



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

# Liikunnan ja ruokavalion vaikutus hiiren maksa- ja lihaskudoksen hienorakenteeseen

Morfometrinen tutkimus

Sira Torvinen

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

## **Alkusanat**

Tämä pro gradu -työ tehtiin yhteistyössä Jyväskylän yliopiston ympäristötieteiden ja liikuntabiologian laitosten kanssa. Elektronimikroskooppikuvat otettiin ja valmistettiin ympäristötieteiden laitoksella ja ne analysoitiin liikuntabiologian laitoksella. Tutkimuksen kokeellinen osa ja kirjoitustyö tehtiin kevään 2007 ja 2008 välisenä aikana.

Haluan kiittää ohjaajiani Heikki Kainulaista ja Hilikka Reunasta asiantuntevasta opastuksesta sekä kaikesta tuesta ja ajasta, jonka he käyttivät ohjaamiseeni. Kiitän myös tutkimusryhmän muita jäseniä; Maarit Lehteä, Riikka Kivelää sekä Rita Rinnankoskea avusta ja neuvoista, joita olen heiltä työni aikana saanut. Suurkiitos näytteiden valmistamisesta kuuluu Raija Vassiselle ja Sunna Lappalaiselle. Kiitän Paavo Niutasta hänen korvaamattomasta avustaan elektronimikroskooppikuvien valmistamisessa sekä perehdyttämisessä elektronimikroskoopin ihmeelliseen maailmaan. Kiitokset pro gradu -työni oikolukemisesta kuuluvat Reetta Titoffille ja Jyrki Laitiselle. Kiitän yhteisesti myös ympäristötieteiden laitoksen henkilökuntaa avusta työni eri vaiheissa.

Suurimmat kiitokset osoitan vanhemmilleni, jotka ovat kaikella tuellaan ja kannustuksellaan luoneet minulle vakaan pohjan, jolta on ollut helppo ponnistaa. Vertaistuesta kiitän ystäviäni, joiden kanssa olen saanut jakaa niin hyvät kuin huonotkin hetket opiskeluni aikana.

Asenne ratkaisee – aina.

Jyväskylässä 10.3.2008

Sira Torvinen

---

<b>Tekijä:</b>	Sira Torvinen	
<b>Tutkielman nimi:</b>	Liikunnan ja ruokavalion vaikutus hiiren maksa- ja lihaskudoksen hienorakenteeseen. Morfometrinen tutkimus	
<b>English title:</b>	The effects of exercise and diet on liver and muscle tissue morphology of mice. Morphometric study	
<b>Päivämäärä:</b>	10.3.2008	<b>Sivumäärä:</b> 69 + 3
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Solubiologia	
<b>Tutkielman ohjaajat:</b>	Heikki Kainulainen (prof.) ja Hilkka Reunanen (FT)	

---

**Tiivistelmä:**

Neuroendokriinisen järjestelmän ohella maksa- ja lihaskudoksilla on merkittävä rooli elimistön energiametabolian tasapainon ylläpidossa. Tämän vuoksi suuret muutokset energiametaboliassa havaitaan myös näiden kudosten hienorakenteessa. Rasva on usein energianlähteistä se, joka vaikuttaa olennaisesti saatuun energiamäärään. Normaalisti ylimääräinen energia varastoidaan triglyserideiksi rasvakudokseen mutta sen varastointikykyyn ylittyessä triglyseridejä alkaa kertyä muun muassa maksa- ja lihaskudoksiin. Tämän maksa- ja lihassolujen sisälle kertyvän rasvan on havaittu olevan yhteydessä insuliiniresistenssin syntyy, ja sitä kautta tyypin 2 diabeteksen kehittymiseen.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää liikunnan ja ruokavalion vaikutusta hiiren lihas- ja maksakudoksen hienorakenteeseen, sekä saada tätä kautta lisätietoa elintapaisairauksien synnystä. Tutkimuksessa selvitettiin liikunnan ja ruokavalion vaikutuksia solun sisään kertyvän rasvan määrään, rasvapisaroiden kokoon sekä kappalemäärään hiiren maksa- ja lihaskudoksissa. Lisäksi tutkittiin liikunnan ja ruokavalion vaikutusta solukalvonalaisen mitokondriokeräymien pinta-alaan lihaskudoksessa.

Tutkimus tehtiin C57BL/6J-kannan uroshiirillä. Kokeessa oli mukana kuusi ruokavalion (10 % tai 60 % ravinnon energiasta rasvoina) ja liikunnan (kontrolli tai juoksija) suhteen erilaista ryhmää, joista jokaisessa oli viisi hiirtä (n=5). Tutkimusta varten hiiriltä otettiin näytteet sekä luustolihasesta (*soleus*) että maksasta. Näytteistä valmistettiin näyteblokit, joista leikattiin ultramikrotomilla ensin puoliohutleikkeitä. Puoliohutleikkeet värjättiin toluidiinisinisellä ja tarkasteltiin valomikroskoopilla. Näytteistä leikattiin lisäksi ohutleikkeet elektronimikroskooppitarkastelua varten, ja ne värjättiin uranyyliasetatilla ja lyijysitraatilla. Maksa- ja lihasnäytteiden ohutleikkeet kuvattiin elektronimikroskoopilla, ja kuvat analysoitiin morfometrisesti tietokoneohjelman avulla.

Korkearasvainen ravinto odotetusti lisäsi solunsisäisen rasvan tilavuusosuutta ja rasvapisaroiden kokoa sekä maksa- että lihaskudoksessa. Lihaskudoksessa tulokset eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä. Vähiten solunsisäistä rasvaa ja pinta-alaltaan pieninä pisaroina oli oletusten mukaisesti vähärasvaista ravintoa syöneillä hiirillä. Uutta tuloksissa oli, että ruokavalion vaihtaminen korkearasvaiseen vähärasvaiseen vähensi merkittävästi solunsisäisen rasvan määrää, ja pienensi rasvapisaroiden kokoa sekä maksa- että lihaskudoksessa. Maksakudoksesta määritettiin lisäksi rasvapisaroiden lukumäärä sytoplasmien pinta-alaa kohti, ja merkittävästi eniten rasvapisaroitaa oli korkearasvaisen ruokavalion juoksijaryhmällä ja vähiten vähärasvaisen ravinnon ryhmällä. Lihaskudoksesta määritettyjen solukalvonalaisen mitokondriokeräymien pinta-alojen erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Käytetyissä olosuhteissa ruokavaliolla oli saatujen tulosten nojalla suurempi merkitys rasvan kertymiselle sekä yksittäisten rasvapisaroiden koolle, kuin pelkällä liikunnan lisäämisellä. Uutena muuttujana tarkasteltu ruokavalion vaihtaminen vähärasvaiseen sai aikaan merkitseviä positiivisia muutoksia maksakudoksessa, sekä suuntaa antavia positiivisia muutoksia lihaksessa. Jatkoissa elintapaisairauksien hoidossa ja tutkimuksessa tulisivat kiinnittää yhä enemmän huomiota ruokavaliioon ja sen vaihtamisen tuomiin morfologisiin ja metabolisiin muutoksiin koko kehon tasolla.

---

**Avainsanat:** Energiametabolia, insuliiniresistenssi, morfologia, solunsisäinen rasva, mitokondriokeräymä

---

**Author:** Sira Torvinen  
**Title of thesis:** The effects of exercise and diet on liver and muscle tissue morphology of mice. Morphometric study  
**Finnish title:** Liikunnan ja ruokavalion vaikutus hiiren maksa- ja lihaskudoksen hienorakenteeseen. Morfometrinen tutkimus  
**Date:** 10.3.2008 **Pages:** 69 + 3  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell Biology  
**Supervisors:** Heikki Kainulainen (prof.) and Hilikka Reunanen (FT)

---

**Abstract:**

Liver and muscle tissues play a major role in maintaining energy balance along with the neuroendocrine system. Consequently, major changes in energy metabolism can be seen in the morphology of these tissues. Fat, the most energy-rich fuel, affects substantially the amount of energy gain. Normally excess energy is stored as triglyceride in adipose tissue. If energy intake exceeds the storage capacity of adipose tissue, it leads to fat accumulation into ectopic sites, such as liver tissue and skeletal muscle. This intracellular fat accumulation is a factor in the development of insulin resistance, which is a characteristic of type 2 diabetes.

The aim of this study was to examine the effects of exercise and diet on liver and muscle tissue morphology of mice and to obtain more information about the development of noncommunicable diseases. We studied the impacts of exercise and diet on the amount of accumulated intracellular fat and on the average size and number of intracellular fat droplets in liver and muscle tissues. In addition, we observed the effect diet and exercise had on the areas of intracytoplasmic mitochondria fractions in skeletal muscle.

In this research we used 30 male mice from the C57BL/6J strain. The mice were divided into six groups, each group containing five individuals (n=5). Groups differed in their opportunity to exercise (control or runner) and in the amount of fat in their diet (10 % or 60 %). Samples were taken from both skeletal muscle (*soleus*) and liver and they were prepared for ultramicrotome sectioning. Semi-thin sections were stained with toluidine blue and examined with light microscope. We also cut ultra-thin sections which were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope. Pictures taken of the ultra-thin sections were analysed morphometrically with computer software.

High fat diet increased the amount and size of intracellular fat droplets in both liver and muscle tissues, as expected. However, in muscle the results were not statistically significant. The mice with the low fat diet had the least fat and the smallest droplets. A new finding was that changing the diet from high fat to low fat notably decreased the amount of intracellular fat and the size of fat droplets in both tissues. The highest number of intracellular fat droplets in the liver was found in the high fat diet runner group and the lowest number in low fat diet groups. The changes in the areas of intracytoplasmic mitochondria fractions were not statistically significant. The data suggest that, under the research circumstances, diet plays a larger role in fat accumulation and in the size of an individual fat droplet than exercise alone. The studied new variable, changing the diet, led to significant positive changes in liver tissue. There were also positive changes in muscle, but the results were not statistically significant. In future studies, emphasis should be placed on observing the effects of changing the diet on tissue morphology and metabolism on whole body level.

---

**Keywords:** energy metabolism, insulin resistance, morphology, intracellular fat, subsarcolemmal mitochondria

# Sisällys

**Alkusanat**

**Tiivistelmä**

**Sisällys**

**Lyhenteet**

<b>1. Johdanto.....</b>	<b>8</b>
1.1 Elimistön energiametabolia.....	8
1.1.1 Solun energiametabolia.....	8
1.2 Energiametabolian tasapainon ylläpito.....	9
1.2.1 Hormonaalinen säätely.....	10
1.2.1.1 Insuliini.....	10
1.2.1.2 Glukagoni.....	12
1.2.2 Energiametaboliaa ylläpitävät kudokset.....	13
1.2.2.1 Maksa.....	13
1.2.2.2 Luustolihas.....	14
1.2.2.3 Rasvakudos.....	15
1.3 Elintavat ja energiametabolia.....	16
1.3.1 Ruokavalio.....	16
1.3.1.1 Hiilihydraatit.....	16
1.3.1.2 Lipidit.....	17
1.3.1.3 Proteiinit.....	19
1.3.2 Liikunta.....	20
1.4 Energiametabolian häiriöt.....	21
1.4.1 Ylipaino.....	21
1.4.2 Insuliiniresistenssi.....	22
1.4.2.1 Rasvahappojen indusoima insuliiniresistenssi.....	23
1.4.3 Metabolinen oireyhtymä.....	26
1.4.4 Diabetes.....	28
1.4.4.1 Tyypin 2 diabetes.....	29
<b>2. Tutkimuksen tarkoitus.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Materiaali ja menetelmät.....</b>	<b>32</b>
3.1 Koeasetelma.....	32
3.2 Insuliinitoleranssikoe.....	33
3.3 Näytteiden valmistus elektronimikroskopointia varten.....	33
3.4 Näytteiden mikroskopointi ja kuvaus.....	34
3.5 Kuvien morfometrinen analysointi.....	34

<b>4. Tulokset</b> .....	<b>36</b>
4.1 Hiirten punnitustulokset ja maksojen massat .....	36
4.2 Insuliinitoleranssikokeen tulokset .....	36
4.3 Puoliohutteikkaiden tarkastelu .....	37
4.3.1 Maksa .....	37
4.3.2 Lihas .....	40
4.4 Ohutteikkaiden morfometrinen analysointi.....	41
4.4.1 Maksanäytteet .....	41
4.4.2 Lihasnäytteet.....	46
<b>5. Tulosten tarkastelu</b> .....	<b>50</b>
5.1 Maksanäytteet.....	50
5.1.1 Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta .....	50
5.1.2 Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat .....	53
5.1.3 Rasvapisaroiden kappalemäärien keskiarvot .....	55
5.2 Lihasnäytteet.....	57
5.2.1 Solukalvonalaisten mitokondrioiden pinta-alat .....	57
5.2.2 Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta .....	58
5.2.3 Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat .....	60
5.3 Yhteenveto.....	61
<b>Lähteet</b> .....	<b>64</b>

**Liitteet (3 kpl)**

## Lyhenteet

DAG	diasyyli glyseroli (engl. diacylglycerol)
FOXO	(engl. forkhead box protein O)
GLUT	glukoosinkuljetusproteiini (engl. glucose transporter protein)
GSK3	glykogeenisyntaasikinaasi-3 (engl. glycogen synthase kinase-3)
HDL	(engl. high-density lipoprotein)
IDF	(engl. International Diabetes Federation)
IRS	insuliinireseptorin substraatti (engl. insulin receptor substrate)
PI 3-kinaasi	fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi (engl. phosphoinositol 3-kinase)
PIP <sub>2</sub>	fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatti (engl. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate)
PIP <sub>3</sub>	fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trisfosfaatti (engl. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PKB	proteiinikinaasi B (engl. protein kinase B)
PKC	proteiinikinaasi C (engl. protein kinase C)
WHO	Mailman terveystjärjestö (engl. World Health Organisation)

# 1. Johdanto

## 1.1 Elimistön energiametabolia

Elimistössä tapahtuvien fysikaalisten ja kemiallisten prosessien muodostamaa kokonaisuutta kutsutaan metaboliaksi eli aineenvaihdunnaksi. Ravinnosta saatavan energian hyödyntämisen avulla kehossa voidaan rakentaa uutta kudosta kasvun tai korjauksen tarpeisiin, ylläpitää sopivaa ruumiinlämpöä ja elintärkeiden elinten toimintaa sekä tehdä mekaanista työtä. Aineenvaihdunta voidaan luokitella anaboliseen ja kataboliseen metaboliaan. Katabolisen aineenvaihdunnan tehtävänä on hajottaa ravintomolekyylit vapauttaen niistä energiaa. Anabolinen eli kokoava aineenvaihdunta puolestaan hyödyntää katabolisesta toiminnasta saatua energiaa uusien molekyylien rakentamiseen.

Elimistössä tapahtuva ravinnon käsittely sisältää kolme vaihetta: ruuansulatus, ravinnon imeytyminen ja aineenvaihdunta. Nämä vaiheet ovat itsenäisiä, mutta yhteydessä toisiinsa neuroendokriinisen eli hormonaalisen ja hermostollisen, säätelyn kautta. Neuroendokriininen järjestelmä koostuu keskushermostosta, autonomisesta hermostosta sekä endokriini- eli umpieritysrauhasista. Keskushermoston tehtävänä on koota tietoa eri kudosten tilasta ja välittää tarvittavat muutokset autonomisen hermoston hermopäätteiden sekä umpieritysrauhasista erittyvien hormonien avulla kohdekudoksiin. Näin elimistö voi niin solu- kuin koko kehon tasolla vastata muutoksiin energian saannissa ja käytössä.

### 1.1.1 Solun energiametabolia

Energiametaboliaa tapahtuu kaikissa kehon soluissa jatkuvasti. Yksittäiset solut tarvitsevat energiaa muun muassa aineiden aktiiviseen kuljetukseen, molekyyliarakenteiden korjaamiseen ja kasvuun sekä mekaaniseen työhön. Tarvittava energia saadaan hapettamalla ravinnosta saatavia molekyylejä ja varastoimalla vapautunut energia helposti hyödynnettävään muotoon korkeaenergisiksi fosfaattiyhdisteiksi, pääosin adenosiinitrifosfaattina (ATP). Energia on tämän yhdisteen fosfaattisidoksissa, joista se



vapautuu pieninä annoksina fosfaattitähteiden irrotessa. Nisäkkäät voivat tuottaa ATP:ta käyttäen energianlähteenä glukoosia, rasvahappoja tai aminohappoja. ATP:n tuottaminen tapahtuu sytoplasmassa sijaitsevilla mitokondrioilla.

Solun energiametabolia eli soluhengitys voidaan jakaa kolmeen pääreaktiosarjaan: glykolyysiin (kun energianlähteenä on glukoosi), sitruunahappokiertoon ja elektroninsiirtoketjuun. Glykolyysi eli glukoosin pilkkominen tapahtuu anaerobisesti solulimassa. Tämän jälkeen ATP:n tuottaminen tapahtuu joko anaerobisten tai aerobisten prosessien kautta. Energiantuoton kannalta hyödyllisempi on aerobinen reitti, koska siinä vapautuu enemmän energiaa. Aerobisessa reitissä glykolyysin jälkeinen reaktiosarja on sitruunahappokierto, joka tapahtuu mitokondrion sisäkalvolla. Sitruunahappokierrossa vapautuu elektroneja ja vetyioneja, jotka oksidatiivisessa fosforylaatioissa siirtyvät välittäjäaineelta toiselle yhdistyessä lopulta hapteen, jolloin muodostuu vettä ja vapautuu energiaa. Tämä reaktiosarja johtaa ravinnon molekyyleistä hapettamalla saatavan energian varastointiin ATP:ksi.

## **1.2 Energiametabolian tasapainon ylläpito**

Yksilön ravinnonsaanti vaihtelee eri vuorokaudenaikoina suuresti. Tästä huolimatta solujen saatavilla tulisi olla ravinteita tasaisesti koko ajan. Erityisen tärkeää on ylläpitää sopivaa verensokerin tasoa, sillä glukoosi on soluhengityksen pääasiallinen energian- ja tärkeä hiilirunkojenlähde muiden orgaanisten yhdisteiden valmistamisessa. Koko kehon energiametabolian tasapainon ylläpidosta vastaa yhdessä neuroendokriinisen järjestelmän kanssa pääsääntöisesti kolme kudosta: lihas-, rasva- ja maksakudos. Näiden kudosten metabolista tilaa puolestaan säädellään useiden eri hormonien välityksellä, joista tärkeimpiä ovat insuliini ja glukagoni. Yksittäisen hormonin määrä veressä ei ole säätelyn kannalta olennaista, vaan eri hormonien konsentraatioiden välinen suhde määrää kehon senhetkisen metabolisen tilan.

## 1.2.1 Hormonaalinen säätely

Hormonit ovat eliöiden tuottamia monimuotoisia yhdisteitä, jotka vaikuttavat yksilön fysiologiseen toimintaan ja käyttäytymiseen jo hyvin pieninä pitoisuuksina. Rakenteensa puolesta hormonit voivat kuulua proteiineihin, rasva-aineisiin sekä amiineihin tai niiden johdannaisiin. Nisäkkäillä hormonit erittyvät pääosin umpieritysrauhasista, joita ovat muuan muassa aivolisäke, lisämunuaiset sekä haimasaarekkeet. Hormonien pääasiallisena tehtävänä on yhdistää keskushermosto kudoksiin ja elimiin, jotka puolestaan säätelevät muun muassa kasvua, kehitystä ja aineenvaihduntaa.

Hormonit kulkeutuvat kohdekudoksiinsa veren välityksellä. Vaikka hormonit ovatkin veren avulla lähes kaikkien solujen saatavilla, vaikuttavat ne spesifisesti vain tiettyyn kohdekudokseen, sillä hormoneilla on tietyt reseptorit. Hormoni saa siten aikaan halutun muutoksen vain sellaisissa soluissa, joiden solukalvolla tai tumassa on kyseiselle molekyylille sopiva reseptori. Hormonimolekyylin kiinnittyminen reseptoriinsa käynnistää solussa usein signalointireitin, joka voimistuu edetessään välittäjämolekyyliltä toiselle.

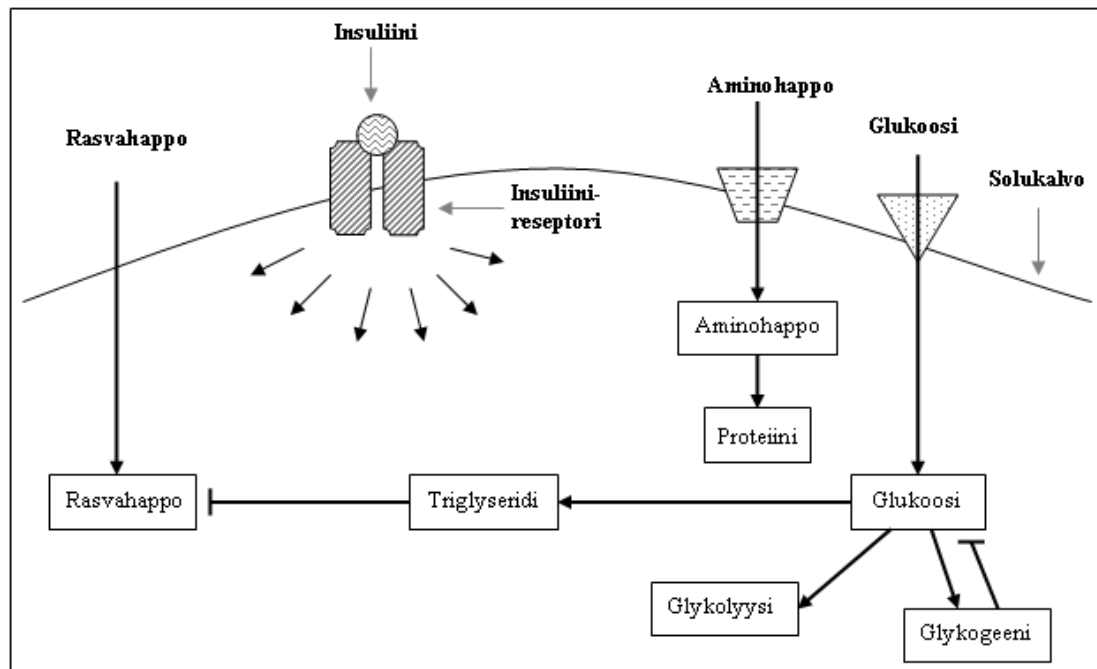
### 1.2.1.1 Insuliini

Insuliini on haiman Langerhansin saarekkeiden  $\beta$ -solujen erittämä peptidihormoni, jolla on tehtäviä niin glukoosi-, proteiini- kuin lipidimetaboliassakin. Insuliini muuan muassa edistää glukoosin, rasva- ja aminohappojen varastointia samalla estäen niiden pilkkoutumista ja vapauttamista verenkiertoon (ks. yleiskatsaus Saltiel ja Kahn., 2001). Insuliini toimii siten solussa anabolisena säätelijänä, vaikuttaen kaikkien kehon energianlähteiden metaboliaan. Insuliinin erittymistä vereen edistää pääosin ravinnon nauttimisen jälkeinen veren glukoosipitoisuuden nousu. Veren sokeripitoisuuden laskiessa haiman insuliinineritys puolestaan pienenee, jolloin glukoosin kuljetus insuliinisensitiivisiin kudoksiin, kuten luustolihasiin laskee.

Insuliini vaikuttaa kohdekudoksiinsa insuliinireseptorien kautta. Insuliinireseptori kuuluu solukalvon läpäiseviin tyrosiinikinaaseihin (ks. yleiskatsaus Joost, 1995). Se koostuu kahdesta solukalvon ulkopuolisesta  $\alpha$ -alaysiköstä ja kahdesta solukalvon läpäisevästä  $\beta$ -

alayksiköstä muodostaen heterotetrameerisen rakenteen. Insuliinireseptori aktivoituu insuliinin kiinnittyessä sen solukalvon ulkopuolisiin alayksiköihin, mikä saa aikaan solukalvon läpäisevien tyrosiinikinaasialayksiköiden autofosforyloitumisen tyrosiinitähteistä (ks. yleiskatsaus White ja Kahn, 1994).

