

FYYSISEN KUORMITUKSEN VAIKUTUS HARJOITELLEIDEN HIIRTEN
REISILIHAKSEN LYSOSOMAALISTEN HYDROLAASIEIN AKTIIVISUUKSIIN

Kari Hongisto

Solubiologian
pro gradu -työ
Syksy 1981
Jyväskylän yliopisto,
Biologian laitos

SISÄLLYSLUETTELO

1.	JOHDANTO	1
2.	TUTKIMUKSEN TAUSTAA	2
3.	TUTKIMUKSEN TARKOITUS	7
4.	MATERIAALI JA MENETELMÄT	8
	4.1. Koe-eläimet	8
	4.2. Koejärjestely	8
	4.3. Lihasnäytteiden preparointi	10
	4.4. Entsyymiaktiivisuudet ja proteiini- pitoisuus	11
	4.5. Tulosten käsittely	12
5.	TULOKSET	13
	5.1. Submaksimaalisen kuormituksen vaikutus hiiren reisilihaksen happamien hydrolaa- sien aktiivisuuksiin	13
	5.2. Harjoittelukertojen määrän vaikutus hii- ren reisilihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin	15
	5.3. Kuormituksen vaikutus harjoitelleiden hiirten reisilihaksen happamien hydrolaa- sien aktiivisuuksiin	15
6.	POHDINTA	19
7.	TIIVISTELMÄ	23
8.	KIRJALLISUUSVIITTEET	24
	LIITTEET	

1. JOHDANTO

Raajalihassolut soveltuvat hyvin fysiologisiin soluvaurio-
tutkimuksiin in vivo mm. seuraavista syistä johtuen: 1) Nii-
den käyttötiheyttä ja kuormittumista on helppoa kokeellisesti
muunnella, sillä solut voivat lisätä energiankulutustaan yli
satakertaiseksi lepotilaan verrattuna. 2) Täysikasvuudessa
yksilössä lihassolut eivät enää jakaudu, joten solujen adap-
taatiot ovat mm. biokemiallisesti periaatteessa havaittavissa.
3) Lihassolujen fysiologisia adaptoitumisilmiöitä tunnetaan
entuudestaan ja tiedetään, että esim. uuvuttava kuormitus
aiheuttaa koe-eläimissä raajalihassolujen osittaista tai täy-
dellistä nekroosia.

Jyväskylän yliopiston Biologian laitoksella suoritettuis-
sa tutkimuksissa on osoitettu, että fyysinen kuormitus vauri-
oittaa raajalihassoluja myös subletaalisti ja että subletaalin
vaurion seurauksena lihassolujen lysosomaalinen järjestelmä
stimuloituu voimakkaasti. Kuormitusta edeltävällä säännölli-
sellä harjoittelulla voidaan kuitenkin estää solujen letaali
ja subletaali vaurioituminen. Tämän tutkimuksen tarkoituksena
oli selvittää harjoittelun aiheuttaman vauriosuojan kehitty-
mistä käyttämällä vaurioindikaattoreina lysosomaalisen stimu-
laation yhteydessä voimakkaasti kohoavia happamien hydrolaa-
sien aktiivisuuksia.

2. TUTKIMUKSEN TAUSTAA

Soluvaurio voi olla letaali (69,71) tai subletaali (69,7). Makrofaagit osallistuvat kudoksen letaalien soluvaurioiden korjaamiseen poistamalla kuolevan solun jäännökset (14,17,31,69,55). Autofagosytoosi liittyy subletaalien soluvaurioiden korjaamiseen (16,31,32,69). Lysosomaalinen järjestelmä osallistuu solun vaurioitumiseen joko ensisijaisesti tai toissijaisesti. Kyseessä on lysosomien primaaritoiminta, jos vaurio aiheutuu lysosomaalisten happamien hydrolaasien vapautumisesta solulimaan (16,66). Solun vaurioituminen voi johtua myös muiden aineenvaihduntatapahtumien häiriintymisestä (31,69). Tällöin lysosomaalinen järjestelmä toimii sekundaarisesti ja toiminnan tarkoituksena on vaurioituneiden solunosien eristäminen ja hajottaminen (31,66). Lysosomaaliset entsyymit aktivoituvat vasta lysosomaalisen järjestelmän poistaessa subletaalisti vaurioituneiden solujen käyttökelvottomia osia. (31). Hydrolyysituotteet käytetään uudelleen joko rakennusaineina tai solun energiantuotannossa (17,67)..

Lihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuudet ovat normaalisti alhaiset esimerkiksi maksaan verrattuna (32,76). Sekä nopeasti että hitaasti supistuvassa oksidatiivisessa punaisessa lihaksessa aktiivisuudet ovat suuremmat kuin valkoisessa lihaksessa (49,74,76). Normaaleissa lihassoluissa on harvoin havaittu lysosomeja eikä lihassoluissa ole sellaista kehittynyttä lysosomaalista järjestelmää kuin useimmissa muissa solutyypeissä (14). Lysosomeja muistuttavia rakenteita ja happamien hydrolaasien aktiivisuuksia havaitaan tavallisesti lihassolun sarkotubulaarisessa järjestelmässä (63). Happaman fosfataasin ja beta-glukuronidaasin aktiivisuutta on havaittu myös sarkoplasmisessa retikulumissa (15). Happamien hydrolaasien aktiivisuuden kasvaessa lihassolun lysosomaalinen järjestelmä aktivoituu. Lihassolun perinukleaarille alueelle Golgin laitteiden läheisyyteen sekä myofibrillien väliin ilmestyy primaarilyosomeja. Samalla Golgin laitteiden

koko ja niiden lukumäärä kasvavat (63). Yhtä aikaa primaari-lysosomien kanssa, tai niiden ilmestymisen jälkeen, havaitaan lihassolun perinukleaarilla alueella autofagosomeja (15,63). Yleisimmin lysosomeja ja autofagosomeja on runsaasti mitokondrioita sisältävissä punaisissa lihassoluissa (63, 59).

Happamien hydrolaasien kokonaisaktiivisuudet lisääntyvät sekä normaaleissa kudosuutoksissa että erilaisissa patologisissa tiloissa. Korkeita lysosomaalisten hydrolaasien aktiivisuuksia on mitattu dystrofisissa lihassairauksissa (1) sekä kokeellisissa (39,54) ja fysiologisissa atrofioissa (1) kuten vanhenemisen yhteydessä (29,53). Fysiologista atrofiaa ja korkeita hydrolaasiaktiivisuuksia esiintyy myös kontrolloidussa solukuolemassa metamorfoosien ja sikiönkehityksen aikana (47). Kokeellinen lihasatrofia voidaan aiheuttaa denervaatiolla (38,39), tenotomialla (54) ja immobilisaatiolla (42). Tutkituin ravintotekijöistä johtuva lihasdystrofia aiheutuu E-vitamiinin puutteesta (80). Tietyt myrkyt häiritsevät lihassolun normaalia metaboliaa ja aiheuttavat atrofioitumista (43). Myös säteily aiheuttaa lihassoluissa letaaleja ja subletaaleja muutoksia, joihin liittyy solujen lysosomaalisen järjestelmän stimuloituminen (66). Toisaalta jotkin kemikaalit voivat vähentää solujen säteilyvaurioita. Iskemia (20,65), sekä krooninen (19) ja akuutti (4) hypoksia vaurioittavat lihassoluja. Fyysinen juoksukuormitus aiheuttaa myös happamien hydrolaasien aktiivisuuden kasvua ja autofagosytoosin lisääntymistä hiiren lihaskudoksessa (74,76,59).

Dystrofioiden, denervaation, immobilisaation ja paaston aikana lihasproteiinien hajotustoiminta kiihtyy (24,44) ja hajotustoiminnan kiihtymiseen liittyy lysosomaalisen järjestelmän aktivoituminen (52). Lysosomaalisten happamien proteaasien lisäksi aktivoituvat tällöin useissa tapauksissa myös lihaskudoksen neutraalit ja alkaliset proteaasit (40,9,35,41). Fyysinen kuormitus ei vaikuta näiden sytoplasmisten proteaasien aktiivisuuksiin (62).

Jyrsijöiden lihaksissa on kolmenlaisia lihassoluja:

1) Hitaasti supistuvia soluja, joilla on oksidatiivinen energia-aineenvaihdunta. 2) Nopeasti supistuvia soluja, jotka käyttävät energiantuotannossaan sekä oksidatiivista että anaerobista hapetusta. 3) Nopeasti supistuvia soluja, joilla on glykolyyttinen energia-aineenvaihdunta (6). Oksidatiiviset solut ovat ulkonäöltään punaisia ja glykolyyttiset solut valkoisia.

Lihaksessa kukin solutyypin muodostaa motorisia yksiköitä, joissa on ainoastaan yhdenlaisia lihassoluja. Kuormitustavan valinnalla voidaan vaikuttaa siihen, minkälaisia lihassoluja työssä käytetään. Jos kuormituksen intensiteetti on alhainen, rekrytoidaan pääasiassa lihaksen nopeat ja hitaat oksidatiiviset motoriset yksiköt (6). Energialähteinä solut käyttävät tällöin vain vapaita rasvahappoja ja jonkin verran glukoosia. Tällaisessa tilanteessa lihasta voidaan kuormittaa pitkän aikaa. Jos lihasta kuormitetaan voimakkaasti tai jos pitkäkestoinen kevyehkö kuormitus on tyhjentänyt oksidatiivisten solujen glykogeenivarat, käytetään työssä pääasiassa nopeasti supistuvia glykolyyttisiä soluja ja energia hankitaan anaerobisella energia-aineenvaihdunnalla (6,8,25). Kuormituksen intensiteetin lisääntyessä rasvojen käyttö energialähteenä vähenee ja hiilihydraattien osuus kasvaa (36). Maksimaalinen dynaaminen tai staattinen kuormitus tyhjentää nopeasti lihaksen energiavarat. Tässä tilanteessa ATP:n synteesiin tarvittava energia tuotetaan anaerobisella glykolyysillä ja käytössä ovat pääasiassa lihaskudoksen nopeasti supistuvat glykolyyttiset solut (6,68). Tällöin lihassoluun kertyy maitohappoa.

Kuormituksen vaikutuksesta useimpien lysosomaalisten entsyymien aktiivisuudet lisääntyvät sekä lihassolun sisällä että ympäröivässä sidekudoksessa. Lihassolun sisällä aktiivisuusnousu on kuitenkin suurempi (74). Lysosomaalisten entsyymien aktiivisuusnousun suuruus kuvaa ärsykkeen aiheuttaman lysosomaalisen vasteen suuruutta. Tämä vaihtelee kuormitushjelmasta ja entsyymistä riippuen joistakin kymmenistä lähes

kuuteen sataan prosenttiyksikköön perustasoon verrattuna. Aktiivisuusnousu punaisessa lihaksessa on noin kaksinkertainen valkoiseen lihakseen nähden (58,76). Lysosomaalisten entsyymien perusaktiivisuudetkin ovat punaisessa lihastyyppissä valkoista lihasta korkeammat (73,74,78,58,60,76). Aktiivisuustason nousu johtunee ensisijaisesti uudesta entsyymisynteesisistä, koska vasteen kehittymiseen tarvitaan 4 - 5 vuorokauden induktioaika (74,76).

Aktiivisuusnousun suuruus riippuu kuormitustyyppistä. Pitkäkestoinen ja suhteellisen hidas juoksutus aiheuttaa suuremman aktiivisuusnousun kuin nopea ja lyhytkestoinen kuormitus (58,76). Kun kuormituksen intensiteetti on sopivasti mitoitettu, lihaskudoksessa ei tapahdu letaaleja solumuutoksia, mutta lysosomaalisten entsyymien aktiivisuudet nousevat (60). Tällainen kuormittavuus saavutetaan hiirillä 3 - 6 tunnissa juoksunopeudella $13.5 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ kuuden asteen vastaamaan (58). Juoksunopeuden nostaminen 20:stä 25:een $\text{m} \times \text{min}^{-1}$ nostaa beta-glukuronidaasin aktiivisuutta noin yhdellä yksiköllä tasamaalla ja kahdeksan asteen ylämaahan hieman enemmän. (77). Kevyehkössä tasavauhtisessa kuormituksessa lihas vaurioituu vain subletaalisti (61). Näin tulehdussoluista johtuva epäspesifinen lisäys lysosomaalisissa entsyymiaktiivisuuksissa pienenee (14,55,58).

Hiiren reisilihaksen lysosomaalisten entsyymien aktiivisuudet ovat korkeimmillaan 3 - 5 vuorokauden kuluttua uuvuttavasta kuormituksesta (76). Aktiivisuustasot palautuvat lähes normaaleiksi 10 - 15 vuorokaudessa. Myös säännöllinen kohtuullinen harjoittelu lisää hieman reisilihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuuksia. Jos harjoitellut hiiri uuvutetaan juoksuttamalla, eivät sen raajalihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuudet muutu (78). Vihko ym. (78) tutkivat 20 harjoittelukerran vaikutusta uuvuttavan juokskuormituksen jälkeisiin lysosomaalisten entsyymien aktiivisuuksiin hiiren punaisessa ja valkoisessa reisilihaksessa. Hiiret harjoittelivat viitenä päivänä viikossa, juoksemalla 1,5 tuntia päivässä nopeudella $25 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ kuuden asteen ylämäkeen.

Harjoittelun jälkeinen kuormitus oli intervallityyppinen ja uuvuttava, eikä se vaikuttanut happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin. Reisilihasnäytteissä ei myöskään havaittu histopatologisia muutoksia. Harjoittelu näin ollen suojaa raajalihasta kuormituksen aiheuttamalta vaurioitumiselta.

Mainitussa tutkimuksessa hiiret olivat harjoitelleet varsin tehokkaasti, mm. niiden raajalihasten oksidatiivinen kapasiteetti oli lisääntynyt (78). Harjoittelun suojaava vaikutus oli myös täydellinen, koska kuormitetuissa harjoitteleissa eläimissä ei havaittu lihassolujen nekroosia eikä kohonneita hydrolaasiaktiivisuuksia. Aikaisempien töiden perusteella ei kuitenkaan tiedetä, kuinka harjoittelun suojaava vaikutus kehittyy harjoittelumäärän funktiona. Tämän työn tarkoituksena oli selvittää harjoittelun määrän vaikutusta reisilihaksen kuormitusvaurioiden ilmaantumiseen.

3. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään kuinka harjoittelu suojaa raajalihasta submaksimaalisen fyysisen kuormituksen vaurioittavilta vaikutuksilta. Koejärjestelyllä pyrittiin vastaamaan seuraaviin kysymyksiin:

1. Miten neljän tunnin submaksimaalinen kuormitus (kevyt-
vauhtinen juoksutus juoksumatolla) vaikuttaa hiiren
nelipäisen reisilihaksen punaisen ja valkoisen osan
tiettyjen happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin?
2. Miten harjoittelukertojen (tunnin juoksu vakionopeudella)
lisääminen (3, 6, 9, 15 harjoitusta) vaikuttaa hiiren
nelipäisen reisilihaksen punaisen ja valkoisen osan tiet-
tyjen happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin?
3. Minkälainen on kuormituksen vaikutus 3, 6, 9 ja 15
kertaa harjoitelleiden hiirten nelipäisen reisilihak-
sen punaisen ja valkoisen osan tiettyjen happamien
hydrolaasien aktiivisuuksiin?

4. MATERIAALI JA MENETELMÄT

4.1. K o e - e l ä i m e t

Tutkimuksessa käytettiin urospuolisia NMRI-hiiriä. Eläinten ikä kokeen alussa oli 102 - 109 vuorokautta.

Eläimiä pidettiin läpinäkyvissä, kansiritilällä varustetuissa muovihäkeissä (Scanbur IV, Skensved, Tanska). Kussakin häkissä oli 4 - 8 hiirtä. Kuivikkeina käytettiin puulastuja, jotka vaihdettiin 2 - 3 kertaa viikossa. Samalla häkit pestiin ja juomavesi vaihdettiin. Juomavetenä käytettiin Jyväskylän kaupungin vesijohtovettä. Ruokana käytettiin hiirten kasvatusrehua (R₃, Astra-Ewos, Södertälje, Ruotsi). Eläintallin kosteus ja lämpötila vaihtelivat normaalisti. Eläinten vuorokausirytmii oli vakioitu: vuorokaudessa oli 12 tunnin mittainen valoisa jakso, joka alkoi kello 6.00.

