mere moderat og længerevarende respons. Disse resultater bakkes op af de temporale forskelle i insulin- og aminosyrekoncentrationerne samt af leucin nettobalancen over benet. Derfor kan det konkluderes at fordøjelses- og optagelsesraterne af valle og kasein har betydning for de temporale forskelle i muskelproteinomsætningen efter tung styrketræning. Derudover kan det konkluderes at det anabole responsmønster efter indtag af valle og kasein stemmer overens med det der er observeret på et helkropsniveau i hvile. Angående de cellulære signaleringsmekanismer til regulering af muskelproteinomsætningen observerede vi primært effekter som følge af tiden og kun få forskelle mellem grupperne. Det tunge styrketræningspas kan her tænkes at overdøve eventuelle specifikke forskelle mellem de to proteintyper i de udvalgte parametre. Samlet set er disse resultater relevante for personer engageret i muskelopbyggende og vedligeholdende træning, og de kan have klinisk betydning i situationer relateret til restitution fra rehabiliterende træning efter skade, sygdom eller immobilisering samt for ældre i kampen mod sarkopeni. Set i det lys kunne kombinationen af hurtigt og langsomt optagelige proteintyper være optimalt og bør være målet for yderligere undersøgelser.

REFERENCER

- Aagaard P, Andersen JL, Dyhre-Poulsen P, Leffers AM, Wagner A, Magnusson SP, Halkjaer-Kristensen J, & Simonsen EB (2001). A mechanism for increased contractile strength of human pennate muscle in response to strength training: changes in muscle architecture. *J Physiol* **534**, 613-623.
- Andersen LL, Tufekovic G, Zebis MK, Crameri RM, Verlaan G, Kjaer M, Suetta C, Magnusson P, & Aagaard P (2005). The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. *Metabolism* **54**, 151-156.
- Balagopal P, Schimke JC, Ades P, Adey D, & Nair KS (2001). Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E203-E208.
- Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, & Wolfe RR (1995). Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* **268**, E514-E520.
- Biolo G, Tipton KD, Klein S, & Wolfe RR (1997). An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol* **273**, E122-E129.
- Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, & Beaufriere B (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14930-14935.
- Boirie Y, Fauquant J, Rulquin H, Maubois JL, & Beaufriere B (1995). Production of large amounts of [¹³C]leucine-enriched milk proteins by lactating cows. *J Nutr* **125**, 92-98.
- Boirie Y, Gachon P, Corny S, Fauquant J, Maubois JL, & Beaufriere B (1996). Acute postprandial changes in leucine metabolism as assessed with an intrinsically labeled milk protein. *Am J Physiol* **271**, E1083-E1091.
- Calbet JA & Holst JJ (2004). Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *Eur J Nutr* **43**, 127-139.
- Chesley A, MacDougall JD, Tarnopolsky MA, Atkinson SA, & Smith K (1992). Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. *J Appl Physiol* **73**, 1383-1388.
- Cuthbertson DJ, Babraj J, Smith K, Wilkes E, Fedele MJ, Esser K, & Rennie M (2006). Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E731-E738.
- Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballevre O, & Beaufriere B (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E340-E348.
- Dangin M, Boirie Y, Guillet C, & Beaufriere B (2002). Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *J Nutr* **132**, 3228S-3233S.

Esmarck B, Andersen JL, Olsen S, Richter EA, Mizuno M, & Kjaer M (2001). Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *J Physiol* **535**, 301-311.

Fruhbeck G (1998). Protein metabolism. Slow and fast dietary proteins. *Nature* **391**, 843, 845.

Holm L, Reitelseder S, Pedersen TG, Doessing S, Petersen SG, Flyvbjerg A, Andersen JL, Aagaard P, & Kjaer M (2008). Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. *J Appl Physiol* **105**, 1454-1461.

Kim PL, Staron RS, & Phillips SM (2005). Fasted-state skeletal muscle protein synthesis after resistance exercise is altered with training. *J Physiol* **568**, 283-290.

Levenhagen DK, Carr C, Carlson MG, Maron DJ, Borel MJ, & Flakoll PJ (2002). Postexercise protein intake enhances whole-body and leg protein accretion in humans. *Med Sci Sports Exerc* **34**, 828-837.

Levenhagen DK, Gresham JD, Carlson MG, Maron DJ, Borel MJ, & Flakoll PJ (2001). Postexercise nutrient intake timing in humans is critical to recovery of leg glucose and protein homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E982-E993.

Mahe S, Roos N, Benamouzig R, Davin L, Luengo C, Gagnon L, Gausserges N, Rautureau J, & Tome D (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [¹⁵N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *Am J Clin Nutr* **63**, 546-552.