Insuliinin kiinnittyminen reseptoriin käynnistää solunsisäisiä signalointireittejä, joiden vaikutukset on esitetty yksinkertaistettuna kaaviona kuvassa 1. Insuliini edistää rasva- ja aminohappojen sekä glukoosin ottoa soluun. Aminohapot varastoidaan solun sisällä proteiineiksi. Glukoosi puolestaan varastoidaan glykokeeninä ja triglyserideinä, tai hyödynnetään solun energiametaboliassa glykolyysin kautta. Insuliini toimii myös inhibiittorina, estäen glykokeenin pilkkoutumista glukoosiksi ja triglyseridin pilkkoutumista vapaiksi rasvahapoiksi. Aineenvaihdunnan lisäksi insuliini säätelee muun muassa geenien ilmenemistä, solujen kasvua ja erilaistumista sekä proteiinisynteesiä (Schafer ym., 2007; Rubin ym., 2007).



**Kuva 1. Insuliinin vaikutukset solun metaboliassa.** Insuliinin kiinnittyminen reseptoriinsa aktivoi solunsisäisiä signalointireittejä, jotka johtavat rasva- ja aminohappojen sekä glukoosin lisääntyneeseen kuljetukseen solun sisään. Insuliini edesauttaa aminohappojen varastointia proteiineina ja glukoosin varastointia glykokeeninä ja triglyserideinä. Insuliini edistää myös glukoosin hyödyntämistä solussa glykolyysin kautta. Glykokeenin ja triglyseridien pilkkoutuminen inhiboituu insuliinihormonin vaikutuksesta. (Mukaeltu katsausartikkelista Saltiel ja Kahn, 2001)

Elimistön sokeriaineenvaihdunnassa insuliinilla on hyvin olennainen rooli. Insuliinin avulla plasman glukoosikonsentraatio pysyy 4 ja 7 mmol/l välillä (ks. yleiskatsaus Saltiel ja Kahn, 2001), jolloin glukoosia on aina sitä tarvitsevien, elintärkeiden kudosten saatavilla. Ravinnon nauttimisen jälkeistä veren glukoosikonsentraation nousua insuliinin tiedetään alentavan kahdella keinolla: alentamalla glukoosin tuotantoa maksassa ja edistämällä glukoosin ottoa muissa kudoksissa, kuten luustolihasessa (Fleig ym., 1987; Aqius ym., 1990; Somwar ym., 2001).

### **1.2.1.2 Glukagoni**

Glukagonia erittyy haiman Langerhansin saarekkeiden  $\alpha$ -soluista ja se on insuliinin tavoin peptidihormoni, jonka reseptori sijaitsee solukalvolla. Glukagonireseptori kuuluu G-proteiineihin liittyviin proteiinireseptoreihin, ja siinä on seitsemän solukalvonläpäisevää alayksikköä. Glukagonireseptorissa on havaittu olevan useita säätelykohtia, jotka vaikuttavat reseptorin aktiivisuuteen konformaatiomuutosten kautta (Rodbell ym., 1971; Lad ym., 1977). Solussa glukagonin aikaansaaman reseptorin aktivoitumisen on havaittu välittyvän muun muassa G-proteiiniperheeseen kuuluvan  $G_q$ -proteiinin kautta (ks. yleiskatsaus Jiang ja Zhang, 2003).  $G_q$ :n aktivaatio johtaa adenylyylisyklaasin aktivoitumisen avulla solunsisäisen kalsiumin vapautumiseen (Dillon ym., 1993).

Glukagonin vaikutus solun energiametabolialle on päinvastainen kuin insuliinilla ja se toimiikin insuliinin antagonistina. Glukagoni edistää veren sokeripitoisuuden nousua edistämällä glykokeenin pilkkoutumista sekä glukoneogeeniä muuan muassa maksassa, jolloin glukoosia vapautuu vereen muiden kudosten hyödynnettäväksi (Taunton ym., 1974; Chan, 1984). Glukagoni-hormonia erittyy pääsääntöisesti vasteena paastonaikaiselle veren sokeripitoisuuden laskulle.

## 1.2.2 Energiametaboliaa ylläpitävät kudokset

### 1.2.2.1 Maksa

Maksalla on olennainen tehtävä koko kehon metabolian tasapainon ylläpitämisessä. Maksa vastaa sekä glukoosin varastoinnista että sen synteesistä ja vapautuksestakin koko kehon tasolla. Maksakudoksen tehtävänä on säädellä, ettei veren sokeripitoisuus nouse liikaa aterian yhteydessä eikä toisaalta laske liian alas kun ravintoa ei nautita. Kun ruokailun yhteydessä verensokeri alkaa kohota, varastoidaan se maksaan glykokeeninä. Ylimääräistä glukoosia voidaan muuttaa maksasoluissa myös rasvaksi, jolloin se saadaan varastoitua energiasisällöltään tehokkaampaan muotoon.

Paaston aikana veren sokeripitoisuus ja insuliinin määrä laskevat, jolloin maksakudoksesta vapautetaan glukoosia muiden kudosten käyttöön. Tällöin glykogenolyysi kiihtyy ja glukoosin pilkkominen estyy. Maksan glykokeenivarastojen ehtyessä aminohappojen muuttaminen glukoosiksi kasvaa samalla kun rasvahappojen otto ja  $\beta$ -oksidatio kiihtyvät. Maksa-, lihas- ja rasvakudokset siirtyvät paastotilassa käyttämään energianlähteinään aminohappoja ja rasvoja, säästäten glukoosia kudoksille, joille se on ainoa energianlähde. Näiden mekanismien avulla veren glukoosipitoisuus saadaan pidettyä tasaisena riippumatta glukoosin saannista ravinnon kautta.

Insuliiniresistenssi johtaa maksasolujen heikentyneeseen glukoosin käyttöön saaden aikaan glykokeenin ja rasvojen kertymisen maksaan (Cho ym., 2006). Insuliinin toiminnan heikkeneminen lihas- ja rasvakudoksissa puolestaan johtaa kohonneeseen vapaiden rasvahappojen määrään, sillä solujen kapasiteetti käsitellä sekä glukoosin että rasvojen tuloa ylittyy. Normaalisti lisääntynyt vapaiden rasvahappojen kuljetus solun sisään lisäisi glykokeenin varastointia ja rasvojen hapetusta sekä pienentäisi lipidien synteesiä. Kasvanut rasvahappojen määrä yhdistettynä hyperglykemiaan johtaa kuitenkin kudosten varastointikyvyn ylittymiseen, mikä lisää vapaiden rasvahappojen kuljetusta maksaan.

Tämä johtaa rasvojen kasvaneeseen varastointiin triglyserideinä maksaan, mikä puolestaan heikentää maksasolujen insuliiniherkkyyttä (Samuel ym., 2004).

### 1.2.2.2 Luustolihas

Luustolihakset ovat poikkijuovaista lihaskudosta. Lihassolukimput koostuvat useista yksittäisistä pitkistä lihassoluista, joiden toiminnallinen, eli supistuva yksikkö on sarkomeeri. Lihassolut voidaan jakaa kahteen päätyyppiin riippuen niiden aineenvaihdunta- ja supistumisominaisuuksista. Tyypin I lihassolut ovat supistumisominaisuuksiltaan hitaita lihassoluja. Hitaita soluista koostuvaa lihasta sanotaan myös punaiseksi lihakseksi, sillä se sisältää runsaasti myoglobiinia, joka on hemoglobiinin kaltainen happea välittävä aine. Tyypin I lihassolut tuottavatkin energiansa pääosin aerobisesti, ja niissä on runsaasti mitokondrioita (Gauthier, 1979; Schwerzmann ym., 1989; Philippi ja Sillau, 1994). Aerobisen energiantuoton kannalta olennaisia ovat etenkin solukalvonalaiset mitokondriot, joiden oksidatiivisen kapasiteetin on havaittu olevan suurempi kuin sytosolissa sijaitsevien mitokondrioiden (Philippi ja Shillau, 1994). Pääosin tyypin I lihassoluja sisältävä lihas on esimerkiksi pohkeessa sijaitseva *soleus*-lihas.

Tyypin II lihassolut ovat supistumisominaisuuksiltaan nopeita, ja ne tuottavat energiansa pääsääntöisesti anaerobisesti. Nopeita lihassoluja sisältäviä lihaksia kutsutaan myös valkoiseksi lihakseksi johtuen niiden alhaisesta myoglobiinipitoisuudesta. Nopeat lihassolut voidaan luokitella aineenvaihduntaominaisuuksiensa perusteella edelleen alatyyppeihin IIa ja IIb. IIa-tyypin nopeat lihassolut voivat toimia sekä aerobisesti että anaerobisesti, kun taas IIb-tyypin lihassolut toimivat lähes yksinomaan anaerobisesti (ks. yleiskatsaus Pette, 1985).

Sekä glukoosi että rasvahapot hapetetaan pääsääntöisesti luustolihasessa. Luustolihas onkin merkittävin glukoosia kuluttava kudos vastaten noin 70–80 %:sta insuliiniriippuvaisesta glukoosinkulutuksesta (DeFronzo ym., 1981). Kun insuliinia on veressä runsaasti, kuljetaan glukoosia lihassolujen sisään energiantuottoon ja glykogeenivarastoiksi (Douen ym., 1990). Kun insuliinin määrä veressä laskee, glukoosin

otto ja hyödyntäminen lihassoluissa pienenevät ja lihas siirtyy käyttämään energianlähteenään pääsääntöisesti vapaita rasvahappoja.

Häiriöt lihaskudoksen insuliiniherkkydessä vaikuttavat koko kehon glukoosimetaboliaan. Aiemmin on huomattu rasvaisen ruokavalion aiheuttavan rasvojen kertymistä luustolihasiin (de Fourmestraux ym., 2004), mikä johtaa lihaksen heikentyneeseen insuliiniherkkyteen. Insuliiniresistenssi pienentää lihaksen kykyä ottaa glukoosia verestä, edesauttaen diabetekselle tyypillisen korkean verensokerin kehittymistä. Insuliini lisää glukoosin ottoa lihassoluissa eli myosyyteissa insuliiniriippuvaisten glukoosinkuljetusproteiinien (GLUT4) avulla. Insuliinin kiinnittyessä insuliinireseptori autofosforyloituu saaden aikaan signalointiketjun, joka johtaa glukoosinkuljetusproteiinien varastointivesikkelien siirtymiseen solukalvolle (ks. yleiskatsaus Watson ja Pessin, 2001). Näin ollen glukoosinkuljetusproteiinien määrä solukalvolla kasvaa, jolloin lihas voi vastaanottaa enemmän glukoosia ja hyödyntää sen energiametaboliassaan tai varastoida glykokeeninä. Insuliinin puuttuessa suurin osa GLUT4-kuljetusproteiineista (> 90 %) varastoituu jälleen vesikkeleissä solukalvon alle (ks. yleiskatsaus Thong ym., 2005). Insuliini siis vaikuttaa myosyyttien glukoosinoton paranemiseen lisäämällä insuliiniriippuvaisten glukoosinkuljetusproteiinien lukumäärää, eikä muuttamalla niiden aktiivisuutta. Insuliinitason laskiessa GLUT4-kuljetusproteiinit varastoidaan jälleen vesikkeleissä solulimaan.

### **1.2.2.3 Rasvakudos**

Rasvakudos vastaa lipidien varastoinnista triglyserideinä rasvasoluihin eli adiposyytteihin. Triglyseridien määrä adiposyyteissä riippuu rasvojen sisään ja uloskuljetuksen välisestä tasapainosta, jota säädellään koko kehon tasolla sekä hormonien että hermoston kautta. Kun ravintoa on vähän saatavilla, triglyseridit vapautetaan hydrolyysin kautta vapaina rasvahappoina verenkiertoon, josta ne ovat muiden kudosten hyödynnettävissä. Jos vapaiden rasvahappojen pitoisuus kuitenkin pysyy korkeana useamman tunnin, seuraa insuliiniresistenssi (Randle ym., 1963; Boden ym., 1991). Tämä on tietyissä olosuhteissa tarkoituksenmukaista, sillä tällöin glukoosia säästetään elintärkeiden kudosten, kuten aivojen, energiaksi. Insuliini vaikuttaa rasvakudokseen solunsisäisten signalointireittien

kautta estäen triglyseridien pilkkoutumista takaisin vapaiksi rasvahapoiksi (Smith ym., 1991). Kun tämä säätelymekanismi ei toimi kunnolla, rasvahappoja vapautuu vereen normaalia enemmän, mikä johtaa rasvojen kertymiseen muihin kudoksiin.

### **1.3 Elintavat ja energiametabolia**

Elintavoilla, etenkin liikunnalla ja ruokavaliolla, on olennainen vaikutus yksilön energiametabolialle ja sitä kautta terveydelle. Nykyisin yhä suuremman uhan terveydelle aiheuttaa liikalihavuus, jonka taustalla on usein liikaa energiaa sisältävä ruokavalio ja vähäinen liikunta. Näin ollen lihavuudesta johtuvien sairauksien hoidossa avainasemassa ovat oikeanlainen ruokavalio sekä liikunnan lisääminen. Energian tuotannon lähtöaine ja energianvapautustapa liikunnan aikana riippuvat useista tekijöistä, joihin kuuluvat muuan muassa ruokavalio, liikunnan rasittavuus ja kesto, sekä fyysisen harjoittelun ja yksilön terveyden taso (Evans ja Hughes, 1985).

#### **1.3.1 Ruokavalio**

Terveellinen ruokavalio sisältää sopivassa suhteessa kolme tärkeintä ravintoainetta: hiilihydraatteja, rasvaa ja proteiineja. Viime vuosina voimakkaasti yleistynyt liikalihavuus on usein seurausta liian energiapitoisesta ruokavaliosta. Rasva on energianlähteistä se, joka vaikuttaa olennaisesti saatuun energiamäärään. Tämä johtuu siitä, että rasva sisältää noin kaksi kertaa enemmän energiaa kuin vastaava määrä proteiineja tai hiilihydraatteja. Näin ollen vähärasvaisempaan ruokavalioon siirtyminen vähentää päivittäin saatua energiamäärää huomattavasti. Liikalihavuuden ja siihen liittyvien sairauksien mallina on käytetty muun muassa C57BL/6-kannan hiiriä, sillä ne ovat taipuvaisia ylipainoon etenkin korkearasvaisen ruokavaliion yhteydessä (Rebuffe-Scrive ym., 1993; Gregoire ym., 2002).

##### **1.3.1.1 Hiilihydraatit**

Hiilihydraatit ovat elimistön pääasiallinen energianlähde. Lisäksi ne ovat tärkeitä solujen rakennus- ja tukiranka-aineita. Hiilihydraatit rakentuvat monosakkarideista, jotka ovat



kiinnittyneet toisiinsa glykosididoksien avulla muodostaen suuren polymeerin. Tietyt elintärkeät kudokset, kuten aivot, voivat käyttää energianlähteenään lähes yksinomaan glukoosia, minkä vuoksi glukoosi onkin tärkein hiilihydraateista saatava energianlähde.

Aerobisissa oloissa glukoosi pilkotaan ensin kahdeksi pyruvaatiksi, jotka dekarboksyloidaan edelleen asetyylikoentsyymi-A:ksi. Asetyylikoentsyymi-A voi siirtyä mitokondrion matriksiin sitruunahappokiertoon ja edelleen oksidatiiviseen fosforylaatioon, jossa se hapetetaan hiilidioksidiksi ja vedeksi. Hiilihydraatit varastoidaan eläinsoluissa pääosin glykokeeninä, eli haaroittuneena glukoosin varastomuotona etenkin maksa- ja lihaskudokseen. Tätä glukoosin anabolista reittiä kutsutaan glykogeneesiksi. Jos glukoosia on hyvin runsaasti saatavilla, varastoidaan sitä myös energiatehokkaampaan muotoon triglyserideinä. Glukoneogeneesilla tarkoitetaan glukoosin valmistusta muusta lähtöaineesta kuin hiilihydraateista, esimerkiksi aminohapoista. Glukoneogeneesia tapahtuu pääosin maksassa verensokerin laskiessa ja maksan ja lihaksen glykokeenivarastojen ehtyessä.

Eläinmallien avulla on havaittu runsaasti hiilihydraatteja sisältävän ruokavalion lisäävän glukoosin hyödyntämistä lihaksessa ja maksassa (Hespel ja Richter, 1992; Surina-Baumgartner ym., 1996). Hyvin hiilihydraattipitoisen ruokavalion on myös havaittu indusoivan maksan rasvoittumista ja olevan yhteydessä metabolisen oireyhtymän kehittymiseen, jonka tyypillisiä piirteitä ovat muun muassa kohonnut verenpaine sekä insuliiniresistenssi (Ackerman ym., 2005). Hiilihydraatteja yhdistettynä korkearasvaiseen ruokavalioon käytetäänkin yleisesti rotilla ja hiirillä indusoimaan painonnousua tutkittaessa ylipainoon kytkeytyneitä sairauksia, kuten insuliiniresistenssiä ja tyypin 2 diabetestä (Surwit ym., 1995; Murase ym., 2001).

### **1.3.1.2 Lipidit**

Lipidit ovat hiilihydraattien jälkeen elimistön toiseksi tärkein energianlähde. Ne ovat myös solukalvojen olennainen rakennusaine. Suurin osa ravinnon lipideistä on rasvoja eli triglyseridejä. Ne koostuvat glyserolista sekä kolmesta siihen esterisidoksella liittyneestä rasvahaposta. Myös muita lipidejä, kuten kolesterolia, monoglyseridejä sekä fosfolipidejä esiintyy ravinnossa pieniä määriä. Yhteistä kaikille lipidiyhdisteille on, että ne liukenevat

huonosti veteen. Verisuonissa lipidit kuljetetaan proteiineihin yhdistettyinä, lipoproteiineina, jolloin ne ovat vesiliukoisia.

Koska rasvat sisältävät runsaasti energiaa, otetaan ne käyttöön, kun elimistön helpommin hyödynnettävä energia on käytetty. Tällöin rasvojen triglyseridirakenne hajotetaan lipaasientsyymien avulla ensin glyseroliksi ja rasvahapoiksi. Vapautuneet rasvahapot siirtyvät hajotettavaksi mitokondrioihin  $\beta$ -oksidointiin ja glyseroli puolestaan kuljetetaan maksaan glykolyysin tarpeisiin. Lipidien synteesiä tapahtuu pääosin rasvakudoksessa ja maksassa. Triglyseridejä tuotetaan etenkin silloin, kun glukoosia on runsaasti saatavilla. Tällöin osa soluun tulevasta glukoosista voidaan varastoida energiatehokkaampaan muotoon eli triglyserideiksi. *De novo* -lipidisynteesillä tarkoitetaan lipidien rakentamista pienistä, kahden hiilen yksiköistä.

Korkearasvainen ruokavalio tehostaa rasvojen käyttöä energianlähteenä. Selvin muutos on yleensä juuri lisääntynyt kyky hyödyntää rasvoja energianlähteenä, mikä on seurausta muun muassa lipoproteiinilipaasin kohonneesta määrästä (de Fourmestraux ym., 2004). Lipoproteiinilipaasi on entsyymi, joka katabolisoi triglyseridien pilkkoutumista vapaiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi rasvakudoksessa. Näin vapautuneet rasvahapot siirtyvät verenkierron mukana energianlähteeksi muun muassa lihaksiin. Lipoproteiinilipaasin ohella myös muiden rasvahappojen hajotukseen tarvittavien entsyymien määrä sekä maksassa että lihaksissa kasvaa (Kim ym., 2004; Turner ym., 2007).

Ylipainoon liittyviä sairauksia tutkittaessa korkearasvainen ruokavalio on yleinen keino painonnousun indusointiin koe-eläimillä (Oscai 1982; Collins ja Surwit, 1996; Kim ym., 2004). Kun ruokavaliosta saadaan energiaa enemmän kuin elimistö ehtii sitä kuluttaa, varastoituu ylimääräinen energia glykokeeninä ja triglyserideinä kudoksiin. C57BL/6J-kannan hiirillä tehdyissä kokeissa on havaittu korkearasvaisen ruokavalion johtavan triglyseridien kertymiseen rasvakudoksen ohella maksa- ja lihaskudoksiin (Strackowski ym., 2001; Gregoire ym., 2002; Lee ym., 2006b). Liian paljon energiaa sisältävä ravinto voi siten paitsi muuttaa elimistön tärkeiden kudosten energiametabolialla, myös vaikuttaa niiden morfologiaan. Tämän solunsisäisen rasvankertymisen on tutkimuksissa havaittu

olevan yhteydessä insuliiniresistenssin kehittymiseen (Goodpaster ym., 2000; Samuel ym., 2004).

### **1.3.1.3 Proteiinit**

Proteiinit ovat solun elintärkeitä rakenneosia. Lisäksi proteiineilla on useita eri tehtäviä; ne toimivat muun muassa entsyymeinä kemiallisissa reaktioissa, kuljetuskanavina solukalvolla sekä vasta-aineina elimistön immuunipuolustuksessa. Proteiinit koostuvat peptidisidoksin toisiinsa liittyneistä aminohapoista, joita esiintyy eläinsoluissa kaksikymmentä erilaista.

Ravinnosta saatavat aminohapot käytetään solun sisällä pääosin proteiinisynteesiin, mutta jos aminohappoja on runsaasti saatavilla, voidaan ne hapettaa sitruunahappokierrossa energian saamiseksi. Yleisemmät syyt aminohappojen käyttöön energianlähteenä ovat kuitenkin paasto tai hoitamaton diabetes, jolloin lihaksista vapautuu proteiineja energiametabolian käyttöön. Nämä proteiinit kulkeutuvat veren mukana maksaan, jossa aminohappojen hiilirungoista vapautetaan energiaa tai tuotetaan glukoosia glukoneogeenin avulla.

Korkean proteiinipitoisuuden vaikutuksia yksilön energiametabolialle ei ole tutkittu yhtä kattavasti kuin hiilihydraattien ja rasvojen vaikutuksia. Rotilla tehdyissä tutkimuksissa on havaittu ruokavalion korkean proteiinipitoisuuden olevan yhteydessä vähentyneeseen kehon rasvanmäärään, pienentyneeseen adiposyyttien kokoon sekä parantuneeseen verensokerinsäätelyyn (Baum ym., 2006; Blouet ym., 2006). Proteiinipitoista ruokavaliota on myös käytetty insuliiniresistenssin hoitoon ylipainoisilla potilailla (Farnsworth ym., 2003). Näissä tutkimuksissa ruokavalio on kuitenkin yhdistetty rajoitettuun energiansaantiin, jolloin ei voida suoraan päätellä, mikä vaikutus itse ruokavaliolla on yhdessä laihtumisen ja energiametabolian muutosten kanssa glukoositoleranssin paranemiseen.

### 1.3.2 Liikunta

Liikunta kuluttaa ravinnosta saamaamme energiaa sekä kehossa jo olevia energiavarastoja. Liikunta vaikuttaa osaltaan myös kehon sisäeritysjärjestelmään; sen aikana adrenaliinin ja noradrenaliinin vapautus lisämunuaisista lisääntyy vasteena sympaattisen hermoston aktiivisuudelle (Richter ym., 1981; Hoelzer ym., 1986). Samalla glykolyysi maksassa ja lihaksessa lisääntyy kasvaneen energiantarpeen myötä ja lipolyysi rasvakudoksessa stimuloituu (Ahlborg ym., 1974). Nämä muutokset saavat aikaan energian vapautumisen lisäksi energiametaboliaan tarvittavien metaboliittien mobilisaatiota. Lihaksen supistuminen myös lisää glukoosin aktiivista ottoa lihassolujen sisään, jolloin veren sokerin hyödyntäminen lisääntyy. Tämä puolestaan laskee hieman insuliinin määrää veressä alentaen vastaavasti glukagonin erittymistä.

Fyysisestä harjoittelusta seuraa yksilölle myös fysiologisia muutoksia: mitokondrioiden määrä ja energiametabolian oksidatiivisten entsyymien määrä lihaksissa kasvaa, kapillarisaatio lisääntyy ja lihaksen rasva- ja glykokeenivarastot lisääntyvät (Hollozy, 1967; Mole ym., 1971). Nämä muutokset ovat suurimpia punaisessa lihaksessa, eli tyypin I lihassoluissa. Harjoittelevilla yksilöillä on myös havaittu olevan enemmän tyypin I eli hitaita lihassoluja, jotka toimivat pääosin aerobisesti (Luginbuhl ym., 1984; Staron ym., 1984).