4.2. K o e j ä r j e s t e l y

Koejärjestelynä käytettiin hiirten kuormittamista ja harjoittamista sähkökäyttöisellä juoksumatolla (Liite 1). Eläimet jaettiin satunnaisesti ryhmiin kaksi viikkoa ennen koetta (Liite 2). Kontrollieläimet, samoin kuin harjoittelevat ja kuormitettavat eläimet muulloin kuin juostessaan matolla, elivät normaaleissa häkkiolosuhteissa.

Kuormituksena käytettiin neljän tunnin submaksimaalista juoksutusta nopeudella $20 \text{ m} \times \text{min}^{-1} 6^{\circ}$ ylämaahan. Kuormituksessa eläimet juoksivat neljä 50 min jaksoa, joiden välillä oli 10 min tauko, jonka aikana eläinten saatavilla oli vettä ja ruokaa (Liite 3).

Harjoittelevia hiiriä juoksutettiin nopeudella $18 \text{ m} \times \text{min}^{-1} 6^\circ$ ylämäkeen kerran vuorokaudessa pääasiassa aamu-
päivisin. Tutkimuksessa käytettiin neljää harjoitteluryh-
mää, joiden harjoittelukertojen lukumäärät olivat 3, 6, 9 ja
15. Harjoitteluohjelmissa juoksuaikaa lisättiin siten, että
kaikilla ryhmillä ensimmäinen harjoitus kesti 30 min, toi-
nen 45 min ja kolmannelta harjoituksesta eteenpäin 60 min
(Liite 4).

Kuormitusvaikutusta harjoittelemattomilla eläimillä
mitattiin koeryhmillä K ja KK. Ryhmään K (kontrollit) kuu-
luvat eläimet elivät jatkuvasti normaaleissa häkkiolosuhteis-
sa. Ryhmän KK (kuormitetut kontrollit) eläimet juoksivat
submaksimaalisen kuormitusohjelman. Ne tapettiin 4 vrk
kuormituksen jälkeen, jolloin happamien hydrolaasien aktii-
visuudet ovat suurimmillaan aiankin uuvuttavan kuormituksen
jälkeen (48).

Harjoitusvaikutuksen mittaamiseksi 3, 6, 9 ja 15 kertaa
harjoitelleet eläinryhmät (H) tapettiin viimeistä harjoitus-
ta seuraavana päivänä. Samanaikaisesti tapettiin kuormittamat-
tomia kontrollieläimiä (K).

Yhdistetyn harjoitus- ja kuormitusvaikutuksen tutkimi-
seksi käytettiin kahta koeryhmää: Ryhmää HK (harjoitelleet -
kuormitetut), jossa eläimet harjoittelivat 3 - 15 kertaa,
ne kuormitettiin submaksimaalisesti viimeistä harjoitusta
seuraavana päivänä ja tapettiin neljän vuorokauden kuluttua
kuormituksesta ja ryhmää HL (harjoittelun lopettaneet), jossa
hiiret harjoittelivat 3 - 15 kertaa, niitä ei kuormitettu
ja ne tapettiin viisi vuorokautta viimeisen harjoituskerran
jälkeen.

Kontrollihiiret ja harjoitelleet hiiret kuormitettiin
samalla ohjelmalla. Hiirten lukumäärät eri koeryhmissä
14 vrk ennen kokeen alkua on esitetty liitteessä 2.

4.3. L i h a s n ä y t t e i d e n p r e p a r o i n t i

Hiiret tapettiin katkaisemalla niiden niska. H- ja K-ryhmien koe-eläimet tapettiin aina samana päivänä. Preparointipäiviä kertyi näiden ryhmien osalle neljä. Samoin neljälle päivälle ajoittuivat HK-, HL-, KK-ryhmien ja vastaavaan kontrolliryhmään (K) kuuluvien eläinten tappo ja preparointi. Yhteensä preparointipäiviä kertyi kahdeksan. Menettely aiheutti eroja näytteiden syväjäädetyksaikoihin (Liite 5).

Molempien takaraajojen nelipäiset reisilihakset (*m. quadriceps femoris*) preparoitiin esiin. Lihasuryhmän ympärillä oleva kalvo poistettiin. Lihaksen valkoinen ja punainen osa preparoitiin erilleen silmämääräisesti mahdollisimman samantyyppisesti. Punaisen näytteen muodostivat ulomman reisilihaksen (*m. vastus medialis*) proksimaalisten päiden ja keskimäisen reisilihaksen (*m. vastus intermedius*) punaiset osat. Valkoinen näyte leikattiin ulomman reisilihaksen distaalipäästä. Punaisen lihasnäytteen märkápaino (keskiarvo \pm keskihajonta) olivat ryhmittäin seuraavat: HK-ryhmä 28.2 ± 7.2 mg (n=62), HL-ryhmä 28.5 ± 9.0 mg (n=32), H-ryhmä 31.0 ± 5.9 mg (n=32), KK-ryhmä 29.5 ± 6.7 mg (n=16) ja K-ryhmä 30.2 ± 5.7 mg (n=24). Punnituksen jälkeen (Mettler H10) näytteet jäädetyttiin tinapaperiin käärittyinä nestetyypessä ja varastoitiin -80°C :een.

Näytteistä valmistettiin 2 % (w/v) homogenaatti tislattuun veteen. Syväjäädetyt näytteet homogenoitiin Potter-Elvehjem-tyyppisellä teflonmäntäisellä homogenisaattorilla jää-vesihauteella. Homogenaatista määritettiin mittareiksi valittujen happamien lysosomaalisten hydrolaasien aktiivisuudet sekä proteiinipitoisuus.

Samaan päivittäiseen määrityssarjaan sisällytettiin näytteitä kaikista koeryhmistä ja kontrolliryhmästä. Kesälomien vuoksi analyysit tehtiin kahdessa jaksossa, joiden välillä oli kuukauden tauko (Liite 6). Proteiinimäärityksiin käytettävä osa homogenaatista varastoitiin -20°C :een ja mitattiin myöhemmin sopivissa erissä.

4.4. E n t s y y m i a k t i i v i s u u d e t j a p r o t e i i n i p i t o i s u u s

Lysosomaalisen järjestelmän aktivoitumista tutkittiin tässä työssä neljän happaman hydrolaasin (2,11,10,12) aktiivisuusmittauksilla.

Tutkituista hydrolaaseista kaksi, katepsiinit C ja D, ovat peptidihydrolaaseja (3,45). Katepsiini C (EC 3.4.14.1.) on eksopeptidaasi, josta on käytetty useita eri nimiä (mm. dipeptidyylipeptidaasi I, dipeptidyyliaminopeptidaasi I) (11,18). Entsyymillä on myös transferaasiaktiivisuutta (11, 18,45). Katepsiini D (EC 3.4.23.5.) on karboksipeptidaaseihin kuuluva endopeptidaasi (11,28). Endopeptidaasit aloittavat lysosomien sisäisen proteolyysin ja eksopeptidaasit pilkkovat näin vapautuneet oligopeptidit (17,67).

Lysosomaalisista glykosidaaseista määritettiin beta-glukuronidaasi (EC 3.2.1.31.) (79), jonka aktiivisuutta tavaan lysosomien lisäksi lihaksen sarkotubulaarisessa järjestelmässä (12,22,66). Entsyymi vapauttaa terminaalisia beta-glukuronosyylijäännöksiä mm. glykosaminoglykaaneista (79, 12).

Nukleiinihappoja hydrolysoivista lysosomaalisista entsyymeistä määritettiin fosforihapon diesterisidoksia hydrolysoiva hapan ribonukleaasi (EC 3.1.4.23.) eli ribonukleaasi II (13,12,11). Entsyymi katalysoi endotyypistä RNA:n hydrolyysiä siten, että nukleotidin 3'-fosfaattiryhmä jää vapaaksi (12,13,11).

Entsyymiaktiivisuuksien mittaukset suoritettiin Barrettin (1972) (10) esittämällä tavalla. Käytetyt reagenssit ja menetelmien yksityiskohdat on esitetty liitteessä 7.

Entsyymiaktiivisuudet laskettiin sekä lihasnäytteen märkäpainoa (Liite 14, Taulukot) että sen proteiinipitoisuutta (Liite 13) kohti. Aktiivisuudet ilmaistiin pikomooleina minuutissa painoyksikköä kohti (Liite 8). Lihasnäytteiden

proteiinipitoisuus määritettiin Lowryn ym. (50) menetelmällä. Ennen määrittystä lihashomogenaattia inkuboitiin 1 N NaOH:ssa + 40 °C:ssa tunnin ajan. Vakiokuvaaja tehtiin härän albumiinilla (Liite 9).

4.5. Tulosten käsittely

Entsyymiaktiivisuuksien primaariarvot ($\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ lihasta) laskettiin pöytälaskimella (Monroe 1939). Tulosten tilastollinen käsittely suoritettiin Jyväskylän yliopiston Laskentakeskuksessa Univac 1100-laitteistolla käyttäen HYLPS-ohjelmistoa.

Tulosten käsittelyssä käytettiin toisaalta vertailuarvoja (K vs. KK, HL vs. HK, K vs. H ja HL vs. H) ja toisaalta tuloksia tarkasteltiin ryhmien sisäisesti (HK, HL, H) harjoittelukertojen (0, 3, 6, 9, 15 kertaa) funktiona.

Tietojenkäsittelyssä tulostettiin ryhmäkeskiarvot keskihajontoineen, yksi- tai kaksisuuntaisen varianssianalyysin tulokset sekä entsyymiaktiivisuudet ilmaistuina näytteen proteiinipitoisuutta kohti. Tilastollisissa vertailuissa käytettiin lisäksi t-testiä (Monroe 1930) ja korrelaatiokerroimien sekä regressiosuorien laskemista (Hewlett-Packard 25).

Tulosten käsittelyn yksityiskohdat on esitetty liitteessä 10 ja menetelmien luotettavuuden arviointi liitteessä 11.

5. TULOKSET

5.1. Submaksimaalisen kuormituksen vaikutus hiiren reisilihaksen aktiivisuuksiin

Submaksimaalinen neljän tunnin kevytvauhtinen juoksutus lisäsi kaikkien tutkittujen happamien hydrolaasien aktiivisuuksia hiiren nelipäisen reisilihaksen punaisessa osassa neljän vuorokauden kuluttua kuormittamisesta. Suhteellinen aktiivisuustasojen nousu valkoisessa lihaksessa oli samansuuntainen, mutta tilastollisesti vähemmän merkitsevä (Taulukko 1, Liite 14). Aktiivisuuksien lisääntyminen oli erilaista eri hydrolaaseilla: beta-glukuronidaasin aktiivisuuden nousu oli suurin (120 %) ja katepsiini D:n pienin (17 %). Hydrolaasien aktiivisuuden lisääntymisen selektiivisyys heijastui myös niiden keskinäisten korrelaatioiden muutoksissa (Liite 12).

Kummankaan lihastyypin proteiinipitoisuudessa ei havaittu kuormituksen aiheuttamia muutoksia. Hydrolaasiaktiivisuudet ilmaistuna lihasnäytteen proteiinipitoisuutta kohti olivat varsin samanlaisia kuin märkápainoa kohti ilmaistut aktiivisuudet (Liite 13).

Taulukko 1.

Neljän tunnin submaksimaalisen kuormituksen vaikutus hiiren nelipäisen reisilihaksen punaisen ja valkoisen osan eräiden happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin (keskiarvo \pm S.D.).

		Muuttuja:				
		β -Glukuronidaasi	Katepsiini C	Hapan ribonukleaasi	Katepsiini D	Proteiini
<u>K-ryhmä:</u>						
punainen osa		13.3 \pm 3.2	133 \pm 37	389 \pm 102	859 \pm 149	213 \pm 25
(n)		24	23	24	24	23
valkoinen osa		8.2 \pm 2.1	117 \pm 40	413 \pm 109	638 \pm 125	207 \pm 21
(n)		24	23	24	24	24
<u>KK-ryhmä:</u>						
punainen osa		29.2 \pm 10.5	239 \pm 77	510 \pm 180	1019 \pm 218	200 \pm 24
(n)		16	15	16	16	16
valkoinen osa		16.8 \pm 10.9	180 \pm 110	527 \pm 278	744 \pm 233	204 \pm 28
(n)		16	15	16	16	16
<u>%-kuormitusvaikutus ($\frac{KK-K}{K} \times 100$)</u>						
punainen osa		+ 120***	+ 80***	+ 31**	+ 19**	- 6
valkoinen osa		+ 105***	+ 54*	+ 28	+ 17	- 1

β -Glukuronidaasi ja katepsiini C:n aktiivisuudet on ilmoitettu pmol hydrolysoitunutta substraattia /min /mg lihasta + 37 °C:ssa, katepsiini D:n aktiivisuus pmol vapautuneita tyrosiiniekvivalenteja /min /mg lihasta + 37 °C:ssa ja happaman ribonukleaasin aktiivisuus pmol vapautuneita nukleotidejä /min /mg lihasta + 37 °C:ssa. Lihasnäytteiden proteiinipitoisuus on ilmoitettu μ g seerumin albumiiniekvivalenteja /mg lihasta. Havaintojen lukumäärä on ilmoitettu n:lla ja ryhmäerojen tilastollinen merkitsevyys symboleilla *** (p<.001), ** (p<.01) ja * (p<.05).

5.2. Harjoittelukertojen määrän vaikutus hiiren reisilihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin

Työssä käytetty harjoittelu ei vaikuttanut happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin kummassakaan lihastyypissä (Taulukko 2, Liite 14). Harjoittelun lopettamisen jälkeen viisi päivää normaaleissa häkkiolosuhteissa eläneiden hiirien (ryhmä HL) aktiivisuudet eivät myöskään poikenneet kontrollieläinten eivätkä harjoitelleiden eläinten arvoista. Näytteiden proteiinipitoisuuksissa tai eri ryhmien entsyymiaktiivisuuksissa ilmaistuna proteiinipitoisuutta kohti ei myöskään ollut eroja eri ryhmien välillä.

5.3. Kuormituksen vaikutus harjoitelleiden hiirien reisiilihaksen happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin

Kolmen harjoittelukerran jälkeen toteutettu neljän tunnin juoksutus aiheutti punaisen raajalihaksen beta-glukuronidasiin aktiivisuudessa pienen nousun verrattuna harjoittelun lopettaneiden kuormittamattomien hiirien (ryhmä HL) aktiivisuuksiin (Kuva 1, Taulukko 3, Liite 14). Nousu oli vain 1/6 harjoittelemattomien kuormitettujen hiirien (ryhmä KK) aktiivisuusnoususta ja pysyi samansuuruisena myös 6, 9 ja 15 harjoituskerran jälkeen. Kuormitus ei aiheuttanut muutoksia harjoitelleiden hiirien punaisen raajalihaksen muitten happamien hydrolaasien aktiivisuuksissa tai valkoisessa lihaksessa.

Taulukko 2.

Harjoittelukertojen lukumäärän vaikutus hiiren nelipäisen reisilihaksen punaisen ja valkoisen osan eräiden happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin (keskiarvo ± S.D.).