Miller BF, Olesen JL, Hansen M, Dossing S, Cramer RM, Welling RJ, Langberg H, Flyvbjerg A, Kjaer M, Babraj JA, Smith K, & Rennie MJ (2005). Coordinated collagen and muscle protein synthesis in human patella tendon and quadriceps muscle after exercise. *J Physiol* **567**, 1021-1033.

Moore DR, Phillips SM, Babraj JA, Smith K, & Rennie MJ (2005). Myofibrillar and collagen protein synthesis in human skeletal muscle in young men after maximal shortening and lengthening contractions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1153-E1159.

Narici MV, Roi GS, Landoni L, Minetti AE, & Cerretelli P (1989). Changes in force, cross-sectional area and neural activation during strength training and detraining of the human quadriceps. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **59**, 310-319.

Phillips SM, Parise G, Roy BD, Tipton KD, Wolfe RR, & Tamopolsky MA (2002). Resistance-training-induced adaptations in skeletal muscle protein turnover in the fed state. *Can J Physiol Pharmacol* **80**, 1045-1053.

Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, & Wolfe RR (1997). Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* **273**, E99-E107.

Phillips SM, Tipton KD, Ferrando AA, & Wolfe RR (1999). Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *Am J Physiol* **276**, E118-E124.

Rasmussen BB, Tipton KD, Miller SL, Wolf SE, & Wolfe RR (2000). An oral essential amino acid-carbohydrate supplement enhances muscle protein anabolism after resistance exercise. *J Appl Physiol* **88**, 386-392.

Rennie MJ & Tipton KD (2000). Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. *Annu Rev Nutr* **20**, 457-483.

Schoenheimer R (1942). *The dynamic state of body constituents* Harvard University Press, Cambridge.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, & Nair KS (2004). Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E92-E101.

Tipton KD, Elliott TA, Cree MG, Wolf SE, Sanford AP, & Wolfe RR (2004). Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 2073-2081.

Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Jr., & Wolfe RR (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol* **276**, E628-E634.

Tipton KD, Rasmussen BB, Miller SL, Wolf SE, Owens-Stovall SK, Petrini BE, & Wolfe RR (2001). Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E197-E206.

Urey HC, Brickwedde FG, & Murphy GM (1932). A hydrogen isotope of mass 2 and its concentration. *Physical Rev* **40**, 1-15.

Wolfe RR (2001). Effects of amino acid intake on anabolic processes. *Can J Appl Physiol* **26 Suppl**, S220-S227.

PUBLIKATIONER OG OFFENTLIGGØRELSER

Artikler i internationale tidsskrifter

Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, Helmark IC, Lund P, Kristensen NB, Frystyk J, Flyvbjerg A, Schjerling P, van Hall G, Kjaer M, Holm L. Whey and casein labeled with L-[1-¹³C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 300: E231-E242, 2011.

Reitelseder S, Agergaard J, Doessing S, Helmark IC, Schjerling P, van Hall G, Kjaer M, Holm L. Positive muscle protein net balance and differential regulation of FOXO and atrogene mRNAs after resistance exercise and milk protein supplementation. Under revision, *Journal of Applied Physiology*, 2011.

Dideriksen KJ, Reitelseder S, Petersen SG, Hjort M, Helmark IC, Kjaer M, Holm L. Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, Article in Press, accepted 2011.

Bechshoeft R, Dideriksen KJ, Reitelseder S, Kjaer M, Holm L. Light-load resistance exercise increases and prolongs the elevation in myofibrillar protein synthesis rate in human skeletal muscle induced by continuous protein feeding. Under forberedelse.

Populærvidenskabelige artikler

Reitelseder S, Holm L. Mælkeprotein og muskelmasse. *Mælkeritidende* 12: 302-304, 2008.

Studenteropgaver

Dideriksen KJ. Milk proteins labelled with L-[1-¹³C]leucine and muscle protein synthesis: Effect of resistance exercise, protein type, and timing of protein ingestion in elderly untrained individuals. Speciale, Institut for Idræt, Det Naturvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, 2009.

Indlæg ved faglige kongresser

Holm L, Bechshoeft R, Dideriksen KJ, Reitelseder S, Kjaer M. Light-load resistance exercise increases and prolongs the elevation in myofibrillar protein synthesis rate in human skeletal muscle

induced by continuous protein feeding. Poster præsentation ved Experimental Biology 2011, abstract# 2463, prog. # 983.5, Washington DC, USA, 2011.

Reitelseder S, Holm L, Doessing S, Helmark IC, van Hall G, Kjaer M. Muscle leucine oxidation after heavy resistance exercise and milk proteins. Mundtlig præsentation og poster ved 14th International Biochemistry of Exercise Conference 2009, abstract# 134, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, 2009.

