



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Hormonikorvaushoidon vaikutus lihaksen lihassolutyyppeihin ja insuliinin kaltaiseen kasvutekijä 1:een ikäntyvillä naisilla

Minna Toivonen

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

Alkusanat

Tämä pro gradu -työ tehtiin Jyväskylän yliopistossa terveystieteiden laitoksella. Työ oli osana laajempaa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan hormonikorvaushoidon ja liikunnan vaikutusta ikääntyvien naisten lihaksiin.

Haluan kiittää ohjaajiani Vuokko Kovasta ja Eija Pöllästä asiantuntevasta ja kärsivällisestä ohjauksesta, sekä erittäin mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta. Kiitokset myös tutkimusryhmämme muille jäsenille, jotka ovat jakaneet tietouttaansa ja opastaneet aina tarvittaessa. Lisäksi haluaisin kiittää Paavo Rahkilaa ja Juha Hulmia vasta-aineiden lainaamisesta ja hyvistä neuvoista. Laboratoriossa avustamisesta suuri kiitos kuuluu laboratorion henkilökunnalle.

Lopuksi haluaisin osoittaa lämpimät kiitokset perheelleni ja ystäväilleni, jotka ovat jaksaneet tukea ja kannustaa.

Jyväskylässä 2.7.2010

Minna Toivonen

Tekijä:	Minna Toivonen	
Tutkielman nimi:	Hormonikorvaushoidon vaikutus lihaksen lihassolutyyppeihin ja insuliinin kaltaiseen kasvutekijä 1:een ikääntyvillä naisilla	
English title:	Effects of hormone replacement therapy on muscle fiber types and insulin like growth factor 1	
Päivämäärä:	2.7.2010	Sivumäärä: 52 + 1
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Solubiologia	
Tutkielman ohjaaja(t):	FT, dosentti Vuokko Kovanen ja FM Eija Pöllänen	

Tiivistelmä:

Ikääntymisen myötä luustolihasrakenteessa ja toiminnassa tapahtuu monia muutoksia, jotka vaikuttavat lihaksen massaan ja suorituskykyyn heikentävästi. Lihassolujen määrä ja koko vähenee sekä rasva- ja sidekudoksen määrä lihaksessa kasvaa. Näihin muutoksiin vaikuttavat mm. hormonaaliset tekijät, mutta taustalla olevia tarkkoja mekanismeja ei vielä tunneta. Naisilla lihasvoiman heikkenemisen on havaittu kiihtyvän vaihdevuosi-ikässä ja hormonikorvaushoidon on havaittu hidastavan tätä ilmiötä. Kaikki tutkimukset eivät kuitenkaan ole antaneet yhdenmukaisia tuloksia. Estrogeeni on kuitenkin yksi todennäköinen vaikuttaja lihaksen toiminnan säätelyssä, ja lihassolujen onkin todettu ilmentävän sekä estrogeenireseptori α :aa että β :aa. *In vitro* -tutkimukset lihassoluilla ovat myös paljastaneet, että estrogeeni aktivoi fosfoinositoli 3-kinaasi/proteiinikinaasi B (PI3K/Akt) -signaalireitin. Tämän reitin aktivoi myös insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1), joka on yksi tärkeimmistä lihaksen kasvua ja uusiutumista säätelevistä tekijöistä. IGF-1 on peptidihormoni, jota tuotetaan pääasiassa maksassa. IGF-1 aktivoi signaalireittejä, jotka säätelevät solun kasvua, jakautumista ja apoptoosia. Lihaksen voi hyödyntää verenkierron olevaa IGF-1:stä, mutta myös lihaksen oma IGF-1:n tuotto lisääntyy voimakkaasti intensiivisen liikunnan aikana. Ihmisen lihaksessa ilmentyy kolmea eri IGF-1:n silmukointivarianttia; IGF-1Ea, IGF-1Eb ja IGF-1Ec eli MGF.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää hormonikorvaushoidon vaikutusta ikääntyvien naisten luustolihasolutyypin jakaumaan ja kokoon, sekä lihaksen IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen ja lokalisaatioon. Tarkoituksena oli myös tutkia lihaksen IGF-1-silmukointivarianttien yhteyttä luustolihasolutyypin jakaumaan ja kokoon.

Tutkimusaineistona oli ryhmä 60–70-vuotiaita naisia, joista 15 oli käyttänyt hormonikorvaushoitoa viimeisen kymmenen vuoden aikana (käyttöaika 0,5–11 vuotta) ja 24 ei ollut koskaan käyttänyt. Tutkittavilta mitattiin antropometriset ominaisuudet sekä liikunta-aktiivisuus. Lisäksi tutkittavilta otettiin lihasbiopsiat biokemiallisia analyysejä varten. Lihassolutyypin jakauma ja lihassolujen koko määritettiin ATPaasi-värjäyksellä. Lihaksen IGF-1:n silmukointivarianttien lähetti-RNA-tasot määritettiin reaaliaika-PCR:llä. IGF-1Ea:n ja MGF:n lokalisaatio tutkittiin immunohistokemiallisin menetelmin poikkileikkeistä.

Hormonikorvaushoidolla ei ollut merkittävää vaikutusta lihassolujen kokoon, lihassolutyypin jakaumaan eikä IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen. Tuloksia kokonaisuutena tarkasteltaessa vaikuttaa kuitenkin siltä, että hormonikorvaushoito suosii tyypin II lihassoluja, joiden koko ja suhteellinen osuus oli hiukan suurempi hormonikorvaushoitoa käyttäneillä. Juuri tyypin II lihassolut ovat herkkiä ikääntymisen vaikutuksille ja saattaa olla, että hormonikorvaushoito hidastaa näitä ikääntymiseen liittyviä muutoksia. Hormonikorvaushoidolla ei myöskään ollut vaikutusta IGF-1Ea:n ja MGF:n lokalisaatioon lihaskudoksessa. IGF-1Ea ja MGF lokalisoituivat odotetusti solukalvon läheisyyteen. Kaikki variantit tunnistava IGF-1-vasta-aine lokalisoitui lihaskudoksessa lihassolujen (ja mahdollisesti satelliittisolujen) tumiin. Tämä hieman yllättävä tulos saattaa johtua IGF-1Eb:n tumalokalisoinnista, koska IGF-1Eb:n transkriptista on löydetty tumalokalisatiosignaali. IGF-1Eb toimintaa ei vielä tunneta, mutta voi olla, että IGF-1Eb:llä on tärkeä rooli lihassolujen geenien ilmentymisen säätelyssä.

Avainsanat: Hormonikorvaushoito, luustolihas, estrogeeni, IGF-1

Author: Minna Toivonen
Title of thesis: Effects of hormone replacement therapy on muscle fiber types and insulin like growth factor 1
Finnish title: Hormonikorvaushoidon vaikutus lihaksen lihassolutyyppeihin ja insuliinin kaltaiseen kasvutekijä 1:een ikääntyvillä naisilla
Date: 2.7.2010 **Pages:** 52+1
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): PhD, docent Vuokko Kovanen and MSc Eija Pöllänen

Abstract:

With aging many changes occur in structure and function of skeletal muscle and these changes decrease muscle mass and performance. The number and size of muscle fibers decreases while the amount of fat and connective tissue increases in muscle. These changes are affected by i.e. hormonal factors, although the exact molecular mechanisms underlying are still unknown. In women the weakening of muscle strength has been shown to accelerate during menopause and hormone replacement therapy has been shown to decelerate this phenomenon. However not all the studies have gained similar results. Presumably estrogen has an important role in regulation of muscle function. Skeletal muscle fibers express both estrogen receptors α and β . *In vitro* studies with muscle fibers have shown that estrogen activates the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway. This pathway is also activated by insulin like growth factor 1 (IGF-1), which is an important regulator of muscle hypertrophy and regeneration. IGF-1 is a peptide hormone, which is produced mainly in liver. IGF-1 activates signal pathways that regulate the growth, proliferation and apoptosis of cells. Skeletal muscle can utilize the IGF-1 in circulation, but also IGF-1 production in muscle increases during intensive exercise. Human muscle expresses three IGF-1 splice variant; IGF-1Ea, IGF-1Eb and IGF-1Ec or MGF.

The aim of this study was to investigate the effects of hormone replacement therapy on muscle fiber type proportions, fiber sizes and the expression and localization of muscle IGF-1 splice variant. Other aim was to investigate whether the expressions of different muscle IGF-1 splice variants are associated with the proportions and sizes of muscle fiber types.

Study subject group consisted of postmenopausal women aged 60-70 from whom 15 had used hormone replacement therapy during past ten years (duration of use was 0.5-11 years) and 24 had never used. Study subject participated in anthropometric and physical activity measurements. Study subject also gave muscle biopsies for biochemical analysis. Muscle fiber type proportions and fiber sizes were determined by ATPase staining. The expression of muscle IGF-1 splice variants was determined by real-time PCR. Localization of IGF-1Ea and MGF were studied by immunohistochemical procedures.

Hormone replacement therapy had no significant effect on muscle fiber type proportions, fiber sizes or the expression of IGF-1 splice variant. However, if the results are observed as a whole, it seems that hormone replacement therapy favours type II muscle fibers. The type II muscle fibers are the most susceptible to the effects of aging, and it might be that hormone replacement therapy delays these age-related changes. Hormone replacement therapy had also no effect on localization of IGF-1Ea and MGF in muscle tissue. IGF-1Ea and MGF localized in the vicinity of cell membrane as expected. IGF-1 antibody, which recognizes all the IGF-1 variants, localized in the nuclei of muscle fiber (and possibly nuclei of satellite cells). This somewhat unexpected result might come from nuclear localization of IGF-1Eb, since there is nuclear localization signal in IGF-1Eb transcript. The function of IGF-1Eb is unknown, but it might be that IGF-1Eb has an important role in the regulation of genes of muscle fibers.

Keywords: Hormone replacement therapy, skeletal muscle, estrogen, IGF-1

Sisällys

Lyhenteet

1. Johdanto	8
1.1. Luustolihas.....	8
1.1.1. Rakenne ja toiminta	8
1.1.2. Ikääntymisen vaikutus luustolihakseen	10
1.1.3. Vaihdevuodet ja luustolihas.....	12
1.2. Hormonikorvaushoito ja luustolihas	13
1.2.1. Estrogeeni ja progesteroni	13
1.2.2. Estrogeenin ja progesteronin signalointi.....	14
1.2.3. Estrogeenin ja progesteronin vaikutus luustolihakseen	16
1.3. Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1	17
1.3.1. IGF-1 ja luustolihas	18
2. Tutkimuksen tarkoitus	22
3. Materiaalit ja menetelmät	23
3.1. Koeasetelma.....	23
3.2. Antropometriset ja liikunta-aktiivisuuden mittaukset.....	23
3.3. Lihاسبiopsioiden otto.....	24
3.4. RNA:n eristys ja komplementaarisen DNA:n (cDNA) valmistus	24
3.5. Kvantitatiivinen reaaliaika-PCR (RT-PCR)	25
3.6. Lihassolujen tyyppijakauman ja koon määrittäminen	26
3.7. Immunohistokemia	28
3.8. Tilastolliset analyysit	29
4. Tulokset	30
4.1. Tutkittavien ominaisuuksia kuvaavat taustamuuttujat.....	30
4.2. Lihassolujen koko	30
4.3. Lihassolujen tyyppijakauma	31
4.4. IGF-1-silmukointivarianttien lokalisoituminen	32
4.5. IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentyminen	39
4.6. IGF-1:n yhteys lihassolutyyppien ilmentymiseen	39

5. Tulosten tarkastelu	41
5.1. Hormonikorvaushoidon vaikutus luustolihaslutyyppeihin.....	41
5.2. IGF-1:n silmukointivarianttien lokalisoituminen luusto-lihassoluissa.....	43
5.3. Hormonikorvaushoidon vaikutus luustolihasen IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen	45
5.4. IGF-1:n yhteys luustolihaslutyyppeihin	46
5.5. Tämän tutkimuksen rajoitteet ja tulevaisuuden tavoitteet	47
6. Lähteet	48

Liitteet (1 kpl)

Lyhenteet

AMPK	Adenosiinimonofosfaatti-aktivoituva proteiinikinaasi (engl. adenosine monophosphate-activated protein kinase)
Akt	Proteiinikinaasi B
ATP	Adenosiinitrifosfaatti (engl. Adenosine triphosphate)
BSA	Naudan seerumin albumiini (engl. bovine serum albumin)
cDNA	Komplementaarinen DNA (engl. complementary DNA)
ERE	Estrogeeniin reagoiva elementti (engl. estrogen response element)
ERK1/2	(enlg. extracellular signal-regulated kinase 1/2)
FOXO1	(engl. forkhead box protein O 1)
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi (engl. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GLUT4	Glukoosin kuljettajaproteiini 4 (engl. glucose transporter 4)
IGF-BP	IGF-1:een sitoutuva proteiini (engl. IGF binding protein)
IGF-1	Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (engl. insulin-like growth factor 1)
JAK2	Janus-kinaasi 2 (engl. janus-kinase 2)
MAPK	Mitogeeni-aktivoituva proteiinikinaasi (engl. mitogen activated protein kinase)
MGF	Mekaaninen kasvutekijä (engl. mechano growth factor)
mTOR	(engl. mammalian target of rapamycin)
MyHC	Myosiinin raskaketju (engl. myosin heavy chain)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. Phosphate buffered saline)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
PI3K	Fosfoinositoli 3-kinaasi (engl. phosphoinositide 3-kinase)
RT-PCR	Reaaliaika-PCR (engl. real-time PCR)
TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos (engl. tris buffered saline)
4E-BP1	(engl. Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1)

1. Johdanto

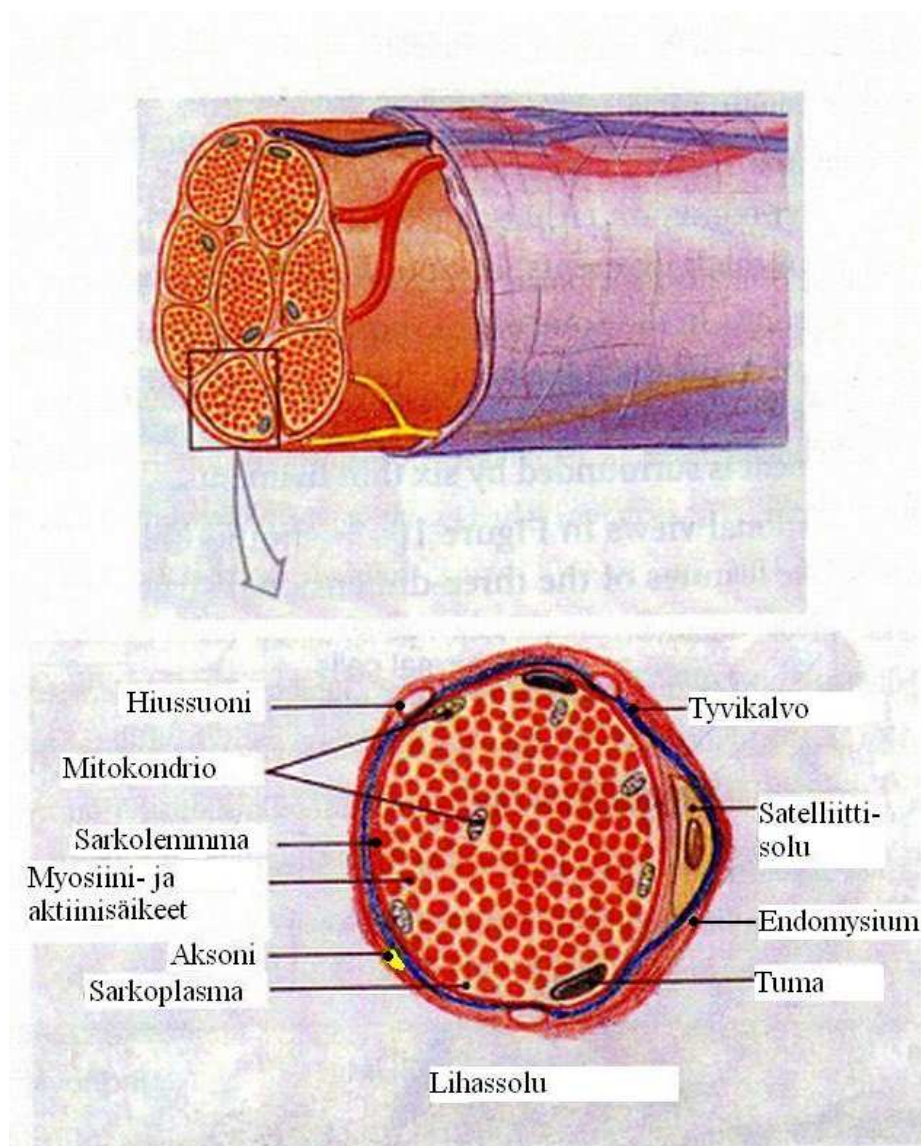
1.1. Luustolihas

1.1.1. Rakenne ja toiminta

Luustolihas koostuu pitkistä poikkijuovaisista lihassoluista eli lihassyistä, jotka kiinnittyvät toisiinsa fibroblastien muodostaman sidekudoksen avulla. Lihassolun solukalvoa, sarkolemmaa, ympäröi tyvikalvo, johon liittyy endomysiumiksi nimetty sidekudosrakenne. Lihaskudoksessa olevat kantasolut eli satelliittisolut sijaitsevat sarkolemman ja tyvikalvon välissä. Satelliittisolut ovat pieniä, yksitumaisia soluja, jotka mahdollistavat lihassyiden kasvun tai korjaantumisen niiden vaurioituessa. Lihassolut ovat järjestäytyneet rinnakkain pitkittäissuuntaisesti ja muodostavat lihassolukimppuja, joita ympäröi perimysiumiksi nimetty sidekudoskalvo (kuva 1). Nämä lihassolukimput muodostavat lopulta kokonaisen, epimysium-kalvon ympäröimän lihaksen, joka kiinnittyy jänteen avulla luuhun. Lihaskudoksen verisuonet ja hermot sijaitsevat lihassolujen soluvälitilassa. Jokaista lihassolua hermottaa liikehermosolu, joka yhdessä hermottamiensa lihassolujen kanssa muodostaa yhdessä toimivan motorisen yksikön.

Lihassolut ovat pitkiä, monitumaisia soluja, joiden poikkijuovaisuus johtuu rinnakkain järjestäytyneistä supistumisyksiköistä, sarkomeereista. Lihassupistuksen aikana sarkomeereissa sijaitsevat myosiini- ja aktiinisäikeet liukuvat toistensa lomiin, jolloin lihas supistuu. Lihassolut jaetaan kahteen pääluokkaan, I- ja II-tyypin lihassoluihin. Nämä eroavat toisistaan rakenteellisilta ja toiminnallisilta ominaisuuksiltaan. Eri lihassolutyypit ilmentävät eri isoformeja tietyistä lihasproteiineista kuten tropomyosiinista, troponiinista ja myosiinista. Pääasiassa lihassolut luokitellaan myosiinin raskasketju (MyHC, engl. *Myosin Heavy Chain*) -isoformin perusteella. Tyypin I lihassolut ovat oksidatiivisia, hitaammin supistuvia soluja, jotka ilmentävät MyHC I -isoformia. Nämä lihassolut sisältävät paljon mitokondrioita ja myoglobiinia, ja ne väsyvät hitaammin kuin tyypin II solut. Tyypin II lihassolut ovat nopeita lihassoluja, jotka tuottavat energiaa pääasiassa glykolyysin avulla. Tyypin II lihassolut ilmentävät MyHC II -isoformeja, joita ihmisellä on kaksi; Iia ja Iix.