		Muuttuja:									
		β-Glukuronidaasi	% ^(a)	Katepsiini C	%	Hapan ribo- nukleaaasi	%	Katepsiini D	%	Proteiini	%
<u>H-ryhmä / punainen</u>											
osa:											
3-harjoittelukertaa	15.4 ± 1.8	+16	128 ± 25	-4	351 ± 47	+10	927 ± 236	+8	240 ± 19	+13	
6-harjoittelukertaa	15.5 ± 4.5	+17	130 ± 37	-2	308 ± 66	-21	827 ± 202	-4	221 ± 19	+4	
9-harjoittelukertaa	13.4 ± 2.2	+1	127 ± 23	-5	425 ± 56	+9	872 ± 158	+2	210 ± 16	-1	
15-harjoittelukertaa	12.3 ± 2.5	-8	145 ± 17 ^(b)	-6	417 ± 92	+7	807 ± 81	-6	208 ± 12	-2	
<u>H-ryhmä / valkoinen</u>											
osa:											
3-harjoittelukertaa	9.8 ± 2.1	+20	106 ± 11	-9	382 ± 71	-6	690 ± 208	+8	240 ± 23	+16	
6-harjoittelukertaa	9.9 ± 2.9	+21	123 ± 30	+5	349 ± 131	-15	602 ± 139	-6	219 ± 10	+6	
9-harjoittelukertaa	8.8 ± 2.1	+7	116 ± 27	0	497 ± 50	+20	691 ± 172	+8	197 ± 17	-5	
15-harjoittelukertaa:	8.5 ± 1.3	+4	139 ± 15 ^(b)	+19	519 ± 81	+26	632 ± 71	-1	216 ± 20	+4	

a) Prosenttiluku ilmaisee harjoitteluvaikutuksen: $\frac{H-K}{K} \times 100$; ryhmän K primaariarvot on annettu Taulukossa 1.

b) Havaintojen lukumäärä 6. Kaikissa muissa tapauksissa havaintoja on 8.

Muut tiedot kuten Taulukossa 1.

Taulukko 3.

Kuormituksen ja harjoittelun lopettamisen vaikutus harjoitelleiden hiirien reisilihaksen punaisen ja valkoisen osan eräiden happamien hydrolaasien aktiivisuuksiin.

	Muuttuja:														
	β -Glukuroni- daasi	Z-1 ^(a)	Z-2 ^(b)	Katepsiini C	Z-1	Z-2	Hapan ribo- nukleasi	Z-1	Z-2	Katepsiini D	Z-1	Z-2	Proteiini	Z-1	Z-2
Punainen osa/															
HK-ryhmä:															
3-harjoittelu- kerta	16.6 ± 2.3	+19**		147 ± 31	+12		296 ± 31	-8		985 ± 222	+9		226 ± 24	0	
6- "	17.4 ± 23	+23**		135 ± 26	+12		292 ± 87	-2		891 ± 212	0		225 ± 25	+9	
9- "	15.6 ± 22	+22*		136 ± 36 ^(c)	-1		430 ± 29 ^(c)	-2		1010 ± 107 ^(c)	+1		216 ± 19	+12**	
15- "	15.9 ± 2.9 ^(c)	+25*		149 ± 15 ^(c)	+12		439 ± 63 ^(c)	+6		884 ± 65 ^(c)	+4		200 ± 18	+4	
Punainen osa/															
HL-ryhmä:															
3-harjoittelu- kerta	13.9 ± 2.0		-10	131 ± 21		+2	321 ± 54		-9	903 ± 192		-3	226 ± 16		-6
6- "	14.2 ± 2.3		-8	121 ± 24		-7	297 ± 83		-4	889 ± 137		+8	207 ± 23		-6
9- "	12.8 ± 2.0		-4	138 ± 19		+9	439 ± 61 ^(d)		+3	1001 ± 97		+15	193 ± 16		-8
15- "	12.7 ± 1.7 ^(d)		+3	133 ± 8 ^(d)		-8	413 ± 46		-1	852 ± 99		+6	193 ± 26		-7
Valkoinen osa/															
HK-ryhmä:															
3-harjoittelu- kerta	9.2 ± 2.5	+7		117 ± 45	+1		349 ± 38	-3		695 ± 165	+5		218 ± 22	0	
6- "	9.4 ± 3.1	-6		123 ± 31	+2		323 ± 103	-9		654 ± 126	0		217 ± 23	+4	
9- "	9.7 ± 4.0 ^(e)	+9		132 ± 32 ^(e)	-8		533 ± 109 ^(e)	-5		748 ± 108 ^(e)	0		197 ± 24 ^(e)	+2	
15- "	11.8 ± 4.5	+9		153 ± 28 ^(e)	+16		517 ± 68 ^(e)	-4		637 ± 99 ^(e)	+5		209 ± 20 ^(e)	+7	
Valkoinen osa/															
HL-ryhmä:															
3-harjoittelu- kerta	8.6 ± 2.0		-12	116 ± 21		+9	359 ± 40		-7	622 ± 201		-10	218 ± 8		-9
6- "	10.0 ± 3.2		+1	121 ± 35		-2	356 ± 100		+2	642 ± 82		+8	208 ± 21		-5
9- "	8.9 ± 2.5		+1	143 ± 30		+23	559 ± 127		+13	751 ± 93		+9	193 ± 17		-2
15- "	10.6 ± 3.1		+25	132 ± 19 ^(f)		-5	541 ± 68		+4	607 ± 93		-4	189 ± 26		-13

a) $\frac{HK-HL}{HL}$ ilmaisee harjoitelleiden eläinten kuormitusvaikutuksen eli $\frac{HK-HL}{HL} \times 100$

b) $\frac{HL-H}{H}$ ilmaisee harjoittelun lopettamisen vaikutuksen eli $\frac{HL-H}{H} \times 100$. H-ryhmän primaariarvot on ilmoitettu Taulukossa 2.

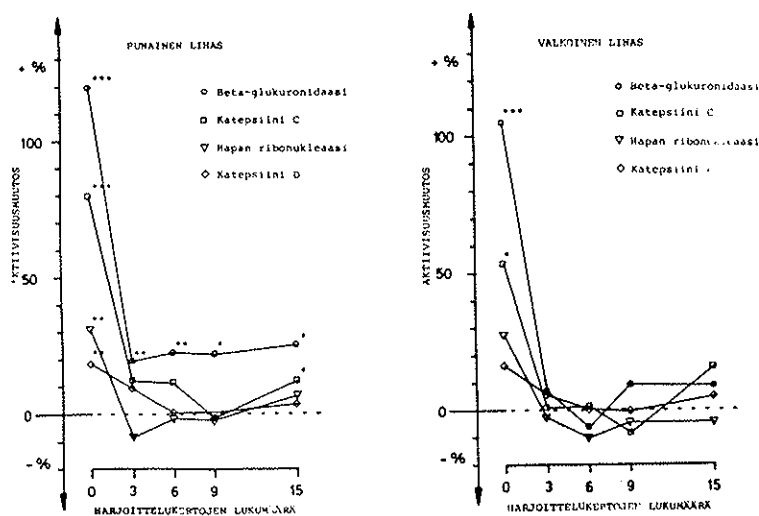
Havaintojen lukumäärä on HK-ryhmässä 16 ja HL-ryhmässä 8 paitsi seuraavissa tapauksissa:

c) n vaihtelee 12-15, d) n vaihtelee 6-7, e) n vaihtelee 12-15 ja tapauksessa f) n=6.

Muut tiedot kuten Taulukossa 1.

Kuva 1.

Harjoittelun vaikutuksesta syntyvä vauriosuoja fyysistä kuormitusta vastaan hiiren nelipäisessä reisilihaksessa.



Harjoittelemattomien eläinten kuormitusvaikutus prosentteina saadaan: $\frac{KK-K}{K} \times 100$ ja harjoitelleiden eläinten kuormitusvaikutus prosentteina saadaan: $\frac{HK-HL}{HL} \times 100$. Ryhmäkohtaiset arvot on esitetty taulukoissa 1 ja 3.

6. POHDINTA

Tulokset kaikkien happamien hydrolaasien osalta osoittivat, että jo kolme kuormitusta edeltävää harjoituskertaa vähensi hydrolaasiaktiivisuuksien kuormitusnousua erittäin voimakkaasti. Kuormituksen jälkeiset hydrolaasitasot pysyivät varsin samankaltaisina harjoittelun määrää lisättäessä 15 kertaan saakka. Suhteelliset aktiivisuusmuutokset olivat hyvin samankaltaisia punaisissa ja valkoisissa lihasnäytteissä. Edeltävä harjoittelu siis suojaa lihasta kuormitusvaurioilta ja tämä vaurioitumissuoja kehittyy jo varsin vähäisen harjoittelun vaikutuksesta.

Tässä työssä käytetty kuormitus oli suhteellisen kevyt, juoksunopeus $20 \text{ m} \times \text{min}^{-1}$ ja kuormitusaika 4 t (4 x 50 min). Kontrollieläinten hydrolaasiaktiivisuuksien nousu oli esimerkiksi beta-glukuronidaasilla 100 - 120 %. Käytetty kuormitus ei ilmeisestikään aiheuttanut lihassolujen nekroosia ja aikaisempiin havaintoihin perustuen hydrolaasiaktiivisuudet kuvannevat tässä tapauksessa hyvin kudoksen subletaalia vaurioitumista (58).

Pitkäkestoisen submaksimaalisen kuormituksen (58) ja uuvuttavan intervallityyppisen kuormituksen (76) vaikutukset hiiren reisilihaksessa ovat hyvin saman kaltaisia ja muistuttavat, kvantitatiivisesti vähäisempinä, kokeellisen iskemian (64) aiheuttamia lihaskudosmuutoksia. Iskemiassa ja uuvuttavassa fyysisessä kuormituksessa lihassoluvaurioiden syynä on pidetty hypoksiaa ja happamien metaboliittien kertymistä lihakseen (64,72). Tässä työssä käytetty kuormitus ei aiheutane hypoksista energiavajetta eikä maitohapon kertymistä lihakseen. Samantyyppistenkin lihassolujen energiatila voi kuitenkin submaksimaalisessa kuormituksessa poiketa toisistaan ja solujen energiansaanti ja -tarve olla työn aikana erilaisia (esim. 72). Kevyehkössä harjoittelussa ja kuormituksessa käytössä ovat pääasiassa oksidatiiviset lihassytt (27). Kuormituksen vaikutus punaisten lihassolujen homeostaasiin

on siten voimakkaampi kuin valkoisten solujen homeostaasiin. Punaisten lihassolujen absoluuttisesti huomattavasti suurempi hydrolaasiaktiivisuuksien nousu valkoiseen lihakseen verrattuna saattaisikin johtua solutyypin rekrytoinnin eroista käytetyssä kuormituksessa. Solutyypin vaurioitumisherkkydessä tiedetään olevan eroja myös mm. iskemian (46), E-vitaamiinin ja seleenin puutoksen (56) sekä denervaation (21) aiheuttamissa vaurioissa.

Harjoitelleita ja harjoittelemattomia hiiriä kuormitettiin tutkimuksessa samalla juoksuohjelmalla. Harjoitelleessa lihaksessa sekä sydän-verenkiertojärjestelmän (81) että lihaskudoksen adaptaatiot tehostavat (33) työtätekevien lihasten kykyä käyttää happea. Harjoitteluohjelmasta riippuen lihaksen oksidatiivisen kapasiteetin lisäys saadaan aikaan muutamassa viikossa (ks. esim. 72). Tässä työssä käytettyä harjoittelua vastaava ohjelma lisää hiiren reisilihaksen oksidatiivista kapasiteettia 15 - 30 % mittarista riippuen kolmessa viikossa (78). Kolmen kevyehkön harjoittelukerran vaikutuksesta hiiren reisilihaksen oksidatiivisessa kapasiteetissa ei havaita muutoksia (34). Tämä tutkimus kuitenkin osoitti, että jo kolme harjoittelukertaa estää lähes täydellisesti kuormituksen harjoittelemattomissa eläimissä aiheuttaman raajalihaksen lysosomaalisen järjestelmän aktivaation.

Aikaisemmin on uuvuttavan kuormituksen yhteydessä ehdotettu, että harjoittelun kuormitusvaurioilta eli kuormitusmyopatialta suojaava vaikutus saattaisi johtua lihaksen oksidatiivisen kapasiteetin adaptoitumisesta johtuvasta ATP:n resynteesin tehostumisesta erityisesti heti kuormituksen loputtua (72). Suojaavan vaikutuksen nopea kehittyminen ilman osoitettavissa olevia oksidatiivisen kapasiteetin muutoksia (57) vaatii tämän käsityksen tarkentamista.

Kuormitusmyopatiassa lihassolujen vaurioituminen kohdistuu nähtävästi solujen kalvorakenteisiin ja mitokondrioihin, koska elektronimikroskooppitutkimuksissa on havaittu erityisesti punaisissa lihassoluissa patologisia kalvomuodostumia

ja autofagosomien sisällä mitokondrioita muistuttavia rakenteita 2 - 5 päivän kuluttua pitkäkestoisesta submaksimaalisesta kuormituksesta (59). Soluvaurioiden perimmäisiksi syiksi on ehdotettu ATP:n synteesin estymistä ja palautumattomia kalvomutoksia (31,69). ATP:n puute voi johtaa ionipumpujen toiminnan häiriintymiseen (37) ja kalvorakenteiden permeabiliteettimuutoksiin (71). Lihassolussa kalsiumin metabolia on kalvotoiminnoissa tärkeä. Sen häiriintyminen esimerkiksi energianpuutteen takia voi johtaa nopeasti solun vaurioitumiseen (80,51). Sytoplasmaan vapautuva kalsium kertyy mm. mitokondrioihin ja aiheuttaa niissä toiminnallisia ja rakenteellisia muutoksia (26,70). Kalsium aktivoi fosfolipaaasia ja nopeuttaa näin solun kalvorakenteiden fosfolipidien hajoamista. Klorpromatsiini inhiboi mikrosomifraktion fosfolipaaseja ja estää solukalvon rakennemuutokset sekä fosfolipidien määrän vähenemisen iskemian aikana (20). Lisäksi kalsium aktivoi myofibrillaarista proteaasia. Myofibrillaarisen proteaasin aktiivisuus ei kuitenkaan muutu fyysistä kuormitusta seuraavana ajanjaksona (61). Kalsiumin merkitystä oletettuna lihassoluja vaurioittavana tekijänä vähentävät submaksimaalisesta kuormituksesta tehdyt havainnot (58), joiden mukaan vakava solujen energianpuute on epätodennäköinen ja tämän tutkimuksen ja sen jatkotöiden havainnot, joiden mukaan lihassoluihin kehittyy "harjoittelusuoja" nopeammin kuin solujen energiantuottokoneisto adaptoituu lisääntyneiden vaatimusten mukaiseksi.

Kalvolipidien peroksidoituminen vapaiden radikaalien vaikutuksesta (66) on myös mahdollinen lihassolujen vaurioitumismekanismi. Iskemian vaikutuksesta raajalihaksen sarkoplasmisen retikulumin lipidiperoksidaatio lisääntyy (5) ja harjoittelemattomien hiirten juoksutus lisää mm. lihaskudoksen autoksidatiivista potentiaalia muutaman päivän aikana kuormituksesta (62). Solut voivat suojautua radikaalivaurioilta lisäämällä antioksidanttikapasiteettiaan (66), mikä voisi olla harjoittelusuojankin mekanismi. Toistaiseksi ei kuitenkaan tiedetä, kuinka harjoittelu vaikuttaa lihassolujen antioksi-

danttijärjestelmiin tai kuinka kuormitus vaikuttaa lihaskudoksen autoksidaatioon harjoitelleilla eläimillä.

Kuormitusvaurion mekanismia tai harjoittelusuojan luonnetta ei siis tunneta. Vaurio kohdistuu solun kalvorakenteisiin ja siitä on seurauksena lihassolujen lysosomaalisen järjestelmän voimakas stimuloituminen, joka tässä tutkimuksessa näkyy kohonneina happamien hydrolaasien aktiivisuuksina. Vaurioitumisesta tiedetään edelleen, että solujen subletaali vaurioituminen edeltää letaalia vaurioitumista ja että kuormitus ei aina johda lihassolujen nekroosiin (58). Lysosomaalisen stimulaation tarkoituksena lienee solun vaurioituneiden rakenteiden poistaminen, jolloin solun subsellulaarinen regeneroituminen tulee mahdolliseksi.