Koska lihaksen ja maksan glykokeenivarastot ovat rajallisia, täytyy kehon tuottaa energiaa muistakin lähteistä kuin glukoosista. Tätä varten maksassa tapahtuu glukoneogeneesiä, jolloin glukoosia tuotetaan muista lähtöaineista kuin hiilihydraateista. Glukoosia voidaan liikunnan yhteydessä tuottaa esimerkiksi lihaksista vapautuvista laktaatista ja pyruvaatista, tai rasvakudoksen vapauttamasta glyserolista. Näin ollen maksa kierrättää muita metaboliitteja ylläpitääkseen sopivaa verensokeria. Glukoosin ohella rasvat ovat aerobisessa liikunnassa tärkeä energianlähde. Rasvat voivat tarjota energiaa ATP:n tuotantoon kolmesta eri lähteestä: lihaksen tai rasvakudoksen triglyseridivarastoista sekä seerumin vapaista rasvahapoista. Rasvojen hyödyntäminen on tehokkainta submaksimaalisessa liikunnassa, sillä rasvahapoista ei voida tuottaa ATP:ta anaerobisesti.

Myös vapaiden rasvahappojen määrä veressä on rajallinen, joten liikunnan kannalta olennaisin energianlähde ovat rasvakudoksesta vapautuvat rasvahapot.

Lihaksissa olevat mitokondriot voidaan jakaa kahteen eri ryhmään: myofibrillien väleissä sijaitseviin solunsisäisiin mitokondrioihin sekä solukalvonalaisiin mitokondrioihin. Näistä solukalvonalaiset tuottavat pääasiassa energiaa membraanikuljetukseen, kun taas solunsisäiset tuottavat energian lihaksen supistumiseen. Mitokondriopopulaatioilla on havaittu olevan erilaiset morfologiset, fysiologiset ja biokemialliset ominaisuudet (Cogswell ym., 1993; Koves ym., 2005). Myofibrillien väleissä sijaitsevat mitokondriot ovat kooltaan pieniä, ja ne sijaitsevat nimensä mukaisesti supistuvien filamenttien väleissä. Solukalvonalaiset mitokondriot puolestaan ovat usein kooltaan suurempia ja ne ryhmittyvät solukalvon alle tiiviiksi keräymiksi. Kestävyysharjoittelun on havaittu lisäävän mitokondrioiden biogeneesiä sekä oksidatiivista kapasiteettia (Mole ym., 1971; Gordon ym., 2001). Mitokondriopopulaatioista solukalvonalaisten mitokondrioiden on havaittu antavan suuremman vasteen liikunnalle niin mitokondrioiden kasvaneena pinta-alana kuin lisääntyneenä oksidatiivisena kapasiteettinakin (Bizeau ym., 1998).

## **1.4 Energiametabolian häiriöt**

### **1.4.1 Ylipaino**

Yksi nykyajan nopeimmin yleistyvistä terveysriskeistä on ylipaino. Terveellä ihmisellä positiivinen energiatasapaino johtaa ylimääräisen energian varastointiin triglyserideinä rasvakudokseen (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007). Kun positiivinen energiatasapaino jatkuu pitkään, seuraa liikalihavuus. Maailman terveysjärjestö WHO:n (World Health Organisation) mukaan liikalihavuus määritellään kehon rasvakudoksen lisääntyneenä kertymisenä siinä määrin, että se alkaa olla terveydelle vaarallista (vuoden 2000 määritelmä). Ylipaino määritellään yleisesti kehon massaindeksillä, joka lasketaan jakamalla paino (kg) pituuden neliöllä (m<sup>2</sup>).

**Taulukko 1.** Aikuisten luokittelu kehon massaindeksin mukaan

<b>Kehon massaindeksi</b>	<b>Luokittelu</b>
≥ 30,0	Liikalihavuus
≥ 25,0	Ylipaino
18,5–24,99	Normaalipaino

Ylipaino lisää riskejä sairastua muihin energiametabolian häiriöistä johtuviin sairauksiin, joista hyvin yleinen on tyypin 2 diabetes. Kun kehon massaindeksin arvo nousee yli 25,0, joka on ylipainon raja, kasvaa riski sairastua. Pelkkä kehon massaindeksi ei kuitenkaan yksin riitä terveystarkistuksen arvioimiseksi, vaan merkitystä on myös sillä, mihin rasva on kertynyt. Tyypillistä diabeetikoille on etenkin keskivartaloon sisäelinten ympärille kertyvä rasva (Miyazaki ym., 2002), jonka on havaittu olevan yhteydessä insuliiniherkkyyden alenemiseen (Gabriely ym., 2002). On arvioitu, että noin 25–35 % insuliinin toiminnan muutoksista on yhteydessä juuri ylipainoon (ks. yleiskatsaus Reaven ym., 2004). Keskivartaloon kertynyt vatsaontelon sisäinen rasva vapauttaa verenkiertoon muita rasvakudoksia enemmän vapaita rasvahappoja, sillä se ei ole herkkä insuliinin lipidien pilkkoutumista estävälle vaikutukselle (ks. yleiskatsaus Bjorntorp, 1991). Näin syntyvää, diabetekselle tyypillistä kohonnutta vapaiden rasvahappojen määrää kutsutaan hyperlipidemiaksi.

### **1.4.2 Insuliiniresistenssi**

Insuliiniresistenssi määritellään siten, että tietty määrä insuliinia aiheuttaa normaalia pienemmän biologisen vasteen (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007). Pienentynyt insuliinin erityis tai sen heikentyneet vaikutukset kohdekudoksissa vähentävät insuliinin stimuloimaa glukoosinottoa, mikä puolestaan johtaa veren sokeripitoisuuden nousuun. Tämä kehon energiametabolian häiriö on myös yksi tyypin 2 diabeteksen tyypillisimmistä piirteistä.

### 1.4.2.1 Rasvahappojen indusoima insuliiniresistenssi

Vuonna 1963 kiinnitettiin ensimmäisen kerran huomiota vapaiden rasvahappojen merkitykseen insuliiniresistenssin synnyssä (Randle ym., 1963). Normaalisti ylimääräinen energia varastoidaan rasvakudokseen triglyserideiksi. Lopulta rasvakudoksen varastointikyky voi ylittyä, jolloin triglyseridejä alkaa kertyä muualle kuin rasvakudokseen, esimerkiksi maksaan ja luustolihasiin (ks. yleiskatsaus Unger, 2003). Ylimääräisten lipidien kertyminen muualle kuin rasvakudokseen voi johtua pääsääntöisesti kolmesta eri syystä:

- 1) rasvahappojen lisääntynyt kuljetus solujen sisään
- 2) rasvahappojen kasvanut tuottaminen kudoksessa
- 3) rasvahappojen vähentynyt  $\beta$ -oksidatio tai kulutus (ks. yleiskatsaus Shulman, 2000)

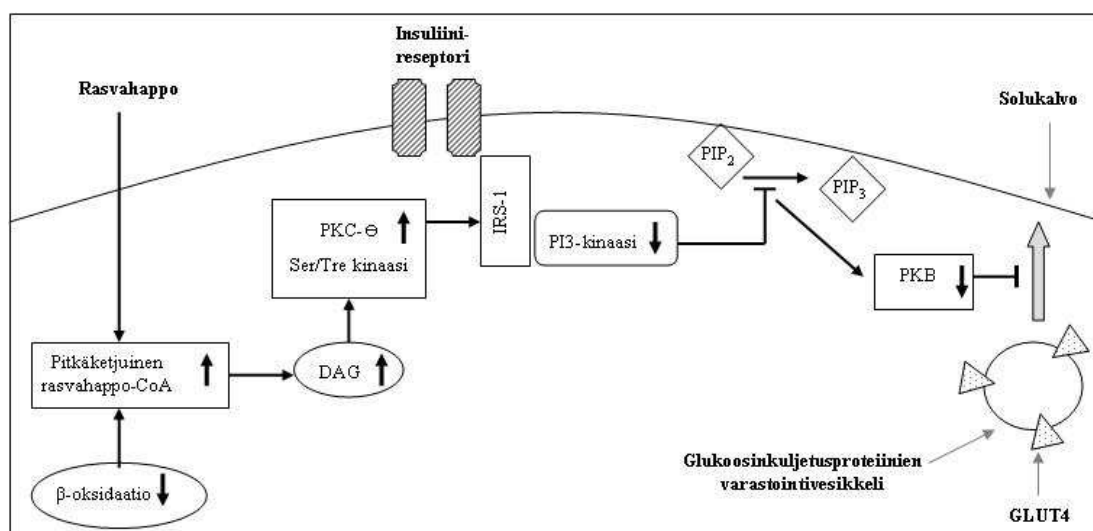
Solunsisäisen rasvan kertyminen muualle kuin rasvakudokseen voi johtaa rasvahappojen aiheuttamaan insuliiniresistenssiin (ks. yleiskatsaus Shullman, 2000).

#### Luustolihas

Luustolihas on kehon merkittävin glukoosia kuluttava kudos (DeFronzo ym., 1981). Tämän vuoksi sen heikentynyt insuliiniherkkyys vaikuttaa koko kehon glukoosimetaboliaan. Aiemmin on huomattu rasvaisen ruokavalion aiheuttavan rasvojen kertymistä luustolihasiin (de Fourmestreaux ym., 2004). Goodpaster ym. (2000) havaitsivat lisäksi, että lihassolujen triglyseridimäärä oli lisääntynyt erityisesti ylipainoisilla tyypin 2 diabetestä sairastavilla henkilöillä. Yksinkertaistettu kaavio rasvahappojen indusoiman insuliiniresistenssin ehdotetusta signalointireitistä lihaksessa on esitetty kuvassa 2.

Kohonnut pikäketjuisten rasvahappojen määrä on seurausta joko lisääntyneestä rasvahappojen otosta soluun, pienentyneestä rasvojen  $\beta$ -oksidatiosta tai molemmista. Tämä lisää diasyyloglyserolin (DAG) määrää solun sisällä johtaen tietyn proteiini- ja treoniinifosforylaation. Tämä estää IRS-1:n tyrosiinifosforylaatiota, joka normaalisti

tapahtuisi vasteena insuliinin kiinnittymiselle. IRS-1:n seriini-treoniinifosforylaatio inhiboi fosfatidyylinositoli 3-kinaasin (PI 3-kinaasi) toimintaa. PI 3-kinaasin toiminnan lasku puolestaan estää solukalvolla olevan fosfatidyylinositoli-4,5-bisfosfaatin (PIP<sub>2</sub>) muuttumista fosfatidyylinositoli-3,4,5-trisfosfaatiksi (PIP<sub>3</sub>), jolloin myös proteiinikinaasi B:n (PKB) aktivaatio laskee. PKB:n aktivaation lasku inhiboi glukoosinkuljetusproteiinien varastointivesikkelien siirtymistä solukalvolle. Signaalintiketju johtaa lopulta siihen, etteivät glukoosinkuljettajaproteiinit siirry solukalvolle vasteena insuliinille, jolloin lihaksen glukoosinottokyky pienenee (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007).



**Kuva 2. Yksinkertaistettu kaavio rasvahappojen indusoimasta insuliiniresistenssistä luustolihasessa.** Rasvahappojen kertyminen solun sisään yhdessä alentuneen  $\beta$ -oksidaation kanssa lisäävät koentsyymi A:han (CoA) liittyneiden pitkäketjuisten rasvahappojen ja diasyylyglyserolin (DAG) määriä. Tämä laukaisee reaktiketjun, jossa aktivoitunut proteiinikinaasi C (PKC- $\theta$ ) fosforyloi insuliinireseptorin substraatti 1:n (IRS-1) seriini- ja treoniinikohdista. Tämä estää IRS-1:n tyrosiinifosforylaatiota johtaen fosfatidyylinositoli 3-kinaasin (PI 3-kinaasi) aktivaation laskuun. Näin ollen fosfatidyylinositoli-4,5-bisfosfaatin (PIP<sub>2</sub>) muuttuminen fosfatidyylinositoli-3,4,5-trisfosfaatiksi (PIP<sub>3</sub>) estyy saaden aikaan proteiinikinaasi B:n (PKB) aktivaation laskun. Reaktiketju johtaa siihen, etteivät glukoosireseptorien varastointivesikkelit siirry enää solukalvolle, jolloin insuliinin stimuloima glukoosinotto heikkenee. (Mukaeltu katsausartikkelista Morino ym., 2006)

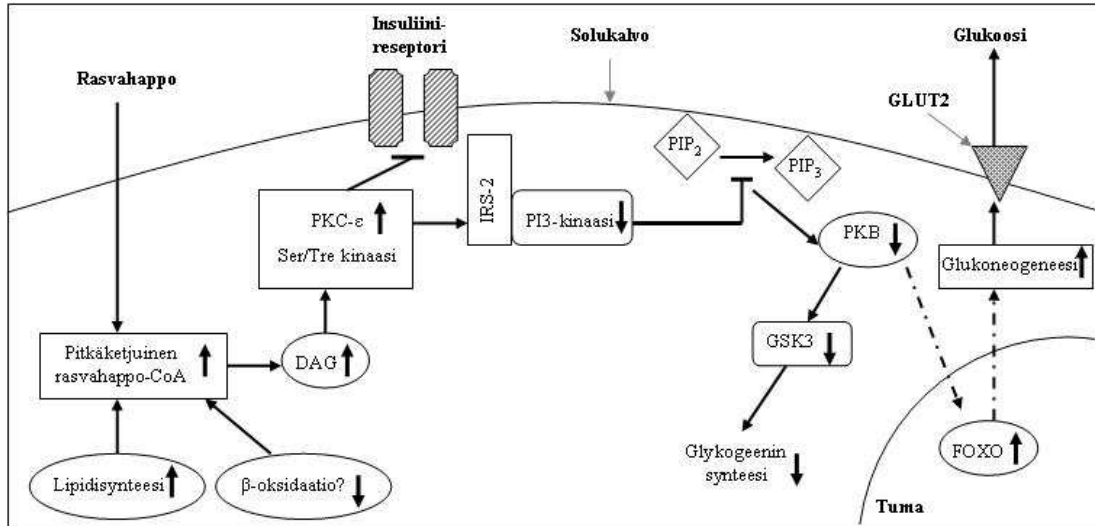


## Maksa

Maksa vastaa glukoosin varastoinnista, synteesisistä ja vapautuksesta koko elimistön tasolla pitäen veren sokeripitoisuuden tasaisena. Kun veren sokeripitoisuus on korkea, kuljetetaan glukoosia maksasoluihin eli hepatosyytteihin glukoosinkuljetusproteiini 2:n (GLUT2) kautta. Glukoosin kuljettaminen maksasoluissa on hormonaalisesti säädeltyä, mutta toisin kuin luustolihaksissa olevat GLUT4-kuljetusproteiinit, GLUT2-proteiinit eivät ole suoranaisesti insuliinisensitiivisiä (Nevado ym., 2006). Kun ruokailun yhteydessä verensokeri alkaa kohota, varastoidaan se maksaan glykokeeninä. Kun glukoosia on hyvin runsaasti, hyödynnetään glukoosista saatava asetyylikoentsyymi-A lipogeneesissä varastoiden osa glukoosista soluun rasvoina. Yksinkertaistettu kaavio rasvahappojen indusoiman insuliiniresistenssin ehdotetusta signaalintireitistä maksassa on esitetty kuvassa 3.

Pitkäketjuisten rasvahappojen ylimääräinen kertyminen maksasolujen sisään johtuu lisääntyneestä rasvahappojen kuljetuksesta soluun tai kohonneesta lipidisynteesisistä. Kuten lihaskudoksessakin, syyksi on arveltu myös mitonkondrioiden pienentyntä rasvojen  $\beta$ -oksidaatiota. Kohonnut pitkäketjuisten rasvahappojen määrä johtaa kohonneeseen diasyylyglyserolin (DAG) konsentraatioon, joka puolestaan aktivoi tietyn proteiinkinaasi C:n alatyypin, joka on maksassa PKC- $\epsilon$ . PKC- $\epsilon$  kiinnittyy solukalvolla olevaan insuliinireseptiin inaktivoien sen. Tämä johtaa insuliinireseptorin substraatti 2:n (IRS-2) vähentyneeseen tyrosiinifosforylaatioon, jolloin fosfatidyli-inositoli 3-kinaasin (PI 3-kinaasi) toiminta estyy (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007).

PI3-kinaasin aktivaation lasku on yhteydessä proteiinkinaasi B:n (PKB) toiminnan estymiseen solukalvolla olevien PIP<sub>2</sub>:n ja PIP<sub>3</sub>:n kautta, mikä voi puolestaan johtaa glykokeenin synteisiin laskuun glykokeenisyntaasikinaasi-3:n (GSK3) kautta. PKB:n inhibiition arvellaan olevan myös yhteydessä glukoneogeneesin nousuun tumassa olevan FOXO-proteiinin ("forkhead box protein O") toiminnan noustessa. Glukoneogeneesin noustessa kuljetetaan sokeria yhä enemmän solusta ulos solukalvolla olevan glukoosinkuljetusproteiinin (GLUT2) kautta (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007).



**Kuva 3. Yksinkertaistettu kaavio rasvahappojen indusoimasta insuliiniresistenssistä maksakudoksessa.** Rasvahappojen kertyminen solun sisään yhdessä lisääntyneen lipidisynteesin kanssa lisäävät koentsyymi A:han (CoA) liittyneiden pitkäketjuisten rasvahappojen ja diasyyli glyserolin (DAG) konsentraatioita. Tämä laukaisee signaalireitin, jossa tietty aktivoitunut proteiinkinaasi C (PKC-ε) inhiboi insuliinireseptoria ja estää insuliinireseptorin substraatti 2:n tyrosiinifosforylointia (IRS-2). Tämä johtaa fosfatidyli-inositoli 3-kinaasin (PI 3-kinaasi) inaktivointiin, mikä puolestaan estää solukalvolla olevan fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatin (PIP<sub>2</sub>) muuttumista fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trisfosfaatiksi (PIP<sub>3</sub>). Näin ollen proteiinkinaasi B:n (PKB) aktivaatio laskee. PKB:n toiminnan inhibiointi johtaa vähentyneeseen glykogeenisyntaasi-kinaasi-3:n (GSK3) aktivaatioon ja sitä kautta glykogeenin synteesin laskuun. PKB:n aktivaation laskun uskotaan myös johtavan FOXO:n ("forkhead box protein O") aktivaation nousuun tumassa, joka johtaa lopulta glukoneogeneesin kasvuun sekä glukoosin vapauttamiseen solun ulkopuolelle. (Mukaeltu katsausartikkelista Morino ym., 2006)

### 1.4.3 Metabolinen oireyhtymä

Tyyppin 2 diabeteksen puhkeaminen sekä sydän- ja verisuonitaudit ovat usein yhteydessä metaboliseen oireyhtymään. Oireyhtymä kuvattiin jo 1920-luvulla, mutta diabeteksen yhteydessä se otettiin ensimmäisen kerran esille vuonna 1988 (ks. yleiskatsaukset Alberti ym., 2005; Reaven, 1988). Metabolinen oireyhtymä koostuu useista eri oireista, eikä sitä voida yksiselitteisesti määrittellä. Taudista onkin ollut käytössä useita eri nimityksiä; muun muassa syndrooma X, dysmetabolinen syndrooma ja insuliiniresistenssioireyhtymä (WHO, 1999). Kaikkien näiden nimitysten taustalla ovat kuitenkin samat sydän- ja verisuonitautien riskitekijät. Nykyisin käyttöön on vakiintunut termi metabolinen oireyhtymä.

Metabolinen oireyhtymä on eräs esimerkki useiden eri sairauksien ja riskitekijöiden kertymisestä samalle henkilölle. Tällaisia riskitekijöitä ovat esimerkiksi muuttuneet veren rasva-arvot, korkea verenpaine, ylipaino ja insuliiniresistenssi (ks. yleiskatsaus Laaksonen ja Niskanen, 2006). Useilla eri järjestöillä on omat suosituksensa metabolisen oireyhtymän määrittämiseksi. Näistä tunnetuimpia ovat Maailman terveysjärjestön (WHO, 1999) ja International Diabetes Federationin (IDF) kriteerit (ks. yleiskatsaus Alberti ym., 2005). Tällä hetkellä yksi käytetyimmistä on IDF:n määritelmä, joka on esitetty taulukossa 2. Tässä määritelmässä ensimmäinen merkki metabolisesta oireyhtymästä on keskivartalolihavuus, jonka lisäksi potilaalla tulee olla vähintään kaksi seuraavista kriteereistä: alentunut HDL-kolesterolipitoisuus (HDL = high-density lipoprotein, yksi veren lipoproteiinityppi) tai kohonnut triglyseridipitoisuus, verenpaine tai plasman glukoosipitoisuuden paastoarvo. Tiettyjä veren rasva-arvojen muutoksia, kuten edellä mainittuja triglyseridipitoisuuden nousua ja HDL-kolesterolipitoisuuden laskua, nimitetään yhdessä dyslipidemiaksi.

**Taulukko 2.** Metabolisen oireyhtymän kriteerit International Diabetes Federationin (IDF) mukaan.

<b>Keskivartalolihavuus</b>	
Vyötärön ympärysmitta	Naisilla $\geq 80$ cm Miehillä $\geq 94$ cm
<b>Lisäksi kaksi seuraavista kriteereistä:</b>	
HDL-kolesterolipitoisuus	Naisilla $< 1,29$ mmol/l Miehillä $< 1,03$ mmol/l tai pieneen HDL-kolesterolipitoisuuteen kohdistuva lääkehoito
Triglyseridipitoisuus	$\geq 1,7$ mmol/l tai suureen triglyseridipitoisuuteen kohdistuva lääkehoito
Kohonnut verenpaine	systolinen $\geq 130$ mmHg diastolinen $\geq 85$ mmHg tai aikaisemmin todetun korkean verenpaineen lääkehoito
Plasman glukoosipitoisuuden paastoarvo	$\geq 5,6$ mmol/l tai aikaisemmin todettu tyypin 2 diabetes

Keskivartalolihavuuden ohella tyypillistä metaboliselle oireyhtymälle on triglyseridien epänormaali kertyminen muun muassa luustolihaan, maksaan ja jopa verisuonten seinämiin. Ylimääräisen rasvan kertyminen lihaksiin heikentää niiden glukoosinottoa ja lipidien kuljetus maksakudokseen puolestaan heikentää maksan insuliiniherkkyyttä. Kehon energiametabolian muutokset johtavat lopulta myös pienentyneeseen HDL -

kolesterolipitoisuuteen sekä verenpaineen nousuun. Nämä veriarvojen muutokset yhdistettynä verisuonten seinämiin kertyvän rasvan kanssa altistavat sydän- ja verisuonitaudeille.

Keskivartalolihavuus ja siihen liittyvä metabolinen oireyhtymä ovat Suomessa hyvin yleisiä. Suomessa aikuisväestöstä tautia esiintyy noin 39 %:lla miehistä ja 22 %:lla naisista (Ilarinne-Parikka ym., 2004). IDF:n määrittelemän vyötärön ympärysmittan perusteella jopa noin 69–76 % suomalaisista on metabolisen oireyhtymän riskiryhmässä (Peltonen ym., 2006). Viiden vuoden seurantatutkimuksessa on havaittu, että metabolista oireyhtymää sairastavilla on noin 3,5-kertainen riski sairastua tyypin 2 diabetekseen (ks. yleiskatsaus Laakso, 2005). Terveysriskeltään metabolinen oireyhtymä on hyvin samankaltainen kuin tyypin 2 diabetes, minkä vuoksi sen aikainen diagnosointi ja hoitaminen ovat tärkeässä asemassa lisäsairauksien ehkäisemisen kannalta.