Tyypin IIa lihassolut voivat tuottaa energiaa myös aerobisesti ja niissä on lähes yhtä paljon mitokondrioita kuin tyypin I soluissa, kun taas tyypin IIx lihassolut ovat pääasiassa anaerobisia. Ihmisillä esiintyy myös hybridisoluja, jotka ilmentävät useampaa MyHC-isoformia samaan aikaan.

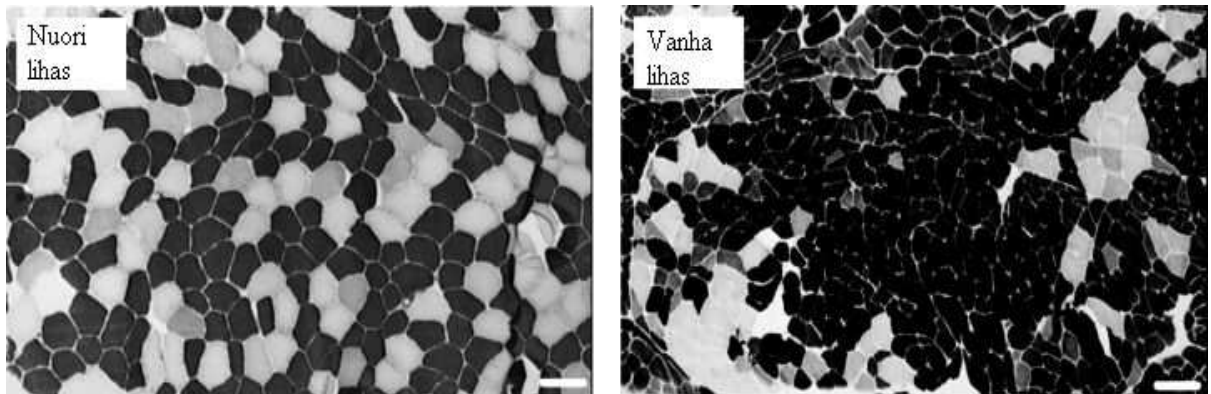


Kuva 1. Luustolihasen rakenne. Lihassolukimppu (ylempi kuva) koostuu pitkittäisistä lihassoluista, joita ympäröi perimysium. Yksittäinen lihassolu (alempi kuva) koostuu aktiini- ja myosiinisäikeistä, jotka liukuessaan lomittain saavat aikaan lihassupistuksen. Kuvassa näkyy myös satelliittisolu, joka sijaitsee sarkolemma ja tyvikalvon välissä. (Kuva on mukailtu väitöskirjasta Wiik, 2008).

1.1.2. Ikääntymisen vaikutus luustolihakseen

Ikääntymisen myötä luustolihakseen tapahtuu monia muutoksia, jotka vaikuttavat lihaksen massaan ja suorituskykyyn heikentävästi. Lihasten heikkenemisellä on suuri vaikutus elämän laatuun ja se on usein syynä vanhusten heikentyneeseen toimintakykyyn. Sen lisäksi, että lihasvoimaa tarvitaan päivittäisissä askareissa, lihas auttaa ylläpitämään luumassaa sekä toimii lämmön lähteenä ja dynaamisena varastona aineenvaihduntatuotteille (ks. yleiskatsaus Goldspink, 2005). Ikääntymiseen liittyviin muutoksiin lihaksen rakenteessa ja toiminnassa vaikuttaa moni tekijä, joita ovat mm. hormonaaliset muutokset, immunologiset tekijät ja lämpösokkiproteiinit (ks. yleiskatsaus Lee ym., 2007). Tarkkoja molekulaarisia mekanismeja, joilla nämä tekijät välittävät vaikutuksensa, ei kuitenkaan vielä tunneta kovinkaan hyvin.

Vanhetessa sekä lihassolujen koko että määrä vähenevät. Erityisesti tyypin II lihassolut pienenevät vanhetessa (kuva 2). Lihassolujen vähenemiseen vaikuttaa osittain liikehermosolujen kuoleminen ja lihassolujen hermotuksen tuhoutuminen (denervaatio), joka kiihtyy 60 vuoden iässä ja on aluksi yleisempää tyypin II lihassoluissa. Tämä ilmiö kasvattaa tyypin I lihassolujen suhteellista osuutta, mutta tasapaino palautuu myöhemmällä iällä kun myös I tyypin soluissa denervaatio kiihtyy. Liikehermosolun kuollessa myös lihaksen motoristen yksikköjen määrä pienenee, jäljelle jäävien hermosolujen hermottaessa yhä isompaa lihassolujen joukkoa. Tätä ilmiötä kutsutaan reinnervaatioksi ja se aiheuttaa lihaksessa lihassolutyypien ryhmittymistä (kuva 2), mikä vaikuttaa heikentävästi lihaksen toimintakykyyn. Vanhoilla ihmisillä on myös havaittu olevan enemmän useampaa MyHC-isoformia ilmentäviä hybridilihassoluja kuin nuorilla. Samalla puhtaiden lihassolutyypien määrä vähenee (ks. yleiskatsaus Andersen, 2003b).



Kuva 2. ATPaasi-värjäys nuoren ja vanhan luustolihasen poikkileikkauksesta. Vanhetessa lihassolujen koko pienenee ja lihaksessa tapahtuu eri lihassolutyypin ryhmittymistä. Tummat solut ovat tyypin I soluja, valkoiset tyypin IIa soluja ja harmaat tyypin IIx soluja. Mittajana on 100 μm . (Kuva on mukailtu katsausartikkelista Andersen, 2003.)

län myötä rasva- ja sidekudoksen osuus lihaksessa kasvaa, mikä pienentää supistuvan lihaskudoksen massaa (ks. yleiskatsaus Lexell, 1995). Ikääntymiseen liittyvään lihassolun pienenemiseen vaikuttaa myös lihaksen heikentynyt proteiinisynteesi. Vanhetessa MyHC IIa:n ja IIx:n lähetti-RNA:n määrät pienenevät, mikä johtaa niiden proteiinisynteesin heikkenemiseen (Balagopal ym., 2001). Ihmisillä myös mitokondriaalisten proteiinien synteesi vähenee vanhetessa (Rooyackers ym., 1996). Eläinkokeissa on havaittu ikääntymisen pienentävän myös mitokondriaalisen DNA:n kopiolukua (Barazzoni ym., 2000). Nämä muutokset heikentävät lihaksen kykyä syntetisoida adenosiinitrifosfaattia (ATP), jolloin lihas väsy nopeammin. Ikääntymisen myötä lihasproteiinien vahingoittuminen oksidatiivisen stressin ja glykosylaation välityksellä lisääntyy huomattavasti. Tämä johtuu osittain siitä, että vahingoittuneita proteiineja poistavan proteasomisysteemin toiminta heikkenee iän myötä. Oksidatiiviset modifikaatiot myosiini- ja aktiiniproteiineissa heikentävät lihaksen supistumiskykyä ja modifikaatiot kalsiumhomeostasiaa säätelevissä proteiineissa nostavat solunsisäistä kalsiumkonsentraatiota (ks. yleiskatsaus Thompson, 2009).

Myös lihaksen uusiutumiskyky saattaa heiketä iän myötä. Lihaskudoksen vaurioituessa (esimerkiksi raskaan liikunnan aikana) käynnistyy korjausprosessi, jonka aikana satelliittisolut aktivoituvat jakautumaan. Vähitellen satelliittisolut erilaistuvat ja fuusioituvat olemassa oleviin lihassoluihin. Satelliittisolujen määrä vähenee ihmisellä ikääntymisen myötä (Renault ym., 2002; Kadi ym., 2004). Tämä saattaa johtua satelliittisolujen toimintakyvyn heikkenemisestä, jolloin niiden jakautuminen ja

erilaistuminen on vähentynyt. Satelliittisolujen toimintaa säätelevät myogeeniset säätelytekijät, joiden ilmentymisen on havaittu vähenevän vanhetessa (Bigot ym., 2008). Lisäksi myostatiinin (estää satelliittisolujen jakautumisen) ilmentymisen on havaittu lisääntyvän naisilla ikääntymisen myötä (Raue ym., 2006). Vanhoilla ihmisillä myös lihaksen tärkeän uusiutumistekijän, mekaanisen kasvutekijän (MGF, engl. *Mechano Growth Factor*) ilmentyminen on heikentynyt (Hameed ym., 2003), mikä johtuu luultavasti siitä, että vanhetessa lihaksen rakenteessa tapahtuu muutoksia, jolloin MGF:n ilmentymisen aktivoiva, solutukirankavälitteinen signalointisysteemi ei enää toimi (ks. yleiskatsaus Goldspink, 2005). Lihassolun solukalvolla sijaitsevan, lihassolun tukirankaan ja soluvälitilaan yhteydessä olevan dystroglykaanikompleksin arvellaan osallistuvan mekaaniseen signaalinvälitykseen, joka saa aikaan MGF:n ilmentymisen lihasvenytyksen aikana (De Bari ym., 2003). Vanhetessa lihaksen sidekudoksessa on havaittu tapahtuvan rakennemuutoksia (Alnaqeeb ym., 1984), jotka saattavat vaikuttaa mekaaniseen signaalinvälitykseen.

1.1.3. Vaihdevuodet ja luustolihas

Vaihdevuodet eli menopaussi on elimistön luonnollinen prosessi, joka alkaa yleensä 40–60 vuoden iässä keskimääräisen alkamisiän ollessa 51 vuotta. Vaihdevuosien aikana munasarjojen hormonintuotanto heikkenee ja kuukautiset loppuvat kokonaan. Tämä hormonituotannon loppuminen aiheuttaa monia oireita, joita ovat ärtyneisyys, masentuneisuus, kuumat aallot, yölliset hikoilupuuskat, hermostuneisuus, rintakivut, sydämen tykytys, päänsärky, nivel- ja lihaskivut, tuntohäiriöt käsissä ja jaloissa, haluttomuus, painonnousu, unihäiriöt, väsymys, aggressiivisuus, ummetus, virtsaamisvaivat ja virtsankarkailu. Lisäksi vaihdevuodet lisäävät riskiä sairastua sydän- ja verisuonitauteihin, aivohalvaukseen, osteoporoosiin, lonkkamurtumaan, dementiaan ja Alzheimerin tautiin. Vaihdevuosien oireita pystytään lievittämään estrogeenia sisältävällä hormonilääkityksellä. Hormonikorvaushoidon on havaittu ehkäisevän osteoporoosia (ks. yleiskatsaus Gambacciani ja Vacca, 2004) ja paksusuolen syöpää (Mandelson ym., 2003), mutta pitkäaikainen käyttö saattaa lisätä myös rintasyövän riskiä (ks. yleiskatsaus Coombs ym., 2005).

Vaihdevuosien on havaittu vaikuttavan myös lihasvoimaan. Naisilla lihasvoiman heikkeneminen kiihtyy 50–60 vuoden iässä, mikä viittaisi siihen, että alentuneella hormonituotannolla on yhteys lihasvoiman heikkenemiseen (Calmels ym., 1995). Tätä lihasvoiman heikkenemisen kiihtymistä ei ole myöskään havaittu vastaavan ikäisillä miehillä (Samson ym., 2000).

1.2. Hormonikorvaushoito ja luustolihas

Useat tutkimukset ovat havainneet hormonikorvaushoidon ehkäisevän lihasmassan ja -voiman heikkenemistä vaihdevuosi-ikäen ylittäneillä naisilla (Phillips ym., 1993; Skelton ym., 1999; Sipilä ym., 2001; Taaffe ym., 2005; Ronkainen ym., 2009b). Kaikki tutkimukset eivät kuitenkaan ole saaneet samankaltaista tuloksia (Ribom ym., 2002; Tanko ym., 2002; Kenny ym., 2003). Nämä ristiriitaiset tulokset saattavat johtua siitä, että monet ulkopuoliset tekijät, kuten ikä, ruokavalio, fyysinen aktiivisuus ja hormonikorvaushoidon kesto, tyyppi ja aloitusikä, vaikuttavat tuloksiin. Vaikka hormonikorvaushoidon on havaittu vaikuttavan lihaksen fenotyypin, tarvitaan vielä tutkimuksia, jotka selvittävät hormonikorvaushoidon vaikutuksia solu- ja molekyyllitasolla. Tutkittaessa hormonikorvaushoidon vaikutuksia lihaksen geenien ilmentymiseen havaittiin vaihdevuosien muuttavan lihaksen geenien ilmentymistä (erityisesti proteiini- ja energiametaboliaan liittyvien geenien) kun taas hormonikorvaushoito ehkäisi osittain näitä muutoksia (Pöllänen ym., 2007).

Hormonikorvaushoitolääkkeet sisältävät yleensä synteettistä estrogeeniä, jonka lisäksi niissä saattaa olla myös synteettistä progesteronia. Progesteronia sisältävää valmistetta suositellaan naisille, joille ei ole tehty kohdunpoistoa, koska progesteroni auttaa suojaamaan kohdun limakalvoja jatkuvalta estrogeenin vaikutukselta ja ehkäisee siten kohtusyövän syntyä (ks. yleiskatsaus Emons ym., 2004).

1.2.1. Estrogeeni ja progesteroni

Estrogeenit, estradioli, estroni ja estrioli, ovat steroidihormoneja, jotka säätelevät mm. naisille tyypillisiä sukupuoliominaisuuksia. Estrogeeneistä estradioli on voimakkaimmin

vaikuttava, ja sitä tuotetaan eniten hedelmällisessä iässä olevien naisten elimistössä. Estradiolia valmistetaan pääasiassa testosteronista munasarjojen teeka- ja granuloosasoluissa ja sen tuottomäärät vaihtelevat kuukautiskierron vaiheesta riippuen. Estroni ja estrioli valmistetaan pääasiassa maksassa estradiolista. Estrogeenejä tuotetaan kuitenkin myös pieniä määriä lisämunaisten kuorikerroksessa, rasvasoluissa ja kiveksissä. Raskauden aikana estriolia tuotetaan myös istukassa. Vaihdevuosien aikana munasarjojen estradiolin tuotanto loppuu lähes kokonaan, jolloin estronista tulee vallitseva estrogeeni. Vaihdevuosien jälkeen estradiolia valmistetaan testosteronista tai estronista ekstragonadaalisissa kudoksissa aromataasientsyymien avulla. Estrogeenillä on vaikutuksia monissa kudoksissa. Se mm. säätelee sukupuolielinten ja rintakudoksen kasvua, erilaistumista ja toimintaa, lisää maksan proteiinien tuottoa (lipoproteiinireseptorit ja hyytymistekijät), ylläpitää luuntiheyttä, suojelee hermostoa ja verenkiertoelimistöä, ehkäisee ihon vanhenemista ja vaikuttaa mielialaan (ks. yleiskatsaus Gruber ym., 2002).

Progesteroni eli keltarauhashormoni on steroidihormoni, jota tuotetaan pääasiassa munarakkulan keltarauhasessa, mutta myös kiveksissä ja lisämunaisten kuorikerroksessa. Raskauden aikana progesteronia tuotetaan myös istukassa ja sillä on tärkeä rooli raskauden ylläpidossa. Progesteroni stimuloi kohdun, maitorauhasten ja sukupuolielinten kehitystä ja helpottaa hedelmöittyneen munasolun kiinnittymistä kohtuun. Lisäksi se välittää aivoissa signaaleja, jotka johtavat feminiiniseen käyttäytymiseen. Progesteronia syntetisoidaan kolesterolista ja se toimii monen muun steroidihormonin esiasteena.

1.2.2. Estrogeenin ja progesteronin signalointi

Estrogeenin vaikutukset solussa määräytyvät sen mukaan mihin estrogeenireseptori-alatyypin estrogeeni sitoutuu ja mitä koaktivaattoreita ja -repressoreita estrogeeni-estrogeenireseptorikompleksi sitoo. Myös eri estrogeeneillä on erilaisia vaikutuksia solussa, koska ne aiheuttavat erilaisia konformaatiomuutoksia estrogeenireseptorissa. (ks. yleiskatsaus McDonnell, 2004). Estrogeenireseptorit sijaitsevat sytoplasmassa ja tumassa, ja ne jaetaan kahteen eri alatyypin, estrogeenireseptori α :aan ja β :aan. Näitä reseptoreita koodittavat eri geenit, mutta niiden rakenteet ovat hyvin samankaltaisia. Estrogeenireseptorit α ja β ilmentyvät eri tavalla eri kudoksissa, ja mm. estradiolilla on

havaittu olevan vastakkaisia vaikutuksia, riippuen siitä kumpaan reseptorialatyyppiin se sitoutuu (Paech ym., 1997). Estrogeenireseptorit α ja β voivat muodostaa homo- tai heterodimeerejä ja niillä voi olla sekä genomisia, että ei-genomisia vaikutuksia. Genomiset vaikutukset välittyvät sytosolissa sijaitsevien reseptorien avulla. Solukalvon läpäistyään estrogeeni sitoutuu näihin reseptoreihin, minkä jälkeen kompleksi kulkeutuu tumaan. Tumassa estrogeeni-estrogeenireseptori-kompleksi sitoutuu DNA:n estrogeeniin reagoivaan elementtiin (ERE), jolloin se saa aikaan muutoksen geenien transkriptiossa. Estrogeeni voi säädellä myös geenejä, joista puuttuu ERE, muokkaamalla muiden transkriptiotekijöiden aktiivisuutta. Perinteisen genomisen estrogeenisignaalintireitin lisäksi, estrogeeni pystyy aiheuttamaan myös nopeampia, solukalvoreseptorivälitteisiä muutoksia solussa (ei-genomisia), kuten fosfoinositoli 3-kinaasi (PI3K)/proteiinikinaasi B (Akt)/endoteliaalinen typpioksidisyntaasi -reitin aktivoitumisen (Li ym., 2003).

Estrogeenireseptori voi aktivoitua myös ilman estrogeenin sitoutumista. Tämä aktivoituminen tapahtuu reseptorin fosforylaation avulla ja sen voi saada aikaan mm. kasvutekijät, jotka aktivoivat proteiinikinaaseja. Esimerkiksi insuliinin ja insuliinin kaltaisen kasvutekijä 1:n (IGF-1, engl. *Insulin-like Growth Factor 1*) on havaittu aktivoivan estrogeenireseptoreita *in vitro* -tutkimuksissa (Newton ym., 1994).

Progesteronin vaikutuksia soluun välittävät progesteronireseptorit, jotka ovat ligandin aktivoimia transkriptiotekijöitä. Aktivoituneet progesteronireseptorit sitoutuvat DNA:n progesteroniin reagoivaan elementtiin ja muokkaavat näin geenien transkriptiota. Ihmisellä ilmentyy kaksi erilaista progesteronireseptori-isoformia, progesteronireseptori A ja B, ja niillä on hieman erilaisia transkriptionaalaisia vaikutuksia, riippuen solutyypistä ja geenin promoottorialueen koostumuksesta. Myös näiden kahden reseptorin suhteellisilla osuuksilla on vaikutusta siihen miten progesteroni vaikuttaa soluun. Useimmissa soluissa progesteronireseptori B on voimakkaampi transkriptioaktivaattori, kun taas progesteronireseptori A toimii transkription estäjänä (ks. yleiskatsaus Giangrande ja McDonnell, 1999). Progesteronireseptori A toimii myös ligandista riippuvaisena repressorina muille steroidireseptoreille, kuten progesteronireseptori B:lle ja estrogeenireseptorille. Estrogeeni taas lisää progesteronireseptorien ilmentymistä, joten vaikuttaa siltä, että estrogeeni ja progesteroni säätelevät toistensa toimintaa. Sen lisäksi,

että progesteronireseptorilla on transkriptionaalisia vaikutuksia tumassa, se vaikuttaa myös ei-genomisella tavalla solun signaalireitteihin. Progesteronireseptorissa on domeeni, jonka avulla se pystyy nopeasti aktivoimaan Src/Ras/mitogeeni-aktivoituva proteiinikinaasi (MAPK)-, PI3K/Akt- ja Janus-kinaasi 2 (JAK2)/Stat3 -signaalireittejä (ks. yleiskatsaus Boonyaratanakornkit ym., 2008).