Lihassolujen vaurioituminen kuormituksessa samoin kuin harjoittelusuojakin voivat johtua lihassolujen sisällä tai ulkopuolella vaikuttavista tekijöistä ja/tai niiden yhteisvaikutuksesta. Lihassolujen endogeenisten tekijöiden osalta tiedot vaurioitumisen mekanismeista ovat toistaiseksi viitteellisiä, joten harjoittelusuojan luonnekin on vain arveltavissa. Eksogeenisten tekijöiden, jotka hyvinkin voivat vaikuttaa mm. solun energiatilan kautta, merkitystä erityisesti harjoittelusuojan yhteydessä on pidetty suhteellisen vähäisenä (72). Tämän tutkimuksen havainto suojan nopeasta kehittymisestä korostaa mm. verenkierron säätelyllisten tekijöiden merkitystä. Esimerkiksi ihmisen iskeemisessä kuormitusmyopatiassa etummaisen säärilihaksen verenkierto estyy lihaksen turpoamisen ja kalvorakenteiden johdosta ja seurauksena on lihaksen nekrotisoituminen (23). Hiirellä on aivan vastikään havaittu, että kuormitus vaurioittaa erityisen voimakkaasti nelipäisen reisilihaksen punaista osaa ja sen vaikutus esimerkiksi kaksoiskantalihaksen punaiseen osaan on huomattavasti vähäisempi. Eräissä juoksussa käytetyissä lihaksissa ei vaurioitumista havaita lainkaan (75). Kuormituksen aiheuttamalla lihassolujen edemalla lihaksen spesifiin anatomiaan yhdistyneenä saattaa siis olla merkitystä lihassoluvaurioiden synnyssä samoin kuin tunnetusti nopealla verenkierrollisten tekijöiden säätelyn (30) adaptoitumisella harjoittelusuojan kehittymisessä.

7. TIIVISTELMÄ

Lysosomaalisten happamien hydrolaasien aktiivisuuden kasvu merkitsee lysosomaalisen järjestelmän stimuloitumista. Ilmiön histokemialliseen ja histologiseen tietämykseen nojautuen voidaan katsoa entsyymiaktiivisuuksien valtaosan olevan peräisin lihassoluista. Aktiivisuusmuutoksen syynä on lihaskudoksen homeostaasin muutos ja lihassolujen adaptoituminen sen mukaisesti.

Neljän tunnin kevytvauhtinen juoksutus juoksumatolla lisäsi kaikkien tutkittujen happamien hydrolaasien aktiivisuuksia hiiren nelipäisessä reisilihaksessa neljän vuorokauden kuluttua kuormittamisesta. Harjoittelulla ei ollut vaikutusta lysosomaalisten entsyymien aktiivisuuksiin. Viisi vuorokautta harjoittelun lopettamisen jälkeen entsyymiaktiivisuudet eivät poikenneet kontrollieläinten eivätkä harjoitelleiden eläinten arvoista.

Kolmen harjoittelukerran jälkeen neljän tunnin submaksimaalinen juoksutus ei enää aiheuttanut huomattavaa entsyymiaktiivisuuksien nousua. Tämä merkitsee solun subletaalin vaurioitumisen estymistä jo kolmen kevyehkön harjoittelukerran vaikutuksesta.

Ilmeisesti harjoittelun vaikutuksesta lihas adaptoituu kestämään toistuvaa rasitusta. Harjoittelusuojan mekanismeja ei tunneta ja kyseessä voi olla joko endogeeniset tai eksogeeniset tekijät tai niiden yhteisvaikutus. Varsin yllätyksellistä oli harjoittelusuojan kehittymisen nopeus.

KIRJALLISUUSVIITTEET:

1. ADAMS, R.D.: Diseases of Muscle. A Study in Pathology. Harper & Row, New York, 1975
2. ALTMAN, D.L., KATZ, D.D.: Cell Biology, ss. 315-332. Federation of American Societes for Experimental Biology, Bethesda, 1976
3. APPEL, W.: Di- and Polypeptidases. Kirjassa: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2, (H.U. Bergmeyer, toim.), ss. 978-985. Academic Press, Inc., New York, 1974
4. ARCANGELI, P., DIGIESI, V., MASALA, B., SERRA, V.M., CONGIU, A.: Metabolism of skeletal muscle following incomplete ischemia. *Angiology*. 24, 144-152 (1973)
5. ARCHIPENKO, Y.V., BILENKO, M.V., DOBRINA, S.K., KAGAN, V.E., KOZLOV, Y.P., SHELENKOVA, L.N.: Ischemic damage to the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: The role of lipid peroxidation. *Bull. Exp. Biol. Med. (Engl. Tr.)* 83, 810-813 (1977)
6. ARMSTRONG, R.B., SAUBERT IV, C.W., SEMBROWICH, L.W., SHEPHERD, R.E., GOLLNICK, P.D.: Glycogen depletion in rat skeletal muscle fibers at different intensities and durations of exercise. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 352, 243-256 (1974)
7. ARSTILA, A.U., HIRSIMÄKI, P., TRUMP, B.F.: Studies on subcellular pathophysiology of sublethal chronic cell injury. *Beitr. Pathol.* 152, 211-242 (1974)
8. BALDWIN, K.M., FITTS, R.H., BOOTH, F.W., WINDER, W.W., HOLLOSZY, J.O.: Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 354, 203-212 (1975)

9. BANNO, Y., SHIOTANI, T., TOWATARI, T., YOSHIKAWA, D., KATSUNUMA, T., AFTING, E.-G., KATUNUMA, N.: Studies on new intracellular proteases in various organs of rat. 3. Control of group-specific protease under physiological conditions. *Eur. J. Biochem.* 52. 59-63 (1975)
10. BARRETT, A.J.: *Lysosomal Enzymes*. Kirjassa: *Lysosomes. A Laboratory Handbook*, (J.T. Dingle, toim.), ss. 46-126. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1972
11. BARRETT, A.J.: Introduction to the history and classification of tissue proteinases. Kirjassa: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (A.J. Barret, toim.), ss. 1-55. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1977
12. BARRETT, A.J., HEATH, M.F.: *Lysosomal Enzymes*. Kirjassa: *Lysosomes. A Laboratory Handbook*, (J.T. Dingle, toim.), ss. 19-145. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1977
13. BERGMAYER, H.U., GAWEHN, K., GRASSL, M.: *Enzymes as Biochemical Reagents. Ribonuclease*. Kirjassa: *Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 1*, (H.U. Bergmeyer, toim.), ss. 511-512. Academic Press, Inc. New York, 1974
14. BIRD, J.W.C.: Skeletal muscle lysosomes. Kirjassa: *Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 4*, (J.T. Dingle, R.T. Dean, toim.), ss. 75-109. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1975
15. CHRISTIE, K.N., STOWARD, P.J.: A cytochemical study of acid phosphatases in dystrophic hamster muscle. *J. Ultrastruct. Res.* 58, 219-234 (1977)

16. CULLEN, M.J., APPLEYARD, S.T., BINDOFF, L.: Morphologic aspects of muscle breakdown and lysosomal activation. *Ann. NY Acad Sci.* 317, 440-464 (1979)
17. DEAN, R.T., BARRET, A.J.: Lysosomes. *Kirjassa: Essays in Biochemistry, Vol. 12*, (P.N. Campbell, N.N. Aldridge, toim.), ss. 1-40. Academic Press, Inc., London, New York, San Francisco, 1976
18. DELAGE, R.J., SMITH, E.L.: Leucine Aminopeptidase and Other N-Terminal Exopeptidases. *Kirjassa: The Enzymes, Vol. III*, (P.D. Boyer, toim.), ss. 81-118. Academic Press, Inc., New York, 1971
19. DIGIESI, V., NASSI, P., CICCHI, P., CASTIGLI, E., RAMPONI, G., ARCANGELI, P.: Changes in enzyme levels in human skeletal muscle during obstructive arteriopathy of the lever limbs. *Angiology.* 26, 511-517 (1975)
20. FARBER, J.L.: Irreversible Ischemic Cell Injury. *Am. J. Pathol.* 92, 713-732 (1978)
21. FIDZIANSKA, A., STRUGALSKA, H., BADURSKA, B.: Histochemical and ultrastructural studies of the rat muscle after denervation. *Folia Histochem. Cytochem.* 12, 321-328 (1974)
22. FISHMAN, W.H.: Beta-glucuronidase. *Kirjassa: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 2*, (H.U. Bergmayer, toim.), ss. 929-942. Academic Press, Inc., New York, 1974
23. GETZEN, L.C., CARR III, J.E.: Etiology of anterior tibiae compartment syndrome. *Surg. Gynec. Obstet.* 125, 347-350 (1967)
24. GOLDSPIK, D.F.: The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 156, 71-80 (1976)

25. GOLLNICK, P.D., ARMSTRONG, R.B., SEMBROWICH, W.L., SHEPHERD, R.E., SALTIN, B.: Glycogen depletion pattern in human skeletal muscle fibers after heavy exercise. *J. Appl. Physiol.* 34, 615-618 (1973)
26. GOLLNICK, P.D., KING, D.W.: Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* 216, 1502-1509 (1969)
27. GRANIT, R.: The basis of motor control. Academic Press, Inc., New York, London, 1970
28. GREENBAUM, L.M.: Cathepsins and Kinin-Forming and -Destroying Enzymes. Kirjassa: The Enzymes, Vol. III, (P.D. Boyer, toim.), ss. 475-483. Academic Press, Inc., New York, 1971
29. GUTMANN, E., LOJDA, Z., TEISINGER, J.: Changes in acid phosphatase activity of fast and slow rat muscles during ontogenic development. *Histochemistry.* 49, 227-236 (1976)
30. HEISTAD, D.D., ABOUD, F.M.: Circulatory adjustments to hypoxia. *Circulation.* 61, 463-470 (1980)
31. HELMINEN, H.J.: The Cellular Mechanisms of Hormonally Induced Tissue Atrophy. Kirjassa: Pathobiology of Cell Membranes, Vol. 1, (B.F. Trump, A.U. Arstila, toim.), ss. 283-323. Academic Press, Inc., New York, San Francisco, London, 1975
32. HIRSIMÄKI, P.: Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. *Jyväskylän yliopiston Biologian laitoksen Tiedonantoja-sarja, No: 23, Jyväskylä 1980*
33. HOLLOZY, J.O., BOOTH, F.W.: Biochemical adaptations to endurance in muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 273-291 (1976)

34. KAINULAINEN, H., VIHKO, V.: Cardiac muscle enzyme activities during the development of exercise induced hypertrophy in mice. Käsikirjoitus 1981
35. KAR, N.C., PEARSON, C.M.: Dipeptidyl peptidases in human muscle disease. Clin. Chim. Acta 82, 185-192 (1978)
36. KEUL, J., DOLL, E., KEPPLER, D.: Energy metabolism of human muscle. S. Karger AG., Basel 1972
37. KÖRGE, P., VIRU, A.: Water and electrolyte metabolism in skeletal muscle of exercising rats. J. Appl. Physiol. 31, 1-4 (1971)
38. MANOLOV, S., OVTSCHAROFF, W.: Ultrastructural changes in the muscle cells of denervated muscles of rat. Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 88, 726-744 (1974)
39. MASKREY, P., PLUSKAL, M.G., HARRIS, J.B., PENNINGTON, R.T.J.: Studies of increased acid hydrolase activities in denervated muscle. J. Neurochem. 28, 403-409 (1977)
40. MAYER, M., AMIN, R., MILHOLLAND, R.J. ROSEN, F.: Possible significance of myofibrillar protease in muscle catabolism. Enzyme activity in dystrophic, tumor-bearing, and glucocorticoid-treated animals. Exp. Mol. Pathol. 25, 9-19 (1976)
41. MAYER, M., AMIN, E., SHAFIR, E.: Rat myofibrillar protease: enzyme properties and adaptive changes in conditions of muscle protein degradation. Arch. Biochem. Biophys. 161, 20-25 (1974)
42. MAX, S., MAYER, R.F., VOGELSANG, L.: Lysosomes and disease atrophy of skeletal muscle. Arch. Biochem. Biophys. 146, 227-232 (1971)

43. MEIJER, A.E.F.H., ISRAEL, D.E.: The increase in activity of acid hydrolases in muscles of rats after subcutaneous administration of dimethyl-para-phenylene diamine. A combined histochemical and biochemical investigation. 1. The histochemical investigation. *Histochemistry*. 61, 81-91 (1979)
44. MILLWARD, D.J., GARLICK, D.J., NNANYELUGO, D.O., WATERLOW, J.C.: The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem. J.* 156, 185-188 (1976)
45. MYCEK, M.J.: Cathepsins. Kirjassa: *Methods in Enzymology*, Vol. XIX, (G.E. Perlman, L. Lorand, toim.), ss. 285-315. Academic Press, Inc., New York, 1970
46. MÄKITIE, J., TERÄVÄINEN, H.: Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. *Acta neuropathol. (Berl.)* 37, 101-110, (1974)
47. LOCKSHIN, R.A., BEAULATON, J.: Programmed cell death. *Life Sci.* 14, 1549-1565 (1974)
48. LUCY, J.A.: Lysosomal membranes. Kirjassa: *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol. 2, (J.T. Dingle, H.B. Fell, toim.), ss. 313-341. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1973
49. LOJDA, Z., GUTMANN, E.: Histochemistry of some acid hydrolases in striated muscle of the rat. *Histochemistry*. 49, 337-342 (1976)
50. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
51. OBERC, M.A., ENGEL, W.K.: Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab. Invest.* 36, 566-577 (1977)

52. PEARSON, C.M., KAR, N.C.: Muscle breakdown and lysosomal activation (Biochemistry). *Ann. NY Acad. Sci.* 317, 465-477 (1979)
53. PILSTRÖM, L., VIHKO, V., ÅSTRÖM, E., ARSTILA, A.U.: Activity of acid hydrolases in skeletal muscle of untrained, trained and detrained mice of different ages. *Acta Physiol. Scand.* 104, 217-224 (1978)
54. POLLACK, M.S., BIRD, J.W.C.: Distribution and particle properties of acid hydrolases in denervated muscle. *Amer. J. Physiol.* 215, 716-722 (1968)
55. REZNIK, M.: Current Concepts of Skeletal Muscle Regeneration. Kirjassa: *The Striated Muscle* (C.M. Pearson, F.K. Mostofi, toim.), ss. 185-225. The Williams & Wilkins Company, Baltimore 1973
56. RUTH, G.R., VAN VLEET, J.F.: Experimentally induced selenium-vitamin E deficiency in growing swine: Selective destruction of type I muscle fibers. *Amer. J. Vet. Res.* 35, 237-244 (1974)
57. SALMINEN, A., HONGISTO, K., VIHKO, V.: Protective role of endurance training in exercise myopathy. *Käsi-kirjoitus* 1981
58. SALMINEN, A., VIHKO, V.: Acid proteolytic capacity in mouse cardiac and skeletal muscles after prolonged submaximal exercise. *Pflügers Arch.* 389, 17-20 (1980)
59. SALMINEN, A., VIHKO, V.: Ultrastructural changes in mouse skeletal muscle after prolonged running. *Käsikirjoitus* 1980
60. SALMINEN, A., VIHKO, V.: Effects of age and prolonged running on proteolytic capacity in mouse cardiac

and skeletal muscles. Acta Physiol. Scand. 112, 89-95 (1981)

61. SALMINEN, A., VIHKO, V.: Exercise myopathy: Selectively enhanced proteolytic capacity in rat skeletal muscle after prolonged running. Käsikirjoitus 1981
62. SALMINEN, A., VIHKO, V.: Julkaisemattomia havaintoja 1981
63. SCHIAFFINO, S., HANZLIKOVA, V.: Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. J. Ultrastruct. Res. 39, 1-14 (1972)
64. SHANNON, A.D., ADAMS, E.P., COURTICE, F.C.: The lysosomal enzymes acid phosphatase and glucuronidase in muscle following a period of ischemia. Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 52, 157-171 (1974)
65. SHANNON, A.D., COURTICE, F.C.: The lysosomal enzyme N-acetyl- β -glucosaminidase in rabbit muscle following a period of ischemia. Pathology 7, 25-33 (1975)
66. SLATER, T.F.: Lysosomes and experimentally induced tissue injury. Kirjassa: Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 1, (J.T. Dingle, H.B. Fell, toim.), ss. 469-492. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1973
67. TAPPEL, A.L.: Lysosomal enzymes and other components. Kirjassa: Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 2, (J.T. Dingle, H.B. Fell, toim.), ss. 207-244. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1973
68. TERJUNG, R.L.: Muscle fiber involvement during training of different intensities and durations. Amer. J. Physiol. 230, 946-950 (1976)
69. TRUMP, B.F., ARSTILA, A.U.: Cellular Reaction to Injury.