#### **1.4.4 Diabetes**

Diabetes mellitus eli sokeritauti on aineenvaihduntasairaus, joka voidaan jakaa pääasiassa tyypin 1 ja tyypin 2 diabetekseen. Tyypin 1 diabetes aiheutuu haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia erittävien  $\beta$ -solujen autoimmuuniohjatusta tuhoutumisesta, joka johtaa kykenemättömyyteen tuottaa insuliinia. Tyypin 1 diabetesta nimitetään myös nuoruusiän diabetekseksi, sillä tauti kehittyy yleisesti lapsuudessa tai nuoruusiässä. Tyypin 2 diabeteksessa haiman  $\beta$ -solut eivät ole tuhoutuneet, mutta niiden kyky tuottaa insuliinia on pienentynyt samalla kun insuliinin vaikutukset kohdekudoksissa ovat heikentyneet. Tyypin 2 diabetes kehittyy usein vasta aikuisiässä tai vanhuudessa, minkä vuoksi sitä kutsutaankin aikuisiän diabetekseksi. Insuliinin erityksen tai toiminnan häiriintyminen johtaa diabetekselle tyypilliseen veren sokeripitoisuuden nousuun. Sekä tyypin 1 että 2 diabeteksessa hoitona on ruokavalion muuttaminen sekä tarvittaessa liikunnan lisääminen. Nuoruusiän diabeteksen hoidossa tarvitaan lisäksi insuliinipistoksia korvaamaan  $\beta$ -solujen toimintaa.

Maksa- ja lihaskudoksilla on tärkeä rooli elimistön energiametaboliassa. Maksa vastaa muun muassa glukoosin varastoinnista ja tuotannosta ylläpitäen energiatasapainoa koko kehon tasolla. Luustolihakset puolestaan ovat vastuussa glukoosin ja lipidien kulutuksesta mekaanisen työn kautta. Molemmista näissä kudoksissa on havaittu tapahtuvan aineenvaihdunnan muutoksia tyypin 2 diabeteksen kehittymisen yhteydessä.

Ylipaino ja vähäinen liikunta ovat tyypin 2 diabeteksen yleistymisen suurimpia geneistä riippumattomia aiheuttajia (ks. yleiskatsaus Zimmet, 1999). Rasvaisen ruokavalion aikaansaama positiivinen energiantasapaino johtaa muutoksiin lipidimetaboliassa, mikä havaitaan muun muassa rasvojen kertymisinä maksa- ja lihaskudoksiin. Ylimääräisen rasvan kertymisen muualle kuin rasvakudokseen on havaittu olevan yhteydessä insuliiniresistenssiin, joka on yksi diabetekselle tyypillinen piirre (ks. yleiskatsaus Kovacs ja Stumvoll, 2005). Taudin syntymekanismien selvittäminen on tärkeää, sillä tyypin 2 diabetes aiheuttaa useita lisäsairauksia, joiden hoitaminen on hankalaa ja yhteiskunnalle kallista.

#### **1.4.4.1 Tyypin 2 diabetes**

Tyypin 2 diabetes on tällä hetkellä yksi maailman nopeimmin yleistyvistä elintapasairauksista. On arvioitu, että vuoteen 2025 mennessä tautia sairastaisi jopa 300 miljoonaa ihmistä ympäri maailman (ks. yleiskatsaus Zimmet ym., 2001). Tyypin 2 diabetes on hyvin yleinen Suomessa ja se onkin yksi kansantaudeistamme. Suomessa on tällä hetkellä hoidossa arviolta 300 000 diabeetikkoa, joista noin 250 000 sairastaa tyypin 2 diabetesta. On arvioitu, että laskettaessa mukaan diabetesta tietämättään sairastavat suomalaiset, nousisi sairastavien kokonaismäärä yli puolen miljoonan (ks. yleiskatsaus Reunanen 2004).

Tyypin 2 diabeteksen tärkeimpiä riskitekijöitä taudin kehittymiselle ovat perinnöllinen taipumus, vähäinen liikunta sekä ylipaino. Epäterveelliset elintavat ja yleistynyt liikalihavuus ovat lisänneet tyypin 2 diabeteksen esiintymistä jopa siinä määrin, että nykyisin tautia tavataan myös lapsilla ja nuorilla (Fagot-Campagna ym., 2001). Diabetes on monisyinen aineenvaihduntasairaus, joka vaikuttaa koko elimistöön. Taudille tyypillistä

ovat ongelmat niin hiilihydraatti-, rasva- kuin proteiiniaineenvaihdunnassakin. Tyypin 2 diabeteksen peruspierre on kuitenkin veren sokeripitoisuuden nousu eli hyperglykemia, joka on seurausta joko liian vähäisestä insuliinin erityksestä tai sen tehottomuudesta kohdekudoksissa. Insuliinin tehottomuus kohdekudoksissa voidaan havaita veren kohonneesta insuliinimäärästä, eli hyperinsulinemiasta, kun keho tuottaa ylimäärin insuliinia kompensoidakseen sen toimimattomuutta kohdekudoksissa.

Tyypin 2 diabetes diagnosoidaan plasman glukoosiarvon perusteella taulukon 3 mukaisesti. Taulukon arvot perustuvat Maailman terveysjärjestön WHO:n diabeteskriteereihin vuodelta 1999. Paastoglukoosiarvo määritetään yön yli kestäneestä paastosta. Kahden tunnin glukoosiarvo mitataan glukoositoleranssitestissä antamalla yön yli paastonneelle koehenkilölle 75 g glukoosia liuksena suun kautta.

**Taulukko 3.** Glukoosinsietokyvyn diagnoosit plasman glukoosiarvojen perusteella

<b>Diagnoosi</b>	<b>Paastoglukoosi (mmol/l)</b>	<b>2 tunnin arvo (mmol/l)</b>
Normaali	< 6,1	< 7,8
Kohonnut paastoglukoosi	6,1 – 6,9	< 7,8
Heikentynyt glukoosinsieto	< 7,0	7,8 – 11,0
Tyypin 2 diabetes	> 7,0	> 11,0

Tyypin 2 diabeteksessa paastoglukoosiarvon on oltava yli 7,0 mmol/l ja kahden tunnin glukoositoleranssitestin arvon yli 11,0 mmol/l. Diabeteksen toteamisen lisäksi on ryhdytty kiinnittämään yhä enemmän huomiota myös lievempiin glukoosiaineenvaihdunnan häiriöihin, kuten kohonneeseen paastoglukoosiarvoon sekä heikentyneeseen glukoosinsietoon glukoositoleranssitestissä (taulukko 3). Sekä kohonnut paastoglukoosi että heikentynyt glukoosinsieto altistavat diabeteksen kehittymiselle sekä sydän- ja verisuonitaudeille. Hoitamattomana noin joka kolmannelle ihmisistä, joilla on todettu heikentynyt glukoosinsieto, kehittyy aikuisiän diabetes 5–10 vuoden sisällä (Vaccaro ym., 1999).

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää liikunnan ja ruokavalion vaikutusta hiiren lihas- ja maksakudoksen hienorakenteeseen sekä saada tätä kautta lisätietoa elintapasairauksien synnystä. Tutkimuksen tarkoituksena oli:

- 1) Selvittää liikunnan ja ruokavalion vaikutuksia solun sisään kertyvän rasvan määrään maksa- ja lihaskudoksessa.
- 2) Tutkia ruokavalion ja liikunnan yhteyttä solunsisäisten rasvapisaroiden kokoon sekä kappalemäärään.
- 3) Selvittää liikunnan ja ruokavalion vaikutusta solukalvonalaisten mitokondriokeräymien pinta-alaan lihaskudoksessa.

## 3. Materiaali ja menetelmät

### 3.1 Koeasetelma

Tutkimuksen koesarja tehtiin C57BL/6J-hiirikannan uroshiirillä (Jyväskylän yliopiston koe-eläintoimikunta, lupanumero 55/12.12.2005). Mukana oli kuusi ruokavalion ja liikunnan suhteen erilaista ryhmää, joista jokaisessa oli viisi hiirtä (n = 5). Koeryhmät olivat seuraavat:

- 1) Kontrolli10 on hiiri, joka on saanut 10 % energiastaan rasvoista
- 2) Kontrolli60 on hiiri, jonka on saanut 60 % energiastaan rasvoista
- 3) Juoksija10 on hiiri, joka on saanut 10 % energiastaan rasvoista, ja sen häkissä on ollut juoksupyörä
- 4) Juoksija60 on hiiri, jonka on saanut 60 % energiastaan rasvoista, ja sen häkissä on ollut juoksupyörä
- 5) Kontrolli/kontrolli on hiiri, joka on aloittanut syömällä 60 % rasvaa sisältänyttä ruokaa ja myöhemmin vaihtanut vähärasvaiseen ruokaan
- 6) Kontrolli/juoksija on hiiri, joka on aloittanut syömällä 60 % rasvaa sisältänyttä ruokaa ja myöhemmin siirtynyt vähärasvaiseen ruokaan ja saanut häkkiinsä juoksupyörän

Kontrolliryhmien hiiret elivät tavallisissa hiirihäkeissä. Juoksijahiirillä oli häkeissään lisäksi juoksupyörät vapaaehtoista juoksuharjoittelua varten. Hiiret aloittivat ruokavalion noudattamisen ja mahdollisen juoksuharjoittelun 5–6 viikon ikäisinä. Hiiret elivät häkeissä yksin. Molempien ruokavalioiden ravinto annettiin koe-eläimille pelletteinä (Purina Mills TestDiet®, PMI® Nutrition International, Richmond, IN). Ravinto ja vesi olivat häkeissä vapaasti saatavilla. Tutkimuksen ajan eläimet pidettiin koe-eläinhuoneessa, jonka kosteusprosentti oli noin 50 ja lämpötila + 20 °C. Valo/pimeä-rytmi oli 12 /12 tuntia.



Koe kesti 19 viikkoa. Ruokavaliota vaihtaneet hiiret siirtyvät vähärasvaiseen ravintoon yhdeksän viikon kuluttua kokeen alkamisesta. Ryhmän kontrolli/juoksija hiiret saivat häkkeihinsä juoksupyörät ruokavalion vaihdon yhteydessä. Hiiret punnittiin ja lopetettiin kolmen tunnin paaston jälkeen kello 9–11 välisenä aikana aamupäivällä. Preparoinnin yhteydessä hiirten maksat punnittiin kokonaisina.

### **3.2 Insuliinitoleranssikoe**

Hiirille tehtiin insuliinitoleranssikoe 17 viikon kuluttua kokeen aloittamisesta (Heikki Kainulaisen tutkimusryhmä). Hiiret olivat paastonneet kuusi tuntia ennen kokeen aloittamista. Kokeen alussa koe-eläimet punnittiin, ja insuliinia injektoitiin vatsaonteloon 1 U hiiren painokiloa kohti (Novo Nordisk A/S, Espoo, Suomi; 100 IU/ml). Verinäytteet otettiin takaraajan jalkavarren iholaskimosta (*saphenous*), ja niistä analysoitiin B-glukoosin paastoarvo ennen insuliinin injektointia, sekä B-glukoosin arvot 15, 30 ja 60 minuutin jälkeen insuliinin injektoinnista (HemoCue AB, Ruotsi; B-Glucose Analyzer).

### **3.3 Näytteiden valmistus elektronimikroskopointia varten**

Hiiriltä otettiin näytteet sekä luustolihaksesta (*soleus*) että maksasta ja ne leikattiin partakoneen terällä pieniksi paloiksi (1 x 1 x 1 mm). Näytteet fiksoitiin glutaraldehydillä (3 %, 2–2,5 h) ja osmiumtetroksidilla (1 %, 1 h) fosfaattipuskurissa (0,1 M, pH 7,4, + 4 °C). Näytteistä poistettiin vesi nousevalla alkoholisarjalla, ja ne valettiin Eponiin (LX-112).

Näyteblokeista leikattiin ultramikrotomilla ensin puoliohuteleikkeitä, ja ne värjättiin toluidiinisisinillä. Puoliohuteleikkeet tarkasteltiin valomikroskoopilla, ja niiden perusteella näytteistä valittiin edustavat kohdat ohuteleikkeitä varten. Lihasnäytteet pyrittiin leikkaamaan poikkisyylin. Ohuteleikkeet asetettiin hiloille ja värjättiin uranyyliasetaatilla ja lyijysitraatilla.

Maksanäytteet ja osa lihasnäytteistä leikattiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella (Raija Vassinen). Suurin osa lihasnäytteistä leikattiin Kuopion yliopiston BioMater-keskuksessa (Sunna Lappalainen).

### 3.4 Näytteiden mikroskopointi ja kuvaus

Puoliohutleikkeet tarkasteltiin ja kuvat otettiin valomikroskoopilla (LEITZ DM RB/E - tutkimusmikroskooppi). Maksakudoksesta arvioitiin silmämääräisesti solunsisäisten rasvapisaroiden määrää ja kokoa. Lihaskudoksesta puolestaan tarkasteltiin solukalvonalaisia mitokondriokeräymiä. Molempien kudosten puoliohutleikkeistä otettiin esimerkkikuvia käyttäen 40 kertaa suurentavaa objektiivia.

Ohutleikkeet tutkittiin läpäisyelektronimikroskoopilla (JEOL JEM-1200 EX) käyttäen 60 kV:n kiihdytysjännitettä. Parhaat leikkeet valittiin kuvattaviksi ja kuvat otettiin hilalta valitusta ohutleikkeestä satunnaisesti, eikä sama solu saanut esiintyä useammassa kuin yhdessä kuvassa.

Maksanäytteet kuvattiin 4 000-kertaisella ja lihasnäytteet 2 500-kertaisella primäärisuurenoksella. Lihaskuvat pyrittiin ottamaan lihassolun reunalta, jotta kuvaan saataisiin mahdollisimman paljon solukalvoa. Lopuksi kuvat siirrettiin digitaaliseen muotoon (Paavo Niutanen) ja analysoitiin morfometrisesti.

### 3.5 Kuvien morfometrinen analysointi

Maksa- ja lihasnäytteiden kuvat analysoitiin Jyväskylän yliopiston liikuntabiologian laitoksella morfometriin määrittämiin kehitetyn tietokoneohjelman avulla (Olympus: AnalySIS). Määrittämiä varten kuvat kalibroitiin mittajanalla. Yhdestä leikkeestä analysoitiin 10–13 kuvaa.

Maksanäytteistä määritettiin solunsisäisten rasvapisaroiden lukumäärä ja keskimääräinen pinta-ala ( $\mu\text{m}^2$ ) sekä rasvapisaroiden tilavuusosuus sytoplasmasta (%). Rasvapisarot tunnistettiin muodon ja värin perusteella. Sytoplasmian pinta-alaa määritettäessä kuvista rajattiin pois tumat, Kupfferin solut, sappikapillaarit sekä verisuonet. Maksanäytteistä analysoitiin yhteensä 358 kuvaa.

Lihasnäytteistä määritettiin solukalvonalaisten mitokondrioiden pinta-ala ( $\mu\text{m}^2$ ) suhteutettuna solukalvon pituuteen ( $\mu\text{m}$ ), rasvapisaroiden keskimääräinen pinta-ala sekä rasvapisaroiden tilavuusosuus sytoplasmasta (%). Rasvapisarat ja mitokondriot tunnistettiin kuvista muodon, värin ja sijainnin perusteella. Mitokondrioiden pinta-alaa mitattaessa otettiin huomioon vain solukalvonalaiset mitokondriokeräymät. Keräymäksi katsottiin viiden tai useamman mitokondrion muodostama ryhmä ja siihen liittyneet, solukalvon alla yhtenäisenä nauhana jatkuvat mitokondriojonot. Lihasnäytteistä analysoitiin kaikkiaan 343 kuvaa.

Tulokset käsiteltiin tilastollisesti SPSS-ohjelman avulla käyttäen yksisuuntaista varianssianalyysiä (One-Way ANOVA) ja Post Hoc LSD-testiä.

## **4. Tulokset**

### **4.1 Hiirten punnitustulokset ja maksojen massat**

Hiiret punnittiin ennen lopetusta ja saadut massat on esitetty ryhmäkohtaisina keskiarvoina liitteissä (liite 1). Massaltaan suurimmat hiiret olivat ryhmissä kontolli60 ja juoksija60. Ryhmän juoksija10-hiiret olivat puolestaan massaltaan pienimpiä. Lähellä ryhmän juoksija10 keskiarvoa olivat myös ryhmien kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija massojen keskiarvot. Ryhmän kontrolli10-hiirten massojen keskiarvo sijoittui massaltaan suurimpien ja pienimpien ryhmien välille.

Myös hiirten maksat punnittiin kokonaisina lopetuksen yhteydessä. Maksojen keskimääräiset massat on esitetty liitteissä (liite 2). Massaltaan pienimmät maksat olivat ryhmän juoksija10-hiirillä. Massaltaan suurimmat maksat olivat ryhmän kontrolli60-hiirillä, ja toiseksi suurimmat ryhmän juoksija60-hiirillä. Ryhmien kontrolli10, kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija-hiirillä maksojen keskimääräiset massat sijoittuvat korkearasvaista ravintoa syöneiden ryhmien ja juoksija10-ryhmän välille.

### **4.2 Insuliinitoleranssikokeen tulokset**

Hiirille tehtiin insuliinitoleranssikoe viikolla 17 tutkimuksen aloittamisesta. Kokeen tulokset on esitetty liitteissä (liite 3). Heikoin vaste insuliinille oli ryhmän kontrolli60-hiirillä. Ryhmillä kontrolli10, juoksija10, kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija vaste insuliinille oli nopea, ja ryhmien glukoosiarvot erosivat toisistaan havaittavasti vasta viimeisen aikapisteen kohdalla. Juoksija60-hiirten insuliinivaste oli hitaampi kuin edellä mainituissa ryhmissä, mutta nopeampi verrattaessa ryhmään kontrolli60.

## 4.3 Puoliohutteikkojen tarkastelu

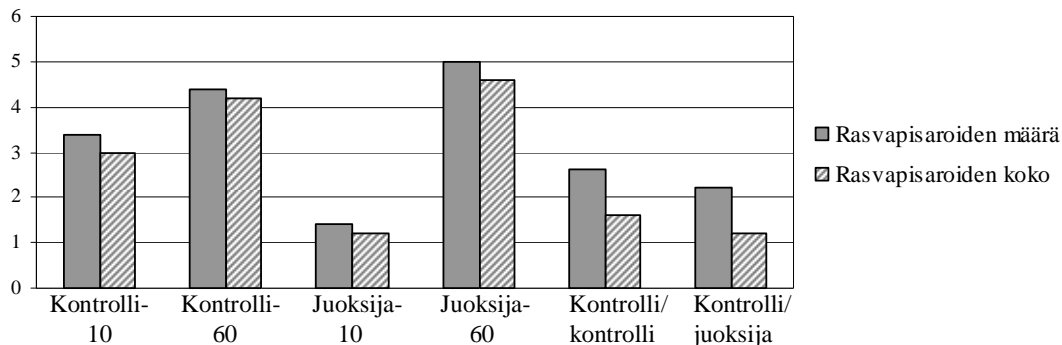
### 4.3.1 Maksa

Maksanäytteiden puoliohutteikkoista määritettiin silmämääräisesti solunsisäisten rasvapisaroiden määrää ja kokoa. Rasvapisarot tunnistettiin värin ja muodon perusteella, ja niitä arvioitiin asteikolla 1–5 taulukon 4 mukaisesti:

**Taulukko 4.** Solunsisäisten rasvapisaroiden arviointiasteikko

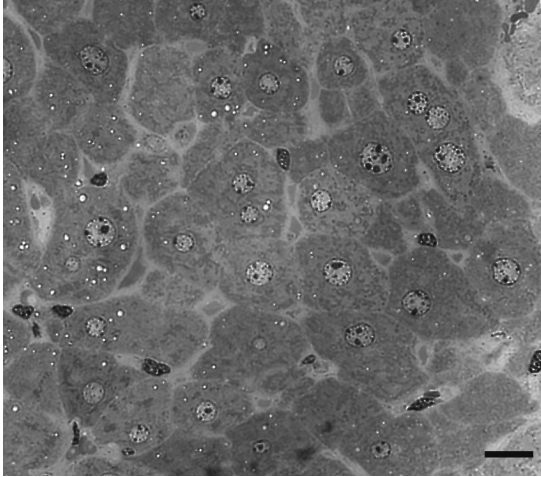
Lukuarvo	1	2	3	4	5
Rasvapisaroiden määrä	Hyvin vähän	Vähän	Kohtalaisesti	Paljon	Hyvin paljon
Rasvapisaroiden koko	Hyvin pieni	Pieni	Keskikokoinen	Suuri	Hyvin suuri

Arvioinnin perusteella jokaiselle ryhmälle määritettiin keskiarvot, jotka on esitetty kuvassa 4. Ryhmien juoksija60 ja kontrolli60 leikkeet sisälsivät eniten solunsisäistä rasvaa ja rasva esiintyi suurina pisaroina. Ryhmän juoksija10-hiirillä puolestaan oli vähiten rasvaa ja rasvapisarot olivat kooltaan pieniä. Ryhmillä kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija solunsisäiset rasvapisarot olivat kooltaan pieniä, mutta määrällisesti niitä oli enemmän kuin ryhmällä juoksija10. Kontrolli10-hiirillä solunsisäisten rasvapisaroiden määrä oli selvästi korkeampi sekä niiden koko suurempi kuin vastaavalla juoksijaryhmällä, mutta rasvaa oli vähemmän kuin korkearasvaista ravintoa syöneillä hiirillä.

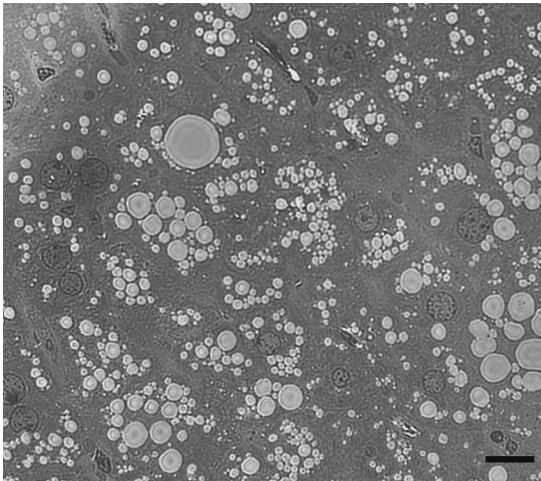


**Kuva 4. Maksanäytteiden puoliohutelekkeiden tarkastelun tulokset.** Kuvassa on esitetty pylväin ryhmien solunsisäisten rasvapisaroiden määrän ja koon keskiarvot. Eniten solunsisäistä rasvaa oli ryhmässä juoksija60 ja kontrolli60. Näillä ryhmillä myös rasvapisaroiden keskimääräinen koko oli suuri. Myös ryhmässä kontrolli10 rasvapisaraita oli runsaasti. Ryhmässä kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija rasvapisarot olivat pieniä, ja niitä oli solulimassa suhteellisen vähän. Ryhmän juoksija10 hiirillä oli vähiten solunsisäistä rasvaa, ja rasva esiintyi pienikokoisina pisaroina.

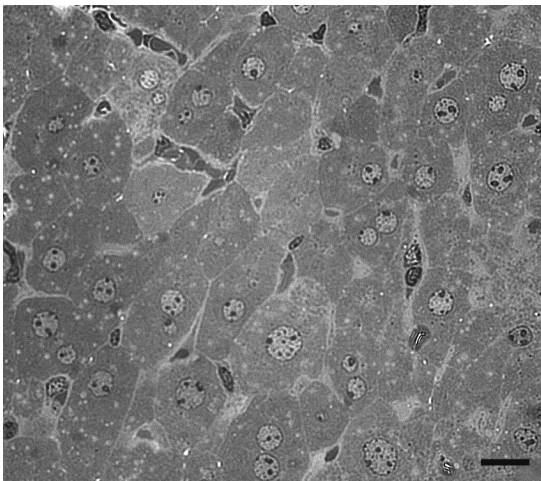
Puoliohutelekkeiden valomikroskooppikuvista on esillä esimerkkikuvat ryhmistä kontrolli10, juoksija60 ja juoksija10 (kuvat 5, 6 ja 7). Ryhmän juoksija60 kuvassa on näkyvissä runsaasti solunsisäisiä rasvapisaraita (kuva 6), joista osa on kooltaan hyvin suuria. Ryhmien kontrolli10 (kuva 5) ja juoksija10 (kuva 7) esimerkkikuvissa rasvapisarot ovat kooltaan pieniä ja määrällisesti niitä on vähemmän kuin ryhmällä juoksija60.