1.2.3. Estrogeenin ja progesteronin vaikutus luustolihakseen

Luustolihas on yksi estrogeenin kohdekudoksista, sillä lihassolut ilmentävät molempia estrogeenireseptoreita (Wiik ym., 2009). Lihas pystyy luultavasti myös itse tuottamaan estrogeeniä, koska se ilmentää aromataasientsyymiä (estrogeeniä testosteronista syntetisoiva entsyymi) ja onkin arveltu, että lihas on tärkeä estrogeenin lähde miehillä ja vaihdevuosi-ikäen ylittäneillä naisilla (Larionov ym., 2003). Estrogeeni saattaa vaikuttaa luustolihasen lihassolutyypijakaumaan, sillä eräässä koe-eläintutkimuksessa kohdunpoisto sai aikaan MyHC I -isoformin suhteellisen osuuden kasvun, mutta estrogeenihoito yhdessä liikunnan kanssa esti tämän muutoksen tehokkaammin kuin pelkkä liikunta (Kadi ym., 2002). Estrogeenin vaikutuksia lihassoluissa on tutkittu paljon myös lihassoluviljelmien avulla. Eräässä *in vitro* -tutkimuksessa on havaittu, että estrogeeni edistää myoblastien (lihassolujen esiastesoluja) jakautumista ja erilaistumista (Kahlert ym., 1997). *In vitro* -tutkimukset ovat myös paljastaneet, että estrogeeni aktivoi PI3K/Akt -signaalireitin, joka edistää lihassolujen kasvua ja estää apoptoosia (Vasconsuelo ym., 2008; ks. yleiskatsaus Boland ym., 2008). Estrogeenin on havaittu aktivoivan myös MAPK, ERK1/2:n ("extracellular signal-regulated kinase 1/2") ja p38:n, toimintaa (Ronda ym., 2007) ja lisäävän lämpösokkiproteiini 27:n ilmentymistä (Vasconsuelo ym., 2009) lihassoluissa. Nämä tutkimukset osoittavat, että estrogeenillä on apoptoosilta suojaavia vaikutuksia lihassoluissa.

Monet koe-eläimillä tehdyt tutkimukset ovat paljastaneet, että estrogeenillä on tärkeä rooli myös glukoosihomeostasiassa. Estrogeenihoito on havaittu parantavan glukoosi-intoleranssia ja insuliiniresistenssiä hiirillä, joilta aromataasientsyymiin geeni on poistettu (Takeda ym., 2003). Rotilla tehty tutkimus on paljastanut, että estrogeenillä on vaikutusta myös glukoosin kuljettajaproteiini 4:n (GLUT4) ilmentymiseen ja translokation

lihaksessa (Sugaya ym., 2000). Nämä vaikutukset välittyvät ilmeisesti estrogeenireseptori α :n avulla, koska hiirillä, joilla on tämän reseptorin geeni poistettu, GLUT4:n ilmentyminen on heikentynyt (Barros ym., 2006). Estrogeenin vaikutukset glukoosihomeostasiin saattavat välittyä osittain Akt:n, AMP-aktivoituvan proteiinikinaasin (AMPK) ja TBC1D1/4:n (glukoosihomeostasiaa sääteleviä proteiineja) kautta, koska estrogeeni stimuloi näiden proteiinien fosforylaatiota (Rogers ym., 2009).

Vaikka estrogeenin vaikutuksista luustolihakseen on saatu viime aikoina paljon uutta tietoa *in vitro* - ja koe-eläintutkimuksista, tarvitaan kuitenkin lisää tietoa siitä, mitä ihmisen lihaksessa tapahtuu. Myöskään tarkkoja mekanismeja, joiden avulla estrogeenin vaikutukset välittyvät lihaksessa, ei tiedetä.

Progesteronin vaikutuksia luustolihakseen ei ole tutkittu yhtä paljon kuin estrogeenin, vaikka luustolihakseen on todettu ilmentävän solukalvoreseptoria, joka pystyy aiheuttamaan solussa ei-genomisia vaikutuksia progesteronin sitoutuessa siihen. Progesteronin on kuitenkin todettu vaikuttavan lihassolujen glukoosihomeostasiaan lisäämällä anaerobista energiatuotantoa (glykolyysiä) ja vähentämällä glukoosin kuljetusta soluun. Onkin epäilty, että raskauden aikana lisääntyvä progesteronin tuotanto on yksi tärkeimmistä tekijöistä raskausdiabeteksen synnyssä. Nämä progesteronin vaikutukset välittyvät nopealla, ei-genomisella tavalla lihassoluun, mutta tarkkaa signalointimekanismia ei vielä tunneta (Gras ym., 2007). Eräässä koe-eläintutkimuksessa on havaittu progesteronin myös ehkäisevän lihasuupumusta (Schneider ym., 2004). Tämä saattaa johtua siitä, että progesteroni lisää glykogeenin käyttöä energian lähteenä lihaksessa (D'Eon ym., 2002).

1.3. Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1

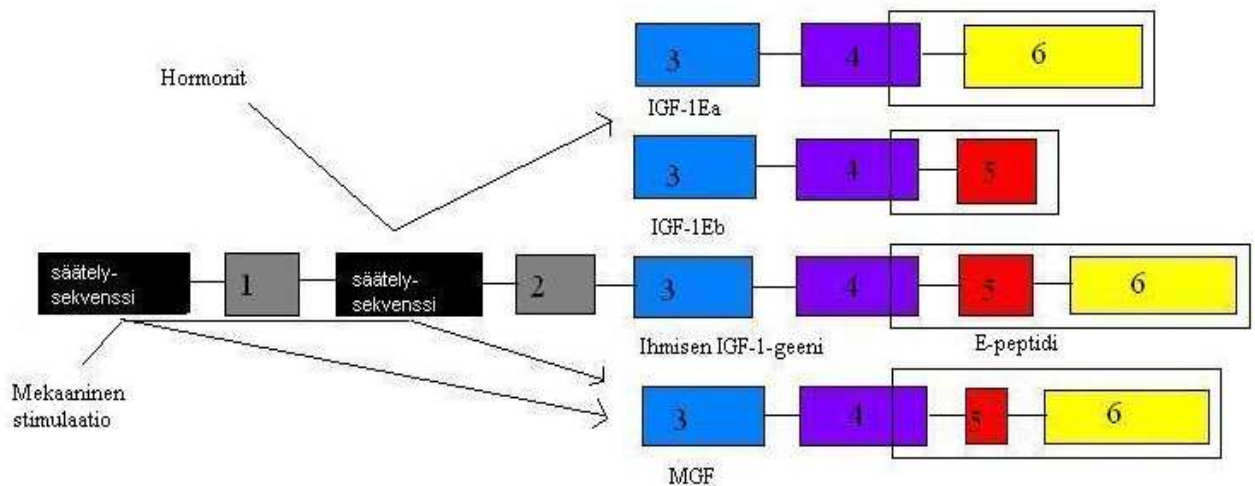
Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) on peptidihormoni, jota tuotetaan pääasiassa maksassa. Sen tuottoa säätelevät kasvuhormoni ja insuliini, joiden vapautumista IGF-1 säätelee negatiivisen palautteen avulla. Maksassa tuotettu IGF-1 vaikuttaa elimistössä endokriinisenä hormonina, mutta IGF-1:stä tuotetaan myös kudoksissa paikallisesti, jolloin sen vaikutukset ovat para- ja autokriinisiä. IGF-1 sitoutuu solukalvon IGF-1-reseptoriin ja aktivoi signaalireittejä, jotka säätelevät solun kasvua, jakautumista ja apoptoosia. IGF-1

pystyy sitoutumaan myös insuliinireseptoriin, mutta pienemmällä affiniteetilla kuin insuliini (ks. yleiskatsaus Pavelic ym., 2007). IGF-1 muistuttaa rakenteeltaan insuliinia ja sillä on todettu olevan insuliinin kaltaisia vaikutuksia perifeerisissä kudoksissa (ks. yleiskatsaus Rajpathak ym., 2009).

IGF-1-reseptori kuuluu tyrosiinikinaasireseptoreihin ja aktivoituessaan se fosforyloi useita signaalimolekyylejä kuten insuliinireseptori substraatteja. IGF-1 aktivoi näiden avulla mm. PI3K/Akt- ja Raf/MAPK-signaalireittejä, joiden aktivoituminen saa solussa aikaan monia eri tapahtumia kuten solun jakautumisen, erilaistumisen, migraation ja apoptoosin estymisen. IGF:ään sitoutuva proteiinit (IGF-BP, engl. *IGF Binding Protein*) pystyvät estämään IGF-1:n sitoutumisen reseptoriinsa. IGF-BP:t myös pidentävät IGF-1:n puoliintumisaikaa ja jotkin niistä voivat tehostaa IGF-1:n toimintaa. IGF-BP:ja hajottavat proteaasit toimivat eräänlaisina kasvun stimulaattoreina tehostaen IGF-1:n toimintaa paikallisesti (ks. yleiskatsaus Pavelic ym., 2007).

1.3.1. IGF-1 ja luustolihas

Luustolihasen kasvun yksi tärkeimmistä säätelijöistä on IGF-1. Lihaskasvu hyödyntää verenkierrossa olevaa IGF-1:stä, mutta myös lihaksen oma IGF-1:n tuotto lisääntyy voimakkaasti intensiivisen liikunnan aikana (McKoy ym., 1999). Ihmisen lihaksessa ilmentyy kolmea eri IGF-1:n silmukointivarianttia: IGF-1Ea, IGF-1Eb ja IGF-1Ec eli MGF, jotka eroavat toisistaan karboksiterminaalisen E-peptidin osalta. Näistä IGF-1Ea on systeeminen IGF-1, jota tuottaa myös maksa ja muut kudokset. IGF-1Eb:n peptidiketjussa on karboksiterminaalissa eksoni 5 kun taas IGF-1Ea:lla on eksoni 6. MGF:n karboksiterminaalissa koostuu samoista eksoneista kuin IGF-1Ea ja IGF-1Eb, mutta koska silmukoinnin tuloksena eksonista 5 transloittuu vain 16 aminohappoa, tapahtuu lukuraamissa muutos ennen eksonia 6. Näin MGF:n karboksiterminaalinen rakenne eroaa olennaisesti IGF-1Ea:sta ja IGF-1Eb:stä. IGF-1-geenin transkriptio voi alkaa useasta kohdasta (eksonista 1 tai 2) riippuen transkriptiota säätelevästä tekijästä (kuva 3) (ks. yleiskatsaus Goldspink, 2005).



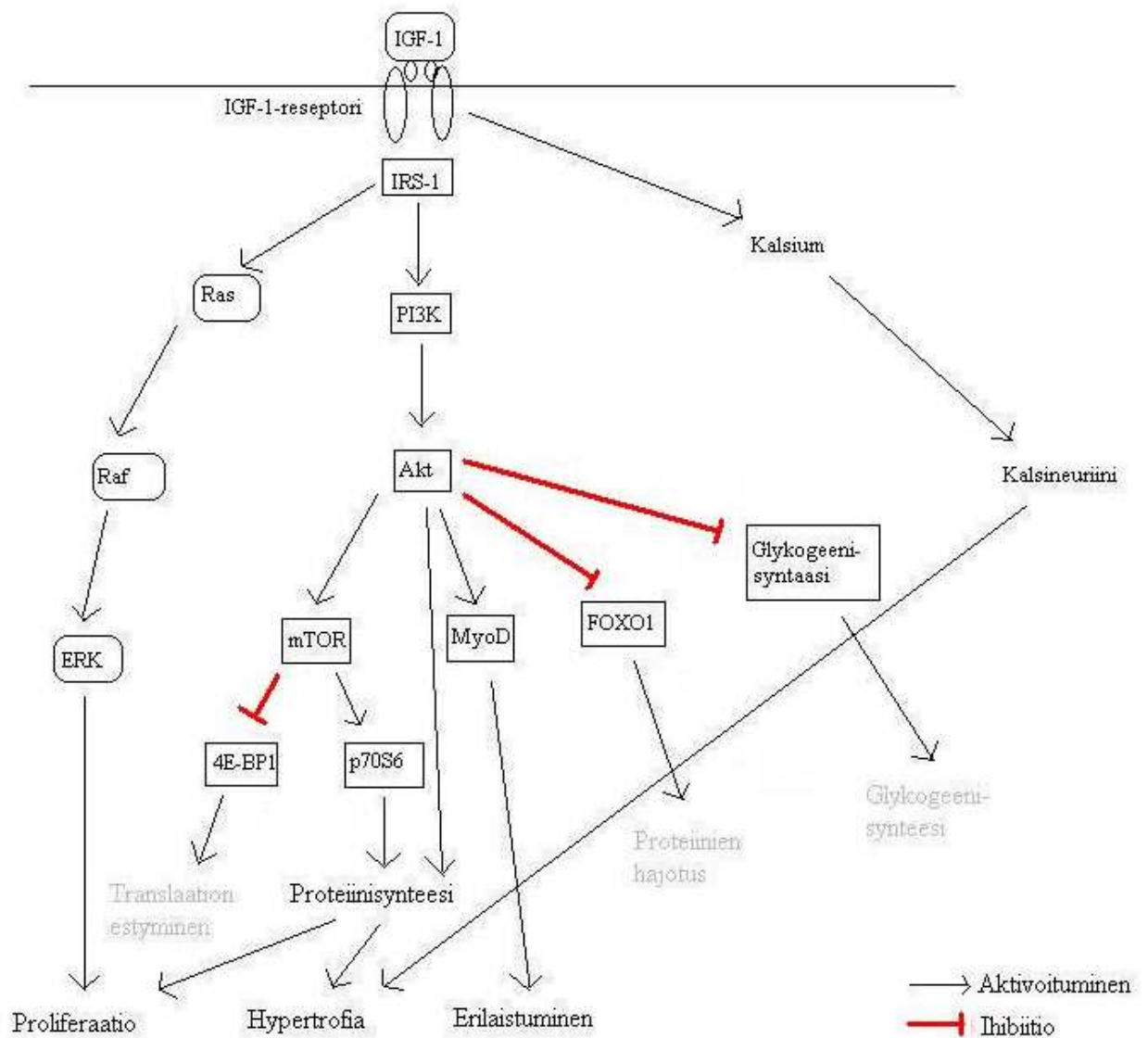
Kuva 3. Lihaksessa ilmentyvät IGF-1:n silmukointivariantit. IGF-1-geeni sisältää kaksi eri säätelysekvenssiä, joihin vaikuttavat eri tekijät. IGF-1Ea:n E-peptidissä on eri eksoni kuin IGF-1Eb:llä. MGF:n E-peptidissä tapahtuu lukuraamimuutos eksonin 5 jälkeen, jolloin MGF:n E-peptidi eroaa täysin IGF-1Ea:n E-peptidistä. (Kuva on mukailtu katsausartikkelista Goldspink, 2005)

Lihaksen kasvun aikana lihaksessa tuotetaan enemmän proteiineja kuin niitä hajotetaan. Rakenneproteiinien synteesin lisääntyessä, lihas pystyy muodostamaan uusia sarkomeerejä, jolloin lihassolun koko kasvaa. Uusia tumia lihassolut saavat aktivoituneista satelliittisolusta, jotka jakautuvat, erilaistuvat ja fuusioituvat olemassa oleviin lihassoluihin tai toistensa kanssa (ks. yleiskatsaus Morgan ja Partridge, 2003). Näin kasvavan lihassolun tuma-sytoplasmasuhde pysyy ennallaan. IGF-1Ea edistää lihaksen kasvua lisäämällä lihaksen proteiinisynteesiä, mutta lihaksen tehokas kasvu ja regeneraatio edellyttävät myös satelliittisolujen aktivoitumista (Barton-Davis ym., 1999). Tutkijat ovat havainneet, että MGF:n ilmentyminen lihaksessa kasvaa heti intensiivisen liikunnan jälkeen, kun taas IGF-1Ea alkaa ilmentyä vasta myöhemmin (Hameed ym., 2003; Hill ja Goldspink, 2003). Tämän on arveltu johtuvan siitä, että lihassolun solutukirangan mekaaninen stimulaatio muuttaa IGF-1-geenin silmukointia niin, että MGF:n tuotto lisääntyy. Syy sille miksi MGF ilmentyy ensin, on luultavasti se, että MGF aktivoi satelliittisoluja jakautumaan (Yang ja Goldspink, 2002). Tämä on tärkeä vaihe lihaksen kasvussa ja regeneraatiossa sillä kypsät lihassolut itse eivät enää pysty jakautumaan erilaistumisensa jälkeen.

IGF-1 pystyy aktivoimaan lihassolussa useita signaalireittejä, jotka vaikuttavat jakautumiseen, proteiinisynteesiin, apoptoosin ehkäisyyn ja erilaistumiseen. IGF-1:n on havaittu aktivoivan lihaksessa PI3K/Akt/p70S6- ja Raf/MAPK-reitin. PI3K/Akt/p70S6-

kinaasi-reitin aktivoituminen saa aikaan proteiinisynteesin lisääntymisen kun taas Raf/MAPK-reitin aktivoituminen stimuloi mitogeenisiä tapahtumia (Coolican ym., 1997). p70S6-kinaasi fosforyloi ribosomaalisia proteiineja, mikä lisää proteiinisynteesiä ribosomeissa. IGF-1 aktivoi PI3K/Akt-reitin avulla mTOR:n ("mammalian target of rapamycin"), joka p70S6-kinaasin lisäksi fosforyloi 4E-BP1:n ("eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1"), jolloin sen translaatiota estävä vaikutus heikkenee (ks. yleiskatsaus Thomas ja Hall, 1997). IGF-1 on havaittu lisäävän PI3K/Akt-reitin kautta myös MyoD:n (kuuluu myogeenisiin säätelytekijöihin) ilmentymistä, mikä johtaa satelliittisolujen aktivoitumiseen (Hsu ym., 1997). PI3K/Akt-signaalireitti johtaa myös FOXO1-proteiinin ("forkhead box protein O 1") fosforylaatioon ja translokation tumasta sytoplasmaan, jolloin sen transkriptionaaliset vaikutukset lihassolun tumassa estyvät (Stitt ym., 2004). FOXO-proteiinit edistävät katabolisia vaikutuksia lihaksessa lisäämällä ubikitiiniligaasien ilmentymistä. IGF-1 pystyy estämään myös glykogeenisyntaasin toimintaa, koska Akt fosforyloi myös glykogeenisyntaasin, jolloin sen toiminta estyy (kuva 4) (Rommel ym., 2001).