Kirjassa: Principles of Pathobiology, (M.F. LaVia, R.B. Hill, Jr., toim.), ss. 9-96. Oxford University Press, New York, 1975

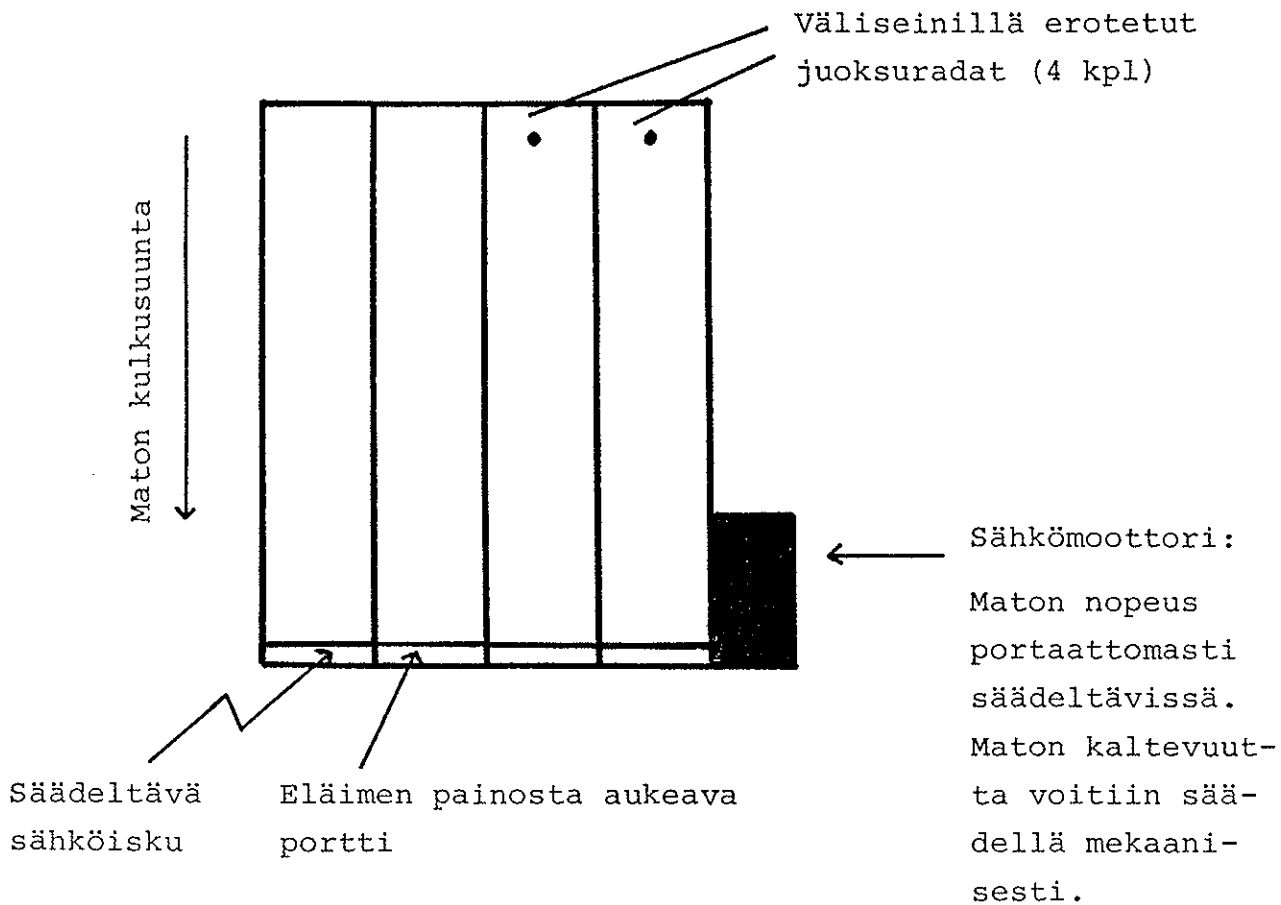
70. TRUMP, B.F., BEREZESKY, I.K., COLLAN, Y., KAHNG, M.W., MERGNER, J.W.: Recent studies on pathophysiology of ischemic cell injury. Beitr. Pathol. 158, 363-388 (1976)
71. TRUMP, B.F., LAIHO, K.A., MERGNER, W.J., ARSTILA, A.U.: Studies on the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. Beitr. Pathol. 152, 243-271 (1974)
72. VIHKO, V.: Response of the lysosomal system of skeletal muscle to exercise. Jyväskylän yliopiston Biologian laitoksen Tiedonantoja-sarja No:23, Jyväskylä 1979
73. VIHKO, V., HIRSIMÄKI, Y., AJIDUAH, A.O.: β -glucuronidase activity in trained red and white skeletal muscle of mice. Eur. J. Appl. Physiol. 39, 255-261 (1978)
74. VIHKO, V., RANTAMÄKI, J., SALMINEN, A.: Exhaustive physical exercise and acid hydrolase activity in mouse skeletal muscle. A histochemical study. Histochemistry 57, 237-249 (1978)
75. VIHKO, V., SALMINEN, A.: Acid hydrolase activities in different skeletal muscles of mice after prolonged running. Käsikirjoitus 1981
76. VIHKO, V., SALMINEN, A., RANTAMÄKI, J.: Acid hydrolase activity in red and white skeletal muscle of mice during a two-week period following exhausting exercise. Pflügers Arch. 378, 99-106 (1978)

77. VIHKO, V., SALMINEN, A., RANTAMÄKI, J.: Oxidative and lysosomal capacity in skeletal muscle of mice after endurance training of different intensities. *Acta Physiol. Scand.* 104, 74-81 (1978)
78. VIHKO, V., SALMINEN, A., RANTAMÄKI, J.: Exhaustive exercise, endurance training, and acid hydrolase activity in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 47 (1), 43-50 (1979)
79. WAKABAYASHI, M.: β -glucuronidases in metabolic hydrolysis. *Kirjassa: Metabolic conjugation and metabolic hydrolysis, Vol. 2, (W.H. Fishman, toim.), ss. 519-602. Academic Press, Inc., New York, 1970*
80. WEINSTOCK, J.M., IODICE, A.A.: Acid hydrolase activity in muscular dystrophy and denervation atrophy. *Kirjassa: Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 1, (J.T. Dingle, H.B. Fell, toim.), ss. 450-468. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1973*
81. ÅSTRAND, P.-O., RODAHL, K.: *Textbook of work physiology. Mc Graw-Hill, New York, 1970*

LIITTEET

1. Juoksumatto ja juoksuohjelman toteutus
2. Koeryhmitys
3. Kuormitusajat
4. Harjoitteluajat
5. Näytteiden preparointi ja säilytys
6. Entsyymien määritysaikataulu
7. Entsyymiaktiivisuuksien mittaaminen
8. Entsyymiaktiivisuuksien ja proteiinipitoisuuden laskeminen
9. Proteiinipitoisuuden määrittäminen
10. Tulosten käsittely
11. Menetelmien arviointi
12. Muuttujien väliset korrelaatiot
13. Happamien hydrolaasien aktiivisuuskuvaajat
(Proteiinimäärään suhteutetut entsyymiaktiivisuudet)
14. Happamien hydrolaasien aktiivisuuskuvaajat ja proteiinipitoisuus
(Märkämpainoon suhteutetut entsyymiaktiivisuudet ja proteiinimäärät)

Liite 1: Koe-eläinten kuormittamiseen ja harjoitteluun käytetty juoksumatto ja vastaavien ohjelmien toteutus.



Ohjelmat:

Kuormitus: - 5 eläintä/rata
- nopeus 20 m/min^{-1}

Harjoittelu: - 8 eläintä/rata
- nopeus 18 m/min^{-1}

Eläimet nosteltiin pyörivälle matolle ja otettiin pois samassa ratajärjestyksessä.

Sama hiirihäkillinen juoksi aina yhdessä samalla radalla.

Liite 2: Eläinten lukumäärät ja merkitseminen eri koeryhmissä. Ryhmä-
jako tehtiin kaksi viikkoa ennen käsittelyn aloittamista.
Harjoittelukertojen lukumäärän suhteen myös kontrollieläimet
jaettiin vastaaviin alaryhmiin kuin harjoittelevat eläimet.

Ryhmä- jako	1.	2.	3.	4.	
K	n=6	n=6	n=6	n=6	-
KK	n=4	n=4	n=4	n=4	-
HK	n=2x8	n=2x8	n=2x8	n=2x8	Yksi piste
HL	n=8	n=8	n=8	n=8	Kaksi pistettä
H	n=8	n=8	n=8	n=8	Rengas

Kukin ryhmä merkittiin omalla värillään:

Ryhmä 1 : Punainen

2 : Sininen

3 : Musta

4 : Vihreä

Harjoittelevat ryhmät tunnistettiin häntämerkistä:

HK : Yksi piste

HL : kaksi pistettä

H : Rengas

Kaikkiaan hiiriä oli 168 ja ne olivat 24 häkissä. Samassa
häkissä oli korkeintaan 8 eläintä.

Koeryhmien jako tehtiin 24.4.1979.

LÄHTEET:

1. FAULKNER, S., WALLER, T.: Försöksdjurkunskap. Almäna Förlaget, Stockholm, 1972
2. NEVALAINEN, T., RYYNÄNEN, A., HÄNNINEN, O.: Koe-eläintieteen kurssimoniste, Kuopio, 1978

Liite 3: Eläinten kuormituksen toteutus

RYHMÄ	PÄIVÄ	KUORMITUS	TAUKO
1.	11.5.1979	53 min, 8.16 - 9.09	10 min, 9.09 - 9.19
		50 min, 9.19 - 10.09	10 min, 10.09 - 10.19
		53 min, 10.19 - 11.12	10 min, 11.12 - 11.22
		50 min, 10.22 - 12.12	
2.	14.5.	50 min, 8.50 - 9.40	10 min, 9.40 - 9.50
		50 min, 9.50 - 7.55	13 min, 10.40 - 10.53
		50 min, 10.53 - 11.43	11 min, 11.43 - 11.54
		50 min, 11.54 - 12.44	
3.	17.5.	50 min, 6.05 - 6.55	10 min, 6.55 - 7.05
		50 min, 7.05 - 7.55	11 min, 7.55 - 8.06
		50 min, 8.06 - 8.56	10 min, 8.56 - 9.06
		50 min, 9.06 - 9.56	
4.	23.5.	50 min, 8.15 - 9.05	10 min, 9.05 - 9.15
		50 min, 9.15 - 10.05	10 min, 10.05 - 10.15
		50 min, 10.15 - 11.05	10 min, 11.05 - 11.15
		50 min, 11.15 - 12.05	

Liite 4: Eläinten harjoittelun toteutus

Pvm.	Ryhmä	1.	2.	3.	4.
8.5.		30 min, 9 - 10	30 min, 10 -11	30 min, 11 - 12	30 min, 12 - 13
9.5.		45 min, 9 - 10	45 min, 10 -11	45 min, 11 - 12	45 min, 12 - 13
10.5.		60 min, 9 - 10	60 min, 10.30 - 11.30	60 min, 12 - 13	60 min, 13.30 - 14.30
11.5.			60 min, 12.30 - 13.30	60 min, 13.45 - 14.45	60 min, 15 - 16
12.5.			60 min, 9.25 - 10.25	60 min, 10.59 - 11.59	60 min, 12.15 - 13.15
13.5.			60 min, 9.24 - 10.24	60 min, 10.38 - 11.38	60 min, 11.48 - 12.48
14.5.				60 min, 12.55 - 13.55	60 min, 14.05 - 15.05
15.5.				60 min, 10.10 - 11.10	60 min, 11.35 - 12.35
16.5.				60 min, 11.15 - 12.15	60 min, 12.55 - 13.55
17.5.					60 min, 10.45 - 11.45
18.5.					60 min, 13.00 - 14.00
19.5.					60 min, 11.13 - 12.13
20.5.					62 min, 9.46 - 10.48
21.5.					60 min, 10.00 - 11.00
22.5.					60 min, 10.50 - 11.50

Liite 5: Lihasnäytteiden preparointi

Työn kulku:

- 1) hiiren tappaminen
- 2) nelipäisen reisilihaksen preparoiminen esiin
- 3) lihaksen punaisen ja valkoisen osan erottaminen
- 4) näytteen punnitseminen
- 5) näytteen jäädytys nestetyössä
- 6) näytteen varastointi tinapaperipakkauksessa -80°C :een
- 7) näytteen homogenointi

	<u>Määrittelyryhmät</u>			
	1.	2.	3.	4.
Hiiriryhmien tappo ja lihasnäytteiden otto:				
H, K	11.5.	14.5.	17.5.	23.5. (1979)
HK, HL, K, KK	15.5.	18.5.	21.5.	27.5.
Lihasnäytteiden syväjäädytysaika (vuorokausia):				
Keskiarvo	27.5	30.5	71.5	72.0
Vaihteluväli	22-33	26-35	67-76	67-77

Määrittelyryhmien pakastusaikaerot (vuorokausia):

Ryhmä	1.	2.	3.	4.
1.	-			
2.	3	-		
3.	44	41	-	
4.	44.5	41.5	0.5	-

Arvot on laskettu ryhmän näytteiden pakastusaikojen keskiarvoista.

Liite 6: Entsyymien aktiivisuusmääritykset

Määrittysryhmä (Harjoittelukertojen lukumäärä)	Koe- päivä	Koe- ja kontrolliryhmien hiiret				Näytemäärä
		HK	H	KH	HL	
1. (3.)	7.6.	21,22	1	9	37	2 x 5
	8.6.	23,24	2		38	2 x 6
	11.6.	25,26,27,28	3,4		39,40	2 x 10
	12.6.	29,30,31,32	5,6	10	41,42	2 x 11
	13.6.	33,34,35,36	7,8		44,46	2 x 10
2. (6.)	14.6.	63,64,65,66	11,12	19	79,80	2 x 11
	15.6.	67,68,69,70	13,14		81,82	2 x 10
	18.6.	71,72,73,74	15,16	20	83,84	2 x 11
	19.6.	75,76	17		85	2 x 6
3. (9.)	27.7.	95,96,97,98	53,54	61	111,112	2 x 11
	30.7.	99,100,101,102	55,56		113,114	2 x 10
	31.7.	103,104,105,106	57,58	62	115,116	2 x 11
	1.8.	107,108,109	59,60		117,118	2 x 9
4. (15.)	2.8.	137,138,139,140	127,128	135	153,154	2 x 11
	6.8.	141,142,143,144	129,130		155,156	2 x 10
	7.8.	145,146,147,148	131,132	136	157,158	2 x 11
	8.8.	149,150,151,152	133,134		159,160	2 x 10
Σ	17	61	8	31	16	2 x 163

Koe-eläimet on numeroitu juoksevasti 1:stä 168:aan. Kontrollihiiret on jaettu harjoittelukertojen mukaisiin määritysryhmiin. Summarivillä on pystysarakkeisiin sisältyvät lukumäärät.

Katepsiini C (dipeptidyylipeptidaasi I), EC 3.4.14.1

Entsyymien määritys:

350 μ l:aan puskuroitua substraattiliuosta lisättiin 50 μ l aktivoivaa reagenssia. Tyhjäkokeisiin lisättiin 0.5 ml 10 % trikloorietikkahapon vesiliuosta. Reagenssiseoksia preinku-
boitiin noin 10 minuuttia 37 °C:ssa vesihauteella.

Reaktio käynnistettiin 100 μ l:lla lihashomogenaattia ja reaktioseoksia inkuboitiin tarkasti noin kaksi tuntia 37 °C:ssa.

Entsyymireaktio pysäytettiin lisäämällä reaktioseoksiin 0.5 ml 10 % jääkylmää trikloorietikkahappoa. Seoksien annettiin seisoa jäähauteella noin puoli tuntia, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin (Heraeus Christ Labofuge -pöytäsentrifuugi) 10 - 15 minuuttia nopeudella 4600 kierrosta minuutissa.