**Kuva 5. Kontrolli10.** Valomikroskooppikuva hiiren maksakudoksesta. Kuvassa yksittäisten solujen rajat ja tummarajaiset tumat erottuvat selvästi. Näkyvissä on myös hieman pieniä solunsisäisiä rasvapisaraita vaaleina pisteinä. Mittajana 20  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 6. Juoksija60.** Maksakudoksesta otetussa valomikroskooppikuvassa on hyvin runsaasti vaaleanharmaana näkyviä solunsisäisiä rasvapisaraita. Kooltaan rasvapisarajat ovat vaihtelevan suuruisia. Kuvassa olevat tummarajaiset tumat erottuvat hyvin. Mittajana 20  $\mu\text{m}$ .

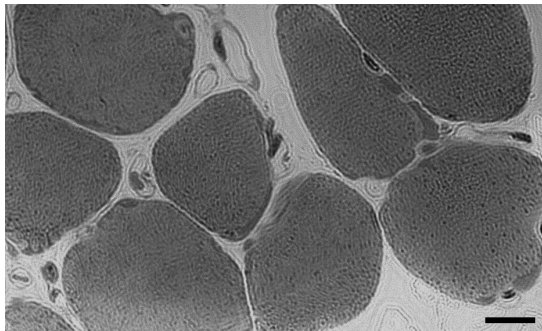


**Kuva 7. Juoksija10.** Valomikroskoopilla maksakudoksesta otetussa kuvassa tumat ja yksittäiset solut erottuvat hyvin. Solunsisäiset rasvapisarajat näkyvät pieninä vaaleanharmaana pisteinä. Lisäksi kuvassa on useita soluväleissä sijaitsevia, tummanharmaana näkyviä verisuonia. Mittajana 20  $\mu\text{m}$ .

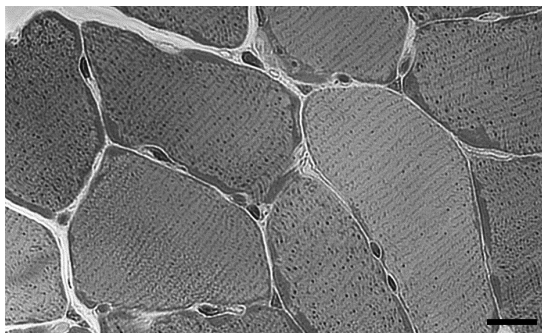
### 4.3.2 Lihas

Lihasnäytteistä tarkasteltiin silmämääräisesti solukalvonalaisen mitokondrioiden määrää. Mitokondriokeräymät tunnistettiin sijainnin ja värin avulla. Mitokondrioiden määrää ei kuitenkaan voitu luokitella, sillä käytetty suurennos ei riittänyt mahdollisten tumien erottamiseen mitokondrioiden joukosta. Lihaksen kohdalla myöskään solunsisäisen rasvan arviointia ei voitu tehdä, sillä rasva oli lihaskudoksessa niin pieninä pisaroina, ettei niitä voitu havaita.

Lihaksen puoliohutleikkeiden valomikroskooppikuvista on esillä esimerkkikuvat ryhmistä kontrolli10 ja juoksija60 (kuvat 8 ja 9). Kuvissa nähdään yksittäisten lihassolujen reunoilla näkyviä tummia mitokondriokeräymiä. Sytoplasmassa olevia rasvapisaroi- ta ei käytetyllä suurennoksella havaita.



**Kuva 8. Kontrolli10.** Lihaskudoksesta otetussa valomikroskooppikuvassa on harmaana näkyviä erillisiä lihassoluja, joiden reunoilla nähdään tummia solukalvonalaisia mitokondriokeräymiä. Solujen väleissä havaitaan myös verisuonia. Mittajana 30  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 9. Juoksija60.** Valomikroskooppikuvassa näkyy useita erillisiä lihassoluja, joiden reunoilla havaitaan runsaasti solukalvonalaisia tummia mitokondriokeräymiä. Solujen väleissä on myös useita verisuonia. Mittajana 30  $\mu\text{m}$ .

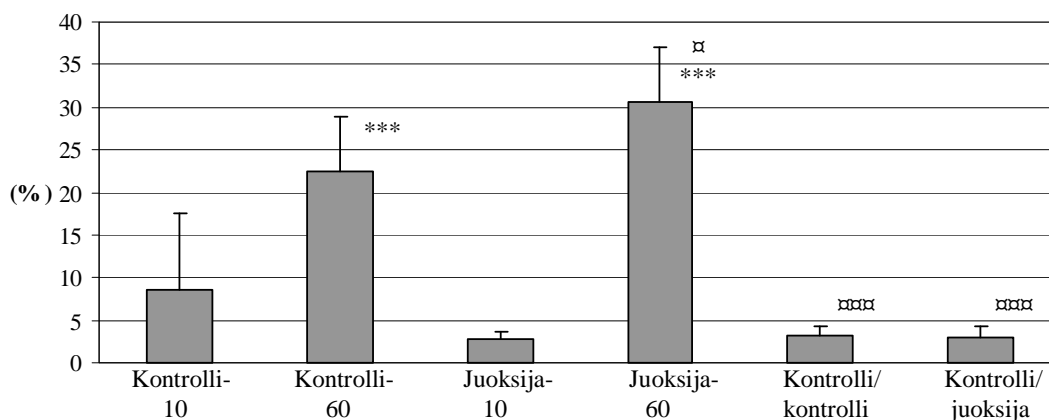


## 4.4 Ohutleikkeiden morfometrinen analysointi

### 4.4.1 Maksanäytteet

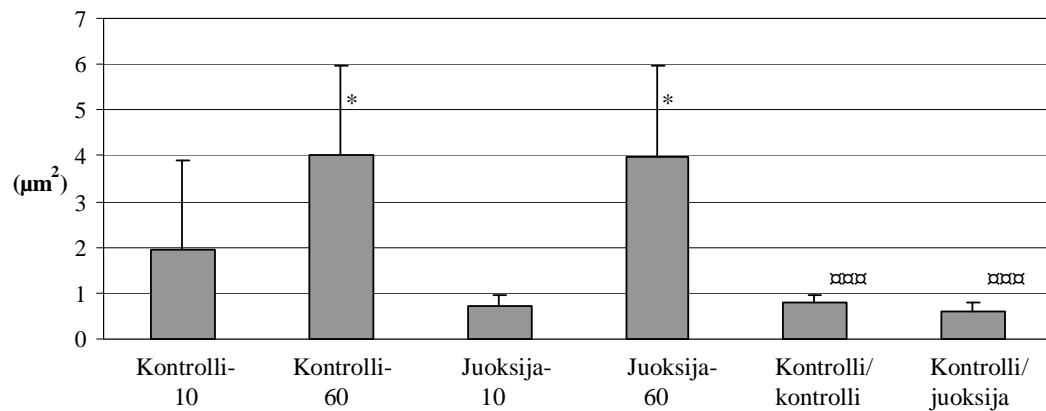
Maksanäytteistä määritettiin rasvapisaroiden tilavuusosuus sytoplasmasta (kuva 10), rasvapisaran keskimääräinen pinta-ala (kuva 11) sekä rasvapisaroiden lukumäärän keskiarvo sytoplasmassa pinta-ala kohti (kuva 12).

Rasvan tilavuusosuudet sytoplasmasta on esitetty ryhmittäin kuvassa 10. Suurimmat arvot havaittiin korkearasvaisen ravinnon hiirillä, eli ryhmissä juoksija60 ja kontrolli60. Kyseisissä ryhmissä havaittiin merkitsevät erot verrattaessa niitä ryhmään kontrolli10 (LSD:  $P < 0,001$ ). Tilastollisesti merkitsevät erot löydettiin myös ryhmistä juoksija60 (LSD:  $P < 0,05$ ), kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija (LSD:  $P < 0,001$ ) käytettäessä vertailukohteena ryhmää kontrolli60. Pienin rasvapisaroiden tilavuusosuus oli vähärasvaista ravintoa syöneillä juoksija10-hiirillä. Verrattaessa ryhmää kontrolli10 ryhmään juoksija10 oli tulos lähellä merkitsevää (LSD:  $P = 0,094$ ).



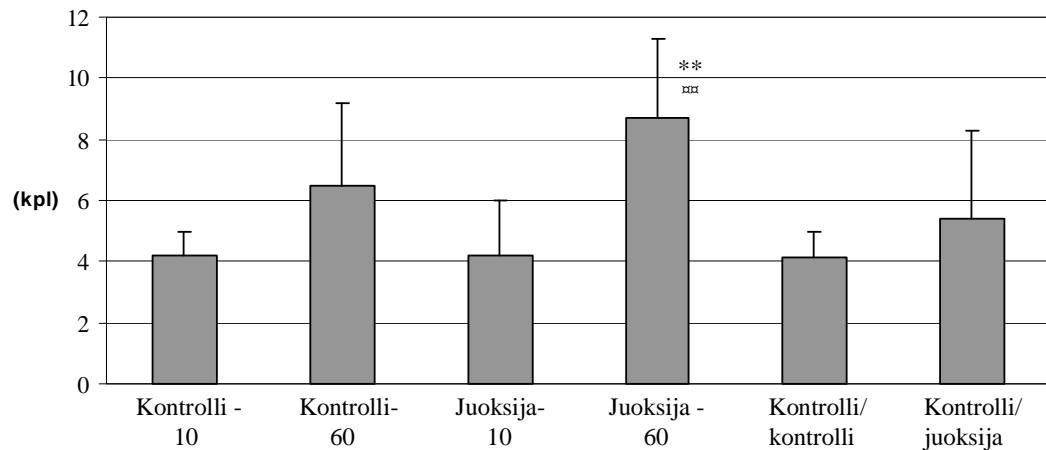
**Kuva 10. Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta (%).** Ryhmien keskiarvot on esitetty pylväin ja janat ilmaisevat ryhmäkohtaiset keskihajonnat. Suurin solunsisäisen rasvan tilavuusosuus havaittiin ryhmässä juoksija60. Myös ryhmässä kontrolli60 solunsisäistä rasvaa oli runsaasti. Pienimmät rasvapisaroiden tilavuusosuudet olivat ryhmissä juoksija10, kontrolli/juoksija ja kontrolli/kontrolli. \*\*\* $P < 0,001$ ; vertailukohteena ryhmä kontrolli10. <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>\*\*\*a</sup> $P < 0,001$ ; vertailukohteena ryhmä kontrolli60.

Rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat on esitetty kuvassa 11. Suurimmat rasvapisarat olivat ryhmissä kontrolli60 ja juoksija60. Näissä ryhmissä oli merkitsevät erot käytettäessä vertailukohteena ryhmää kontrolli10 (LSD:  $P < 0,05$ ). Pinta-alaltaan pienimmät rasvapisarat havaittiin ruokavaliota vaihtaneella kontrolli/juoksija-ryhmällä. Myös ryhmien juoksija10 ja kontrolli/kontrolli-hiirillä rasvapisarat olivat kooltaan pieniä. Käytettäessä vertailukohteena ryhmää kontrolli60, löydettiin merkitsevät erot ryhmistä kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija (LSD:  $P = 0,001$ ). Ryhmän kontrolli10 rasvapisarat olivat kooltaan suurempia kuin ryhmällä juoksija10 ja ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä, mutta selvästi pienempiä kuin korkearasvaista ruokavaliota noudattaneilla hiirillä.



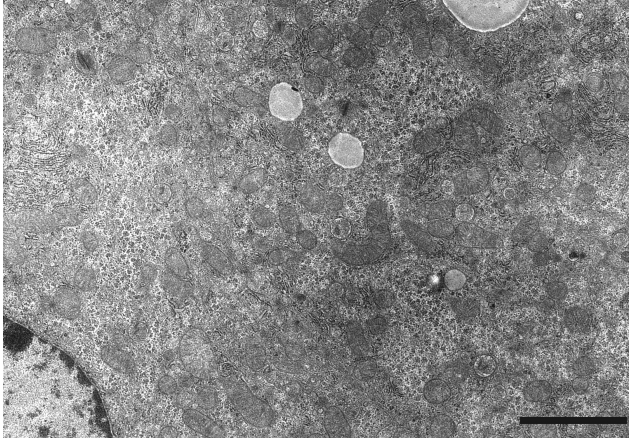
**Kuva 11. Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat (µm<sup>2</sup>).** Janat ilmaisevat ryhmäkohtaiset keskihajonnat ja keskiarvot on esitetty pylväin. Pinta-alaltaan suurimmat rasvapisarat olivat ryhmissä kontrolli60 ja juoksija60. Kooltaan pienimmät rasvapisarat havaittiin ryhmissä juoksija10, kontrolli/kontrolli sekä kontrolli/juoksija. \* $P < 0,05$ ; vertailukohteena ryhmä kontrolli10, #### $P = 0,001$ ; vertailukohteena ryhmä kontrolli60.

Maksanäytteiden kuvista määritettiin myös solunsisäisten rasvapisaroiden lukumäärän keskiarvo sytoplasman pinta-alaa (100 µm<sup>2</sup>) kohti (kuva 12). Kappalemäärältään eniten rasvapisaroita oli ryhmässä juoksija60. Kyseisestä ryhmästä löydettiin myös merkitsevä ero käytettäessä vertailukohteena ryhmää kontrolli10 (LSD:  $P < 0,01$ ) sekä ryhmää juoksija10 (LSD:  $P < 0,01$ ). Lukumäärältään vähiten rasvapisaroita havaittiin ryhmissä kontrolli10, juoksija10 ja kontrolli/kontrolli.

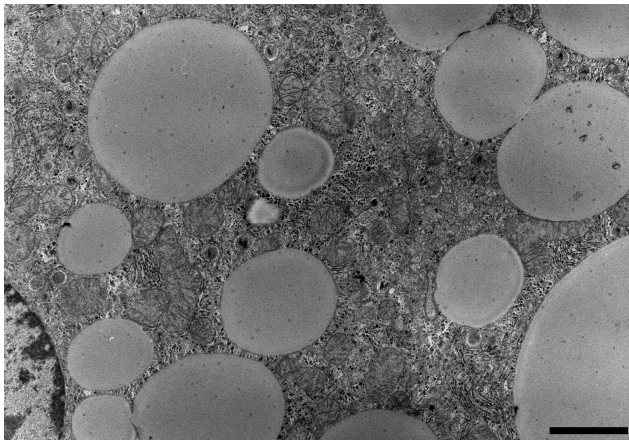


**Kuva 12. Rasvapisaroiden kappalemäärien keskiarvot tiettyä sytoplasman pinta-alaa ( $100 \mu\text{m}^2$ ) kohti.** Ryhmäkohtaiset keskiarvot on esitetty pylväin, ja janat ilmaiset ryhmäkohtaiset keskihajonnat. Kappalemäärältään eniten solunsisäisiä rasvapisaroita oli ryhmässä juoksija60. Toiseksi eniten rasvapisaroita havaittiin ryhmässä kontrolli60. Ryhmissä kontrolli10, juoksija10 ja kontrolli/kontrolli havaittiin kappalemääriltään vähiten solunsisäisiä rasvapisaroita. \*\*\* $P < 0,01$ ; vertailukohteena ryhmä kontrolli10, \*\* $P < 0,01$ ; vertailukohteena ryhmä juoksija10.

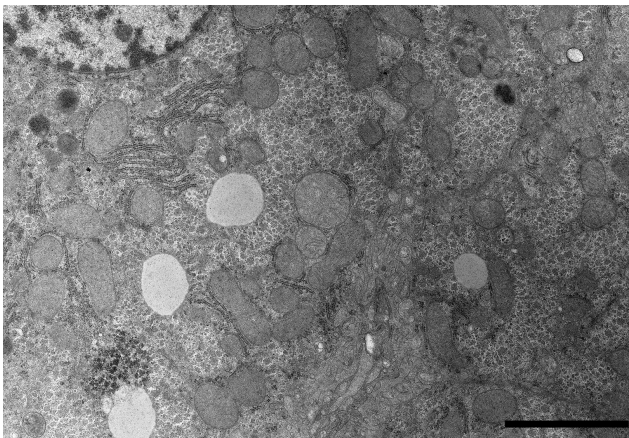
Maksan ohutleikkeiden esimerkkikuvat havainnollistavat ryhmienväliset erot solunsisäisten rasvapisaroiden määrässä ja koossa (kuvat 13 –18). Ryhmissä kontrolli60 ja juoksija60 solunsisäisiä rasvapisaroita on runsaasti, ja ne ovat kooltaan suuria (kuvat 14 ja 16). Ryhmän kontrolli10 rasvapisarot ovat kooltaan vaihtelevan suuruisia, ja niitä on solulimassa vähemmän kuin korkearasvaista ruokavaliota noudattaneilla hiirillä (kuva 13). Juoksija10, kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija ryhmissä solunsisäistä rasvaa on vähän, ja rasvapisarot ovat kooltaan pieniä (kuvat 15, 17 ja 18).



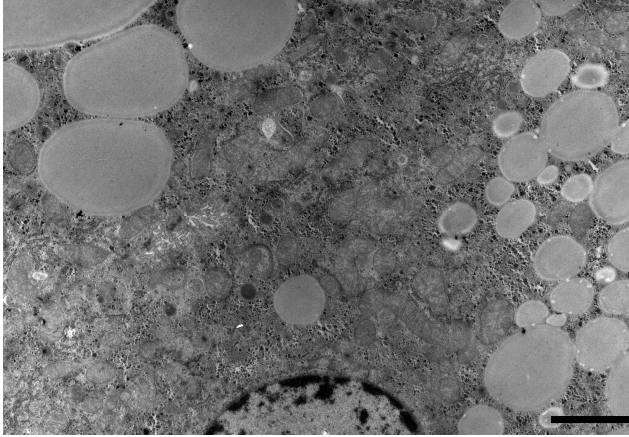
**Kuva 13. Kontrolli10.** Elektronimikroskooppikuva maksakudoksesta. Kuvassa solunsisäiset rasvapisarat näkyvät vaaleanharmaina ja muodoltaan pyöreinä. Kooltaan rasvapisarat ovat vaihtelevan suuruisia ja niitä on vähän. Osa tumasta näkyy tummarajaisena kuvan vasemmassa alareunassa. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



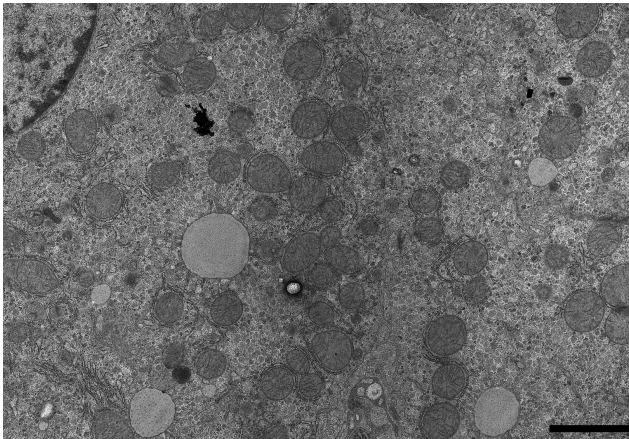
**Kuva 14. Kontrolli60.** Maksakudoksesta otetussa elektronimikroskooppikuvassa näkyy useita kooltaan suuria, vaaleanharmaita solunsisäisiä rasvapisaraita. Tuma on kuvan vasemmassa alareunassa. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



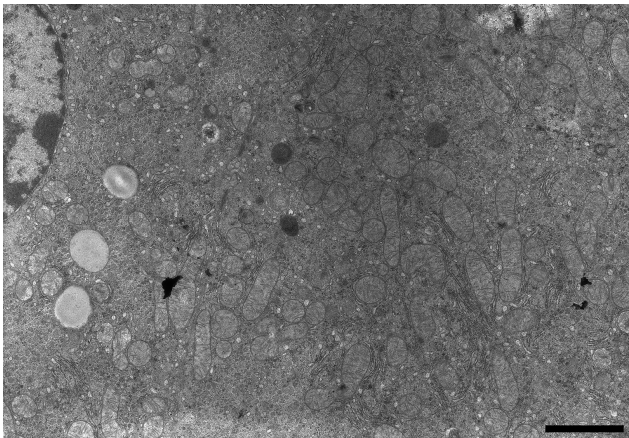
**Kuva 15. Juoksija10.** Elektronimikroskoopilla otetussa kuvassa solunsisäiset rasvapisarat näkyvät vaaleanharmaina ja muodoltaan pyöreinä. Rasvapisaraita on vähän ja ne ovat kooltaan pieniä. Tummarajainen tuma näkyy kuvan vasemmassa yläreunassa. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 16. Juoksija60.** Maksakudoksesta otetussa elektronimikroskooppikuvassa on näkyvissä runsaasti vaaleanharmaita solunsisäisiä rasvapisaroita, jotka ovat kooltaan hyvin vaihtelevan suuruisia. Tuma on havaittavissa kuvan alareunassa. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 17. Kontrolli/kontrolli.** Elektronimikroskooppikuva maksakudoksesta. Solu-  
limassa on nähtävissä muutamia vaalean-  
harmaita rasvapisaroita jotka ovat kooltaan  
suhteellisen pieniä. Tuma näkyy tumma-  
rajaisena kuvan vasemmassa ylälaudassa.  
Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .

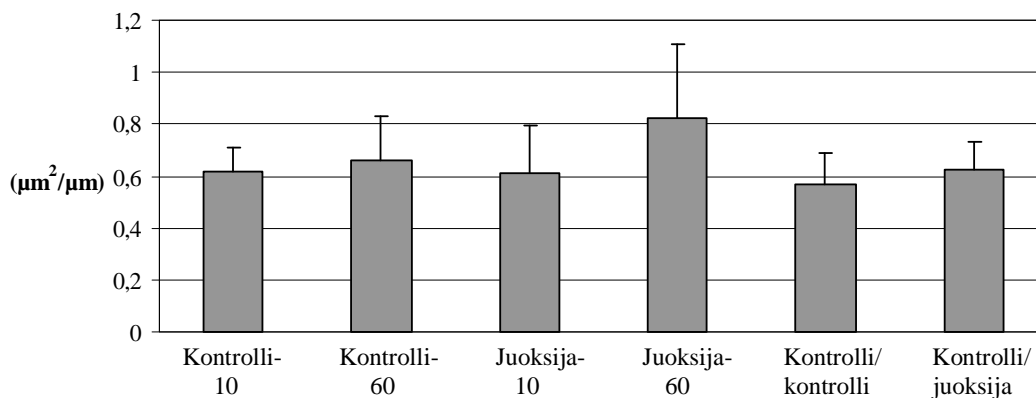


**Kuva 18. Kontrolli/juoksija.** Maksa-  
kudoksesta otetussa elektronimikro-  
skooppikuvassa solunsisäisiä, vaalean-  
harmaita rasvapisaroita on vähän ja  
kooltaan ne ovat pieniä. Osa tumasta näkyy  
kuvan vasemmassa ylälaudassa.  
Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2 Lihasnäytteet

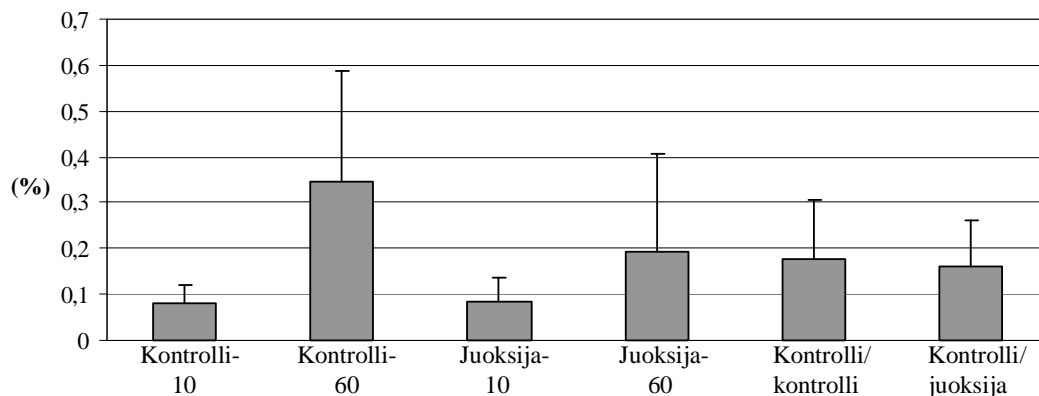
Lihasnäytteistä määritettiin solukalvonalaisen mitokondrioiden pinta-ala suhteutettuna solukalvon pituuteen (kuva 19), rasvapisaroiden tilavuusosuus sytoplasmasta (kuva 20) sekä rasvapisaran keskimääräinen pinta-ala (kuva 21).