PI3K/Akt- ja Raf/MAPK-reitin lisäksi IGF-1:n on havaittu vaikuttavan myös muihin signaalireitteihin, kuten kalsineuriinireittiin, ja säätelevän kalsiumhomeostasiaa, jolloin IGF-1:llä on vaikutusta lihaksen ärsytys-supistukytkentään. Lisäksi IGF-1-signaalireitit voivat olla vuorovaikutuksessa muiden reseptorien aktivoimien reittien kanssa, ja näin ne muokkaavat muuta signalointia. Vielä ei kuitenkaan tiedetä tarkkaan, miten eri IGF-1-isoformit vaikuttavat eri signalointireitteihin (ks. yleiskatsaus Philippou ym., 2007).



Kuva 4. IGF-1-reseptorin aktivoimat signaalireitit luustolihasessa. IRS-1; Insuliini reseptori substraatti 1. (Kuva muokattu artikkelista Philippou ym, 2007)

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää hormonikorvaushoidon vaikutusta ikääntyvien naisten luustolihaslutyypin jakaumaan ja kokoon, sekä IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen ja lokalisaatioon. Tarkoituksena on myös tutkia IGF-1-silmukointivarianttien yhteyttä luustolihaslutyypin jakaumaan ja kokoon.

Tutkimuskysymykset:

1. Vaikuttaako hormonikorvaushoito lihaslutyypin jakaumaan ja lihaslujen kokoon?
2. Vaikuttaako IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentyminen lihaslutyypin jakaumaan ja lihaslujen kokoon?
3. Onko hormonikorvaushoidolla yhteyttä IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen?
4. Mihin IGF-1Ea ja MGF lokalisoituvat lihasluissa?
5. Onko hormonikorvaushoidolla vaikutusta IGF-1Ea:n ja MGF:n lokalisaatioon lihasluissa?

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Koeasetelma

Tutkimusaineistona käytettiin liikunta/hormonikorvaushoitotutkimuksen aineistoa, jonka tutkittavat olivat varhaisessa vaihdevuosi-iässä (50–60 -vuotiaita), kun he osallistuivat tutkimuksen ensimmäiseen vaiheeseen vuosina 1996–1997 Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella. Tällöin tutkittaville tehtiin vuoden mittainen hormonikorvaushoito-liikuntainterventio, jossa heidät satunnaistettiin neljään eri ryhmään; liikunta-, hormonikorvaushoito-, liikunta + hormonikorvaushoito- ja kontrolliryhmään (Sipilä ym., 2001). Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää luusto- ja lihasvasteita. Tässä pro gradu -tutkimuksessa hyödynnetään syksyllä 2007 kerättyä edellä mainitun tutkimuksen 10-vuotisseurannan aineistoa. Käytettävänä ovat olleet lihasbiopsianäytteet 39 tutkittavalta. Tutkittavista 15 on käyttänyt hormonikorvaushoitoa viimeisen kymmenen vuoden aikana ja 24 ei ole käyttänyt koskaan hormonikorvaushoitoa. Hormonikorvaushoitoa käyttäneistä yhdeksän oli käyttänyt hormonikorvaushoitoa 0,5–1 vuotta ja kuusi 9–11 vuotta.

3.2. Antropometriset ja liikunta-aktiivisuuden mittaukset

Tutkittavien paino ja pituus mitattiin standardimenetelmillä. Rasvaprosentti ja rasvattoman kudoksen massa (LBM) mitattiin InBody-kehonkoostumusmittarilla (Biospace, Soul, Korea). Tutkittavat arvioivat itse fyysistä aktiivisuuttaan valitsemalla omia liikuntatottumuksiaan parhaiten kuvaavan luokan seuraavista kuudesta luokasta; 1. En liiku enempää kuin välttämätöntä, 2. Harrastan kevyttä kävelyä ja ulkoilua 1–2 kertaa viikossa, 3. Harrastan kevyttä kävelyä ja ulkoilua useita kertoja viikossa, 4. Harrastan 1–2 kertaa viikossa hikoilua ja hengästyistä aiheuttavaa liikuntaa, 5. Harrastan 3–5 kertaa viikossa jonkin verran hengästyistä ja hikoilua aiheuttavaa liikuntaa, 6. Harrastan kuntoliikuntaa useita kertoja viikossa hikoillen ja hengästyen, ja 7. Harrastan kilpaurheilua ja pidän yllä kuntoani säännöllisen harjoittelun avulla.

3.3. Lihasbiopsioiden otto

Tutkittavilta otettiin lihasbiopsiat Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella aamulla yön yli kestäneen paaston jälkeen. Koehenkilöitä neuvottiin välttämään raskasta liikuntaa biopsian ottoa edeltävinä päivinä. Biopsia (50–100 mg) otettiin reisilihaksesta (*vastus lateralis*) 1,5 cm:n syvyydestä ja siitä poistettiin kaikki näkyvä side- ja rasvakudos. Välittömästi tämän jälkeen RNA-eristykseen käytettävät lihasbiopsiat jäädytettiin nestetyssä ja varastoitiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:een. Histokemiallisiin analyysihin käytettävät lihasbiopsiat pedattiin Tissue Tek™ -petausaineeseen (Sakura, Miles, Elkhart, USA). Tämän jälkeen ne jäädytettiin nopeasti (10–15 sekuntia) isopentaanissa (Fluka, Buchs, Sveitsi), joka oli esijäähdytetty $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$:een nestetyssä. Biopsiat varastoitiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:een.

3.4. RNA:n eristys ja komplementaarisen DNA:n (cDNA) valmistus

Lihasbiopsioille tehtiin RNA-eristys Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella kevään 2008 aikana. RNA:n eristyksessä käytettiin Trizol-reagenssia (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Keraamisia kuulia sisältäviin FastPrep (MP Biomedicals, Illkrich, Ranska) -homogenointiputkiin lisättiin 1 ml Trizolia 50–70 mg lihasbiopsiaa kohden. Homogenointi tehtiin ravistamalla näytteitä FastPrep FP120 -laitteella (ThermoSavant, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA) 1-2 kertaa 10 sekunnin ajan. Homogenoinnin välillä putket olivat jäällä noin yhden minuutin ajan. Homogenoinnin jälkeen putkia inkuboitiin huoneenlämmössä viisi minuuttia ja sentrifugoitiin 10 minuuttia $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (12000 g). Ylin fraktio siirrettiin uuteen Eppendorf-putkeen ja sen annettiin olla huoneenlämmössä viisi minuuttia. Tämän jälkeen putkiin lisättiin 200 μl kloroformia ja putkia sekoitettiin käsin kääntelemällä. Sekoituksen jälkeen putkia inkuboitiin 2-3 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 15 minuuttia $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (12000 g). Ylin nukleiinihapot sisältävä fraktio siirrettiin uuteen Eppendorf-putkeen, johon lisättiin 500 μl isopropanolia RNA:n saostamiseksi. Lisäyksen jälkeen putkia inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 10 minuuttia $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (12000 g). Sentrifugoinnin jälkeen pellettiä pestiin 75 % etanolilla, jonka jälkeen putkia sentrifugoitiin 5 minuuttia $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa (7500 g). Sentrifugoinnin jälkeen pelletit ilmakuivattiin ja liuotettiin dietyylipyrokarbonaatilla käsiteltyyn veteen. RNA-pitoisuudet ja puhtausasteet määritettiin NanoDrop ND-1000 spektrofotometrillä (NanoDrop, Wilmington, USA).

Eristetylle RNA:lle tehtiin DNAaasi-käsittely kaupallisella kitillä (Turbo DNA-Free Kit, Ambion, Austin, TX, USA) valmistajan ohjeiden mukaan. DNAaasi-käsittelyä varten 5 µg RNA:ta laimennettiin 17,5 µl:aan vettä. cDNA:n valmistuksessa käytettiin 2 µg kokonais-RNA:ta (reaktioseoksen kokonaistilavuus oli 40 µl) ja synteesi tehtiin High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) -kitin valmistajan ohjeiden mukaan. Reaktioseoksen entsyymiaktiivisuus oli 2,5 U/µl ja nukleotidi-konsentraatio 4 mM. Synteesissä käytetty polymeerasiketjureaktio (PCR)-ohjelma (Eppendorf Mastercycler Eppgradient S, Eppendorf, hampuri, Saksa) oli seuraavanlainen: 10 minuuttia +25 °C, 120 minuuttia +37 °C, 5 sekuntia +85 °C.

3.5. Kvantitatiivinen reaaliaika-PCR (RT-PCR)

Lihaskudoksen IGF-1Ea:n, IGF-1Eb:n, MGF:n ja glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasin (GAPDH) lähetti-RNA-tasot määritettiin 7300 Real-time RT-PCR System -laitteella (Applied Biosystems). Reaktioseoksen kokonaistilavuus oli 25 µl. PCR-reaktioliuoksena käytettiin TaqMan Universal PCR Master Mix -liuosta (Applied Biosystems), jota käytettiin 12,5 µl/reaktio. Koettimina käytettiin TaqMan-koettimia (Applied Biosystems), joiden loppukonsentraatio reaktioseoksessa oli 250 nM (sekvenssit taulukossa 1). Alukkeiden (Oligomer Oy, Helsinki, Suomi) loppukonsentraatio oli 900 nM (sekvenssit taulukossa 1). GAPDH:n lähetti-RNA-tasot määritettiin TaqMan GAPDH-alue/koetinliuoksella (Applied Biosystems), jota lisättiin PCR-reaktioseokseen 1 µl. Reaktioseokseen lisättiin 5 µl näytettä (25 ng), joka oli 1:10-laimennos cDNA-liuoksesta. Jokaisesta näytteestä ajettiin kaksi rinnakkaisnäytettä. Standardisuoraa varten tehtiin laimennossarja referenssinäytteestä, joka oli seos alkumittauksissa (vuonna 96–97) kerättyjä cDNA-näytteitä. Laimennossarjan cDNA-konsentraatiot olivat 5-, 1-, 0,1-, 0,01- ja 0,001-kertaisia. PCR-ohjelmassa oli aktivaatiovaihe (2 minuuttia 50 °C), denaturaatiovaihe (10 minuuttia 95 °C) ja 50 sykliä pidennysvaihetta (15 sekuntia 95 °C ja 1 minuutti 60 °C). PCR-ajojen väliset erot kalibroitiin referenssinäytteellä, jonka arvo laskettiin $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -kaavalla (Livak ja Schmittgen, 2001). IGF-1Ea:n, IGF-1Eb:n ja MGF:n lähetti-RNA-määrät normalisoitiin GAPDH:n määrällä.

Taulukko 1. RT-PCR:ssä käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssit.

IGF-1Ea:
Eteenpäin-alue: 5'-AGC GCC ACA CCG ACA TG-3'
Taaksepäin-alue: 5'-TCC CTC TAC TTG CGT TCT TCA AA-3'
Koetin: 5'-CAAGACCCAGAA-3'
IGF-1Eb:
Eteenpäin-alue: 5'-GAG GAG CAG ACA GCA AGA ATG A-3'
Taaksepäin-alue: 5'-CCA GCA GGC CTA CTT TTC TTC A-3'
Koetin: 5'-AAGCAGAAAATACAATAGAGG-3'
MGF:
Eteenpäin-alue: 5'-CAC GAA GTC TCA GAG AAG GAA AGG-3'
Taaksepäin-alue: 5'-CTT GTT TCC TGC ACT CCC TCT AC-3'
Koetin: 5'-AAGTACATTTGAAGAACGCA-3'

3.6. Lihassolujen tyyppijakauman ja koon määrittäminen

Lihassolutyyppijakauma määritettiin histokemiallisella menetelmällä, joka perustuu eri MyHC-isoformien erilaiseen ATPaasi aktiivisuuden pH:n kestävyteen. Tyypin I lihassolujen ATPaasi säilyttää aktiivisuutensa happamassa liuoksessa ja tyypin II emäksisessä liuoksessa. Väli-pH:ssa (4,55 tai 4,6) tyypin Ix lihassolut säilyttävät osittain aktiivisuutensa. Näin lihassolujen värjäytymisestä (tumma, harmaa tai vaalea) erilaisissa pH:ssa voidaan päätellä sen solutyyppi.

Kaikista lihasbiopsianäytteistä leikattiin analyysiä varten 8 µm:n peräkkäiset poikkileikkeet -30 °C:ssa (Leica CM 3000, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Saksa). Peräkkäisille leikkeille tehtiin ensin inkubaatiot erilaisen pH:n omaavissa puskuriliuoksissa (pH=4,37 4 minuuttia huoneenlämmössä, pH=4,55 2 minuuttia ja 10 sekuntia huoneenlämmössä, pH=4,6 1 minuutti ja 10 sekuntia huoneenlämmössä ja pH=10,3 9 minuuttia +37 °C:ssa vesihautteella, liuosten valmistus liitteessä 1), minkä jälkeen ne huuhdeltiin kahdesti 15 ja 30 sekunnin ajan liuoksella, jonka pH oli 9,4 (liuoksen valmistus liitteessä 1). Tämän jälkeen leikkeitä inkuboitii ATP-liuoksessa (Sigma, St. Louis, MO,

USA, liuoksen valmistus liitteessä 1) +37 °C:ssa 30 minuuttia. Tämän jälkeen leikkeitä inkuboitiin 1 % kalsiumdikloridiliuoksessa, jolloin ATPaasin pilkkoma vapaa fosfaatti saostuu. Seuraavaksi leikkeitä inkuboitiin 2 % kobolttidikloridiliuoksessa 3 minuuttia (kalsiumfosfaatti muuttuu kobolttifosfaatiksi), minkä jälkeen laseja pestiin vedellä. Lopuksi leikkeitä inkuboitiin 1 % ammoniumsulfidiliuoksessa yhden minuutin ajan, jolloin kobolttifosfaatti muuttuu kobolttisulfidiksi. Tämän jälkeen laseja pestiin vedellä ja ne pedattiin Aquatex-petausaineella (Merck, Darmstadt, Saksa). Näytteitä tarkasteltiin Olympus BX50 -mikroskoopin avulla ja lihassolutyypit määritettiin Tema-ohjelman (Scanbeam, Hadsund, Tanska) avulla. Jokaisesta näytteestä pyrittiin analysoimaan 100-200 solua. Lihassolutyyppien jakauma ilmaistiin prosenttiosuutena kaikista lihasoluista.

Lihassolujen poikkileikkauspinta-alan määrittämisessä käytettiin hyväksi immunohistokemiallista dystrofiini-värjäystä. Värjäystä varten leikattiin 8 µm:n lihaskudosleikkeet -30 °C:ssa (Leica CM 3000). Leikkeitä ilmakeivattiin noin 30 minuuttia, jonka jälkeen ne fiksoitiin asetonissa 10 minuuttia -20 °C:ssa. Fiksoinnin jälkeen leikkeitä ilmakeivattiin 5 minuuttia ja pestiin Tris-puskuroidulla suolaliuoksella (TBS). Tämän jälkeen leikkeitä inkuboitiin 20 minuuttia 0,3 % vetyperoksidiliuoksessa (laimennettu TBS:ään) huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen leikkeitä pestiin TBS:llä kolme kertaa 5 minuutin ajan. Vasta-ainevärjäyksessä käytettiin Vectastain ABC -kittiä (Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ja värjäys tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Primaarivasta-aineena käytettiin hiiren dystrofiinin tunnistavaa vasta-ainetta (Novocastra, Newcastle, UK) ja sen laimennossuhde oli 1:500 (laimennettiin 1 % naudan seerumin albumiini [BSA, Sigma] -TBS-liuokseen). Leikkeitä inkuboitiin primaarivasta-aineessa yön yli +4 °C:ssa. Sekundaarivasta-aineen (kitistä) laimennossuhde oli 1:200 ja inkubaatio kesti 30 minuuttia (huoneenlämmössä). Vasta-aineinkubaatioiden jälkeen leikkeitä pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan TBS:llä, minkä jälkeen leikkeitä inkuboitiin 3,3-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi (DAB) -liuoksessa (Sigma) 5 minuutin ajan huoneenlämmössä. Sen jälkeen leikkeitä pestiin kaksi kertaa vedellä (2 minuuttia/pesu). Leikkeistä poistettiin vesi inkuboimalla niitä ensin 70 % etanolissa (laimennettu veteen) 2 minuuttia, minkä jälkeen niitä pestiin absoluuttisella etanolilla kaksi kertaa (3 minuuttia/pesu). Lopuksi leikkeitä inkuboitiin ksyleenissä 3 minuutin ajan. Leikkeet pedattiin DPX-petausaineeseen (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK). Näytteitä

tarkasteltiin Olympus BX50 -mikroskoopin avulla ja lihassolujen koko määritettiin Tema-ohjelman (Scanbeam) avulla. Jokaisesta näytteestä pyrittiin analysoimaan 100–200 solua.

3.7. Immunohistokemia

Vasta-aineväryksissä käytettiin primaarivasta-aineina IGF-1 (Abcam, Cambridge, UK, 1µg/ml, 1:200), IGF-1Ea (Abcam, 1:300), MGF ((Philippou ym., 2008), 1:500), IGF-1Rβ (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA, 1:25), laminiini α2 ((Leivo ja Engvall, 1988), 1:4000) ja MyHCI (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) -vasta-aineita. IGF-1Rβ on IGF-1:n reseptori, joka sijaitsee lihassolun solukalvolla. Laminiini-vasta-aine värjää lihassolujen sarkolemmaa ympäröivän tyvikalvon. MyHCI-vasta-aine värjää myosiinin raskasketju I:n, joten sen avulla pystytään paikallistamaan tyypin I lihassolut. Lihاسبiopsianäytteistä leikattiin vasta-aineväryksiä varten 8 µm:n jääleikkeet -30 °C:ssa (Leica CM 3000). Leikkeitä ilmakeivattiin huoneenlämmössä 20 minuuttia, minkä jälkeen ne fiksoitiin 4 % paraformaldehydillä (0,1 M fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa [PBS], pH 7,4) huoneenlämmössä. Fiksoinnin jälkeen näytteitä pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan vasta-ainepuskurissa (0,1 % BSA-c [Aurion, Wageningen, Alankomaat], 0,1 % Tween 20 [Fluka] -PBS, pH 7,4). Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin vasta-aineen epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi yhden tunnin ajan huoneenlämmössä PBS-liuoksessa, joka sisälsi BSA:ta (2%, Sigma), naudan sikiön seerumia (FBS, 1%, Gibco, Carlsbad, CA, USA) ja kalan nahan gelatiinia (FSG, 0,55%, Sigma). Primaarivasta-aine laimennokset tehtiin vasta-ainepuskuriin. Leikkeitä inkuboitiin primaarivasta-aineessa yön yli +4 °C:ssa, minkä jälkeen näytteitä pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan vasta-ainepuskurilla. Sekundaarivasta-aineena käytettiin Alexa Fluor 488 vuohen anti-kani IgG:tä (Invitrogen) ja DyLight 549 aasin anti-hiiri IgG:tä (Jackson ImmunoResearch, West Baltimore Pike, PA, USA). Sekundaarivasta-aineet laimennettiin (1:200) vasta-ainepuskurilla ja näytteitä inkuboitiin sekundaarivasta-aineessa yhden tunnin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteitä pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan vasta-ainepuskurilla. Lihassolujen tumat värjättiin Hoechst (Sigma) -liuoksella (2mg/ml [etanolissa], josta tehty 1:4000 laimennos PBS:ään) 10 minuutin ajan huoneenlämmössä, minkä jälkeen näytteet vielä pestiin kolme kertaa 5 minuutin ajan vasta-ainepuskurilla ja pedattiin Aqua poly/Mount -petausaineeseen (Polyscience, Inc,

Niles, Illinois, USA). Näytteitä tarkasteltiin Olympus BX50 -mikroskoopilla ja ne kuvattiin käyttäen 40 kertaa suurentavaa objektiivia ja AnalySIS-ohjelmaa.