Värireaktiota varten pipetoitiin uusiin koeputkiin 0.5 ml kirkasta supernatanttia.

Tähän lisättiin 0.5 ml 0.1 % natriumnitriittiä, jonka annettiin reagoida tasan kolme minuuttia.

Seokseen lisättiin edelleen tarkasti ajoittaen 0.5 ml 0.5 % ammoniumamidosulfonaattia, joka sai reagoida tasan kaksi minuuttia.

Tämän jälkeen reaktioseokseen lisättiin 1.0 ml N-l-naftyylietyleenidiamiinin etanoliliuosta.

Väriin annettiin kehittyä ja stabiloitua 30 minuuttia, jonka jälkeen sen intensiteetti mitattiin 580 nanometrillä aallonpituudella (181 Hitachi Uv-Vis -spektrofotometri).

Beta-naftyyliamiinistandardin perusteella havaittiin värin määrän kasvavan käytetyllä konsentraatioalueella lineaarisesti pitoisuuden funktiona. Vakiokuvaajan perusteella muutettiin absorbanssilukemat entsyymiaktiivisuusyksiköiksi. Aktiivisuudet ilmoitettiin pikomooleina minuutissa hydrolysoitua substraattia milligrammaa lihaksen märkääpainoa kohti.

Substraattiliuos

3.83 mg Gly-Phe-betanaftyylimidia / 100 µl dimetyylisulfoksidia + 0.9 ml 2 mM suolahappoa. Reagenssi liukeni täydellisesti DMSO:iin, mutta HCl lisäyksen jälkeen jäi sameaksi. Tämä kantaliuos pakastettiin päivittäisissä käyttöerissä. Ennen käyttöä kantaliuos puskuroitiin lisäämällä 1 ml:aan kantaliuosta 14 ml 0.1 M Kalium-Natriumfosfaattipuskuria pH 6.0.

Reagenssit:

Gly-L-phe-beta-naphthyl amide, Vega Biochemicals, Tucson.

Dimethylsulfoxid (DMSO), C₂H₆OS, Fur die Gas-Chromatographie, Merck.

Aktivoiva reagenssi

50 mM 2-Merkaptoetyyliamiini liuotettuna 0.1 M Kalium-Natrium-fosfaattipuskuriin pH 6.0. (142 mg / 25 ml).

Reagenssit:

2-Mercaptoethylamine HCl, Koch-Light Laboratories, England, pure.

"NED - reagenssi"

0.5 mg N-1-naftylylietyleenidiamiinia liuotettiin 1 ml:aan 95 % etanolia.

Reagenssit:

N-1-naphthyl-ethylenediamine di HCl, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

Abs. 99.5 %, ALKO.

Natriumnitriittiliuos

Valmistettiin 0.1 % (w/v) natriumnitriitin vesiliuos. (100 mg / 100 ml). -

Reagenssit:

NaNO₂, p.a., Merck.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

Ammoniumamidofosfaattiliuos

Valmistettiin 0.5 % ammoniumamidofosfaatin vesiliuos.
(500 mg / 100 ml).

Reagenssit:

Ammoniumamidofosfaatti, $\text{H}_2\text{NSO}_3\text{NH}_4$, p.a., Merck.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

Pysäytysliuos

Valmistettiin 10 % (w/v) trikloorietikkahapon vesiliuos
(10 g / 100 ml).

Reagenssit:

Trichloressigsäure, CCl_3COOH , p.a., Merck.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

Kalium-Natriumfosfaattipuskuri

Valmistettiin fosfaattisuoloista 0.1 M vesiliuos ja säädettiin mittarilla pH 6.0:ksi. PH:n säätöön käytettiin HCl:ää ja NaOH:ta. (KH_2PO_4 13.609 g / l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 17.799 g / l). Ekvivalentit tilavuudet liuoksia sekoitettiin keskenään ja tarkistettiin pH.

Reagenssit:

Kaliumdihydrogenfosfaat, KH_2PO_4 , p.a., Merck.

di-Natriumhydrogenfosfaat - 2 - hydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, p.a., Merck.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

NED -reagenssi valmistettiin tarvittaessa ja käytettiin tuoreena. Muita liuoksia valmistettiin puolta koesarjaa varten kerrallaan.

Beta-naftyylimiinistandardi

0.5 mM 2-Naftyylimiinin kantaliuoksesta valmistettiin laimennussarja välille 0.72 μg / ml - 21.6 μg / ml. Tällöin absorbanssit olivat 0.020 - 0.675. Käytettiin tislattuun veteen tehtyjä liuoksia, joissa olivat mukana samat komponentit kuin reaktioseoksissakin. Tulosten perusteella laskettiin regressiosuora.

Katepsiini D (Katepsiini), EC 3.4.23.5

Entsyymien määrittäminen:

Jokaisesta mitattavasta näytteestä tehtiin kaksoismäärittäminen ja lähtötason suuruus mitattiin tyhjäkokeen avulla.

Entsyymireaktio aloitettiin pipetoimalla 100 µl 2 % (w/v) lihashomogenaattia 300 µl:aan denaturoitua, puskuroitua, 3 min 37 °C:ssa preinkuboitua hemoglobiinisubstraattiliuosta pH 3.8.

Tarkasti noin 90 minuutin 37 °C:ssa inkuboinnin jälkeen entsyymireaktio pysäytettiin sekoittamalla nopeasti reaktioseokseen 400 µl:aa jääkylmää 10 % (w/v) trikloorietikkahapon vesiliuosta.

Tyhjäkokeeseen lisättiin lihashomogenaatti pysäytysreagenssin jälkeen. Näytteiden inkuboinnin ajan olivat pysäytetyt tyhjäkoeket jää-vesihauteella. Reaktioiden pysäytyksen jälkeen käsiteltiin tyhjäkokeita samoin kuin vastaavia näytteitä.

Reaktioseosta pidettiin jäissä 20 - 30 minuuttia ja sentrifugoitiin laboratoriosentrifuugilla 15 minuuttia nopeudella 3500 kierrosta minuutissa.

Värireaktio aloitettiin lisäämällä 400 µl:aan supernatanttia 2.5 ml alkaalista kuparireagenssia. Kymmenen minuutin kuluttua lisättiin reaktioseokseen 250 µl:aa laimennettua Folin-Ciocalteun kaupallista fenolireagenssia (1 osa reagenssia + 2 osaa vettä).

Väriintensiteetti mitattiin 30 minuutin kuluttua 700 nm:n aallonpituudella (181 Hitachi Uv-Vis -spektrofotometri).

Absorbanssilukemat muutettiin tyrosiinistandardin avulla entsyymiaktiivisuusyksiköiksi. Käytetyllä konsentraatioalueella väriintensiteetin ja pitoisuuden välillä oli lineaarinen riippuvuussuhde. Standardisuoraan perustuen ilmoitettiin entsyymiaktiivisuus pikomolekula 37 °C:ssa minuutin aikana liuenneita tyrosiiniekvivalentteja milligrammaa lihaksen märkää painoa kohti.

Denaturoitu hemoglobiinisubstraatti

2.0 g hemoglobiinia suspendoitiin n. 50 ml:ssa vettä, Erlenmeyerpullossa olevaan seokseen lisättiin 36 g ureaa ja 8 ml:aa 1 N natriumhydroksidia (NaOH 4 g / 100 ml H₂O). Proteiinin denaturoimiseksi seos sai seisoa 30 - 60 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen seokseen lisättiin 10 ml boorihappoliuosta (6.184 g boorihappoa + 0.292 g natriumkloridia). Ravistelun jälkeen lisättiin 4.4 ml 5 % (w/v) kalsiumkloridiliuosta (5 g CaCl₂ / 100 ml). Liuos laimennettiin vedellä 100 ml:ksi ja sentrifugoitiin 15 minuuttia kiihtyvyydellä 4000 G. 0.1 N asetaattipuskuriin pH 3.8 sekoitettiin ekvivalentti tilavuus substraattiliuosta ja säädettiin liuoksen pH 3.8:aan. Liuos pakastettiin sopivissa käyttöerissä ja sitä valmistettiin riittävä määrä puolta koesarjaa varten.

Pysäytysliuos

Valmistettiin 10 % (w/v) trikloorietikkahapon vesiliuos (10 g / 100 ml).

Alkaalinen kuparireagenssi

Liuos A: 1.0 g trinatriumsitraattia ja 0.5 g kuparisulfaattia
5 H₂O liuotettiin 100 ml:aan tislattua vettä.

Liuos B: 16.0 g natriumhydroksidia ja 50 g natriumkarbonaattia
liuotettiin 500 ml:aan tislattua vettä.

Käyttöliuos valmistettiin sekoittamalla 20 ml:aan B-liuosta
80 ml:aa laimennettua A-liuosta (1 osa A-liuosta + 79 osaa tislattua vettä).

Fenolireagenssi

Folin-ciocalteun kaupallinen fenolireagenssi laimennettiin tislattulla vedellä (1 osa reagenssia + 2 osaa vettä).

Tyrosiinistandardi

L - tyrosiinin kantaliuoksesta (200 nmol/0.4 ml tislattua vettä) valmistettiin laimennussarja välille 20 - 200 nmol / 0.4 ml. Vastaavat absorbanssilukemat olivat tällöin 0.075 - 0.502. Laimennoksen lisäksi reaktioseoksissa olivat mukana kaikki jatkoreaktion komponentit ja työtapa oli sama kuin varsinaisissa analyyseissä. Tulosten perusteella laskettiin vakiokuvaajan regressiosuora, koska väri-intensiteetin ja pitoisuuden välinen riippuvuus näytti käytetyllä konsentraatioalueella lineaariselta.

Reagenssit:

L-tyrosin, puriss., Fluka.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

Beta-glukuronidaasi, EC 3.2.1.31

Entsyymien määrittäminen:

450 µl:aan 0.1 N asetaattipuskuria pH 4.2 lisättiin 50 µl 2 % (w/v) lihashomogenaattia. Seosta preinkuboitiin 5 minuuttia 37 °C:ssa.

Entsyymireaktio aloitettiin pipetoimalla vesihauteella oleviin koeputkiin 250 µl 5 mM p-nitrofenyyli-beta-D-glukuronidin vesiliuosta. Substraatti lisättiin ajoittaen ja reaktioseosta inkuboitiin tarkasti noin 18 tuntia 37 °C:ssa. Tällöin entsyymien hydrolyysitoiminnan vaikutuksesta glukuronihappoon konjugoituneena ollut 4-nitrofenoli vapautui liuokseen.

Reaktio pysäytettiin lisäämällä seokseen 1.5 ml 0.1 M jääkylmää glyseriinipuskuria pH 10.8. Samalla koeputket siirrettiin jää-vesihauteelle. Glysiinipuskurin lisäyksen vaikutuksesta reaktioseoksen pH nousi jyrkästi beta-glukuronidasiin optimaaliseen ulkopuolelle ja entsyymi inaktivoitui. Alhainen lämpötila tehosti happamuusmuutoksen aiheuttamaa inhibiitiota. Pysäytysreagenssi lisättiin ajoittaen ja samalla huomioitiin entsyymireaktion tarkka kesto-aika.

Jokaisessa määrittämissarjassa oli aina yksi tyhjäkoe kutakin näytteestä tehtyä kaksoismäärittäystä kohti. Tyhjäkokeeseen lisättiin glysiinipuskuri ennen substraattia ja pysäytettyä reaktioseosta inkuboitiin normaalisti vesihauteella.

Pysäytyksen jälkeen reaktioseoksia sentrifugoitiin 10 minuuttia (Heraeus Christ Labofuge -pöytäsentrifuugi) nopeudella 3000 kierrosta minuutissa.

4 -nitrofenolin molaarinen ekstinktiokerroin pH:ssa 10-11 on 420 nanometrillä aallonpituudella noin 18000 (12). Supernatanteissa olevan p -nitrofenolin määrä saatiin selville mittaamalla liuoksen ekstinktio 420 nanometrillä aallonpituudella tislattua vettä vastaan ja vähentämällä lukemasta tyhjäkokeen aiheuttama epäspesifinen absorbanssi. Mittaus suoritettiin spektrofotometrillä (181 Hitachi Uv-Vis).

Absorbanssilukemat muutettiin p -nitrofenolistandardin avulla entsyymiaktiivisuusyksiköiksi. Aktiivisuus ilmoitettiin pikomooleina minuutissa hydrolysoitua substraattia milligrammaa lihaksen märkätainoa kohti.

Substraattiliuos

Valmistettiin 5 mM p-nitrofenyyli-beta-D-glukuronidin vesiliuos (17.1 mg / 10 ml).

Reagenssit:

p-nitrophenyl-beta-D-glukuronide, Sigma.

Tislattu vesi, Biologian laitos, Jyväskylä.

Asetaattipuskuri

Valmistettiin 0.1 N asetaattipuskuriliuos pH 4.2 etikkahaposta ja natriumasetaatista (0.1 N CH_3COOH : 5.7 ml jääetikkaa / 1000 ml tislattua vettä, 0.1 N CH_3COONa : 8.204 g / 1000 ml tislattua vettä). Sekoitettiin 76.1 ml etikkahappoliuosta ja 23.9 ml natriumasetatiliuosta, jolloin liuoksen pH:ksi tuli 4.2. Happamuus tarkistettiin pH-mittarilla ja säädettiin tarvittaessa oikeaksi.

Glysiinipuskuri

Liuos A: Liuotettiin 7.507 g glysiiniä ja 5.844 g natriumkloridia 1000 ml:aan tislattua vettä.

Liuos B: Valmistettiin 0.1 M natriumhydroksidin vesiliuos (4 g NaOH / 1000 ml).

Käyttöliuos valmistettiin sekoittamalla 52.2 ml A-liuosta ja 47.8 ml B-liuosta, jolloin liuoksen pH:ksi tuli 10.8. Happamuus tarkistettiin ja säädettiin tarvittaessa oikeaksi.

Jos homogenaatit on tehty puskuriin, lisätään näytteisiin detergentiksi Triton X-100-liuosta. (1 ml:aan homogenaattia lisätään 10 μl 10 % (v/v) Triton X-100:aa). (76,80).

Jos homogenaatit on tehty veteen, detergenttiä ei tarvita. (48).

p -Nitrofenolistandardi

Laskuperusteena käytettiin tietoa, jonka mukaan 10.5 nanomoolia p-nitrofenolia / ml aiheutti 0.15 suuruisen absorbanssi-muutoksen 420 nm:n aallonpituudella mitattuna.

Hapan ribonukleaasi (Ribonukleaasi II), EC 3.1.4.23

Entsyymin määrittäminen:

0.35 ml:aan 0.16 N asetaattipuskuria pH 5.0 lisättiin 0.050 ml 2 % (w/v) lihashomogenaattia. Seosta preinkuboitiin noin 10 minuuttia 37 °C:ssa.

Jää-vesihauteella oleviin tyhjäkokeisiin lisättiin asetaattipuskurin ja lihashomogenaatin jälkeen 0.5 ml jääkylmää pysäytysliuosta.

Entsyymireaktio käynnistettiin lisäämällä ajoittain reaktioseoksiin 0.100 ml 37 °C:ssa temperoitua substraattia. Samanaikaisesti lisättiin substraatti pysäytettyihin, jäähauhteella oleviin näytteitä vastaaviin tyhjäkokeisiin.

Reaktioseoksia inkuboitiin tarkasti 15 - 18 tuntia 37 °C:ssa vesihauteella. Haihtumisen välttämiseksi käytettiin suljettuja koeputkia. Tyhjäkokeita säilytettiin inkuboinnin ajan kylmäkaapissa +4 °C:ssa jää-vesihauteella.

Reaktioseoksia pysäytettiin lisäämällä reaktioseoksiin ajoittain 0.5 ml jääkylmää pysäytysliuosta.

Pysäytyksen jälkeen reaktioseokset saivat olla noin 10 minuuttia jäissä, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin. Sentrifugointiaika oli noin 10 minuuttia nopeudella 4600 kierrosta minuutissa (Heraeus Christ Laboguge -pöytäsentrifuugi).

Kirkkaat supernatantit laimennettiin 1:3 lisäämällä 0.1 ml:aan supernatanttia 2.9 ml tislattua vettä.