Solukalvonalaisen mitokondrioiden pinta-alan suhde solukalvon pituuteen on esitetty kuvassa 19. Suurin mitokondrioiden pinta-alan suhde oli ryhmässä juoksija60. Vähiten mitokondrioita suhteessa solukalvon pituuteen oli ryhmässä kontrolli/kontrolli. Lopuilla ryhmillä solukalvonalaisia mitokondrioita oli hieman enemmän kuin ryhmällä kontrolli/kontrolli. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja.



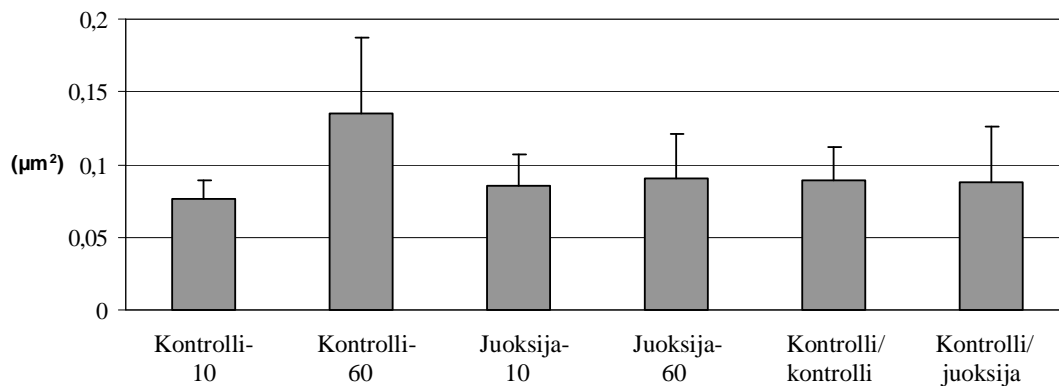
**Kuva 19. Solukalvonalaisen mitokondrioiden pinta-alan suhde solukalvon pituuteen ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ).** Ryhmien keskiarvot on esitetty pylväin, ja janat ilmaisevat ryhmäkohtaiset keskihajonnat. Kontrolli10-, kontrolli60-, juoksija10- sekä kontrolli/juoksija -ryhmien hiirillä mitokondrioiden pinta-alan suhde solukalvon pituuteen oli lähes sama. Suurin arvo oli ryhmässä juoksija60 ja pienin ryhmässä kontrolli/kontrolli. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.

Lihasnäytteiden solunsisäisten rasvapisaroiden tilavuusosuus sytoplasmasta on esitetty kuvassa 20. Eniten solunsisäistä rasvaa oli ryhmässä kontrolli60 ja toiseksi eniten ryhmässä juoksija60. Näitä ryhmiä seurasivat ryhmien kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija-hiiret, joiden sytoplasmassa rasvaa oli lähes saman verran kuin ryhmällä juoksija60. Pienin solunsisäisen rasvan tilavuusosuus oli ryhmässä kontrolli10 ja juoksija10. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.



**Kuva 20. Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta (%).** Ryhmäkohtaiset keskihajonnat on esitetty janoilla, ja pylväät ilmaisevat ryhmien keskiarvot. Vähiten solunsisäistä rasvaa oli ryhmien kontrolli10 ja juoksija10-hiirillä ja eniten ryhmän kontrolli60-hiirillä. Toiseksi eniten solunsisäistä rasvaa oli ryhmässä juoksija60. Kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija-ryhmillä solunsisäistä rasvaa oli hieman vähemmän kuin ryhmässä juoksija60. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja.

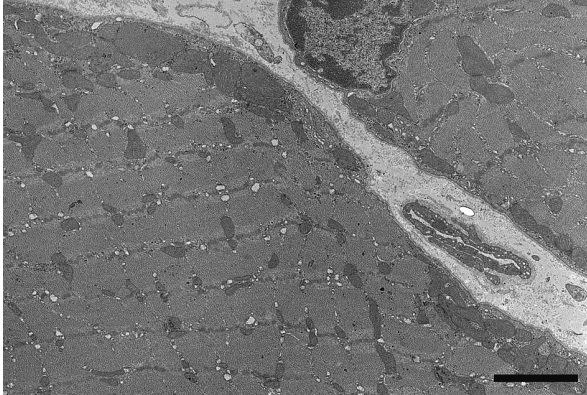
Lihasnäytteiden kuvista määritettiin myös solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat (kuva 21). Pinta-alaltaan suurimmat rasvapisarot löydettiin ryhmästä kontrolli60. Kooltaan pienimmät rasvapisarot olivat puolestaan ryhmässä kontrolli10. Ryhmien juoksija10-, juoksija60-, kontrolli/kontrolli- sekä kontrolli/juoksija-hiirillä solunsisäisiä rasvapisaraita oli hieman enemmän kuin ryhmän kontrolli10-hiirillä.



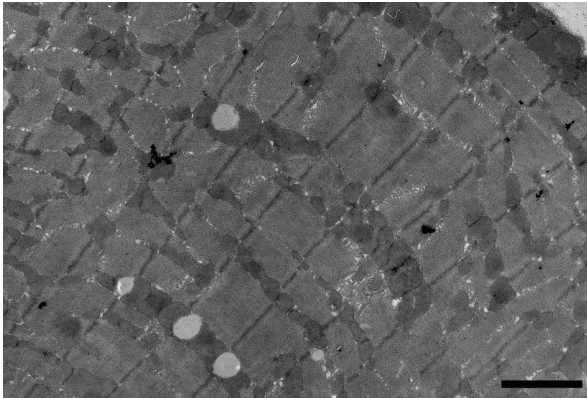
**Kuva 21. Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat (µm²).** Janat ilmaisevat keskihajonnat, ja ryhmien keskiarvot on esitetty pylväin. Pinta-alaltaan suurimmat rasvapisarot olivat ryhmässä kontrolli60. Kooltaan pienimmät rasvapisarot havaittiin ryhmässä kontrolli10. Ryhmien juoksija10-, juoksija60-, kontrolli/kontrolli- sekä kontrolli/juoksija-hiirillä oli rasvaa sytoplasmassa hieman enemmän kuin ryhmällä kontrolli10.

Lihaksen ohutleikkeiden esimerkkikuvat havainnollistavat mitokondriokeräymien sijoittumisen solukalvon alle sekä verisuonten läheisyyteen (kuvat 22–25). Osassa kuvista on nähtävissä myös sytoplasmassa olevia rasvapisaraita (kuvat 23 ja 25). Ryhmän kontrolli10 esimerkkikuvassa on näkyvillä solukalvonalaisia mitokondriokeräymiä, muttei solunsisäisiä rasvapisaraita (kuva 22). Ryhmän kontrolli60 kuvassa lihassolun sisäiset rasvapisarot erottuvat selvästi, ja ne sijaitsevat mitokondrioiden läheisyydessä (kuva 23). Juoksija10-ryhmän kuvassa havaitaan mitokondriokeräymän sijoittuminen lihassolun solukalvon alle (kuva 24). Ryhmän juoksija60 kuvassa puolestaan havaitaan mitokondrioiden sijoittuminen verisuonten läheisyyteen. Kuvassa näkyy myös solunsisäistä rasvaa (kuva 25).

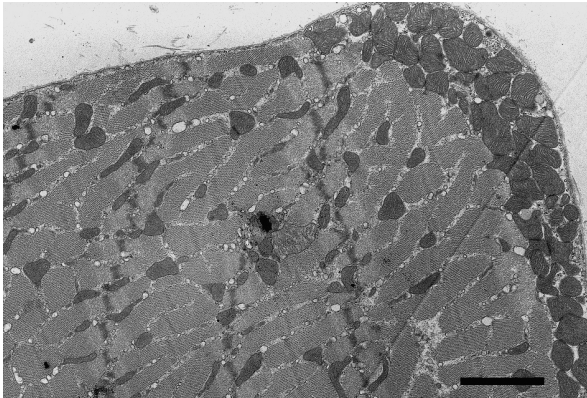




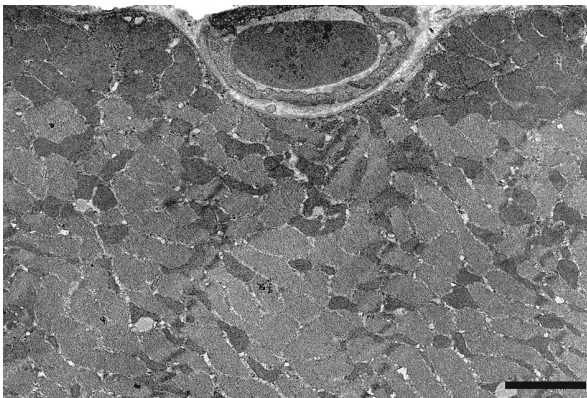
**Kuva 22. Kontrolli10.** Elektronimikroskooppikuva hiiren lihaskudoksesta. Kuvassa on näkyvissä osittain kaksi vaaleanharmaata lihassolua, joiden solukalvojen alla näkyy tummia mitokondriokeräymiä. Oikeanpuoleisessa lihassolussa näkyy lisäksi tummarajainen tuma kuvan yläreunassa. Solulimassa ei ole havaittavissa rasvapisaroita. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 23. Kontrolli60.** Elektronimikroskoopilla otetussa kuvassa havaitaan useita vaaleita ja muodoltaan pyöreitä lihassolunsisäisiä rasvapisaroita, jotka sijaitsevat tummana näkyvien mitokondrioiden läheisyydessä. Kuvan oikeassa yläreunassa on näkyvissä solukalvonalainen mitokondriokeräymä. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 24. Juoksija10.** Lihaskudoksesta otetun elektronimikroskooppikuvan oikeassa laidassa on näkyvissä lihassolun solukalvon alle sijoittunut, tummana näkyvä mitokondriokeräymä. Solunsisäisiä rasvapisaroita ei kuvassa ole. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 25. Juoksija60.** Lihaskudoksesta otettu elektronimikroskooppikuva. Kuvan yläreunassa keskellä nähdään verisuoni, jonka ympärillä on tummana näkyviä solukalvonlaisia mitokondriokeräymiä. Solulimassa on muutamia vaaleanharmaita rasvapisaroita tummana näkyvien mitokondrioiden läheisyydessä. Mittajana 2  $\mu\text{m}$ .

## **5. Tulosten tarkastelu**

### **5.1 Maksanäytteet**

#### **5.1.1 Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta**

Maksa on yksi kehon kolmesta energiametabolialla säätelevästä kudoksesta, ja siksi suuret muutokset elimistön energiametaboliassa vaikuttavat myös maksan hienorakenteeseen. Maksa on myös tärkeä energian varastointikudos, johon ylimääräinen energia varastoidaan glykogeeninä ja triglyserideinä. Maksakudoksen puoliohutelekkeiden silmämääräisessä arvioinnissa havaittiin, että tilavuusosuudeltaan eniten solunsisäistä rasvaa oli oletetusti korkearasvaista ruokavaliota noudattaneilla hiirillä. Maksakudoksen ohutelekkeiden morfometrisen analysoinnin tulokset vastasivat näitä havaintoja. Korkearasvaista ravintoa syöneillä hiirillä maksassa oli tilavuusosuudeltaan merkitsevästi enemmän rasvaa kuin vähärasvaisempaa ravintoa nauttineella kontrolliryhmällä. Näillä hiirillä myös maksan massat olivat selvästi muita ryhmiä suuremmat. Saadut tulokset tukevat aiempia havaintoja, joissa on huomattu korkeaenergisestä ruokavaliosta aiheuttavan C57BL/6J-kannan hiirillä triglyseridien kertymistä maksakudokseen (Murase ym., 2001; Gregoire ym., 2002; Lee ym., 2006a).

Yllättävää tuloksissa oli, että suurin rasvan tilavuusosuus löytyi juoksija- eikä kontrolliryhmästä. Näin ollen liikunta vaikuttaisi osaltaan edesauttavan solunsisäisen rasvan kertymistä maksaan korkearasvaisen ruokavaliota yhteydessä. Aiemmissä kokeissa Lee ym., (2006a) ovat havainneet liikunnan pienentävän maksaan kertyvien lipidien määrää korkearasvaisen ruokavaliota yhteydessä C57BL/6J-kannan hiirillä. Kokeessa korkearasvainen ruokavaliota oli kuitenkin huomattavasti vähärasvaisempi kuin nyt käytetty; siinä hiiret saivat 35 % ravinnon energiasta rasvoina, kun taas tässä kokeessa vastaava osuus oli 60 %. Myös rotilla tehdyssä kokeessa on havaittu liikunnan selvästi vähentävän maksan rasvoittumista sekä erityisesti pienentävän rasvan kertymistä suurina pisaroina

korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä (Gauthier ym., 2003). Toisissa rotilla tehdyissä tutkimuksissa liikunnalla taas ei ole havaittu olevan suurta merkitystä rasvan kertymiselle maksakudokseen korkeaaenergisien ruokavalion yhteydessä (Terao ym., 1987). Teraon ym. tutkimuksessa liikunta kuitenkin aloitettiin vasta rasvamaksan indusoinnin jälkeen, mikä voi osaltaan vaikuttaa siihen, ettei liikuntaa enää vaikuttanut solunsisäisen rasvan määrää vähentävästi. Myöskään Straczkowski ym. (2001) tutkimuksissa korkearasvaiseen ruokavalioon yhdistetty liikunta ei pienentänyt maksaan kertyvän rasvan määrää rotilla. Tässä kokeessa rotille syötetty korkearasvainen ruoka sisälsi lähes saman osuuden energiasta rasvoina (59 %) kuin meidänkin tutkimuksessamme (60 %). Ilmeisesti näin korkearasvaisen ruokavalion tapauksessa lihakset eivät kuluta ravinnosta saatavaa rasvaa siinä määrin, että sen varastointi maksaan vähentyisi. Näin ollen voitaisiin ajatella, että 60 % rasvaa sisältänyt ruoka sisältää niin paljon triglyseridejä, ettei niiden kertymistä maksaan voida liikunnalla merkittävästi vähentää. Pienempi ravinnon rasvanosuus sen sijaan voitaisiin kompensoida kestävyysliikunnan avulla, jolloin maksakudokseen kertyisi vähemmän solunsisäistä rasvaa.

Tämä ei kuitenkaan selitä sitä, miksi rasvaa oli korkearasvaisen ruokavalion liikkuvilla hiirillä noin 8 % enemmän kuin vastaavalla kontrolliryhmällä. Rasvan määrän lisääntymisen liikkuvilla hiirillä voidaan ajatella olevan yhteydessä elimistön lisääntyneeseen energiantarpeeseen. Tällöin harjoittelevilla hiirillä maksaan kertyneet rasvapisarat olisivat metabolisesti aktiivisia palvelen elimistön energiantarvetta aerobisen liikunnan aikana. Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu kestävyysliikunnan lisäävän luustolihaksen solunsisäisen rasvan määrää vasteena lisääntyneelle energiantarpeelle (Kiens ym., 1997). Lihaksen triglyseridivarastot ovat kuitenkin rajalliset, jolloin hyvin korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä rasvaa varastoituisi merkittävästi myös maksakudokseen, josta rasvahappoja voitaisiin vapauttaa luustolihaksen tarpeisiin. Tämän teorian paikkansapitävyyttä ei kuitenkaan voida todeta morfologisin mittauksin. Lisätietoa tulisi hankkia esimerkiksi vertaamalla maksan lipidejä pilkkovien entsyymien määriä eri koeryhmistä.

Solunsisäisen rasvan kertymisen maksakudokseen on havaittu olevan yhteydessä insuliiniresistenssin syntymiseen (ks. yleiskatsaus Savage ym., 2007). Koska

korkearasvaista ravintoa syöneillä juoksijahiirillä oli suurin tilavuusosuus solunsisäistä rasvaa maksakudoksessa, voitaisiin olettaa, että tämän ryhmän yksilöillä olisi myös heikoin insuliinivaste. Hiirille tehty insuliinitoleranssikoe kuitenkin osoittaa, että heikoin vaste insuliinitason nousulle oli korkearasvaisen ravinnon kontrolliryhmällä. Insuliinitoleranssikokeen tulokset osaltaan tukevat teoriaa siitä, että juoksijaryhmän hiirillä solunsisäiset rasvapisarat olisivat ominaisuuksiltaan erilaisia kuin kontrolliryhmällä, sillä suuri rasvan tilavuusosuus maksassa ei yksinomaan aiheuttanut heikkoa insuliinivastetta. Samankaltaisia tuloksia insuliiniresistenssin kehittymisestä on saatu aiemmin rotille tehdyillä kokeilla (Straczkowski ym., 2001). Korkearasvainen ravinto kuitenkin selvästi heikensi hiirten vastetta insuliinille verrattuna vähärasvaisen ravinnon ryhmiin sekä ruokavaliota vaihtaneisiin ryhmiin. Näiden tulosten nojalla korkearasvaiseen ruokavaliioon yhdistetty liikunta ei vähennä rasvan kertymistä maksakudokseen, mutta parantaa vastetta insuliinille verrattaessa vastaavaan kontrolliryhmään.

Ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta pienentyi merkittävästi verrattuna korkearasvaista ravintoa koko seurannan ajan syöneisiin kontrollihiiriin. Ero korkearasvaisen ruokavaliion kontrolliryhmän ja ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien välillä oli noin 27 %. Tulostemme mukaan korkearasvaisen ruokavaliion vaihtaminen vähärasvaiseen vähensi solunsisäisen rasvan määrää lähes saman verran riippumatta siitä, lisättiinkö ruokavaliion vaihdon yhteydessä liikuntaa vai ei. Ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien hiirillä oli vähemmän solunsisäistä rasvaa myös verrattuna vähärasvaisen ravinnon kontrolliryhmään. Tämä tulos oli yllättävä, sillä ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien hiiret söivät aluksi korkearasvaista ravintoa, jolloin oletettavasti maksaan olisi kertynyt triglyseridejä enemmän kuin koko ajan vähärasvaista ravintoa syöneillä hiirillä.

Saatuun tulokseen voi vaikuttaa se, että vähärasvaisen kontrolliryhmän hiirillä oli suurin hajonta määritettäessä rasvan tilavuusosuutta sytoplasmasta. Näin ollen saman ryhmän eri yksilöiden välillä oli suuria eroja, eivätkä kaikki hiiret edustaneet ryhmänsä tyypillisiä piirteitä. Tähän voi olla syynä käytetyn hiirikannan vahva taipumus lihomiseen sekä rasvamaksan kehittymiseen (Gregoire ym., 2002), jolloin osalla yksilöistä rasvan kertyminen olisi voimakasta myös vähärasvaisen ruokavaliion yhteydessä. Vähärasvaisen

ruokavalion kontrolliryhmän hiirten massat olivat suuremmat kuin ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien ja vähärasvaisen ravinnon juoksijaryhmän hiirillä, mikä tukee aiempaa johtopäätöstä hiirten lihomistaipumuksesta myös vähärasvaisen ruokavalion yhteydessä. Odotettavaa olisi ollut, että koko ajan vähärasvaista ravintoa syöneet hiiret olisivat ruokavaliota vaihtaneita kontrollihiiriä kevyempiä, sillä ruokavaliota vaihtaneet hiiret söivät kokeen alussa korkearasvaista ravintoa. Kontrolliryhmässä hiirten massoissa oli myös suhteellisen suuri hajonta, mikä osoittaa yksilöiden välillä olevan eroja. Vähärasvaisen ravinnon kontrolliryhmän hiirillä oli myös hieman painavimmat maksat kuin ruokavaliota vaihtaneilla hiirillä ja vähärasvaisen ravinnon juoksijahiirillä. Maksan massa siten osaltaan korreloi maksakudoksen rasvasisällön kanssa.

Juokseminen oletetusti vähensi rasvan kertymistä maksakudoksen sytoplasmaan vähärasvaisen ruokavalion hiirillä verrattuna vastaavaan kontrolliryhmään. Vähärasvaisen ruokavalion yhteydessä voidaan ajatella, että liikuntaa harrastaneet hiiret ehtivät kuluttaa ravinnosta saamaansa energiaa enemmän kuin kontrolliryhmän hiiret, jolloin energiaa ei varastoitu maksaan niin suuria määriä. Oletusten vastaisesti ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien hiirillä oli kuitenkin solunsisäistä rasvaa lähes yhtä vähän kuin vähärasvaisen ravinnon juoksijaryhmällä. Odotettavaa oli ollut, että ruokavaliota vaihtaneilla hiirillä olisi maksasolujen sisäistä rasvaa enemmän, sillä kokeen alussa ne söivät korkearasvaista ravintoa. Vähärasvaisen ravinnon juoksijaryhmä sen sijaan sai koko kokeen ajan 10 % rasvaa sisältävää ruokaa ja lisäksi hiirillä oli mahdollisuus juosta. Kuitenkin tulosten mukaan ruokavalion vaihtaminen jopa ilman liikunnan lisäämistä vähensi solunsisäisen rasvan määrän lähes juoksijaryhmän tasolle.

### **5.1.2 Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat**

Sekä maksan puoliohut- että ohutleikkeitä tarkasteltaessa havaittiin solunsisäisten rasvapisaroiden koon vaihtelevan ruokavalion mukaan. Korkearasvaisen ravinnon hiirillä oli keskimääräiseltä pinta-alaltaan suurimmat rasvapisarot (kooltaan noin  $4 \mu\text{m}^2$ ). Pienimmät rasvapisarot olivat ryhmissä, joissa rasvaa oli tilavuusosuudeltaankin vähiten, eli ruokavaliota vaihtaneissa ryhmissä sekä vähärasvaista ruokavaliota noudattaneessa

juoksijaryhmässä (kooltaan  $< 1 \mu\text{m}^2$ ). Sama ilmiö rasvapisaroiden koon eroissa on havaittu aiemmin rotilla (Gauthier ym., 2003). Maksan rasvoittumista tutkittaessa solunsisäiset rasvapisarat voidaan jakaa keskimääräiseltä pinta-alaltaan mikro- ( $< 1 \mu\text{m}^2$ ) ja makropisaroihin ( $> 1 \mu\text{m}^2$ ). Gauthierin ym. (2003) tutkimuksessa havaittiin korkeaan energian ruokavalion johtavan rasvan kertymiseen pääosin suurina makropisaroina. Saamamme tulokset tukevat näitä havaintoja, sillä korkeanrasvaisen ruokavalion hiirillä maksan rasvapisarat olivat merkitsevästi suurempia kuin vähärasvaisen ruokavalion kontrolliryhmässä. Tutkimuksemme sen sijaan ei tue Gauthierin ym. (2003) havaintoa siitä, että liikunta estäisi rasvan kertymistä maksaan makropisaroina korkeaan energian ruokavalion yhteydessä. Tulostemme perusteella rasvapisarat ovat korkeanrasvaisen ruokavalion ryhmissä keskimääräiseltä pinta-alaltaan lähes samansuuruisia riippumatta siitä, oliko hiirillä mahdollisuus juosta juoksupyörässä vai ei. Tämä ero voi johtua koeasetelmien hyvin erisuuruuksista rasvamääristä ravinnossa, sillä Gauthierin ym. (2003) kokeessa hiiret saivat vain 35 % ravinnon energiasta rasvoina, kun tässä kokeessa vastaava osuus oli 60 %. Näin ollen kokeessamme käytetty hyvin korkeanrasvainen ruokavalio on voinut vaikuttaa siihen, ettei liikunnalla saatu aikaan merkittäviä eroja maksasolujen sisäisiin rasvapisaroihin.