3.8. Tilastolliset analyysit

Koeryhmien (hormonikorvaushoidon käyttäjät, ei-käyttäjät) välisiä eroja fenotyyppi- ja PCR-tuloksissa analysoitiin riippumattomalla t-testillä SPSS-ohjelmalla (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Lisäksi geenien ilmentymisen yhteyttä lihassolujen kokoon ja lihassolutyypijakaumaan arvioitiin Pearsonin korrelaatiotestillä (SPSS-ohjelmalla).

4. Tulokset

4.1. Tutkittavien ominaisuuksia kuvaavat taustamuuttujat

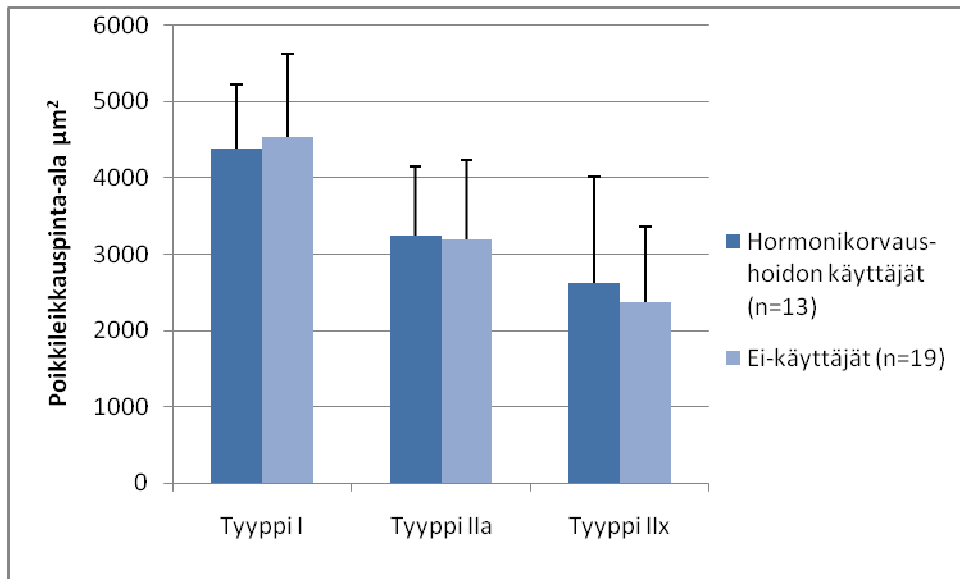
Tutkittavien iässä, painossa, pituudessa, rasvaprosentissa, rasvattoman kudoksen massassa (LBM) ja fyysisessä aktiivisuudessa ei ollut merkitseviä eroja (taulukko 2).

Taulukko 2. Tutkittavien antropometriset ominaisuudet ja fyysinen aktiivisuus. Arvot ovat keskiarvoja ja hajonnat on esitetty suluissa.

	Ikä vuosina	Paino kg	Pituus cm	Rasva %	Rasvattoman kudoksen massa kg (LBM)	Fyysinen aktiivisuus
Hormonikorvaushoidon käyttäjät (n=15)	64,00 (1,65)	68,27 (6,20)	159,98 (4,96)	32,45 (8,20)	44,52 (2,92)	3,53 (0,74)
Ei-käyttäjät (n=24)	63,58 (2,08)	71,40 (13,59)	163,17 (5,06)	34,01 (7,38)	46,08 (4,52)	3,38 (0,97)

4.2. Lihassolujen koko

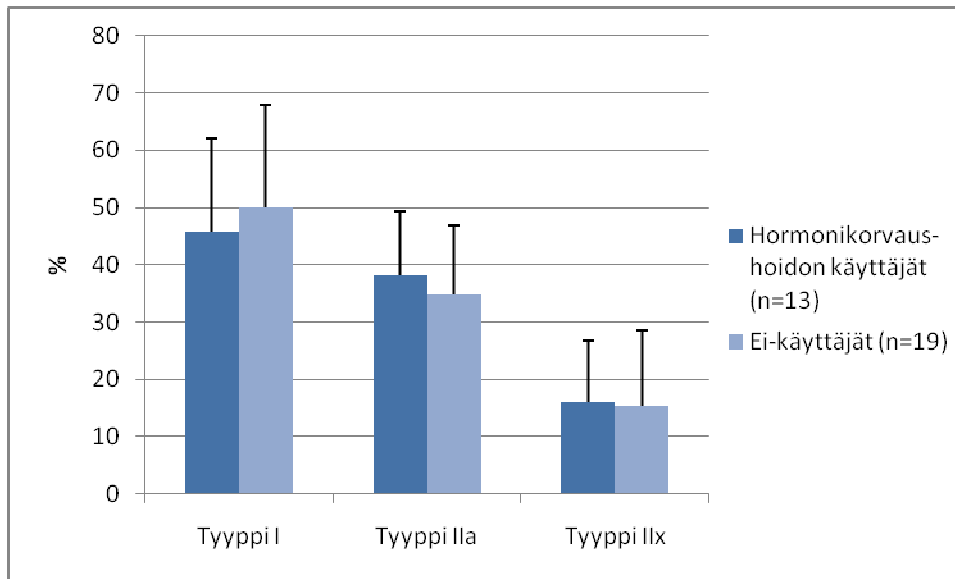
Molemmissa ryhmissä (käyttäjät ja ei-käyttäjät) tyypin I solut olivat suurimpia ($4385 \mu\text{m}^2$ ja $4537 \mu\text{m}^2$) ja tyypin IIx lihassolut pienimpiä ($2628 \mu\text{m}^2$ ja $2369 \mu\text{m}^2$). Tyypin IIa lihassolujen poikkipinta-alat olivat hormonikorvaushoidon käyttäjillä keskimäärin $3246 \mu\text{m}^2$ ja ei-käyttäjillä $3196 \mu\text{m}^2$. Suurin ero ryhmien välillä oli tyypin IIx lihassolujen koossa. Hormonikorvaushoidon käyttäjillä nämä solut olivat hieman suurempia kuin ei-käyttäjillä. Tyypin I lihassolut olivat taas hormonikorvaushoidon käyttäjillä hieman pienempiä (kuva 5). Tyypin IIa lihassolujen koossa ei juuri ollut eroja ryhmien välillä. Erot ryhmien välillä eivät olleet merkitseviä ($p > 0,05$).



Kuva 5. Lihassolujen koko. Kuvassa on esitetty keskimääräiset lihassolujen poikkileikkauksen pinta-alat (μm^2). Mittajanat esittävät keskihajontaa. Ryhmien väliset erot eivät ole merkitseviä ($p > 0,05$).

4.3. Lihassolujen tyyppijakauma

Molemmilla ryhmillä (käyttäjät ja ei-käyttäjät) oli eniten tyypin I lihassoluja (46% ja 50%) ja vähiten tyypin IIx (16% ja 15%) lihassoluja. Tyypin IIa lihassoluja oli hormonikorvaushoidon käyttäjillä keskimäärin 38% ja ei-käyttäjillä 35%. Hormonikorvaushoidon käyttäjillä tyypin I lihassolujen osuus oli hieman pienempi, kun taas tyypin II lihassolujen osuudet olivat hieman suurempia verrattuna ei-käyttäjiin (kuva 6). Ryhmien väliset erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä ($p > 0,05$).

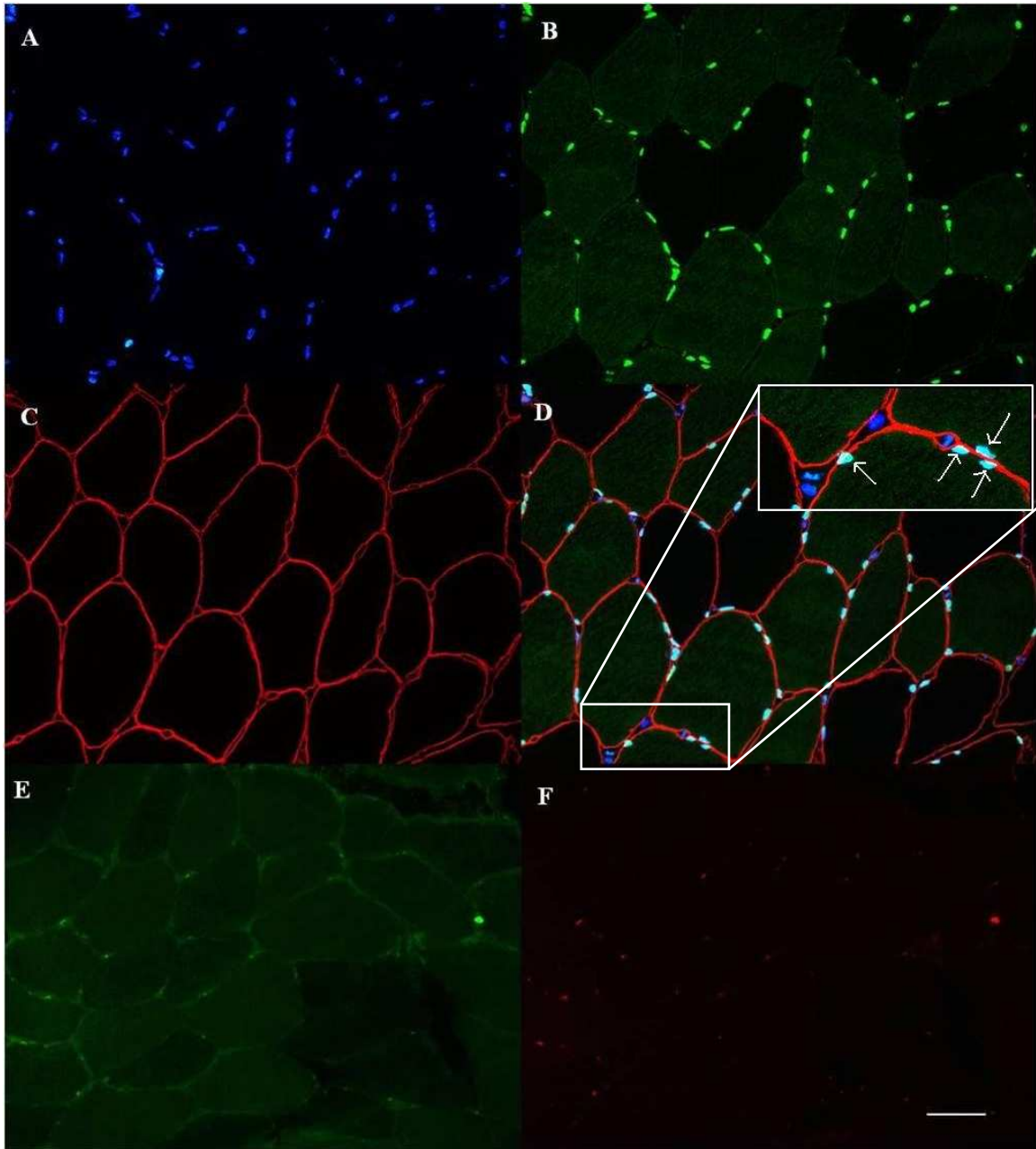


Kuva 6. Lihassolujen tyyppijakauma. Kuvassa on esitetty eri lihassolutyyppien keskimääräiset prosenttiosuudet. Mittajanat esittävät keskihajontaa. Ryhmien väliset erot eivät ole merkitseviä ($p > 0,05$)

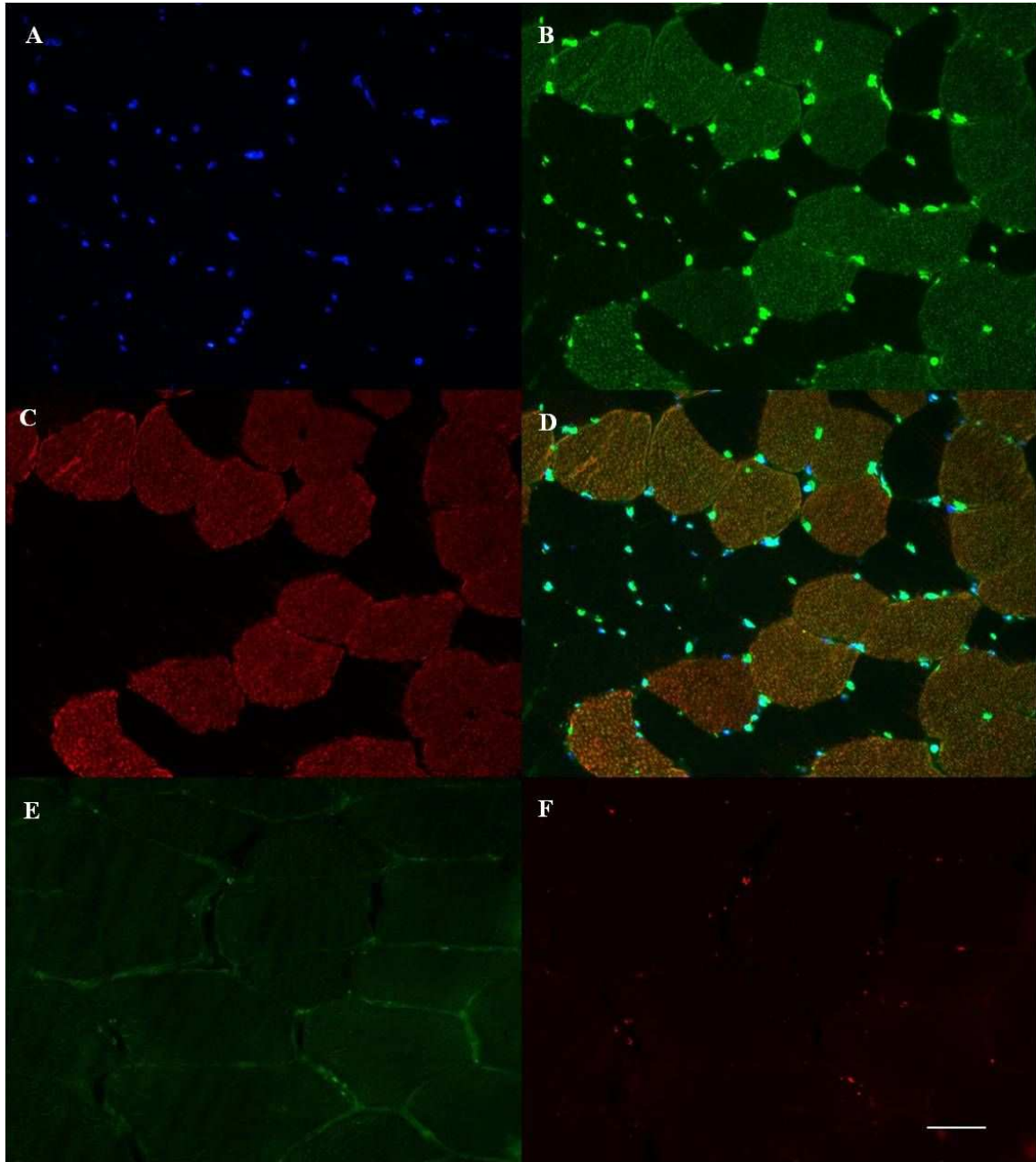
4.4. IGF-1-silmukointivarianttien lokalisoituminen

IGF-1:n kaikki silmukointivariantit tunnistava IGF-1-vasta-aine lokalisoitui lähinnä lihassolujen tumaan ja tyyppi I lihassolujen sytoplasmaan (kuvat 7 ja 8). IGF-1Ea lokalisoitui luustolihas kudoksen soluvälitilaan ja lihassolujen solukalvolle (kuvat 9 ja 10), kun taas MGF lokalisoitui lähinnä lihassolujen solukalvolle (kuva 11). IGF-1Ea kolokalisoi IGF-1-reseptorin kanssa (kuva 10), mutta kolokalisoitumista ei ole kuitenkaan havaittavissa IGF-1:n kanssa (kuva 9).

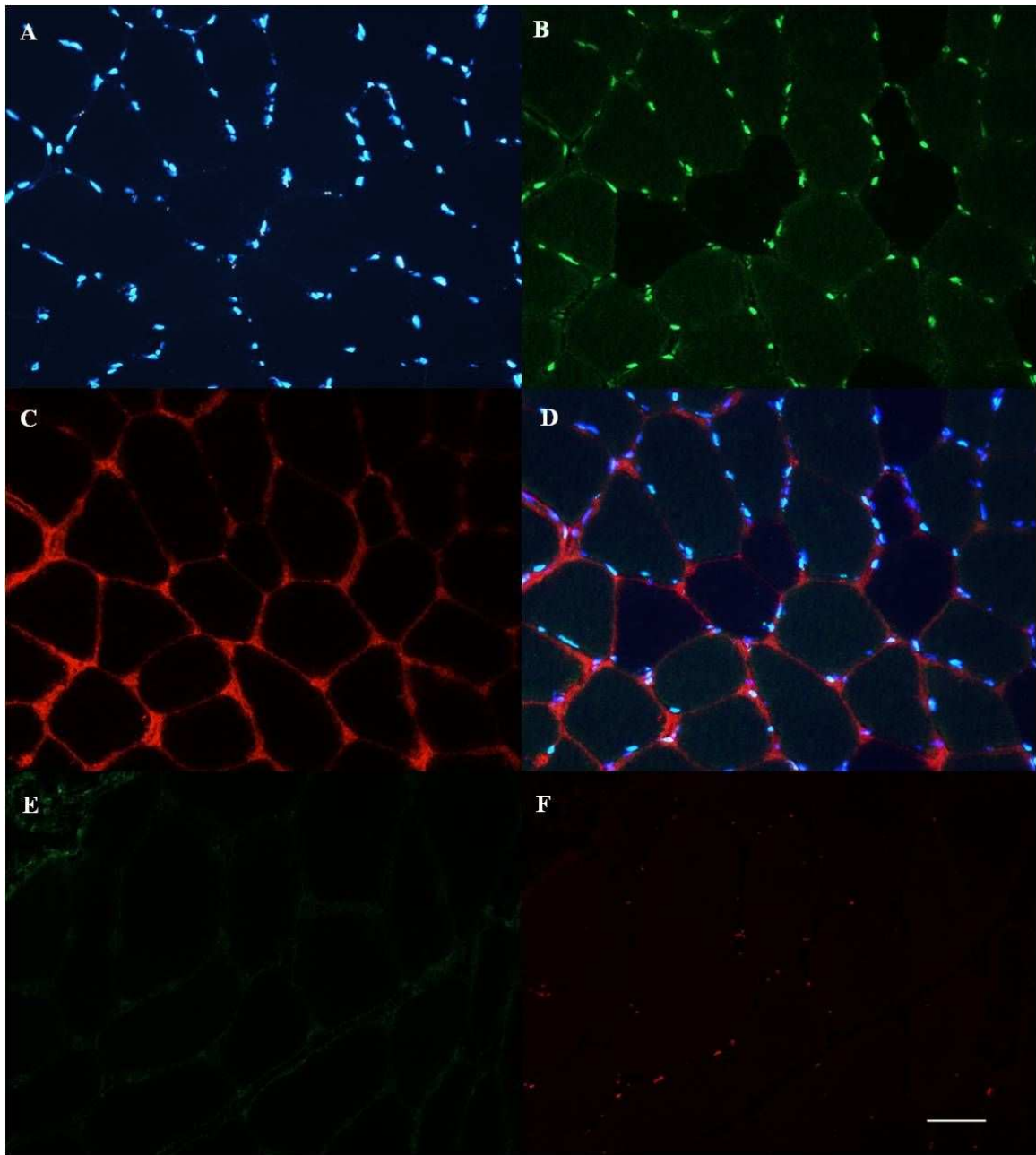
Hormonikorvaushoidon käyttäjillä ja ei-käyttäjillä ei ollut eroja silmukointivarianttien lokalisoitumisessa luustolihasuksessa (kuva 12, 13 ja 14).