Sekoituksen jälkeen mitattiin laimennuksessa olevien oligoribonukleotidien määrä. Määrittäminen tehtiin mittaamalla liuoksen aiheuttama absorbanssi 260 nanometrin aallonpituudella. Ekstinktio mitattiin spektrofotometrillä (Hitachi 100-40).

Mononukleotideille määritetty molaarinen ekstinktiokerroin 8.5×10^6 . Lambert-Beerin lakiin perustuen muutettiin absorbanssilukemat entsyymiaktiivisuusyksiköiksi.

Aktiivisuudet ilmoitettiin pikomoleina 37 °C:ssa minuutin aikana vapautuneita happoliukoisia oligonukleotidifragmentteja milligrammaa lihaksen märkätainaa kohti.

RNA -substraatti

RNA liuotettiin 0.6 % (w/v):ksi liuokseksi 0.16 M natriumasettaattipuskuriin pH 5.0. Saatua RNA -liuosta dialysoitiin 48 tuntia samaa puskuria vastaan +4 °C:ssa. Dialysoitu substraattiliuos pakastettiin sopivissa käyttöerissä ja säilytettiin -20 °C:ssa.

Reagenssit:

RNA, purum, Fluka AG, Switzerland.

Dialyysikalvo, 1-8 / 32", Medicell International Ltd, London.

Natriumasettaattipuskuri

Natriumasetaatista ja etikkahaposta valmistettiin 0.16 M puskuriliuos pH 5.0. Liuos valmistettiin sekoittamalla pH-mittarilla 0.16 M natriumasetaattia ja etikkahappoa keskenään (NaCH₃COO: 13.125 g / l, CH₃COOH: 9.608 g / l eli 9.150 ml / l). Liuokset valmistettiin tislattuun veteen.

Reagenssit:

Natriumasetaatti, NaCH₃COO, p.a., Merck.

Etikkahappo, CH₃COOH, 100 %, p.a., Merck.

Pysäytysliuos

10 % (w/v) perkloorihappoliuos valmistettiin tislattuun veteen. Liuokseen lisättiin uranyliasetaattia 0.25 % (w/v):ksi pitoisuudeksi.

Reagenssit:

Perkloorihappo, HClO₄, 70 %,

Uranyliasetaatti, (CH₃COO)₂UO₂ x 2H₂O, p.a., Merck.

Liite 8: Entsyymiaktiivisuuden ja proteiinipitoisuuden laskeminen

Dipeptidyylipeptidaasi I (Katepsiini C):

$$\frac{0.025}{0.213} \times \frac{\Delta E}{\text{min}} \times 10^6 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

Katepsiini D (Katepsiini):

$$\frac{100}{0.257} \times \frac{\Delta E}{\text{min}} \times 10^3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

Beta-glukuronidaasi:

$$\frac{10.5 \times 2.250}{0.15} \times \frac{\Delta E}{\text{min}} \times 10^3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

Hapan ribonukleaasi (Ribonukleaasi II):

$$\frac{30}{8.5} \times \frac{\Delta E}{\text{min}} \times 10^6 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

Proteiinipitoisuus:

Vakiokuvaajalta saatu arvo x 5 µg proteiinia / mg lihaksen
märkápainoa kohti.

50 µl pakastettua (-20 °C) 2 % (w/v) lihashomogenaattia liuotettiin 200 µl:aan 1 N NaOH:a +40 °C:ssa 60 minuutin ajan. "Hydrolysaatti" laimennettiin lisäämällä 50 µl:aan liuosta 450 µl tislattua vettä. Laimennoksesta määritettiin sen proteiinimäärä.

Määrittäminen aloitettiin lisäämällä 0.5 ml:aan näytettä 2.5 ml alkaalista kuparisuolaliuosta. Liuos sekoitettiin hyvin ja sen annettiin seisoa vähintään 10 minuuttia huoneen lämpötilassa.

Liuokseen lisättiin 250 µl tislattulla vedellä 1:2 laimennettua Folinin fenolireagenssia. Reagenssin lisäyksen jälkeen liuos sekoitettiin 1 - 2 sekunnin kuluessa. Tämän jälkeen liuos sai seisoa vähintään 30 minuuttia huoneen lämpötilassa.

Värin intensiteetti mitattiin spektrofotometrillä 700 nanometrin aallonpituudella (Hitachi 100-40).

Vakiokuvaaja tehtiin härän seerumin albumiinista (BSA). Määrittämissuhteet olivat samat kuin vastaavien näytteiden proteiinimäärien mittauksessa. Albumiinistandardi oli mukana jokaisessa "hydrolysoidussa" määrittäyserässä.

Proteiinistandardin perusteella ilmoitettiin näytteiden proteiinipitoisuus µg:na albuminiekvivalentteja mg lihaksen märkätainoa kohti.

Alkaalinen kuparisuolaliuos

Liuos valmistettiin päivittäin sekoittamalla keskenään 50 ml 0.1 N natriumhydroksidin vesiliuokseen tehtyä 2 % (w/v) natriumkarbonaattiliuosta ja 1 ml 0.5 % (w/v) kuparisulfaattia 1 % (w/v) kaliumtartraattiliuoksessa. Kuparisuolaliuos valmistettiin sekoittamalla keskenään suhteessa 1:2 (1 osa + 1 osa) 1 % kuparisulfaatin vesiliuosta ja 2 % kaliumtartraatin vesiliuosta.

Alkaalinen natriumkarbonaattiliuos

Valmistettiin vesiliuos, joka oli 2 % (w/v) natriumkarbonaatin suhteen ja 0.1 natriumhydroksidin suhteen (40 g NaCO_3 + 8 g NaOH / 2000 ml H_2O).

Kuparisulfaattiliuos

Valmistettiin 1 % (w/v) kuparisulfaatin vesiliuos (0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / 50 ml H_2O).

Kaliumtartraattiliuos

Valmistettiin 2 % (w/v) kaliumtartraatin vesiliuos (1.0 g $\text{K}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ / 50 ml H_2O).

Folin-Ciocaltean fenolireagenssi

Reagenssi valmistettiin tarvittaessa sekoittamalla kaupallista valmistetta (Merck) tislattuun veteen tilavuussuhteessa 1:2 (1 osa + 1 osa).

Vakiokuvaaja

Testattiin pitoisuuden ja pitoisuusmittarin välinen riippuvuus. Härän seerumin albumiinista (Bovine serum albumin, Sigma) tehtiin proteiinimäärän ja vastaavan väri-intensiteetin välisen riippuvuuden vakiokuvaaja alueelle 10, 30, 50, 70 mikrogrammaa (μg). Kantaliuos valmistettiin 1 N natriumhydroksidin vesiliuokseen ja laimennosten NaOH-pitoisuus pidettiin vakiona (0.08 N). Tämä oli sama kuin näytehydrolysaatin

normaalisuus ennen alkaalisen kuparisuolaliuoksen lisääystä. Natriumhydroksidipitoisuuden vakioiminen kasvatti hiukan absorbansseja aikaisempaan tekotapaan verrattuna. Riippuvuus pysyi samanlaisena kuin aikaisemmin.

Kantaliuos: 100 mg / 50 ml 1 N NaOH

10 µg ; 0.5 ml	kantaliuosta	+ 7 ml	0.5 N NaOH	+ 42.5 ml	H ₂ O
30 µg ; 1.5 ml	"	+ 5 ml	"	+ 43.5	"
50 µg ; 2.5 ml	"	+ 3 ml	"	+ 44.5	"
70 µg ; 3.5 ml	"	+ 1 ml	"	+ 45.5	"

Absorbanssit mitattiin 55 minuutin kuluttua fenolireagenssin lisäyksestä.

Proteiinilaimennokset pakastettiin (-20 °C) ja sulatettiin vastaavan määrityssarjan yhteydessä. Näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin 16 erässä.

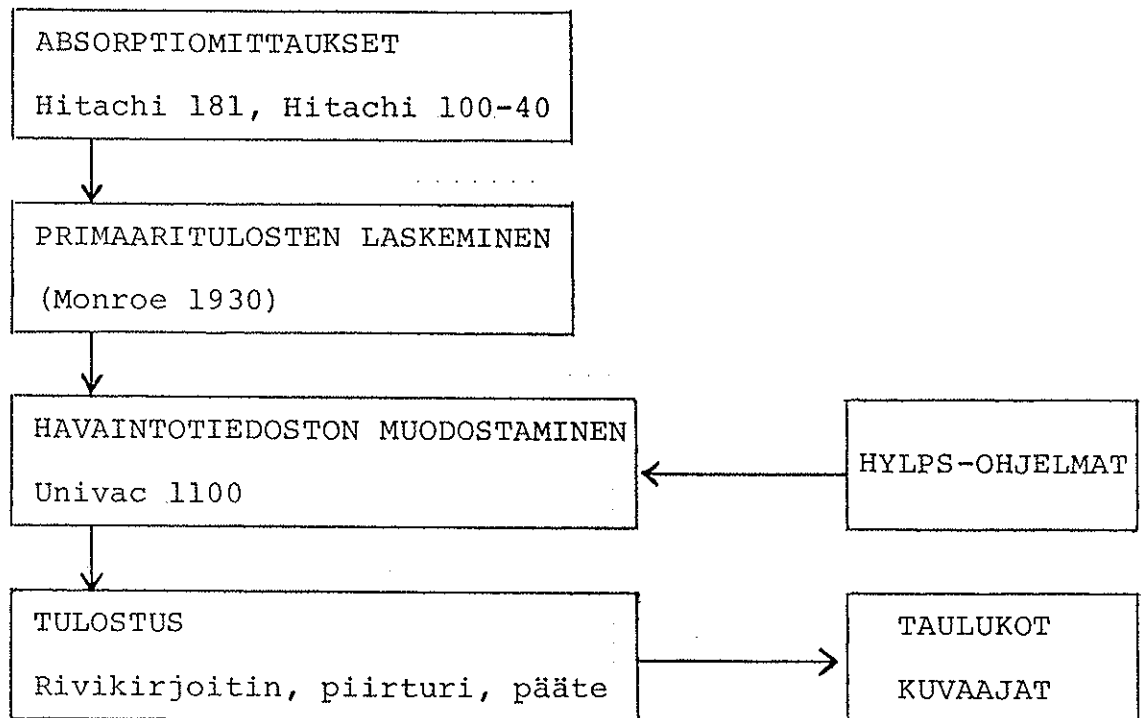
Proteiinipitoisuuden ja värireaktion välinen kuvaaja ei ollut täysin suoraviivainen.

1 N Natriumhydroksidiliuos

Valmistettiin 1 N natriumhydroksidin vesiliuos (20 g NaOH / 500 ml H₂O).

0.5 N Natriumhydroksidiliuos

Reagenssi valmistettiin Titrisol-liuoksesta ohjeen mukaan.



1. T i e d o s t o n k ä s i t t e l y

1.1. Havaintomäärien keskiarvojen ja keskihajontojen laskeminen

Havaintoaineiston luokittelu:

- koe- ja kontrolliryhmien mukaan (K, KK, H, HL, HK)
- harjoittelukertojen mukaan (3, 6, 9, 15)

Ryhmittäin tulostettiin:

- havaintojen lukumäärät (N)
- keskiarvot (M)
- keskihajonnat (D)

Työ tehtiin ohjelmilla: KH16, KH19, KH20, KH22 ja KH23

1.2. Tilastollinen testaus

t-testi:

-ryhmien välillä

Yksi- ja kaksisuuntainen varianssianalyysi:

-ryhmittelymuuttujien suunnassa

Ryhmittäinen tulostus:

-havaintojen lukumäärä (N)

-keskiarvot (M)

-keskihajonnat (D)

Muuttujakohtainen tulostus:

-ryhmien väliset t-arvot vapausasteineen

-varianssianalyysin tulostuksena merkitsevyytaso prosenteissa ja nollahypoteesin hylkäämisriski

Työ tehtiin ohjelmalla KH5

1.3. Muuttujien välinen korrelaatio

Korrelaatiokertoimien lukuarvot:

-ryhmitetystä aineistosta

-kaikkien havaintojen perusteella

Ryhmitetystä aineistosta ja koko aineistosta:

-havaintomäärät (N)

-keskiarvot (M)

-keskihajonnat (D)

Työ tehtiin ohjelmalla KH11

1.4. Muuttujien välinen korrelaatio graafisesti

Tulostuksessa käytettiin

- rivikirjoitinta
- piirturia
- päättettä

Työ tehtiin sekä ohjelmalla KH12 että laskentakeskuksen piirturiohjelmilla.

1.5. Entsyymiaktiivisuuksien laskeminen proteiininimääriä

kohti

$$\text{Kaava: } \frac{X \text{ mol}}{l \text{ min} \cdot V \text{ ml}} \cdot \frac{0.5 \text{ ml}}{2 \cdot y \text{ } \mu\text{g } \%} \quad \left[X \text{ mol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1} \right]$$

Missä: X mol on moolin kerrannainen
 V ml on reaktioseoksen tilavuus
 l min, 0.5 ja 2 ovat vakioita
 $\mu\text{g } \%$ on proteiinipitoisuusyksikkö

Esim. Beta-glukuronidaasi:

$$\frac{29.17}{0.750} \cdot \frac{0.5}{2 \cdot 19.96} = 0.487$$

$$\left[\text{pmol min}^{-1} \mu\text{g prot}^{-1} \right]$$

$$\left[\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1} \right]$$

$$\left[\text{U min}^{-1} \right]$$

Ryhmittäin tulostettiin:

- havaintomäärät (N)
- keskiarvot (M)
- keskihajonnat (D)

Työ tehtiin ohjelmalla KH25

1.6. Kontrolliryhmien uudelleenryhmittely

Kontrollieläimet jaettiin harjoitteluryhmiä vastaaviin määritysryhmiin.

Ryhmittäin tulostettiin:

- havaintomäärät (N)
- keskiarvot (M)
- keskihajonnat (D)

Työ tehtiin ohjelmilla: KH26, KH27, KH28 ja KH29

1.7. Muuttujien välinen korrelaatio

Proteiinipitoisuutta kohti ilmaistuja aktiivisuusarvoja käyttäen laskettiin muuttujien välisten korrelaatiokertoimien lukuarvot.

Työ tehtiin ohjelmalla KH37

1.8. t-testi

Proteiinipitoisuutta kohti ilmoitettujen aktiivisuusarvojen mukaiset ryhmien väliset t-arvot laskettiin vapausasteineen.

Lisäksi tulostettiin:

- havaintomäärät (N)
- keskiarvot (M)
- keskihajonnat (D)

Työ tehtiin ohjelmalla KH40

1.9. Vaihtelukerroin

Laskettiin kullekin entsyymille keskihajonnan ja keskiarvon suhde sekä ryhmittäin että koko aineistossa.

Työ tehtiin ohjelmilla: KH33, KH34, KH35 ja KH36

2. P r o s e n t t i m u u t o s t e n l a s k e m i n e n

Harjoittelemattomien eläinten kuormituksen jälkeinen prosentuaalinen aktiivisuusmuutos laskettiin kaavasta:

$$\frac{KK - K}{K} \times 100$$

Harjoittelun vaikutus kuormituksen jälkeisiin aktiivisuusmuutoksiin laskettiin kaavasta:

$$\frac{HK - HL}{HL} \times 100$$

3, 6, 9 ja 15 harjoittelukerran jälkeen.

Harjoittelun lopettamisen prosentuaalinen vaikutus aktiivisuusmuutoksiin laskettiin kaavasta:

$$\frac{HL - H}{H} \times 100$$

3, 6, 9 ja 15 harjoittelukerran jälkeen.

Harjoittelun prosentuaalinen vaikutus aktiivisuusmuutoksiin laskettiin kaavasta:

$$\frac{H - K}{K} \times 100$$

3, 6, 9 ja 15 harjoittelukerran jälkeen.

Ryhmäsymbolit olivat: K = häkeissä elävä kontrolliryhmä, KK = kuormitettu kontrolliryhmä, H = harjoitellut ryhmä, HL = harjoittelun lopettanut ryhmä ja HK = harjoitellut ja kuormitettu ryhmä.