Kooltaan suurien solunsisäisten rasvapisaroiden oletetaan toimivan pääosin ylimääräisen energian varastoina, kun taas pienten rasvapisaroiden suurempi reaktiopinta-ala mahdollistaisi solun energiatarpeiden nopean palvelemisen. Tulosten perusteella voitaisiin päätellä, että korkeanrasvainen ruokavalio aiheuttaa rasvan kertymistä maksaan suurina, metabolisesti ei-aktiivisina pisaroina riippumatta siitä, harrastaako yksilö liikuntaa vai ei. Toisaalta molemmilla korkeanrasvaisen ruokavalion ryhmillä rasvapisaroiden pinta-aloissa oli myös suuri keskihajonta, mikä tarkoittaa, että solulimassa oli kooltaan hyvin erikokoisia rasvapisaroita. Tällöin osa rasvapisaroista voisi toimia suurina varastointipisaroina, kun taas osa olisi kooltaan pieniä ja metabolisesti aktiivisia. Solulimassa voisi siten olla karkeasti jaoteltuna ainakin kahdenlaisia triglyseridipisaroihin, joista toiset olisivat pysyvämpiä varastopisaroihin ja toiset taas vastaisivat elimistön energiantarpeisiin.

Vähärasvaisen ruokavalion kontrolliryhmällä rasvapisaroiden pinta-alan keskihajonta oli suuri, kuten rasvan tilavuusosuuden tapauksessa. Tämä osoittaa, että solulimassa olevat rasvapisarot ovat hyvin vaihtelevan kokoisia. Tulos voi olla jälleen seurausta kyseisen ryhmän yksilöiden välisistä suurista eroista, jolloin osalla yksilöistä maksaan kertyy rasvaa normaalia enemmän ja keskimääräistä suurempina pisaroina. Vähärasvaisen ruokavalion kontrolliryhmän hiirten maksat olivat massaltaan hieman vähärasvaista juoksijaryhmää ja ruokavaliota vaihtaneita ryhmiä suurempia, ja massojen keskihajonta oli hieman edellä mainittuja ryhmiä suurempi. Nämä havainnot tukevat sitä johtopäätöstä, että vähärasvaisessa kontrolliryhmässä yksilöiden väliset erot voivat vaikuttaa saatuihin tuloksiin. Vähärasvaisen ravinnon juoksijaryhmällä sekä ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä keskihajonta oli pieni, joten näiden ryhmien tapauksessa sytoplasmassa olevat rasvapisarot olivat pinta-alaltaan pieniä ja keskenään hyvin samankokoisia. Vähärasvaisen ruokavalion juoksijahiirillä oli kooltaan pienemmät solunsisäiset rasvapisarot verrattaessa vastaavaan kontrolliryhmään. Liikunnalla ja ruokavalion vaihtamisella korkearasvaisesta vähärasvaiseseen oli siten positiivinen vaikutus solunsisäisten rasvapisaroiden pienenemiseen, kuten rasvan tilavuusosuudenkin tapauksessa.

Uutena tutkimustuloksena tässä kokeessa havaittiin, että ruokavaliota vaihtaneilla hiirillä rasvapisarot olivat merkitsevästi pienempiä, kuin koko ajan korkearasvaista ravintoa syöneillä kontrollihiirillä. Rasvapisarot olivat myös selvästi vähärasvaista kontrolliryhmää pienempiä riippumatta siitä, lisättiinkö hiirille juoksumahdollisuus ruokavalion vaihdon yhteydessä vai ei. Ruokavalion muutoksella vähärasvaisempaan oli siten selkeä positiivinen vaikutus solunsisäisten rasvapisaroiden pienenemiseen.

### **5.1.3 Rasvapisaroiden kappalemäärien keskiarvot**

Kappalemäärältään eniten rasvapisaroita maksasolun sytoplasman pinta-alaa kohti oli odotusten mukaisesti korkearasvaista ruokaa syöneillä juoksijahiirillä, joilla oli myös tilavuusosuudeltaan eniten solunsisäistä rasvaa. Myös korkearasvaisen ruokavalion kontrolliryhmällä rasvapisaroita oli lukumäärältään paljon. Tulos osoittaa, että rasvainen ruoka aiheutti paitsi rasvapisaroiden suuremman tilavuusosuuden, myös niiden suuremman

lukumäärän maksasolujen sytoplasmassa. Solunsisäisten rasvapisaroiden lukumäärän ero oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä vain kun korkearasvaisen ravinnon juoksijahiiriä verrattiin vähärasvaisen ravinnon ryhmiin.

Kappalemäärältään vähiten rasvapisaroita oli vähärasvaista ruokavaliota noudattaneilla kontrolli- ja juoksijahiirillä, joiden tulosta lähellä olivat myös ruokavaliota vaihtaneet ryhmät. Ruokavaliota vaihtaneista ryhmistä liikuntaa harrastaneilla hiirillä oli rasvapisaroita hieman enemmän kuin vastaavalla harjoittelemattomalla ryhmällä. Liikunnalla saattoi siten olla vaikutus siihen, että rasva oli varastoitunut maksaan hieman pienempinä pisaroina, ja niitä oli määrältään hieman enemmän kuin pelkkää ruokavaliota vaihtaneella ryhmällä. Ero näiden kahden ryhmän välillä ei kuitenkaan ollut merkitsevä.

Myös Gauthier ym. (2003) laskivat rotilla tehdyssä tutkimuksessaan rasvapisaroiden keskimääräisen lukumäärän tiettyä maksasolun sytoplasman pinta-alaa kohti. Heidän käyttämässään olosuhteissa vähärasvaiseen ruokavalioon yhdistetty liikunta lisäsi rasvapisaroiden lukumäärää, kun taas korkearasvaiseen ruokavalioon yhdistetty liikunta vähensi niitä. Ryhmien välillä ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Meidän käyttämässämme olosuhteissa liikunta yhdistettynä korkearasvaiseen ruokavalioon ei vähentänyt solunsisäisten rasvapisaroiden määrää, mikä voi olla seurausta käyttämästämme korkeasta ravinnon rasvapitoisuudesta (60 % energiasta rasvoina) verrattuna Gauthierin ym. (2003) kokeeseen (35 % energiasta rasvoina). Toisaalta liikunnan tulisikin lisätä rasvapisaroiden lukumäärää korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä, sillä tällöin rasva on sytoplasmassa pienempinä pisaroina, jolloin rasvapisaroiden reaktiopinta-ala on suurempi. Näin ollen liikunta lisäisi metabolisesti aktiivisten rasvapisaroiden määrää sytoplasmassa. Meidän kokeessamme juokseminen ei myöskään lisännyt solunsisäisten rasvapisaroiden määrää vähärasvaisen ruokavalion yhteydessä. Tämä voi puolestaan johtua siitä, etteivät hiiret harrastaneet tarpeeksi liikuntaa, jotta se olisi saanut aikaan merkittäviä eroja rasvapisaroiden lukumäärässä.



## 5.2 Lihasnäytteet

### 5.2.1 Solukalvonalaisten mitokondrioiden pinta-alat

Lihäs on elimistön suurin glukoosia ja rasvaa kuluttava kudös, ja siksi sen kyky hapettaa ravinnosta saatavia ravintomolekyylejä vaikuttaa olennaisesti yksilön energiämetaboliaan. Tässä kokeessa tutkittiin pohkeen takaosassa sijaitsevaa *soleus*-lihasta, joka kuuluu hitaisiin, pääosin tyypin I soluja sisältäviin luustolihasiin. Tutkimuksen kohteena olivat tämän lihaksen solukalvonalaiset mitokondriot, joiden suhteellista määrää mitattiin vertaamalla solukalvonalaisten mitokondriokeräymien pinta-alan suhdetta tiettyyn solukalvon pituuteen.

Solukalvonalaisten mitokondrioiden pinta-alojen suhteista ei löydetty tilastollisesti merkitseviä eroja. Suhteellisesti suurin solukalvonalaisten mitokondrioiden pinta-ala oli korkearasvaista ravintoa syöneillä juoksijahiirillä, mikä osaltaan tukee aiempia tutkimustuloksia. Aiemmin rotilla ja hiirillä tehdyissä kokeissa on havaittu lihaksen supistumisen lisäävän mitokondrioiden biogeneesissä sekä parantavan lihaksen oksidatiivista kapasiteettia luustolihasessa (Connor ym., 2000; Gordon ym., 2001; Turner ym., 2007). Meshinkova ym. (2005) havaitsivat tutkiessaan ylipainoisten ihmisten luustolihasia, että solukalvonalaisten mitokondriokeräymien pinta-ala kasvaa hieman liikunnan yhteydessä. Rotilla tehdyssä kokeessa on puolestaan saatu todisteita siitä, että korkearasvainen ruokavalio lisää solukalvonalaisten mitokondrioiden rasvahappoja hapettavien entsyymien määriä (Iossa ym., 2002). Oletettavasti liikuntaa harrastavat hiiret tarvitsevat enemmän mitokondrioita energian tehokkaaseen tuottamiseen kuin vastaavan kontrolliryhmän hiiret. Mitokondrioiden suurempaan pinta-alaan on myös voinut osaltaan vaikuttaa hiirten korkearasvainen ruokavalio, jolloin mitokondrioiden on hapetettava lihaksen rasvavarastoja tehokkaasti.

Tuloksissamme vähärasvaisen ravinnon juoksijahiirillä solukalvonalaisia mitokondrioita oli lähes saman verran kuin vastaavassa kontrolliryhmässä. Tämä osoittaisi, ettei vapaaehtoinen liikunta yhdistettynä vähärasvaiseen ruokavalioon saanut aikaan muutoksia

mitokondrioiden biogeneesissä. Hyvin lähellä vähärasvaisen ravinnon kontrolliryhmän tulosta olivat myös ruokavaliota vaihtaneiden hiirten ryhmät sekä korkearasvaista ravintoa syöneiden hiirten kontrolliryhmä. Verrattaessa vähärasvaisen ja korkearasvaisen ruokavalion kontrolliryhmiä toisiinsa, havaitaan, ettei ruokavaliolla ollut juuri merkitystä solukalvonalaisten mitokondrioiden suhteelliseen pinta-alaan liikkumattomissa ryhmissä. Myöskään vähärasvaiseen ravintoon yhdistetty liikuntaa ei lisännyt mitokondrioiden määrää. Todennäköistä on, että hiiret eivät liikkuneet tarpeeksi, jotta eroja solukalvonalaisten mitokondriokeräymien pinta-alaan olisi syntynyt. Myös Meshinkovan ym., (2005) tutkimuksessa suurimmat erot havaittiin mitokondrioiden oksidatiivisessa kapasiteetissa, eikä morfologisissa mittauksissa.

Tämän tutkimuksen tulosten nojalla voidaan päätellä, että korkearasvainen ruokavalio yhdessä liikunnan kanssa näyttäisi hieman nostavan solukalvonalaisten mitokondrioiden suhteellista pinta-alaa, kuten edellä on mainittu. Korkearasvainen ruokavalio yhdistettynä liikuntaan siten lisäsi hieman mitokondrioiden biogeneesiä, kun taas vapaaehtoinen liikunta tai tietty ruokavalio yksin eivät saaneet aikaan eroja mitokondriokeräymien pinta-alassa ryhmien välillä. Tulokset eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä.

### **5.2.2 Solunsisäisen rasvan tilavuusosuus sytoplasmasta**

Maksakudoksen ohella myös luustolihakset voivat varastoida triglyseridejä solunsisäisiksi varastoiksi. Nykytietämyksen valossa lihassolut varastoivat triglyseridejä pääosin kahdesta syystä: lipidien lisääntyneen saannin takia sekä energiavarastoiksi lisääntyneen liikunnan vuoksi. Näistä ensimmäinen johtaa usein lihaksen heikentyneeseen insuliiniherkkyyteen. Tässä kokeessa määritettiin rasvan tilavuusosuus lihaksen sytoplasmasta. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja.

Suurin rasvapisaroiden tilavuusosuus havaittiin korkearasvaisen ravinnon kontrolliryhmässä. Tämä vastaa aiempia rotilla tehtyjä tutkimuksia, joissa korkearasvaisen ruokavalion on havaittu johtavan triglyseridien kertymiseen luustolihakseen (Straczkowski ym., 2001; Hegardy ym., 2002). Sama ilmiö on myös havaittu tutkittaessa ylipainoisia

ihmisiä (Goodpaster ym., 2004). Liikkumattomilla korkearasvaisen ruokavalion hiirillä rasvaa siten varastoitui myös lihaksiin, kun taas vastaavalla juoksijaryhmällä rasvaa oli lihaksessa vähemmän. Voidaan olettaa, että juoksevat hiiret kuluttavat lihaksensisäisiä rasvavarastoja hieman tehokkaammin kuin liikuntaa harrastamattomat hiiret.

Vähiten rasvaa oli vähärasvaisen ravinnon kontrolli- ja juoksijahiirillä. Vähärasvaisen ravinnon tapauksessa liikunnalla ei siten ollut merkittävää vaikutusta solunsisäisen rasvan määrään luustoliuksessa. Ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä sen sijaan rasvaa oli lihaksessa vähärasvaista ruokavaliota noudattaviin verrattuna melko paljon. Oletettavasti solunsisäiset rasvavarastot kertyivät kokeen alussa, kun hiiret olivat korkearasvaisella ruokavaliolla. Ruokavalion vaihdon jälkeen rasvavarastoista osa on jäänyt lihakseen, koska niiden kuluttaminen ei ole ollut tarpeeksi tehokasta. Verrattaessa ruokavaliota vaihtaneita ryhmiä koko kokeen ajan korkearasvaista ravintoa syöneisiin kontrollihiiriin, on ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä kuitenkin selvästi vähemmän solunsisäistä rasvaa. Näin ollen ruokavalion muutoksella oli positiivinen vaikutus solunsisäisen rasvan määrän vähenemiseen, vaikkakaan ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä.

Toisin kuin maksakudoksessa, liikunnalla oli lihaksessa solunsisäisen rasvan määrää pienentävä vaikutus korkearasvaisen ruokavalion tapauksessa. Liikunnan positiivinen vaikutus korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä havaittiin myös hiirille tehdyssä insuliinitoleranssikokeessa, jossa juoksijahiirillä oli kontrolliryhmää parempi vaste insuliinille. Ruokavaliota vaihtaneilla ryhmillä itse ruokavalion vaihtaminen vaikuttaisi kuitenkin olevan jälleen merkittävämpi seikka rasva määrän pienemiseen kuin liikunnan lisääminen. Myös Turner ym. (2004) havaitsivat rotilla tehdyssä kokeessa, että ruokavaliolla oli merkittävämpi vaikutus lihaksen solukalvojen lipidikoostumukseen kuin liikunnalla. Goodpaster ym. (2000) havaitsivat painonlaskun pienentävän lihassolujen sisään kertyneen rasvan määrää ihmisillä, mikä viittaa myös ruokavalion keventämisen vaikuttavan olennaisesti lihaksen lipidisisältöön. Nyt tehdyssä tutkimuksessa ryhmien välille ei kuitenkaan saatu tilastollisesti merkitseviä eroja vertailtaessa solunsisäisen rasvan osuutta sytoplasmasta. Tämä voi osaltaan johtua yksilöiden pienestä määrästä ryhmässä ( $n = 5$ ), ja todennäköisesti ryhmien välinen ero olisi tullut tilastollisesti merkitseväksi, jos kokeessa olisi ollut enemmän hiiriä ryhmää kohti.

### 5.2.3 Solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräiset pinta-alat

Tarkasteltaessa ryhmien välisiä eroja solunsisäisten rasvapisaroiden keskimääräisissä pinta-aloissa, ei ryhmien väliltä löydetty tilastollisesti merkitseviä eroja. Suurimmat pisarat havaittiin korkearasvaista ravintoa syöneestä kontrolliryhmästä. Liikkumattomilla yksilöillä rasva on solun sisällä suurempina pisaroina kuin liikkuvilla, mikä viittaa siihen, että liikuntaa harrastamattomilla hiirillä nämä rasvapisarot olisivat metabolisesti ei-aktiivisia. Tämä oli odotettu tulos, sillä aiemmissa tutkimuksissa on havaittu liikunnan pienentävän yksittäisten lihassolunsisäisten rasvapisaroiden kokoa, mikä johtaa myös lihaksen parantuneeseen insuliiniherkkyyteen (He ym., 2004). Muilla ryhmillä lihassolujen sisäiset rasvapisarot olivat pienempiä kuin korkearasvaisen ruokavalion kontrolliryhmällä, mutta keskenään ne olivat hyvin samankokoisia.

Tutkimuksessamme havaitsimme korkeaenergisien ruokavalion yhdessä liikkumattomuuden kanssa johtavan rasvan kertymiseen lihakseen suurina pisaroina. Liikunnan yhdistäminen korkearasvaiseen ruokavalioon hieman pienensi solunsisäisten rasvapisaroiden kokoa, jolloin niiden koko oli hyvin lähellä vähärasvaista ravintoa syöneitä sekä ruokavaliota vaihtaneiden ryhmien rasvapisaroiden kokoa. Erot eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä He ym. (2004) havaitsivat tutkimuksessaan, että vaikka liikunta ja painonlasku eivät tuoneet merkittäviä muutoksia lihassolujen sisäisen rasvan kokonaismäärään, vaikuttivat ne selvästi yksittäisten rasvapisaroiden kokoon. Liikkuvien yksilöiden lihaksissa oli He ym. (2004) kokeessa myös parempi oksidatiivinen kapasiteetti ja insuliiniherkkyys, mikä viittaa siihen, ettei pelkkä rasvan kokonaismäärä lihaksessa kerro välttämättä lihaksen energiametabolisesta tilasta. Myös meidän kokeemme tukee edellä mainittuja johtopäätöksiä, sillä hiirille tehty insuliinitoleranssikoe osoitti, että korkearasvaista ravintoa syöneillä kontrollihiirillä oli heikoin vaste insuliinille. Tässä ryhmässä lihassolujen sisäiset rasvapisarot olivat myös keskimääräiseltä pinta-alaltaan suurimpia, mikä tukee teoriaa erikokoisten rasvapisaroiden erilaisista ominaisuuksista.

### 5.3 Yhteenveto

Tutkimuksessa selvitettiin liikunnan ja ruokavalion vaikutuksia solunsisäisen rasvan määrään maksa- ja lihaskudoksessa. Aiempien tutkimusten tavoin korkearasvainen ravinto lisäsi solunsisäisen rasvan tilavuusosuutta sytoplasmasta sekä maksa- että lihaskudoksessa (Strackowski ym., 2001; Gregoire ym., 2002). Maksakudoksessa erot ryhmien välillä olivat tilastollisesti merkitseviä, ja suurempi koe-eläinten määrä olisi todennäköisesti tehnyt myös lihasnäytteiden analysoinnin tuloksista merkitsevät. Lihaskudoksessa vapaaehtoinen juoksuharjoittelu vähensi solunsisäisen rasvan määrää korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä. Maksakudoksessa korkearasvaiseen ruokavalion yhdistetty liikunta puolestaan lisäsi solunsisäisen rasvan määrää, mikä toimii todennäköisesti vasteena elimistön lisääntyneeseen energiantarpeeseen (Kiens ym., 1997). Vähiten maksa- ja lihaskudoksen sisäistä rasvaa oli oletusten mukaisesti vähärasvaista ravintoa syöneillä hiirillä. Uutta tuloksissa oli, että ruokavalion vaihtaminen korkearasvaisesta vähärasvaisempaan vähensi merkitsevästi solunsisäisen rasvan määrää maksakudoksessa, riippumatta siitä, lisättiinkö hiirille juoksumahdollisuus vai ei. Myös lihaskudoksessa solunsisäisen rasvan tilavuusosuus oli edellä mainituissa ryhmissä pienempi kuin koko ajan korkearasvaista ravintoa syöneillä hiirillä, eikä liikunnan lisäämisellä ruokavalion vaihdon yhteydessä ollut suurta vaikutusta rasvan tilavuusosuuteen.

Kokeen toisena tavoitteena oli tutkia ruokavalion ja liikunnan yhteyttä maksa- ja lihaskudoksen solunsisäisten rasvapisaroiden kokoon sekä kappalemäärään. Odotusten mukaisesti keskimääräiseltä pinta-alaltaan suurimmat rasvapisarot olivat korkearasvaista ravintoa syöneillä hiirillä, kuten aiemmissa tutkimuksissa on havaittu (Gauthier ym., 2003; He ym., 2004). Lihaskudoksessa liikunta pienensi rasvapisaroiden kokoa korkearasvaisen ruokavalion yhteydessä, kuten aiemmissakin tutkimuksissa, mutta ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä (He ym., 2004). Pienimmät rasvapisarot olivat odotusten mukaisesti vähärasvaista ruokavaliota noudattaneessa juoksijaryhmässä. Uusi tutkimustulos oli ruokavaliota vaihtaneiden hiirien yksittäisten rasvapisaroiden merkitsevästi pienemmät pinta-alat maksakudoksessa verrattaessa korkearasvaisen ravinnon kontrolliryhmään. Ruokavalion vaihtamisella oli siten selvä positiivinen vaikutus maksasolujen sisäisten rasvapisaroiden pienenemiseen. Maksakudoksesta määritettiin

lisäksi rasvapisaroiden lukumäärä sytoplasman pinta-alaa kohti, ja merkitsevästi eniten rasvapisaroita oli korkearasvaisen ruokavalion juoksijaryhmällä, mikä oli aiempien tutkimusten nojalla odotettu tulos (Gauthier ym., 2003). Kappalemäärältään vähiten rasvapisaroita oli vähärasvaisen ravinnon kontrolli- ja juoksija ryhmällä. Myös ruokavaliota vaihtaneen kontrolliryhmän hiirillä maksasolujen sisäisten rasvapisaroiden kappalemäärä oli pieni.

Tutkimuksessa selvitettiin myös liikunnan ja ruokavalion vaikutusta solukalvonalaisen mitokondriokeräymien pinta-alaan lihaskudoksessa. Tässä kokeessa saadut tulokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Suhteellisesti suurin solukalvonalaisen mitokondrioiden pinta-ala oli korkearasvaista ravintoa syöneillä juoksijahiirillä, mikä tuki aiempia tutkimustuloksia (Gordon ym., 2001; Meshinkova ym., 2005). Vähärasvaisen ravinnon juoksijahiirillä solukalvonalaisia mitokondrioita sen sijaan oli lähes saman verran kuin vastaavassa kontrolliryhmässä, joten vapaaehtoinen liikunta yhdistettynä vähärasvaiseen ruokavalioon ei saanut aikaan muutoksia mitokondrioiden biogeneesissä. Todennäköistä on, että hiiret eivät liikkuneet tarpeeksi, jotta eroja solukalvonalaisen mitokondriokeräymien pinta-alaan olisi syntynyt. Lähellä vähärasvaisen ravinnon kontrolliryhmän tulosta olivat myös ruokavaliota vaihtaneiden hiirten ryhmät, mikä oli uusi tutkimustulos.

Edellä esitettyjen tulosten nojalla voidaan tehdä johtopäätös, että käytetyissä olosuhteissa ruokavaliolla oli suurempi merkitys rasvan kertymiselle sekä yksittäisten rasvapisaroiden koolle kuin pelkällä liikunnan lisäämisellä. Uutena tutkimuksessa tarkasteltu ruokavalion vaihtaminen vähärasvaiseen sai aikaan merkitseviä positiivisia muutoksia maksakudoksessa, sekä suuntaa antavia, joskaan ei merkitseviä, positiivisia muutoksia lihaksessa. Jatkossa elintapasairauksien hoidossa ja tutkimuksessa tulisikin kiinnittää yhä enemmän huomiota ruokavalioon ja sen vaihtamisen tuomiin morfologisiin ja metabolisiin muutoksiin koko kehon tasolla. Tässä tutkimuksessa selvitettiin ruokavalion ja liikunnan vaikutuksia maksa- ja lihaskudokseen morfologisin mittauksin. Elimistön energiametabolista tilaa ei kuitenkaan voida päätellä pelkästään kudosten morfologian perusteella, joten jatkossa olisi tärkeää tutkia muutoksia myös esimerkiksi tutkittujen kudosten entsyymiaktiivisuuksissa. Jos tutkitussa kudoksessa rasvoja pilkkovien

entsyymien määrä olisi koholla, viittaisi se rasvojen tehostuneeseen hyödyntämiseen, mikä puolestaan viittaisi muutokseen elimistön energiametaboliassa. Myös solukalvonaisten mitokondrioiden toiminnan eroja voitaisiin tutkia mittaamalla entsyymiaktiivisuuksia, jolloin saataisiin selville mahdolliset muutokset mitokondrioiden oksidatiivisessa kapasiteetissa.