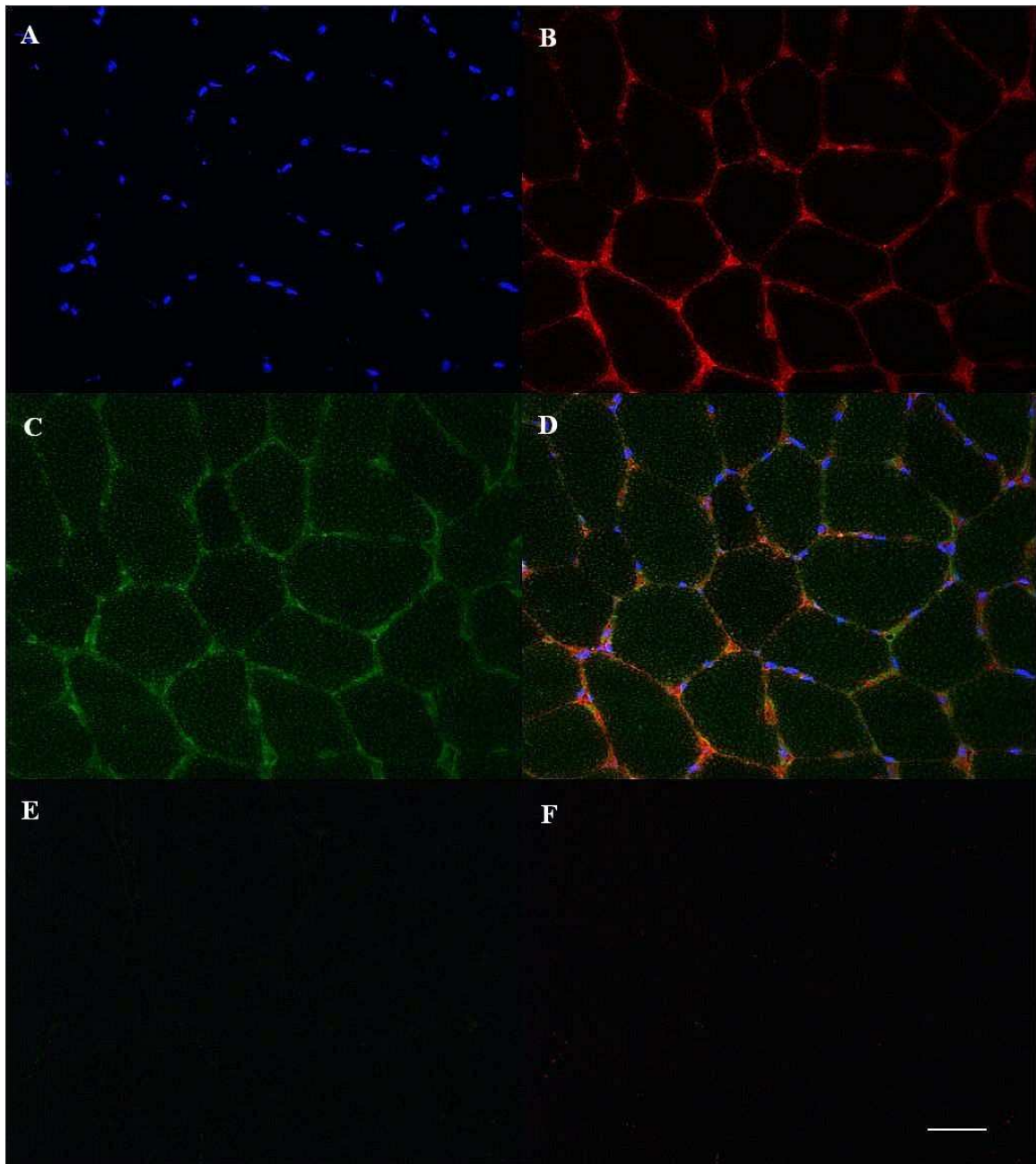
Kuva 7. IGF-1:n lokalisoituminen. Vasta-ainevärykset tehtiin 8 μm :n luustolihasleikkeille. A) Hoechst-väryys (tumat), B) IGF-1, C) laminiini (tyvikalvo), D) yhdistetty kuva, jossa näkyy IGF-1:n lokalisoituminen vain lihassolujen/satelliittisolujen tumiin (merkitty nuolilla) E) kontrolli, josta on jätetty IGF-1:n primaarivasta-aine pois, F) kontrolli, josta on jätetty laminiinin primaarivasta-aine pois. Mittajana on 50 μm , kaikissa kuvissa on sama suurennos.



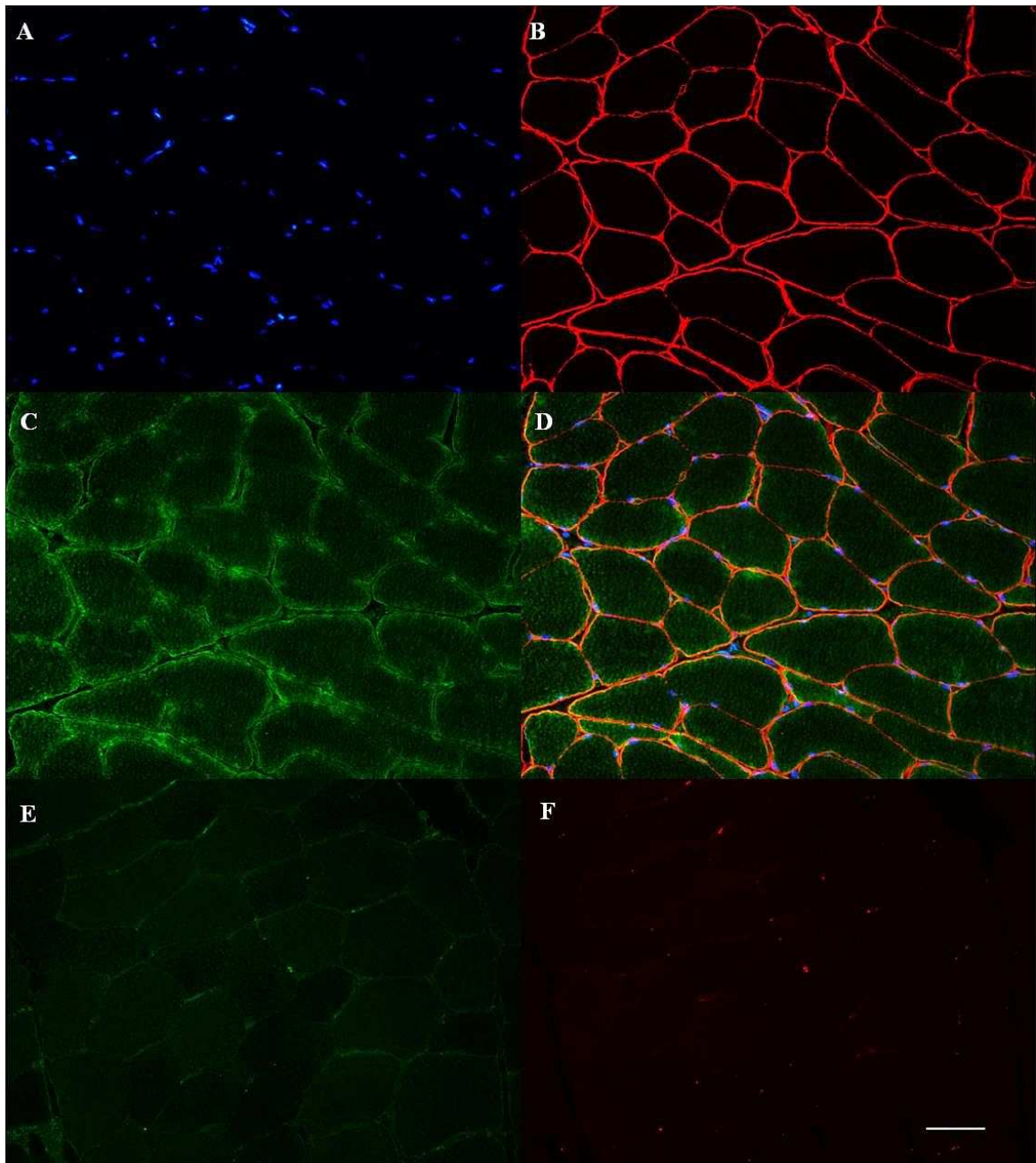
Kuva 8. IGF-1:n ja MHCI:n lokalisoituminen. Vasta-ainevärykset tehtiin 8 μm :n luustolihasleikkeille. A) Hoechst-väryys (tumat), B) IGF-1, C) MyHCI (myosiinin raskasketju I), D) yhdistetty kuva, jossa näkyy IGF-1:n lokalisoituminen tyypin I lihassoluihin, E) kontrolli, josta on jätetty IGF-1:n primaarivasta-aine pois, F) kontrolli, josta on jätetty MyHCI:n primaarivasta-aine pois. Mittajana on 50 μm , kaikissa kuvissa on sama suurennos.



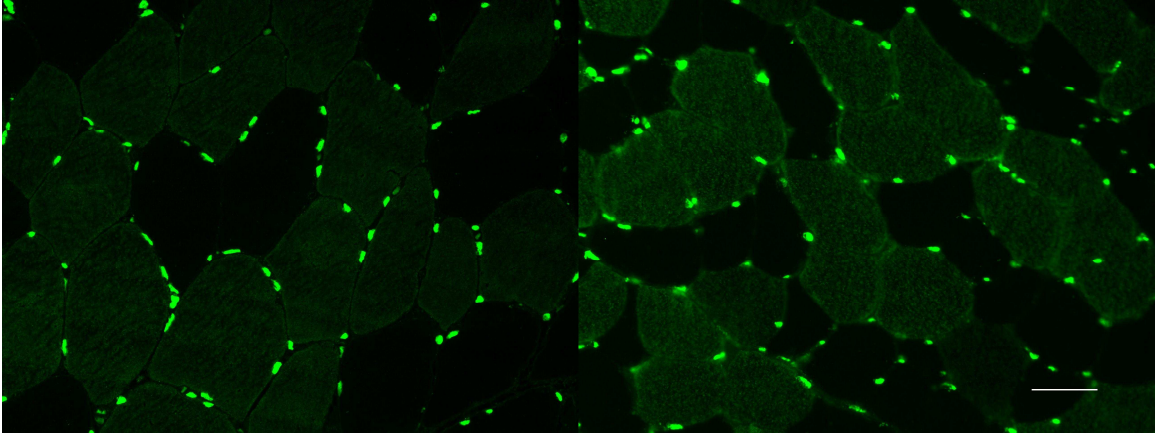
Kuva 9. IGF-1:n ja IGF-1Ea:n lokalisoituminen. Vasta-ainevärjykset tehtiin 8 μm :n luustolihasleikkeille. A) Hoechst-värjäys (tumat), B) IGF-1, C) IGF-1Ea, D) yhdistetty kuva, jossa ei ole havaittavissa IGF-1:n ja IGF-1Ea:n kolokalisaatiota E) kontrolli, josta on jätetty IGF-1:n primaarivasta-aine pois, F) kontrolli, josta on jätetty IGF-1Ea:n primaarivasta-aine pois. Mittajana on 50 μm , kaikissa kuvissa on sama suurennos.



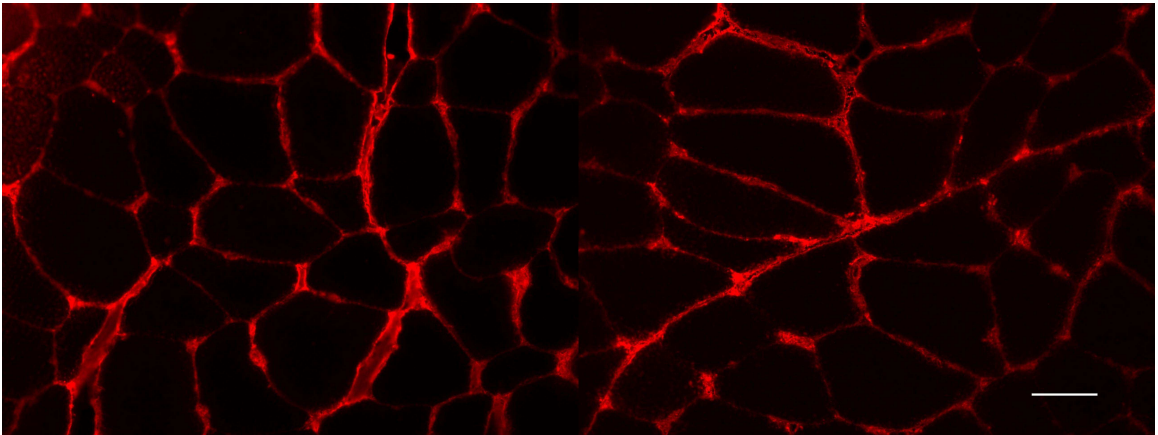
Kuva 10. IGF-1Ea:n ja IGF-1-reseptorin lokalisoituminen. Vasta-ainevärjäykset tehtiin 8 μm :n luustolihasleikkeille. A) Hoechst-värjäys (tumat), B) IGF-1Ea, C) IGF-1-reseptori, D) yhdistetty kuva, jossa havaittavissa IGF-1Ea:n ja IGF-1-reseptorin kolokalisaatiota solukalvon läheisyyteen E) kontrolli, josta on jätetty IGF-1-reseptorin primaarivasta-aine pois, F) kontrolli, josta on jätetty IGF-1Ea:n primaarivasta-aine pois. Mittajana on 50 μm , kaikissa kuvissa on sama suurennos.



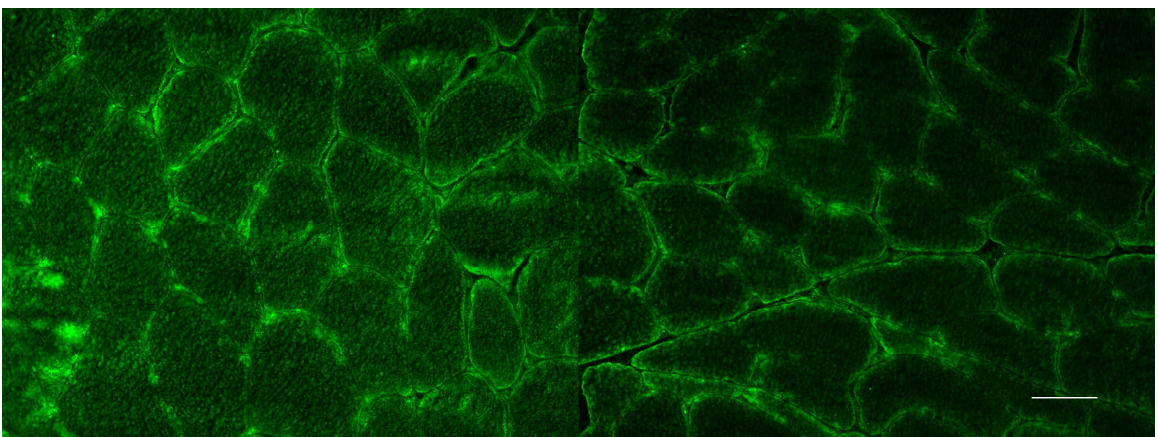
Kuva 11. MGF:n lokalisoituminen. Vasta-ainevärjäykset tehtiin 8 μm :n luustolihasleikkeille. A) Hoechst-värjäys (tumat), B) laminiini (tyvikalvo), C) MGF, D) yhdistetty kuva, jossa havaittavissa MGF:n lokalisoituminen solukalvon läheisyyteen, E) kontrolli, josta on jätetty MGF:n primaarivasta-aine pois, F) kontrolli, josta on jätetty laminiinin primaarivasta-aine pois. Mittajana on 50 μm , kaikissa kuvissa on sama suurennos.



Kuva 12. Hormonikorvaushoidon vaikutus IGF-1:n lokalisoitumiseen. Vasemmalla on kuva hormonikorvaushoidon käyttäjän ja oikealla ei-käyttäjän luustolihasesta. Hormonikorvaushoidolla ei ollut vaikutusta IGF-1:n lokalisoitumiseen. Mittajana on 50 μm .



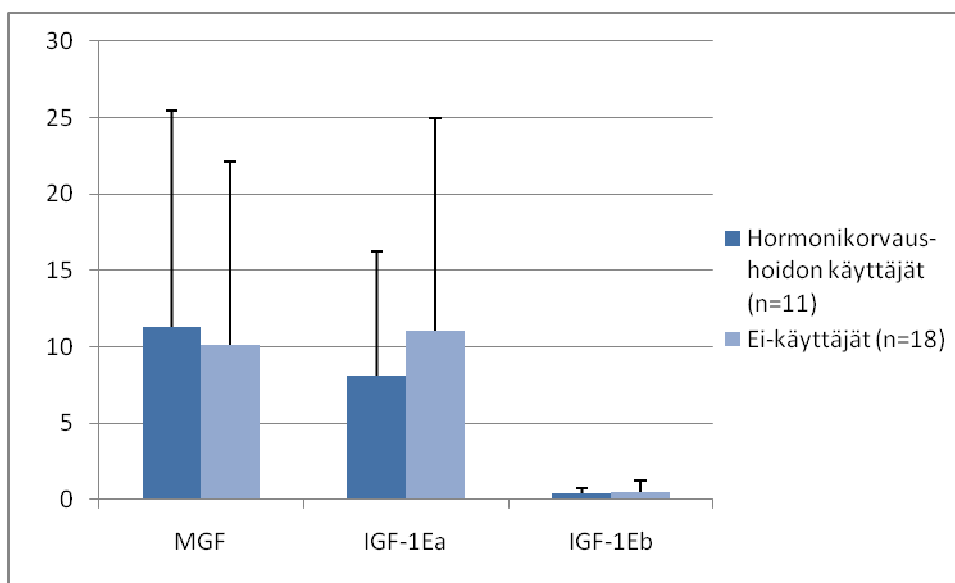
Kuva 13. Hormonikorvaushoidon vaikutus IGF-1Ea:n lokalisoitumiseen. Vasemmalla on kuva hormonikorvaushoidon käyttäjän ja oikealla ei-käyttäjän luustolihasesta. Hormonikorvaushoidolla ei ollut vaikutusta IGF-1Ea:n lokalisoitumiseen. Mittajana on 50 μm .



Kuva 14. Hormonikorvaushoidon vaikutus MGF:n lokalisoitumiseen. Vasemmalla on kuva hormonikorvaushoidon käyttäjän ja oikealla ei-käyttäjän luustolihasesta. Hormonikorvaushoidolla ei ollut vaikutusta MGF:n lokalisoitumiseen. Mittajana on 50 μm .