Reitelseder S, Holm L, Doessing S, Helmark IC, van Hall G, Kjaer M. Muscle leucine oxidation after heavy resistance exercise and milk proteins. Poster præsentation ved Bispebjerg Hospitals forskningsdag, Lassen dagen, Bispebjerg Hospital, København, Danmark, 2009.

Reitelseder S. Muscle and milk proteins. Mundtlig præsentation ved Danish Dairy Board Conference on Milk And Health, København, Danmark, 2007.

Milk proteins and muscle recovery. Mundtlig præsentation ved Arla Foods Corporate Research Day 2007, Vejle, Danmark, 2007.

Reitelseder S, Holm L, Doessing S, van Hall G, Kjaer M. Milk proteins and skeletal muscle protein turnover in relation to resistance exercise. Poster præsentation ved 1st Arla Foods Research Seminar, Aarhus, Danmark, 2007.

Andet

Projektpræsentationer lokalt på Institut for Idrætsmedicin, Bispebjerg Hospital samt i forbindelse med deltagelse i ph.d.-kurser.

Projektpræsentationer bl.a. ved følgende internationale kurser:

Methods in Research – from molecule to man, at the Research School AMBEHR, St. Christoph, Austria, 2007.

Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analyses, at University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, 2007.

FORSKERUDDANNELSE

Ph.d.-uddannelse: Søren Reitelseder, cand.scient.

Afhandling indleveret 25. august 2010 og forsvaret 10. marts 2011.

Titel på afhandling:

”Milk proteins labelled with L-[1-¹³C]leucine and muscle protein turnover: Effect of heavy resistance exercise and protein ingestion.”

SAMARBEJDSRELATIONER

Gerrit van Hall,

Department of Biomedical Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen og Metabolic Mass-Spectrometry Facility, Rigshospitalet, København, Danmark.

Her har vi analyseret alle vores prøver relateret til stabil isotop teknikkerne.

Peter Lund og Niels B. Kristensen,

Department of Animal Health and Bioscience, Faculty of Agricultural Sciences, Aarhus University, Tjele, Danmark.

I dette samarbejde har vi produceret den stabil isotop mærkede mælk.

Hanne C. Bertram,

Department of Food Science, Faculty of Agricultural Science, Aarhus University, Research Centre Aarslev, Årsløv, Danmark.

Vi har udvekslet prøver til analyse i Hanne C. Bertrams laboratorium.

Jan Frystyk og Allan Flyvbjerg,

The Medical Research Laboratories, Clinical Institute and Department of Endocrinology and Internal Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Danmark.

Her har vi fået analyseret blodprøver for væksthormon og IGF-I.

PROJEKTETS BETYDNING FOR MEJERIBRUGET

Det nærværende projekt belyser hvorledes forskellige mælkeproteinkilder (valle og kasein) påvirker muskelproteinmetabolisme og dertilhørende molekulære signaleringsveje hos moderat aktive unge mandlige individer. Det danner grundlag for en bredere forståelse af mælkeproteiners generelle betydning samt for deres muskelspecifikke effekt på adaptationer til styrketræning. Vejledninger vedrørende proteinindtag i relation til styrketræning kan baseres på målinger foretaget direkte ved hjælp af intakte mælkeproteiner. Samlet set taler alt i nærværende projekt for at en kombination af hurtigt og langsomt optagelige proteiner er optimalt i forhold til udøvet styrketræning og det efterfølgende anabole respons.

FREMTIDIGE SAMARBEJDSRELATIONER

Rent metodisk har vi i nærværende projekt været i stand til at berige mælkeproteiner med [$1-^{13}\text{C}$]leucin. Det gør proteinerne særdeles anvendelige i projekter der søger at undersøge muskelproteinsyntese i en given situation. De resterende mængder af valle og kasein er og bliver anvendt af samarbejdspartnere internt på Institut for Idrætsmedicin, Bispebjerg Hospital til bl.a. at undersøge mælkeproteiners betydning for en ældre population (+60 år) i forbindelse med styrketræning samt hvorledes det anabole respons reguleres efter meget let styrketræning og kontinuerligt indtag af kasein (en mindre dose hvert 30. minut).

Vi har med dette projekt banet vejen for anvendelse af indre mærket mælkeproteiner, hvilket giver anvendelsen af stabil isotop teknik en betydelig styrke når man ønsker at undersøge effekterne af et enkelt indtag af intakte proteiner. Det vil i fremtidige projekter være muligt at gentage produktionen af disse specielle proteiner, hvilket muliggør unikke projekter, som ikke udføres særlig mange steder i verdenen.