## Lähteet

- Ackerman, Z., M. Oron-Herman, M. Grozovski, T. Rosenthal, O. Pappo, G. Link, and B.A. Sela. 2005. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*. 45:1012-1018.
- Ahlborg, G., P. Felig, L. Hagenfeldt, R. Hendler, and J. Wahren. 1974. Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J.Clin.Invest.* 53:1080-1090.
- Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw. 2006. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet.Med.* 23:469-480.
- Baum, J.I., D.K. Layman, G.G. Freund, K.A. Rahn, M.T. Nakamura, and B.E. Yudell. 2006. A reduced carbohydrate, increased protein diet stabilizes glycemic control and minimizes adipose tissue glucose disposal in rats. *J.Nutr.* 136:1855-1861.
- Bizeau, M.E., W.T. Willis, and J.R. Hazel. 1998. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J.Appl.Physiol.* 85:1279-1284.
- Bjorntorp, P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*. 14:1132-1143.
- Blouet, C., F. Mariotti, D. Azzout-Marniche, C. Bos, V. Mathe, D. Tome, and J.F. Huneau. 2006. The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J.Nutr.* 136:1849-1854.
- Boden, G., F. Jadali, J. White, Y. Liang, M. Mozzoli, X. Chen, E. Coleman, and C. Smith. 1991. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J.Clin.Invest.* 88:960-966.
- Chan, T.M. 1984. The permissive effects of glucocorticoid on hepatic gluconeogenesis. Glucagon stimulation of glucose-suppressed gluconeogenesis and inhibition of 6-phosphofructo-1-kinase in hepatocytes from fasted rats. *J.Biol.Chem.* 259:7426-7432.
- Cho, Y., M. Ariga, Y. Uchijima, K. Kimura, J.Y. Rho, Y. Furuhata, F. Hakuno, K. Yamanouchi, M. Nishihara, and S. Takahashi. 2006. The novel roles of liver for compensation of insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology*. 147:5374-5384.
- Cogswell, A.M., R.J. Stevens, and D.A. Hood. 1993. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am.J.Physiol.* 264:C383-9.
- Collins, S., and R.S. Surwit. 1996. Pharmacologic manipulation of ob expression in a dietary model of obesity. *J.Biol.Chem.* 271:9437-9440.
- Connor, M.K., O. Bezborodova, C.P. Escobar, and D.A. Hood. 2000. Effect of contractile activity on protein turnover in skeletal muscle mitochondrial subfractions. *J.Appl.Physiol.* 88:1601-1606.
- de Fourmestraux, V., H. Neubauer, C. Poussin, P. Farmer, L. Falquet, R. Burcelin, M. Delorenzi, and B. Thorens. 2004. Transcript profiling suggests that differential metabolic adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes. *J.Biol.Chem.* 279:50743-50753.
- DeFronzo, R.A., E. Ferrannini, Y. Sato, P. Felig, and J. Wahren. 1981. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J.Clin.Invest.* 68:1468-1474.



Dillon, J.S., Y. Tanizawa, M.B. Wheeler, X.H. Leng, B.B. Ligon, D.U. Rabin, H. Yoo-Warren, M.A. Permutt, and A.E. Boyd 3rd. 1993. Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology*. 133:1907-1910.

Douen, A.G., T. Ramlal, S. Rastogi, P.J. Bilan, G.D. Cartee, M. Vranic, J.O. Holloszy, and A. Klip. 1990. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 265:13427-13430.

Evans, W.J., and V.A. Hughes. 1985. Dietary carbohydrates and endurance exercise. *Am.J.Clin.Nutr.* 41:1146-1154.

Fagot-Campagna, A., K.M. Narayan, and G. Imperatore. 2001. Type 2 diabetes in children. *BMJ*. 322:377-378.

Farnsworth, E., N.D. Luscombe, M. Noakes, G. Wittert, E. Argyiou, and P.M. Clifton. 2003. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am.J.Clin.Nutr.* 78:31-39.

Fleig, W.E., D. Enderle, S. Steudter, G. Nother-Fleig, and H. Ditschuneit. 1987. Regulation of basal and insulin-stimulated glycogen synthesis in cultured hepatocytes. Inverse relationship to glycogen content. *J.Biol.Chem.* 262:1155-1160.

Gabriely, I., X.H. Ma, X.M. Yang, G. Atzmon, M.W. Rajala, A.H. Berg, P. Scherer, L. Rossetti, and N. Barzilai. 2002. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 51:2951-2958.

Gauthier, G.F. 1979. Ultrastructural identification of muscle fiber types by immunocytochemistry. *J.Cell Biol.* 82:391-400.

Gauthier, M.S., K. Couturier, J.G. Latour, and J.M. Lavoie. 2003. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J.Appl.Physiol.* 94:2127-2134.

Goodpaster, B.H., R. Theriault, S.C. Watkins, and D.E. Kelley. 2000. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism*. 49:467-472.

Goodpaster, B.H., and D. Wolf. 2004. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr.Diabetes*. 5:219-226.

Gordon, J.W., A.A. Rungi, H. Inagaki, and D.A. Hood. 2001. Effects of contractile activity on mitochondrial transcription factor A expression in skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 90:389-396.

Gregoire, F.M., Q. Zhang, S.J. Smith, C. Tong, D. Ross, H. Lopez, and D.B. West. 2002. Diet-induced obesity and hepatic gene expression alterations in C57BL/6J and ICAM-1-deficient mice. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 282:E703-13.

He, J., B.H. Goodpaster, and D.E. Kelley. 2004. Effects of weight loss and physical activity on muscle lipid content and droplet size. *Obes.Res.* 12:761-769.

Hegarty, B.D., G.J. Cooney, E.W. Kraegen, and S.M. Furler. 2002. Increased efficiency of fatty acid uptake contributes to lipid accumulation in skeletal muscle of high fat-fed insulin-resistant rats. *Diabetes*. 51:1477-1484.

Hespe, P., and E.A. Richter. 1992. Mechanism linking glycogen concentration and glycogenolytic rate in perfused contracting rat skeletal muscle. *Biochem.J.* 284 ( Pt 3):777-780.

Hoelzer, D.R., G.P. Dalsky, W.E. Clutter, S.D. Shah, J.O. Holloszy, and P.E. Cryer. 1986. Glucoregulation during exercise: hypoglycemia is prevented by redundant glucoregulatory systems, sympathochromaffin activation, and changes in islet hormone secretion. *J.Clin.Invest.* 77:212-221.

Holloszy, J.O. 1967. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 242:2278-2282.

Ilanne-Parikka, P., J.G. Eriksson, J. Lindstrom, H. Hamalainen, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Mannelin, M. Rastas, V. Salminen, S. Aunola, J. Sundvall, T. Valle, J. Lahtela, M. Uusitupa, J. Tuomilehto, and Finnish Diabetes Prevention Study Group. 2004. Prevalence of the metabolic syndrome and its components: findings from a Finnish general population sample and the Diabetes Prevention Study cohort. *Diabetes Care.* 27:2135-2140.

Iossa, S., M.P. Mollica, L. Lionetti, R. Crescenzo, M. Botta, and G. Liverini. 2002. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 26:65-72.

Jiang, G., and B.B. Zhang. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 284:E671-8.

Joost, H.G. 1995. Structural and functional heterogeneity of insulin receptors. *Cell.Signal.* 7:85-91.

Kiens, B. 1997. Effect of endurance training on fatty acid metabolism: local adaptations. *Med.Sci.Sports Exerc.* 29:640-645.

Kim, S., I. Sohn, J.I. Ahn, K.H. Lee, Y.S. Lee, and Y.S. Lee. 2004. Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model. *Gene.* 340:99-109.

Kovacs, P., and M. Stumvoll. 2005. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.* 19:625-635.

Koves, T.R., R.C. Noland, A.L. Bates, S.T. Henes, D.M. Muoio, and R.N. Cortright. 2005. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 288:C1074-82.

Lad, P.M., A.F. Welton, and M. Rodbell. 1977. Evidence for distinct guanine nucleotide sites in the regulation of the glucagon receptor and of adenylate cyclase activity. *J.Biol.Chem.* 252:5942-5946.

Laakso, M., 2005. Metabolisen oireyhtymän uudet kriteerit ja hoito. *Duodecim* 121, 1521–30.

Laaksonen, D. ja Niskanen, L. 2006. Metabolinen oireyhtymä ja diabetes – lihavuuden hoidon ykköskohteet. *Duodecim* 122, 1227–34.

Lee, K.Y., S.J. Kim, Y.S. Cha, J.R. So, J.S. Park, K.S. Kang, and T.W. Chon. 2006a. Effect of exercise on hepatic gene expression in an obese mouse model using cDNA microarrays. *Obesity (Silver Spring).* 14:1294-1302.

Lee, Y.M., J.S. Choi, M.H. Kim, M.H. Jung, Y.S. Lee, and J. Song. 2006b. Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition.* 22:956-964.

Luginbuhl, A.J., G.A. Dudley, and R.S. Staron. 1984. Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry.* 81:55-58.

Menshikova, E.V., V.B. Ritov, F.G. Toledo, R.E. Ferrell, B.H. Goodpaster, and D.E. Kelley. 2005. Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 288:E818-25.

- Miyazaki, Y., A. Mahankali, M. Matsuda, S. Mahankali, J. Hardies, K. Cusi, L.J. Mandarino, and R.A. DeFronzo. 2002. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 87:2784-2791.
- Mole, P.A., L.B. Oscai, and J.O. Holloszy. 1971. Adaptation of muscle to exercise. Increase in levels of palmityl Coa synthetase, carnitine palmityltransferase, and palmityl Coa dehydrogenase, and in the capacity to oxidize fatty acids. *J.Clin.Invest.* 50:2323-2330.
- Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 55 Suppl 2:S9-S15.
- Murase, T., T. Mizuno, T. Omachi, K. Onizawa, Y. Komine, H. Kondo, T. Hase, and I. Tokimitsu. 2001. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J.Lipid Res.* 42:372-378.
- Nevado, C., A.M. Valverde, and M. Benito. 2006. Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes. *Endocrinology.* 147:3709-3718.
- Oscai, L.B. 1982. Dietary-induced severe obesity: a rat model. *Am.J.Physiol.* 242:R212-5.
- Peltonen M, Korpi-Hyövälti E, Oksa H, ym. 2006. Lihavuuden, diabeteksen ja muiden glukoosiaineenvaihdunnan häiriöiden esiintyvyys suomalaisessa aikuisväestössä. *Suom Lääkäril* 61:163-70.
- Pette, D. 1985. Metabolic heterogeneity of muscle fibres. *J.Exp.Biol.* 115:179-189.
- Philippi, M., and A.H. Sillau. 1994. Oxidative capacity distribution in skeletal muscle fibers of the rat. *J.Exp.Biol.* 189:1-11.
- Randle, P.J., P.B. Garland, C.N. Hales, and E.A. Newsholme. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1:785-789.
- Reaven, G.M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37:1595-1607.
- Reaven, G., F. Abbasi, and T. McLaughlin. 2004. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog.Horm.Res.* 59:207-223.
- Rebuffe-Scrive, M., R. Surwit, M. Feinglos, C. Kuhn, and J. Rodin. 1993. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 42:1405-1409.
- Reunanen, A., 2004. Suomalaisten diabetes: Harvinaisuudesta kansansairaudeksi. *Diabetes ja lääkäri* 2004;33.
- Richter, E.A., H. Galbo, and N.J. Christensen. 1981. Control of exercise-induced muscular glycogenolysis by adrenal medullary hormones in rats. *J.Appl.Physiol.* 50:21-26.
- Rodbell, M., L. Birnbaumer, S.L. Pohl, and F. Sundby. 1971. The reaction of glucagon with its receptor: evidence for discrete regions of activity and binding in the glucagon molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 68:909-913.
- Rubin, R., A. Arzumanyan, A.R. Soliera, B. Ross, F. Peruzzi, and M. Prisco. 2007. Insulin receptor substrate (IRS)-1 regulates murine embryonic stem (mES) cells self-renewal. *J.Cell.Physiol.* 213:445-453.

- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799-806.
- Samuel, V.T., Z.X. Liu, X. Qu, B.D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A.J. Romanelli, and G.I. Shulman. 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J.Biol.Chem.* 279:32345-32353.
- Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman. 2007. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol.Rev.* 87:507-520.
- Schafer, C., T. Gehrman, L. Richter, V. Keitel, K. Kohrer, D. Haussinger, and F. Schliess. 2007. Modulation of gene expression profiles by hyperosmolarity and insulin. *Cell.Physiol.Biochem.* 20:369-386.
- Schwerzmann, K., H. Hoppeler, S.R. Kayar, and E.R. Weibel. 1989. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:1583-1587.
- Shulman, G.I. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 106:171-176.
- Smith, C.J., V. Vasta, E. Degerman, P. Belfrage, and V.C. Manganiello. 1991. Hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Regulation of insulin- and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 266:13385-13390.
- Somwar, R., D.Y. Kim, G. Sweeney, C. Huang, W. Niu, C. Lador, T. Ramlal, and A. Klip. 2001. GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem.J.* 359:639-649.
- Staron, R.S., R.S. Hikida, F.C. Hagerman, G.A. Dudley, and T.F. Murray. 1984. Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J.Histochem.Cytochem.* 32:146-152.
- Straczkowski, M., I. Kowalska, S. Dzienis-Straczkowska, M. Kinalski, J. Gorski, and I. Kinalska. 2001. The effect of exercise training on glucose tolerance and skeletal muscle triacylglycerol content in rats fed with a high-fat diet. *Diabetes Metab.* 27:19-23.
- Surina-Baumgartner, D.M., M. Arnold, A. Moses, and W. Langhans. 1996. Metabolic effects of a fat- and carbohydrate-rich meal in rats. *Physiol.Behav.* 59:973-981.
- Surwit, R.S., M.N. Feinglos, J. Rodin, A. Sutherland, A.E. Petro, E.C. Opara, C.M. Kuhn, and M. Rebuffe-Scrive. 1995. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism.* 44:645-651.
- Taunton, O.D., F.B. Stifel, H.L. Greene, and R.H. Herman. 1974. Rapid reciprocal changes in rat hepatic glycolytic enzyme and fructose diphosphatase activities following insulin and glucagon injection. *J.Biol.Chem.* 249:7228-7239.
- Terao, T., T. Fujise, and S. Nakano. 1987. Effects of long-term exercise and high-cholesterol diet on lipid-lipoprotein metabolism in rats. *Tokai J.Exp.Clin.Med.* 12:243-251.
- Thong, F.S., C.B. Dugani, and A. Klip. 2005. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)*. 20:271-284.
- Turner, N., J.S. Lee, C.R. Bruce, T.W. Mitchell, P.L. Else, A.J. Hulbert, and J.A. Hawley. 2004. Greater effect of diet than exercise training on the fatty acid profile of rat skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 96:974-980.

Turner, N., C.R. Bruce, S.M. Beale, K.L. Hoehn, T. So, M.S. Rolph, and G.J. Cooney. 2007. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes*. 56:2085-2092.

Unger, R.H. 2003. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology*. 144:5159-5165.

Vaccaro, O., G. Ruffa, G. Imperatore, V. Iovino, A.A. Rivellese, and G. Riccardi. 1999. Risk of diabetes in the new diagnostic category of impaired fasting glucose: a prospective analysis. *Diabetes Care*. 22:1490-1493.

Watson, R.T., and J.E. Pessin. 2001. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp. Cell Res*. 271:75-83.

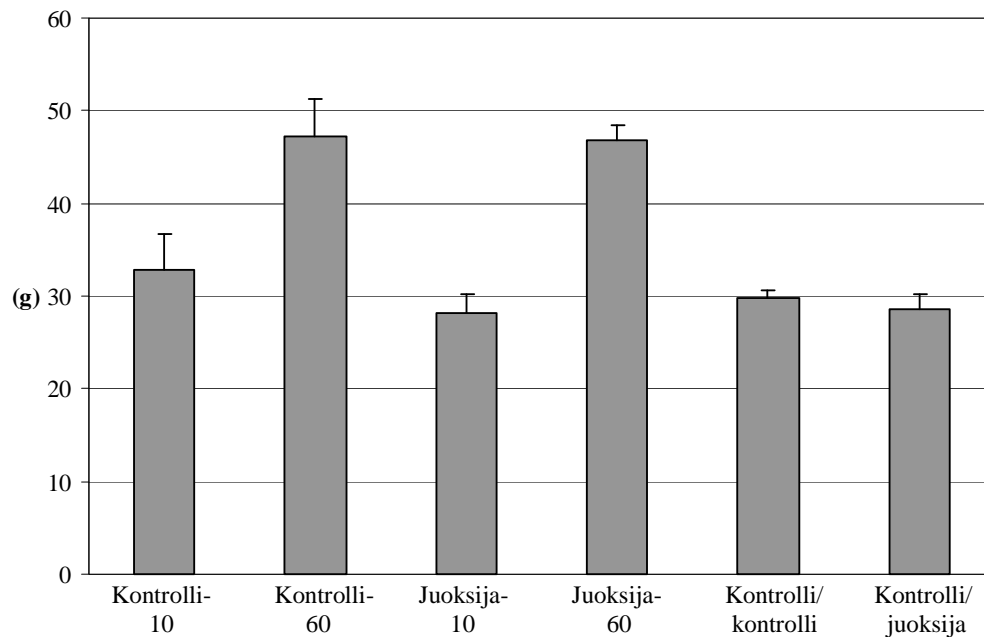
White, M.F., and C.R. Kahn. 1994. The insulin signaling system. *J.Biol.Chem*. 269:1-4.

Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414:782-787.

Zimmet, P.Z. 1999. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia*. 42:499-518.

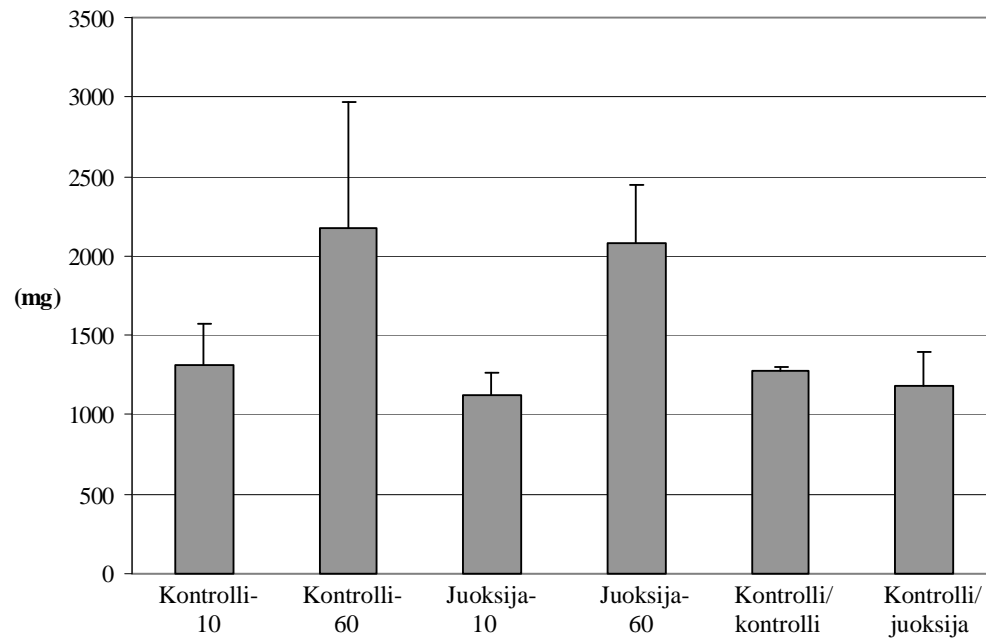
## Liitteet

### Liite 1. Hiirten keskimääräiset massat



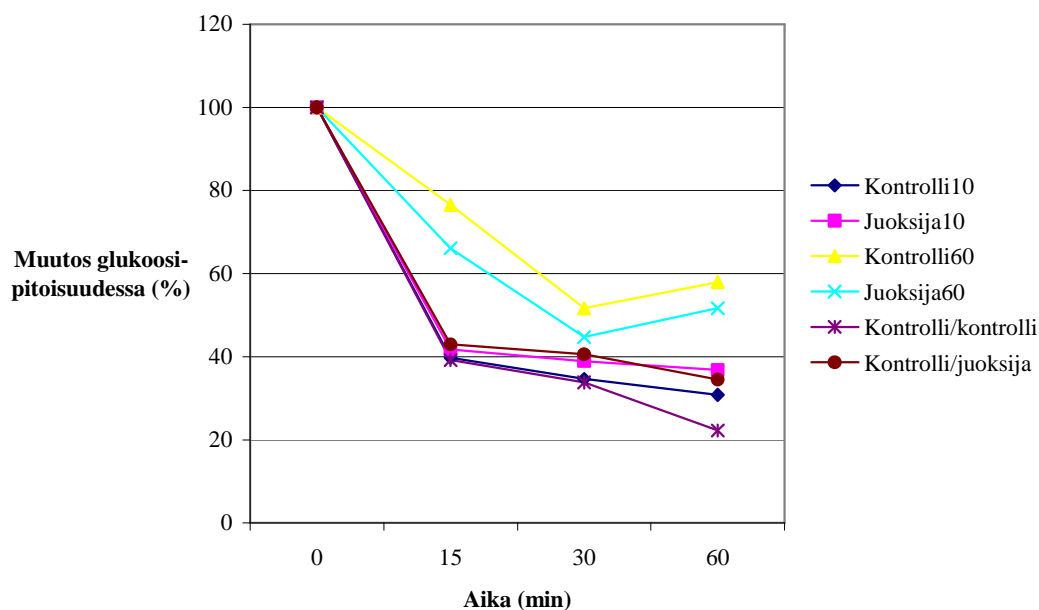
**Kuva 26. Hiirten keskimääräiset massat.** Hiirten massat on esitetty ryhmäkohtaisina keskiarvoina pylväin, ja janat ilmaisevat keskihajonnat. Massaltaan suurimmat hiiret olivat ryhmissä kontrolli60 ja juoksija60. Massaltaan pienimmät hiiret olivat puolestaan ryhmässä juoksija10, jonka keskiarvoa lähellä olivat myös ryhmien kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija keskiarvot. Ryhmän kontrolli10-hiirten keskimääräinen massa sijoittui massaltaan suurimpien ja pienimpien ryhmien välille.

## Liite 2. Hiirten maksojen keskimääräiset massat



**Kuva 27. Hiirten maksojen keskimääräiset massat.** Kuvassa on esitetty pylväin ryhmäkohtaiset maksojen massojen keskiarvot ja janat ilmaisevat ryhmäkohtaiset keskihajonnat. Massaltaan suurimmat maksat olivat ryhmän kontrolli60-hiirillä ja toiseksi suurimmat juoksija60-hiirillä. Massaltaan pienimmät maksat olivat ryhmän juoksija10-hiirillä. Ryhmien kontrolli10, kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija -hiirillä maksojen keskimääräiset massat sijoittuvat korkearasvaista ravintoa syöneiden ryhmien ja juoksija10-ryhmän välille.

### Liite 3. Insuliinitoleranssikokeen tulokset



**Kuva 28. Hiirten insuliinitoleranssikokeen tulokset.** Kuvassa on esitetty viivadiagrammina ryhmäkohtaiset veren glukoosipitoisuudet mitatuissa aikapisteissä. Hitain vaste insuliinin injektioonille oli ryhmän kontrolli60-hiirillä. Juoksija60-ryhmän hiirillä vaste insuliinille oli nopeampi kuin vastaavalla kontrolliryhmällä, mutta selvästi huonompi kuin muilla ryhmillä. Nopeimmat vasteet insuliinin injektioonille olivat ryhmillä kontrolli10, juoksija10, kontrolli/kontrolli ja kontrolli/juoksija. Kun glukoositasoa seurattiin 60 minuutin ajan, saavutti ryhmä kontrolli/kontrolli matalimman glukoosiarvon viimeisessä aikapisteessä.