4.5.IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentyminen

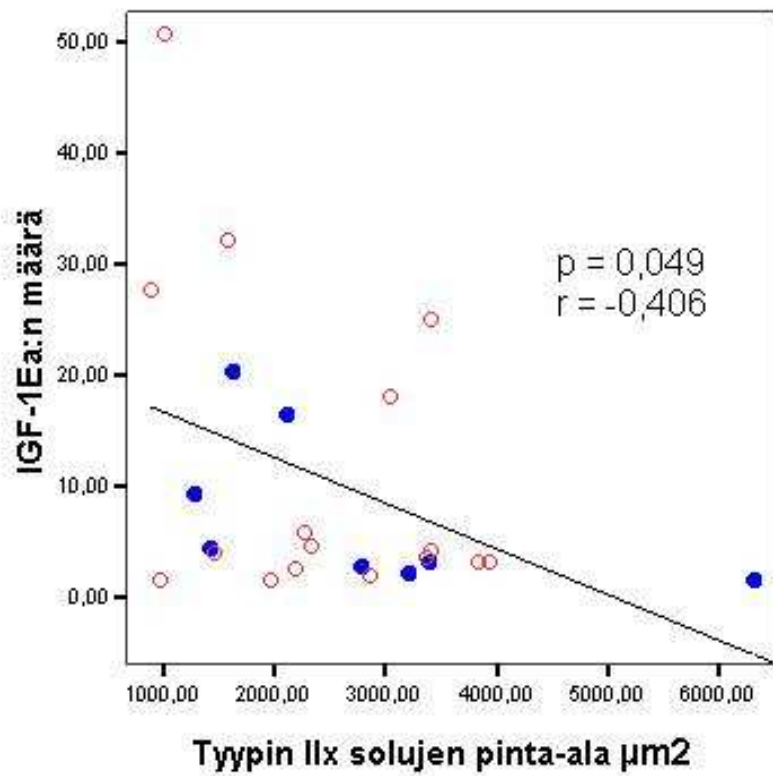
IGF-1:n silmukointivarianteista IGF-1Eb:n lähetti-RNA-tasot olivat matalimmat, kun taas IGF-1Ea:n ja MGF:n lähetti-RNA-tasot olivat miltei yhtä suuret. Hormonikorvaushoidon käyttäjillä oli MGF:n ilmentyminen hieman suurempaa kuin ei-käyttäjillä, kun taas IGF-1Ea:n ja IGF-1Eb:n ilmentyminen oli hieman heikompaa kuin ei-käyttäjillä (kuva 15). Suurin ero ryhmien välillä oli IGF-1Ea:n ilmentymisessä. Erot eivät kuitenkaan olleet merkitseviä ($p > 0,05$). Ryhmien sisällä hajonta oli erittäin suurta.



Kuva 15. IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentyminen. Kuvassa on esitetty IGF-1:n silmukointivarianttien lähetti-RNA-tasot (keskiarvot). Mittajanat esittävät keskihajontaa. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja ($p > 0,05$). Tulokset on esitetty yksiköttömällä asteikolla (*engl.arbitrary units*).

4.6. IGF-1:n yhteys lihassolutyypin ilmentymiseen

Silmukointivarianttien yhteyttä lihassolutyypijakaumaan ja lihassolujen kokoon tutkittiin Pearsonin korrelaatioanalyysillä. Merkitsevä korrelaatio ($p < 0,05$) havaittiin IGF-1Ea:n lähetti-RNA-tason ja tyypin Iix lihassolujen poikkileikkauspinta-alan välillä. IGF-1Ea:n määrän vähentyessä tyypin Iix lihassolujen koko kasvaa (kuva 16).



Kuva 16. IGF-1Ea:n ja tyypin IIx solujen pinta-alan välinen korrelaatio. Siniset symbolit ovat hormonikorvaushoidon käyttäjiä (n = 8) ja punaiset ei-käyttäjiä (n = 16). IGF-1Ea:n lähetti-RNA-tason pienentyessä tyypin IIx lihassolujen poikkileikkauspinta-ala kasvaa.

5. Tulosten tarkastelu

Tämän pro gradu -tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää hormonikorvaushoidon vaikutusta ikääntyvien naisten luustolihasolujen kokoon, lihassolutyypijakaumaan ja IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen, sekä tutkia näiden yhteyttä toisiinsa. Tarkoituksena oli myös selvittää IGF-1:n silmukointivarianttien lokalisaatio luustolihasoluissa ja hormonikorvaushoidon vaikutus lokalisaatioon. Saamiemme tulosten mukaan hormonikorvaushoidolla ei ollut merkittävää vaikutusta lihassolujen kokoon, lihassolutyypijakaumaan eikä IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen. Tuloksia kokonaisuutena tarkasteltaessa vaikuttaa kuitenkin siltä, että hormonikorvaushoito suosii tyypin II lihassoluja, joiden koko ja suhteellinen osuus oli hiukan suurempi hormonikorvaushoitoa käyttäneillä.

Tutkiessamme IGF-1:n lokalisaatiota lihaskudoksessa, havaitsimme yllättäen IGF-1:n (mahdollisesti IGF-1Eb) lokalisoituvan lihassolujen (ja mahdollisesti satelliittisolujen) tumiin. Koska aikaisempia tutkimuksia IGF-1:n lokalisoitumisesta lihaskudoksessa ei ole, tämä havainto on tärkeä ja saattaa auttaa meitä muodostamaan kokonaiskuvan eri IGF-1:n silmukointivarianttien toiminnasta lihaksessa.

5.1. Hormonikorvaushoidon vaikutus luustolihasolutyyppeihin

Estrogeeniä sisältävän hormonikorvaushoidon vaikutuksia ihmisen luustolihasolujen lihassolutyypijakaumaan ja lihassolujen kokoon ei ole aikaisemmin tutkittu. Tämän tutkimuksen hormonikorvaushoitoa käyttävillä koehenkilöillä ei ollut merkitseviä eroja lihassolutyypien koossa tai suhteellisissa osuuksissa verrattaessa ei-käyttäjiin. Vaikka mikään ero ei ollut merkitsevä, kokonaisuutta tarkasteltaessa hormonikorvaushoitoa käyttävillä koehenkilöillä tyypin II lihassoluja oli hieman enemmän ja ne olivat hieman suurempia. Juuri tyypin II lihassolut ovat herkkiä ikääntymisen vaikutuksille (ks. yleiskatsaus Andersen, 2003a) ja saattaa olla, että hormonikorvaushoito hidastaa näitä ikääntymiseen liittyviä muutoksia.

Vaikka aikaisempia tutkimuksia hormonikorvaushoidon vaikutuksista ihmisen lihassolutyyppeihin ei ole, on olemassa koe-eläintutkimuksia, joissa on tutkittu estrogeenin

vaikutusta lihassolutyyppeihin. Rotilla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että munasarjojen poisto saa aikaan MyHC I -isoformin suhteellisen osuuden kasvun ja estrogeenihoito ehkäisee tätä muutosta (Kadi ym., 2002). Toisessa rotilla tehdyssä tutkimuksessa munasarjojen poisto sai aikaan MyHC IIX -isoformin suhteellisen osuuden pienenemisen, minkä estrogeenihoito kumosi (Piccone ym., 2005). Näiden koe-eläintutkimuksista saatujen havaintojen perusteella voisi arvella, että hormonikorvaushoito ehkäisisi normaaliin ikääntymiseen liittyvää tyypin I lihassolujen suhteellisen osuuden kasvua ihmisellä. Vaikka tästä pro gradu -tutkimuksesta saadut tulokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, ne ovat samansuuntaisia Kadin ym. (2002) ja Picconen ym. (2005) raportoimien koe-eläimillä saatujen tutkimustulosten kanssa. Hormonikorvaushoidon käyttäjillä oli hieman pienempi tyypin I lihassolujen osuus ja hieman enemmän tyypin II lihassoluja. Aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu räjähtävän ja maksimaalisen lihasvoiman paraneminen hormonikorvaushoitoa käyttävillä naisilla (Phillips ym., 1993; Skelton ym., 1999; Sipila ym., 2001; Taaffe ym., 2005; Ronkainen ym., 2009a) saattaa osittain johtua tyypin II lihassolujen suuremmasta osuudesta. Tätä hypoteesia tukee myös Skeltonin ym. (1999) tekemä tutkimus, jossa hormonikorvaushoitoa käyttävillä vaihdevuosi-ikä ylittäneillä naisilla lihaksen maksimaalinen voima parani, vaikka lihaksen poikkileikkauspinta-alassa ei tapahtunut merkittävää muutosta.

Tutkimuksessamme hormonikorvaushoidon käyttäjillä oli myös hieman suuremmat tyypin II lihassolut. Picconen ym. (2005) koe-eläimillä tehdyssä tutkimuksessa munasarjojen poistolla ei ollut vaikutusta lihassolujen kokoon, mutta estrogeenihoito pienensi tyypin II lihassolujen kokoa. Tutkijat esittivät, että jokin toinen munasarjojen tuottama hormoni estää estrogeenin kasvua ehkäisevän vaikutuksen leikkaamattomilla eläimillä ja että estrogeeni yksinään estää lihassolujen kasvua. Jos nämä epäilykset ovat oikeassa, saattaa olla, että erot koeasetelmassa (jyrsijä versus ihminen, munasarjojen olemassaolo ja hormonikorvaushoidon sisältämä progesteroni) Picconen tekemän tutkimuksen ja tämän tutkimuksen välillä, selittävät osaltaan erilaisia tuloksia lihassolujen koossa.

Aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu hormonikorvaushoidon käyttäjien suurempi lihaksen kokonaispinta-ala (Sipila ym., 2001; Taaffe ym., 2005; Ronkainen ym., 2009a) ei välttämättä johdu kuitenkaan tyypin II lihassolujen suuremmasta koosta, koska

hormonikorvaushoitoa käyttävillä oli samalla ei-käyttäjiin verrattuna pienemmät tyypin I lihassolut, mikä saattaa kumota tyypin II lihasolujen vaikutuksen lihaksen kokoon. Voi olla, että suurempi lihaksen pinta-ala johtuu lihassolujen suuremmasta määrästä. Koska aikaisempia tutkimuksia hormonikorvaushoidon vaikutuksista lihassolujen kokoon ei ole olemassa, tarvitaan lisää hyvin kontrolloituja tutkimuksia ennen kuin pystytään tekemään varmempia johtopäätöksiä.

5.2. IGF-1:n silmukointivarianttien lokalisoituminen luustolihasoluissa

IGF-1 on eritettävä proteiini, joka perinteisesti vaikuttaa solukalvoreseptorin kautta, joten oletimme IGF-1 silmukointivarianttien lokalisoituvan solukalvon läheisyyteen. Aikaisempia tutkimuksia IGF-1:n lokalisoitumisesta luustolihasoluissa ei juurikaan ole tehty. Hieman yllättävää oli, että käyttämämme IGF-1-vasta-aine, joka valmistajan mukaan tunnistaa kaikki silmukointivariantit, lokalisoitui vain lihassolujen tumiin, eikä solukalvolle tai soluvälitilaan, joihin MGF:n ja IGF-1Ea:n tunnistavat vasta-aineet lokalisoituivat. Valmistajan mukaan IGF-1-vasta-aine sitoutuu eksoneiden 3 ja 4 koodittamaan peptidiketjuun, joka on kaikissa silmukointivarianteissa samanlainen. Tämän vuoksi sen pitäisi kolokalisoitua MGF:n ja IGF-1Ea:n kanssa. Myös eräässä toisessa tutkimuksessa IGF-1 kolokalisoitui tumaväriin kanssa, mutta koska lokalisaation tutkiminen ei ollut kyseisen tutkimuksen tavoite, tutkijat eivät kommentoineet tumalokalisoitumista lainkaan (McKay ym., 2008). McKay'n ym (2008) tutkimuksessa ei myöskään selvitetty IGF-1-värjäytymistä koko lihaskudoksessa vaan vain satelliittisolujen värjäytymistä.

Tästä pro gradu -tutkimuksesta saatujen tulosten perusteella voisi päätellä, että jokin IGF-1:n varianttimuoto vaikuttaa tumareseptorin kautta. Tanin ym. (2002) tutkimuksessa onkin havaittu IGF-1-geenissä olevan tumalokalisatiosignaali eksonin 5 karboksiterminaalissa. Eksonissa 1 oleva, erityisreitille ohjaava signaali kuitenkin kumoaa tumalokalisatiosignaalin. Tällöin vain IGF-1:n esiasteet, jotka eivät sisällä eksonissa 1 sijaitsevaa erityssignaali-peptidiä ohjataan tumaan (Tan ym., 2002). IGF-1:n silmukointivarianteista ainoastaan IGF-1Eb sisältää eksonin 5 karboksiterminaalipään (ks.

yleiskatsaus Goldspink, 2005), ja juuri tämän variantin spesifistä lokalisaatiota emme tutkineet, koska sille ei ole saatavissa kaupallista vasta-ainetta. Saattaa kuitenkin olla, että IGF-1-vasta-aineella aikaansaatu tumavärjäytyminen johtuu juuri IGF-1Eb:n lokalisoitumisesta tumaan. Tutkimuksessamme IGF-1-vasta-aine ei kuitenkaan lokalisoitunut lihassolujen tyvikalvon ulkopuolella sijaitseviin tumiin. Tästä voisi päätellä, että vain myogeeniset solut ts. lihassolut ja mahdollisesti satelliittisolut tuottavat tumaan lokalisoituvaa (autokriinista) IGF-1Eb:tä lihaskudoksessa. IGF-1Eb:n toimintaa ei vielä tunneta, mutta voi olla, että IGF-1Eb:llä on tärkeä rooli lihassolujen geenien ilmentymisen säätelyssä.

Tumien lisäksi IGF-1 lokalisoitui tyypin I lihassoluihin. Tutkimuksessamme tyypin I lihassolut olivat poikkileikkauspinta-alaltaan suurempia kuin tyypin II lihassolut. Tyypin I lihassolujen on havaittu olevan suurimpia myös nuorilla naisilla (Staron ym., 2000). Saattaa olla, että suurempi IGF-1:n ilmentyminen on yksi tyypin I lihassolujen suurempaan kokoon vaikuttavista tekijöistä. Staronen ym. (2002) tutkimuksessa tyypin Ia lihasolut olivat suurimpia miehillä ja olisikin mielenkiintoista tutkia lokalisoituuko IGF-1 eri tavalla miesten lihaskudoksessa.

Verrattuna MGF:n lokalisoitumiseen IGF-1Ea lokalisoitui kauttaaltaan soluvälitilaan. Tämä saattaa johtua siitä, että IGF-1Ea on systeeminen IGF-1, jota maksan solujen lisäksi tuottavat myös monet muut solut kuten lihassolujen välissä sijaitsevat fibroblastit. MGF:ää ilmentävät luultavasti vain tietyt mekaaniseen stimulaatioon reagoivat solut kuten lihassolut (Cheema ym., 2005) ja osteoblastit (Tang ym., 2006). Cheeman ym. (2005) tutkimuksessa lihassoluviljelmille aiheutettiin keinotekoista mekaanista rasitusta, jolloin MGF:n transkriptitaso nousi. Osteoblastien on myös havaittu ilmentävän MGF:ää keinotekoisien mekaanisen ärsytyksen vaikutuksesta *in vitro* -tutkimuksissa (Tang ym., 2006).

Tutkimuksessamme emme havainneet eroja hormonikorvaushoidon käyttäjien ja ei-käyttäjien välillä silmukointivarianttien lokalisoitumisessa.

5.3. Hormonikorvaushoidon vaikutus luustolihasen IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen

Aikaisemmissa tutkimuksissa hormonikorvaushoidolla ei ole ollut vaikutusta tai se on vaikuttanut vähentävästi seerumin IGF-1-tasoihin (de Kraker ym., 2009; Nar ym., 2009). Aikaisempia tutkimuksia hormonikorvaushoidon vaikutuksista lihaksen IGF-1:n transkripti- tai proteiinitasoihin ei ole olemassa. Tästä tutkimuksesta saadut tulokset viittaavat siihen, että hormonikorvaushoidolla ei ole merkittävää vaikutusta lihaksen IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymiseen lähetti-RNA-tasolla. Hormonikorvaushoidon käyttäjillä lihaksen MGF:n ilmentyminen oli hiukan suurempaa kuin ei-käyttäjillä, ja IGF-1Ea:n ja IGF-1Eb:n hiukan pienempää. Erot ryhmien välillä eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä. MGF:n osalta tulokset ovat samansuuntaisia kuin ryhmämme kahdessa muussa tutkimuksessa, joissa MGF:n ilmentyminen oli suurempaa hormonikorvaushoitoa käyttäneillä. Toinen näistä tutkimuksista on tehty satunnaistetun, lumekontrolloidun hormonikorvaushoito-liikuntainterventiotutkimuksen aineistolla, jonka 10-vuotisseuranta-aineisto on tämän pro gradu -työn aineistona. Alkuperäisessä interventiossa havaittiin MGF:n ilmentymisen olevan voimakkaampaa vuoden mittaisen hormonikorvaushoidon jälkeen verrattuna hormoneja käyttämättömiin vaihdevuosi-ikäisiin naisiin (Pöllänen ym., 2010, painossa). Toisessa tutkimuksista (Ahtiainen ym., käsikirjoitus) käytettiin monotsygoottisia kaksospareja (tutkittavat kuvailtu artikkelissa Ronkainen ym., 2009a), jolloin geneettisen variaation vaikutus on minimoitu. Myös tässä kaksostutkimuksessa MGF:n ilmentyminen oli voimakkaampaa hormonikorvaushoitoa käyttäneillä naisilla.

Tutkimuksissamme havaittu MGF:n suurempi ilmentyminen saattaa johtua siitä, että hormonikorvaushoito säilyttää lihassolujen rakenteen paremmin, jolloin MGF:n ilmentymiseen johtava, solukalvon dystroglykaanikompleksin kautta kulkeva, mekaaninen säätelysystemi (De Bari ym., 2003) toimii paremmin. Useissa tutkimuksissa on havaittu estrogeenin ehkäisevän oksidatiivisia vaurioita soluissa sekä vakauttavan solukalvoa (Enns ja Tiidus, 2010). Rotilla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että estrogeeni lisää akuutin liikunnan jälkeistä satelliittisolujen aktivoitumista ja jakautumista, mutta taustalla olevaa tarkkaa mekanismia ei vielä tunneta (Enns ym., 2008; Enns ja Tiidus, 2008). Saattaa olla,

että estrogeeni auttaa suojaamaan lihassolun rakennetta myös liikunnan aikana, jolloin MGF:n ilmentymiseen johtava mekaaninen säätelysystemi toimii tehokkaammin, ja tehostunut MGF:n tuotanto johtaa tehokkaampaan satelliittisolujen aktivoitumiseen.

5.4. IGF-1:n yhteys luustolihaslutyyppeihin

IGF-1 on tärkeä lihaksen kasvua säätelevä tekijä, minkä vuoksi voisi olettaa kasvun IGF-1:n ilmentymisessä korreloivan lihassolujen poikkileikkauspinta-alan kasvun kanssa. Liikunnan onkin havaittu lisäävän IGF-1Ea:n ja MGF:n ilmentymistä samanaikaisesti lihassolujen poikkileikkauspinta-alan kanssa (Suetta ym., 2009). Tässä pro gradu - tutkimuksessa havaittu ainoa merkitsevä korrelaatio oli negatiivinen korrelaatio IGF-1Ea:n ja tyypin Ix lihassolujen poikkileikkauspinta-alan välillä. Tässä tutkimuksessa havaittu tyypin II lihassolujen hieman suurempi koko hormonikorvaushoitoa käyttävillä ei siis välttämättä ole IGF-1-välitteistä vaan estrogeenillä saattaa olla siihen suurempi vaikutus. On kuitenkin vaikeaa arvioida IGF-1:n todellista vaikutusta lihaslutyyppeiden kokoon ja lihaslutyypijakaumaan, koska luultavasti IGF-1-taso nousee stimulaation (esim. liikunnan (McKay ym., 2008)) vaikutuksesta vain hetkellisesti korkeammaksi vaikutuksen lihassolujen kokoon ja lihaslutyypijakaumaan ollessa pidempiaikaisempi. Tämän tutkimuksen koehenkilöt eivät olleet harrastaneet raskasta liikuntaa lihasbiopsian ottoa edeltävinä päivinä, joten tutkimustulokset kuvaavat vain lepotason IGF-1:n ilmentymisen yhteyttä lihaslutyyppeiden kokoon ja lihaslutyypijakaumaan. Vaikkeivat tutkittavat raportoineet toisistaan poikkeavia liikuntatottumuksia, saattaa olla, että hormonikorvaushoitoa käyttävien vaste IGF-1 ilmentymistä aiheuttaville tekijöille (kuten liikunnalle) on voimakkaampi. Tällöin ryhmien väliset vähäiset erot lihassolujen koossa ja lihaslutyypijakaumassa voisivat selittyä joltain osin erilaisista vasteista IGF-1:n ilmentymistä aiheuttaville tekijöille.

Lihasslutyypijakaumaan IGF-1:n silmukointivarianttien ilmentymisellä ei ollut vaikutusta.

5.5. Tämän tutkimuksen rajoitteet ja tulevaisuuden tavoitteet

Vaikka tässä tutkimuksessa hormonikorvaushoitoa käyttäneiden koehenkilöiden fenotyyppi ei eroa merkitsevästi ei-käyttäjien fenotyypistä, ovat pienet erot fenotyypeissä kokonaisuudessaan loogisia ja samansuuntaisia muiden tutkimusten kanssa. Saattaa olla, että ryhmien väliset erot eivät nousseet merkitseviksi, koska ulkopuoliset tekijät vaikuttivat liian vahvasti tuloksiin. Tämän tutkimuksen ongelmana olivat hormonikorvaushoitoon liittyvät tekijät, joita emme pystyneet kontrolloimaan. Suurin osa hormonikorvaushoidon käyttäjistä oli käyttänyt hormonikorvaushoitoa korkeintaan yhden vuoden ja heidän hormonin käyttöajastaan oli kulunut kymmenen vuotta. Vain viisi henkilöä käytti hormonikorvaushoitoa mittaushetkellä. Nämä hormonin käyttöaikaan liittyvät tekijät saattoivat pienentää ryhmien (ei-käyttäjät, käyttäjät) välisiä eroja. Myös erot käytetyn hormonivalmisteen vaikuttavissa aineissa, pitoisuuksissa ja annostelutavoissa saattoivat suurentaa hajontaa. Koska tutkimuksemme oli poikkileikkaustutkimus, myös geneettinen variaatio suurensi hajontaa, jolloin ryhmien väliset erot eivät nousseet merkitseviksi. Tulevaisuudessa on tavoitteena kontrolloida näitä tekijöitä paremmin toisenlaisten koeasetelmien avulla. Tulevaisuudessa tutkimuksemme keskittyikin pitkittäis- ja kaksostutkimuksiin, jolloin geneettisen variaation vaikutus pystytään minimoimaan.

6. Lähteet

- Alnaqeeb, M.A., N.S. Al Zaid, and G. Goldspink. 1984. Connective tissue changes and physical properties of developing and ageing skeletal muscle. *J.Anat.* 139 (Pt 4):677-689.
- Andersen, J.L. 2003a. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand.J.Med.Sci.Sports.* 13:40-47.
- Andersen, J.L. 2003b. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand.J.Med.Sci.Sports.* 13:40-47.
- Balagopal, P., J.C. Schimke, P. Ades, D. Adey, and K.S. Nair. 2001. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 280:E203-8.
- Barazzoni, R., K.R. Short, and K.S. Nair. 2000. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *J.Biol.Chem.* 275:3343-3347.
- Barros, R.P., U.F. Machado, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2006. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:1605-1608.
- Barton-Davis, E.R., D.I. Shoturma, and H.L. Sweeney. 1999. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol.Scand.* 167:301-305.
- Bigot, A., V. Jacquemin, F. Debacq-Chainiaux, G.S. Butler-Browne, O. Toussaint, D. Furling, and V. Mouly. 2008. Replicative aging down-regulates the myogenic regulatory factors in human myoblasts. *Biol.Cell.* 100:189-199.
- Boland, R., A. Vasconsuelo, L. Milanesi, A.C. Ronda, and A.R. de Boland. 2008. 17beta-Estradiol Signaling in Skeletal Muscle Cells and its Relationship to Apoptosis. *Steroids.* 73:859-863.
- Boonyaratanakornkit, V., Y. Bi, M. Rudd, and D.P. Edwards. 2008. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids.* 73:922-928.
- Calmels, P., L. Vico, C. Alexandre, and P. Minaire. 1995. Cross-sectional study of muscle strength and bone mineral density in a population of 106 women between the ages of 44 and 87 years: relationship with age and menopause. *Eur.J.Appl.Physiol.Occup.Physiol.* 70:180-186.
- Cheema, U., R. Brown, V. Mudera, S.Y. Yang, G. McGrouther, and G. Goldspink. 2005. Mechanical signals and IGF-I gene splicing in vitro in relation to development of skeletal muscle. *J.Cell.Physiol.* 202:67-75.
- Coolican, S.A., D.S. Samuel, D.Z. Ewton, F.J. McWade, and J.R. Florini. 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 272:6653-6662.
- Coombs, N.J., R. Taylor, N. Wilcken, and J. Boyages. 2005. Hormone replacement therapy and breast cancer: estimate of risk. *BMJ.* 331:347-349.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, F. Vandenabeele, J.R. Vermeesch, J.M. Raymackers, and F.P. Luyten. 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J.Cell Biol.* 160:909-918.
- de Kraker, A.T., P. Kenemans, R.G. Smolders, M.V. Kroeks, and M.J. van der Mooren. 2009. Short-term effects of two continuous combined oestrogen-progestogen therapies on several cardiovascular risk markers in healthy postmenopausal women: a randomised controlled trial. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 142:139-144.

- D'Eon, T.M., C. Sharoff, S.R. Chipkin, D. Grow, B.C. Ruby, and B. Braun. 2002. Regulation of exercise carbohydrate metabolism by estrogen and progesterone in women. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 283:E1046-55.
- Emons, G., A. Huschmand-Nia, T. Krauss, and B. Hinney. 2004. Hormone replacement therapy and endometrial cancer. *Onkologie.* 27:207-210.
- Enns, D.L., S. Iqbal, and P.M. Tiidus. 2008. Oestrogen receptors mediate oestrogen-induced increases in post-exercise rat skeletal muscle satellite cells. *Acta Physiol.(Oxf).* 194:81-93.
- Enns, D.L., and P.M. Tiidus. 2010. The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med.* 40:41-58.
- Enns, D.L., and P.M. Tiidus. 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J.Appl.Physiol.* 104:347-353.
- Gambacciani, M., and F. Vacca. 2004. Postmenopausal osteoporosis and hormone replacement therapy. *Minerva Med.* 95:507-520.
- Giangrande, P.H., and D.P. McDonnell. 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog.Horm.Res.* 54:291-313; discussion 313-4.
- Goldspink, G. 2005. Impairment of IGF-I gene splicing and MGF expression associated with muscle wasting. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 37:2012-2022.
- Gras, F., B. Brunmair, L. Quarre, Z. Szocs, W. Waldhausl, and C. Fornsinn. 2007. Progesterone impairs cell respiration and suppresses a compensatory increase in glucose transport in isolated rat skeletal muscle: a non-genomic mechanism contributing to metabolic adaptation to late pregnancy? *Diabetologia.* 50:2544-2552.
- Gruber, C.J., W. Tschugguel, C. Schneeberger, and J.C. Huber. 2002. Production and actions of estrogens. *N.Engl.J.Med.* 346:340-352.
- Hameed, M., R.W. Orrell, M. Cobbold, G. Goldspink, and S.D. Harridge. 2003. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *J.Physiol.* 547:247-254.
- Hill, M., and G. Goldspink. 2003. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J.Physiol.* 549:409-418.
- Hsu, H.H., M.M. Zdanowicz, V.R. Agarwal, and P.W. Speiser. 1997. Expression of myogenic regulatory factors in normal and dystrophic mice: effects of IGF-1 treatment. *Biochem.Mol.Med.* 60:142-148.
- Kadi, F., N. Charifi, C. Denis, and J. Lexell. 2004. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve.* 29:120-127.
- Kadi, F., C. Karlsson, B. Larsson, J. Eriksson, M. Larval, H. Billig, and I.H. Jonsdottir. 2002. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *J.Muscle Res.Cell.Motil.* 23:335-339.
- Kahlert, S., C. Grohe, R.H. Karas, K. Lobbert, L. Neyses, and H. Vetter. 1997. Effects of estrogen on skeletal myoblast growth. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 232:373-378.
- Kenny, A.M., L. Dawson, A. Kleppinger, M. Iannuzzi-Sucich, and J.O. Judge. 2003. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in nonobese women who are long-term users of estrogen-replacement therapy. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 58:M436-40.

- Larionov, A.A., D.A. Vasylyev, J.I. Mason, A.F. Howie, L.M. Berstein, and W.R. Miller. 2003. Aromatase in skeletal muscle. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 84:485-492.
- Lee, C.E., A. McArdle, and R.D. Griffiths. 2007. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin.Nutr.* 26:524-534.
- Leivo, I., and E. Engvall. 1988. Merosin, a protein specific for basement membranes of Schwann cells, striated muscle, and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:1544-1548.
- Lexell, J. 1995. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 50 Spec No:11-16.
- Li, L., M.P. Haynes, and J.R. Bender. 2003. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:4807-4812.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-408.
- Mandelson, M.T., D. Miglioretti, P.A. Newcomb, R. Harrison, and J.D. Potter. 2003. Hormone replacement therapy in relation to survival in women diagnosed with colon cancer. *Cancer Causes Control.* 14:979-984.
- McDonnell, D.P. 2004. The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology. *Maturitas.* 48 Suppl 1:S7-12.
- McKay, B.R., C.E. O'Reilly, S.M. Phillips, M.A. Tarnopolsky, and G. Parise. 2008. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J.Physiol.* 586:5549-5560.
- McKoy, G., W. Ashley, J. Mander, S.Y. Yang, N. Williams, B. Russell, and G. Goldspink. 1999. Expression of insulin growth factor-1 splice variants and structural genes in rabbit skeletal muscle induced by stretch and stimulation. *J.Physiol.* 516 (Pt 2):583-592.
- Morgan, J.E., and T.A. Partridge. 2003. Muscle satellite cells. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 35:1151-1156.
- Nar, A., E. Demirtas, A. Ayhan, and A. Gurlek. 2009. Effects of bilateral ovariectomy and estrogen replacement therapy on serum leptin, sex hormone binding globulin and insulin like growth factor-I levels. *Gynecol.Endocrinol.* 25:773-778.
- Newton, C.J., R. Buric, T. Trapp, S. Brockmeier, U. Pagotto, and G.K. Stalla. 1994. The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 48:481-486.
- Paech, K., P. Webb, G.G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P.J. Kushner, and T.S. Scanlan. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 277:1508-1510.
- Pavelic, J., T. Matijevic, and J. Knezevic. 2007. Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family. *Indian J.Med.Res.* 125:511-522.
- Philippou, A., A. Halapas, M. Maridaki, and M. Koutsilieris. 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J.Musculoskelet.Neuronal Interact.* 7:208-218.
- Philippou, A., A. Stavropoulou, A. Sourla, N. Pissimissis, A. Halapas, M. Maridaki, and M. Koutsilieris. 2008. Characterization of a rabbit antihuman mechano growth factor (MGF) polyclonal antibody against the last 24 amino acids of the E domain. *In Vivo.* 22:27-35.

- Phillips, S.K., K.M. Rook, N.C. Siddle, S.A. Bruce, and R.C. Woledge. 1993. Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin.Sci.(Lond)*. 84:95-98.
- Piccone, C.M., G.A. Brazeau, and K.M. McCormick. 2005. Effect of oestrogen on myofibre size and myosin expression in growing rats. *Exp.Physiol*. 90:87-93.
- Pollanen, E., P.H. Ronkainen, H. Suominen, T. Takala, S. Koskinen, J. Puolakka, S. Sipila, and V. Kovanen. 2007. Muscular transcriptome in postmenopausal women with or without hormone replacement. *Rejuvenation Res*. 10:485-500.
- Rajpathak, S.N., M.J. Gunter, J. Wylie-Rosett, G.Y. Ho, R.C. Kaplan, R. Muzumdar, T.E. Rohan, and H.D. Strickler. 2009. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.Res.Rev*. 25:3-12.
- Raue, U., D. Slivka, B. Jemiolo, C. Hollon, and S. Trappe. 2006. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J.Appl.Physiol*. 101:53-59.
- Renault, V., L.E. Thornell, P.O. Eriksson, G. Butler-Browne, and V. Mouly. 2002. Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell*. 1:132-139.
- Ribom, E.L., K. Piehl-Aulin, S. Ljunghall, O. Ljunggren, and T. Naessen. 2002. Six months of hormone replacement therapy does not influence muscle strength in postmenopausal women. *Maturitas*. 42:225-231.
- Rogers, N.H., C.A. Witzak, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, and A.S. Greenberg. 2009. Estradiol stimulates Akt, AMP-activated protein kinase (AMPK) and TBC1D1/4, but not glucose uptake in rat soleus. *Biochem.Biophys.Res.Communic*. 382:646-650.
- Rommel, C., S.C. Bodine, B.A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat.Cell Biol*. 3:1009-1013.
- Ronda, A.C., C. Buitrago, A. Colicheo, A.R. de Boland, E. Roldan, and R. Boland. 2007. Activation of MAPKs by 1 α ,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ and 17 β -estradiol in skeletal muscle cells leads to phosphorylation of Elk-1 and CREB transcription factors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol*. 103:462-466.
- Ronkainen, P.H., V. Kovanen, M. Alen, E. Pollanen, E.M. Palonen, C. Ankarberg-Lindgren, E. Hamalainen, U. Turpeinen, U.M. Kujala, J. Puolakka, J. Kaprio, and S. Sipila. 2009. Postmenopausal hormone replacement therapy modifies skeletal muscle composition and function: a study with monozygotic twin pairs. *J.Appl.Physiol*. 107:25-33.
- Rooyackers, O.E., D.B. Adey, P.A. Ades, and K.S. Nair. 1996. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 93:15364-15369.
- Samson, M.M., I.B. Meeuwssen, A. Crowe, J.A. Dessens, S.A. Duursma, and H.J. Verhaar. 2000. Relationships between physical performance measures, age, height and body weight in healthy adults. *Age Ageing*. 29:235-242.
- Schneider, B.S., J.P. Fine, T. Nadolski, and P.M. Tiidus. 2004. The effects of estradiol and progesterone on plantarflexor muscle fatigue in ovariectomized mice. *Biol.Res.Nurs*. 5:265-275.
- Sipila, S., D.R. Taaffe, S. Cheng, J. Puolakka, J. Toivanen, and H. Suominen. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin.Sci.(Lond)*. 101:147-157.
- Skelton, D.A., S.K. Phillips, S.A. Bruce, C.H. Naylor, and R.C. Woledge. 1999. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin.Sci.(Lond)*. 96:357-364.

- Staron, R.S., F.C. Hagerman, R.S. Hikida, T.F. Murray, D.P. Hostler, M.T. Crill, K.E. Ragg, and K. Toma. 2000. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J.Histochem.Cytochem.* 48:623-629.
- Stütt, T.N., D. Drujan, B.A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyva, W.O. Kline, M. Gonzalez, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol.Cell.* 14:395-403.
- Suetta, C., C. Clemmensen, J.L. Andersen, S.P. Magnusson, P. Schjerling, and M. Kjaer. 2009. Coordinated increase in skeletal muscle fiber area and expression of IGF-I with resistance exercise in elderly post-operative patients. *Growth Horm.IGF Res.*
- Sugaya, A., T. Sugiyama, S. Yanase, X.X. Shen, H. Minoura, and N. Toyoda. 2000. Expression of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. *Life Sci.* 66:641-648.
- Taaffe, D.R., S. Sipila, S. Cheng, J. Puolakka, J. Toivanen, and H. Suominen. 2005. The effect of hormone replacement therapy and/or exercise on skeletal muscle attenuation in postmenopausal women: a yearlong intervention. *Clin.Physiol.Funct.Imaging.* 25:297-304.
- Takeda, K., K. Toda, T. Saibara, M. Nakagawa, K. Saika, T. Onishi, T. Sugiura, and Y. Shizuta. 2003. Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J.Endocrinol.* 176:237-246.
- Tan, D.S., A. Cook, and S.L. Chew. 2002. Nucleolar localization of an isoform of the IGF-I precursor. *BMC Cell Biol.* 3:17.
- Tang, L.L., C.Y. Xian, and Y.L. Wang. 2006. The MGF expression of osteoblasts in response to mechanical overload. *Arch.Oral Biol.* 51:1080-1085.
- Tanko, L.B., L. Movsesyan, O.L. Svendsen, and C. Christiansen. 2002. The effect of hormone replacement therapy on appendicular lean tissue mass in early postmenopausal women. *Menopause.* 9:117-121.
- Thomas, G., and M.N. Hall. 1997. TOR signalling and control of cell growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:782-787.
- Thompson, L.V. 2009. Age-related muscle dysfunction. *Exp.Gerontol.* 44:106-111.
- Vasconsuelo, A., L. Milanesi, and R. Boland. 2009. Participation of HSP27 in the antiapoptotic action of 17beta-estradiol in skeletal muscle cells. *Cell Stress Chaperones.*
- Vasconsuelo, A., L. Milanesi, and R. Boland. 2008. 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J.Endocrinol.* 196:385-397.
- Wiik A. 2008. Estrogen receptors in skeletal muscle. expression and activation. Väitöskirja. Karolinska Institutet, Tukholma, Ruotsi.
- Wiik, A., M. Ekman, O. Johansson, E. Jansson, and M. Esbjornsson. 2009. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem.Cell Biol.* 131:181-189.
- Yang, S.Y., and G. Goldspink. 2002. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett.* 522:156-160.

Liite 1. ATPaasi-värjäyksen liuosten valmistus

pH 10,3 ja 9,4 -liuokset:

6,8 g glysiiniä
7,2 g kalsiumkloridia
5,2 g natriumkloridia
900 ml vettä

Liuos jaettiin kahteen osaan ja pH:t säädettiin 0,099 M natriumhydroksidilla.

pH 4,37, 4,55 ja 4,6 -liuokset:

19,5 g natriumasettaattia
11 g kaliumkloridia
1500 ml vettä

Liuos jaettiin kolmeen osaan ja pH säädettiin etikkahapolla.

ATP-liuos:

0,133 g ATP:tä
80 ml pH 10,3 -liuosta

Liuoksen pH säädettiin 9,4:ään 0,5 M vetykloridilla.