LÄHTEET:

1. DAWES, E.A.: Quantitative Problems in Biochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1972
2. HYVÄRINEN, A.: Tulosten tarkkuus. Kirjassa: Kliiniset Laboratoriotutkimukset, (A. Hyvärinen, J. Jännes, E. Nikkilä, N.-E. Saris, P. Vuopio, toim.), ss. 81-91. Werner Söderström Osakeyhtiö, Porvoo, 1972
3. KORHONEN, M.: Regressio-varianssi- ja kovarianssianalyysi sekä niiden käyttö HYLPS-ohjelmistossa. Helsingin yliopiston monistuspalvelu, 1979
4. MANNFORS, J.-E.: HYLPS-opas. Tilastomatemattisen tietokoneohjelmiston käyttö. Asiakaspalveluopas. TKK, Offset, Helsinki, 1978
5. MÄKINEN, Y.: Tilastotiedettä Biologeille. Synapsi ry:n kurssimoniste, Turku, 1974
6. VILJANEN, P.: H-ohjauskieli ja sen käyttö. Helsingin yliopiston monistuspalvelu, 1977
7. VILJANEN, P., KULOKARI, H.: HYLPS-ohjelmiston yleiskuvaus. Helsingin yliopiston monistuspalvelu, 1979
8. VÄISÄNEN, M.: Käytön opas 2. HYLPS:n käyttö Jyväskylän yliopistossa. Jyväskylän yliopiston Laskentakeskus, 1979

Lisäksi: Jyväskylän yliopiston Laskentakeskuksen päätepakettiin sisältyviä tidotteita ja HYLPS-käsikirja (1979).

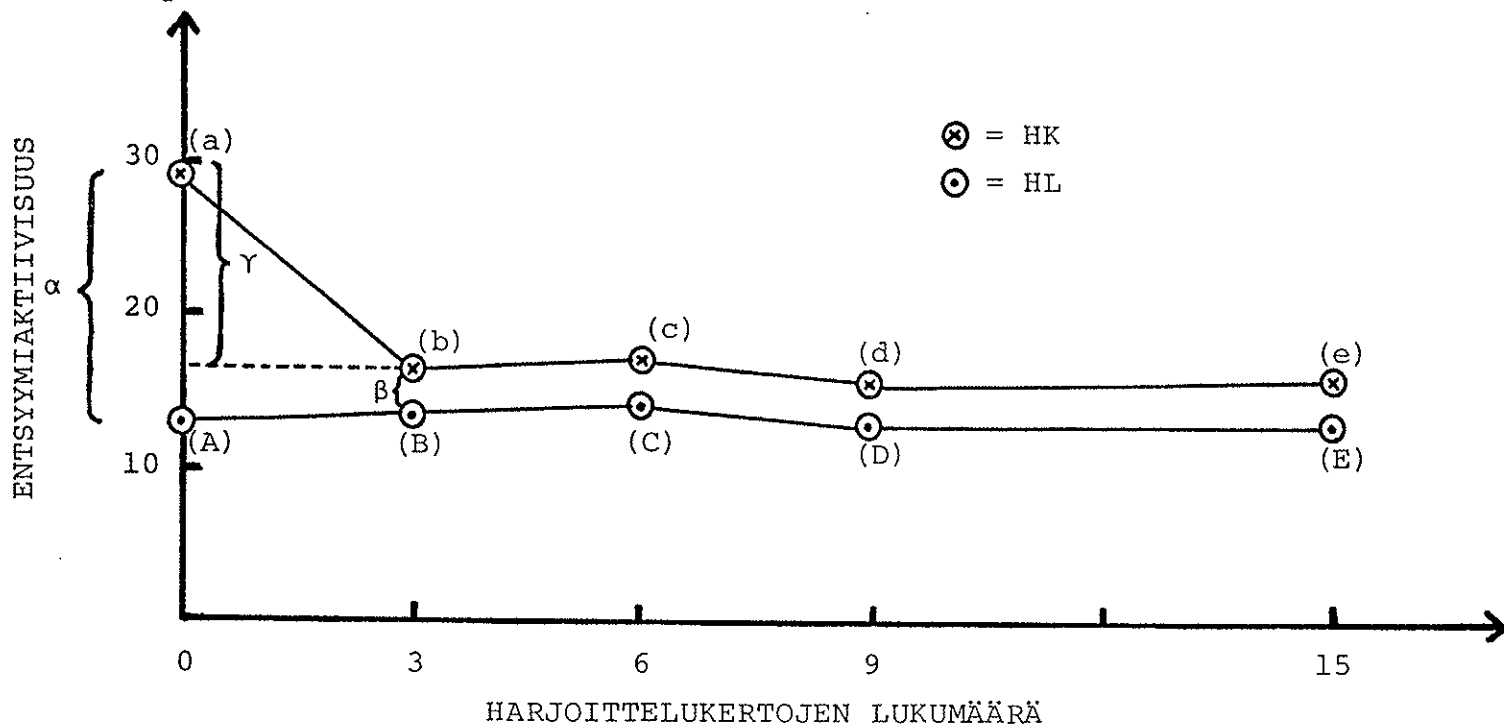
Menetelmällisesti tutkimus jakautui viiteen osavaiheeseen. Nämä olivat: 1) eläinten juoksutus, 2) näytteiden preparointi, 3) näytteiden homogenointi, 4) näytteiden biokemiallinen analysointi sekä 5) tulosten käsittely.

- 1) Happamien hydrolaasien perusaktiivisuudet vaihtelivat koe-eläinkohtaisesti. Eläimet sopeutuivat myös yksilöllisesti fyysiseen kuormitukseen.
- 2) Näytteiden preparointiin kuluva aika vaihteli 6 - 20 minuuttiin. Preparointi tarkoittaa eläimen tappoa, lihasnäytteen ottamista, näytteen punnitsemista ja näytteen nesteytyttämistä. Punainen ja valkoinen lihasnäyte syväjäädytettiin kudospalana. Määritysryhmien välinen pakastusaikaero vaihteli 3 - 44.5 vuorokautteen. Suurin pakastusaikaero, 44 - 44.5 vuorokautta, oli kahden ensimmäisen ja kahden jälkimmäisen määritysryhmän välillä.
- 3) Tarkoituksena oli määrittää näytteiden eräiden lysosomaalisten happamien hydrolaasien kokonaisaktiivisuudet. Lihasnäytteet homogenoitiin jäisinä jääkylmässä tislatussa vedessä. Työmenetelmien vakioimisella pyrittiin homogenointituloksen toistettavuuteen.
- 4) Entsyymien aktiivisuusmääritykset perustuivat pääasiassa Barrettin (1972) esittämiin määritysohjeisiin (10). Proteiinin määrä mitattiin Lowryn ja kumpp. (1951) esittämään menetelmään perustuen (50).
- 5) Aineiston ryhmittely, laskut ja tilastotestit suoritettiin tietokoneella. Osa graafisesta tulostuksesta tehtiin tilastolaskimeen yhdistetyllä piirturilla ja osa kuvista piirrettiin käsin.

Vertailuryhmiä käyttämällä saatiin menetelmävirheet eliminoitua. Muuttujien arvojen vaihtelu johtui tällöin fysiologiasta muuttujasta. Eroavuudet koe-eläinryhmien käsittelyssä vaikuttivat lihaksen fysiologiseen tilaan.

KUVA 1

Beta-glukuronidaasin aktiivisuustasokuvaaja punaisessa lihastyy-
pissä



Harjoituksen vaikutukseksi kuormituksen jälkeiselle aktiivisuustaso-
muutokselle saadaan:

$$\underbrace{a - b}_{\gamma} = \underbrace{(a - A)}_{\alpha} - \underbrace{(b - B)}_{\beta}, \text{ jossa}$$

$\alpha - \beta$ on vertailutasoa käyttämällä saatu aktiivisuusmuutos harjoitusryhmien 0 ja 3 välillä.

γ on edellä mainittujen harjoitusryhmien välinen aktiivisuusmuutos laskettuna HK-ryhmän sisäisen aktiivisuustasovaihtelun perusteella.

Vastaavasti saadaan:

$$a - c = (a - A) - (c - C)$$

$$a - d = (a - A) - (d - D)$$

$$a - e = (a - A) - (e - E)$$

$$b - c = (b - B) - (c - C)$$

$$b - d = (b - B) - (d - D)$$

$$b - e = (b - B) - (e - E)$$

$$c - d = (c - C) - (d - D)$$

$$c - e = (c - C) - (e - E)$$

$$d - e = (d - D) - (e - E)$$

Menetelmien luotettavuuden arvioimiseksi verrattiin keskenään muuttujien absoluuttisia ja suhteellisia arvomuutoksia.

Absoluuttisten ja suhteellisten arvomuutosten välisten erotusten suuruus mittaa menetelmävirheen suuruutta. Suhteellisella mittaustavalla saatu arvomuutos on suurempi, jos erotus on negatiivinen.

PUNAINEN LIHAS

Beta-glukuronidaasi

	0	3	6	9	15
0	-				
3	-1.3	-			
6	-1.5	-0.2	-		
9	-0.2	1.1	1.3	-	
15	-0.1	1.2	1.4	0.1	-

(0.18 ± 1.05)

VALKOINEN LIHAS

Beta-glukuronidaasi

	0	3	6	9	15
0	-				
3	-0.4	-			
6	-1.8	-1.4	-		
9	-0.7	-0.3	1.1	-	
15	-2.4	-2.0	0.6	-1.7	-

(-0.9 ± 1.16)

Katepsiini C (Dipeptidyylipeptidaasi I)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	0.3	-			
6	10.2	9.9	-		
9	-6.8	-7.1	-17.0	-	
15	-2.4	-2.7	-12.5	4.5	-

(-2.36 ± 8.95)

Katepsiini C (Dipeptidyylipeptidaasi I)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	3.8	-			
6	-2.0	-5.8	-		
9	-23.1	-26.9	-21.1	-	
15	-12.9	-16.7	-11.0	10.2	-

(-10.55 ± 12.07)

Katepsiini D (Katepsiini)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	-71.9	-			
6	-58.7	13.3	-		
9	-170.1	-98.6	-119.6	-	
15	-21.0	50.9	6.5	149.5	-

(-31.97 ± 92.47)

Katepsiini D (Katepsiini)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	1.9	-			
6	-27.9	-29.8	-		
9	-126.8	-128.6	-98.9	-	
15	16.9	15.0	44.8	78.6	-

(-25.48 ± 71.70)

Hapan ribonukleaasi (Ribonukleaasi II)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	64.5	-			
6	87.8	23.3	-		
9	-54.4	-118.9	-142.2	-	
15	-28.3	-92.8	-116.0	26.2	-

(-35.08 ± 82.31)

Hapan ribonukleaasi (Ribonukleaasi II)

	0	3	6	9	15
0	-				
3	59.4	-			
6	62.4	3.0	-		
9	-140.7	-200.1	-203.1	-	
15	-122.6	-182.0	-185.0	18.1	-

(-89.06 ± 111.51)

Proteiinipitoisuus

	0	3	6	9	15
0	-				
3	-1.4	-			
6	0.7	1.9	-		
9	2.0	3.2	1.3	-	
15	2.1	3.3	3.6	0.1	-

(1.68 ± 1.56)

Proteiinipitoisuus

	0	3	6	9	15
0	-				
3	-2.3	-			
6	0.3	1.0	-		
9	1.9	2.5	1.6	-	
15	2.2	2.9	1.9	0.4	-

(1.24 ± 1.51)

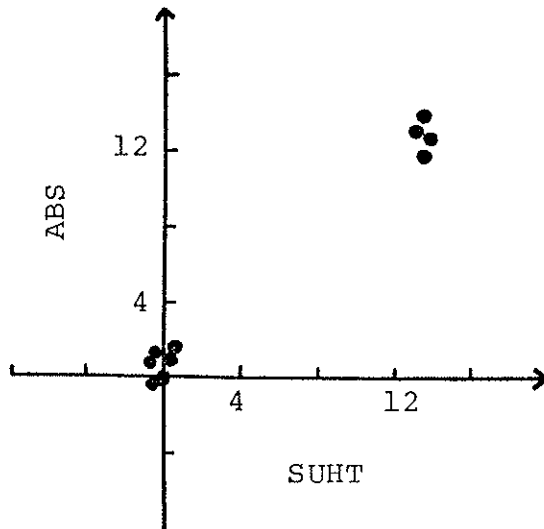
Puolimatriisien akselit ilmoittavat harjoittelukertojen lukumäärät ja lukemat ovat absoluuttisten ja suhteellisten arvojen perusteella laskettujen aktiivisuusmuutosten erotuksia entsyymiaktiivisuusyksikköinä, ja proteiinipitoisuuden tapauksessa mikrogrammoina, lihaksen märkápainoa kohti. Suluissa on ilmoitettu kaikkien ryhmien erotusten keskiarvo ± keskihajonta.

Absoluuttisten ja suhteellisten arvomuutosten välinen korrelaatiokerroin mittaa menetelmän sopivuutta tutkittavan fysiologisen muuttujan havainnointiin.

Absoluuttisten ja suhteellisten arvomuutosten välisestä regressiosuorasta nähdään antaako jompi kumpi mittaustapa systemaattisesti optimituloksesta poikkeavia arvoja.

Absoluuttisten ja suhteellisten aktiivisuuserojen välinen korrelaatio ja regressio.

PUNAINEN LIHAS

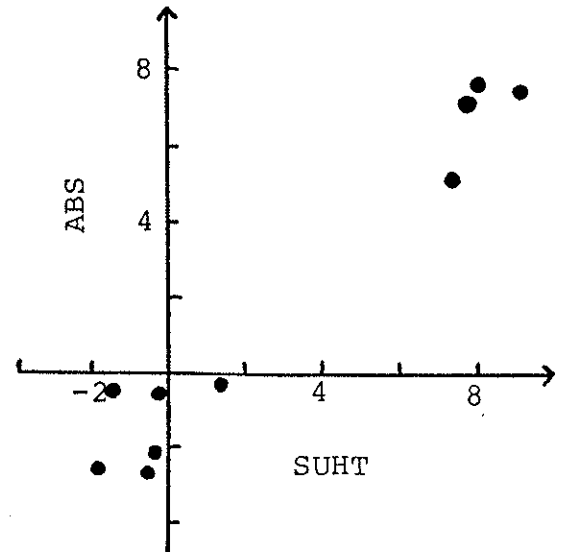


Beta-glukuronidaasi

$$r = 0.994$$

$$y = 1.115 \cdot X - 0.817$$

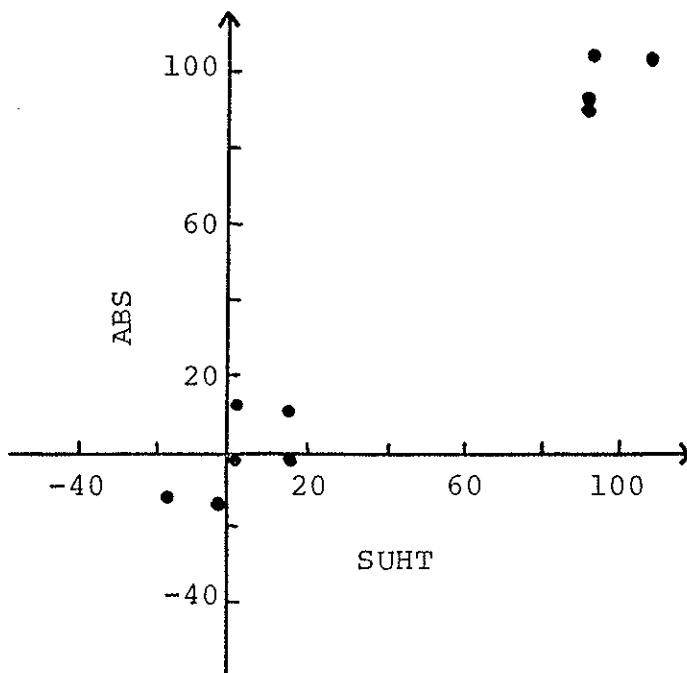
VALKOINEN LIHAS



Beta-glukuronidaasi

$$r = 0.974$$

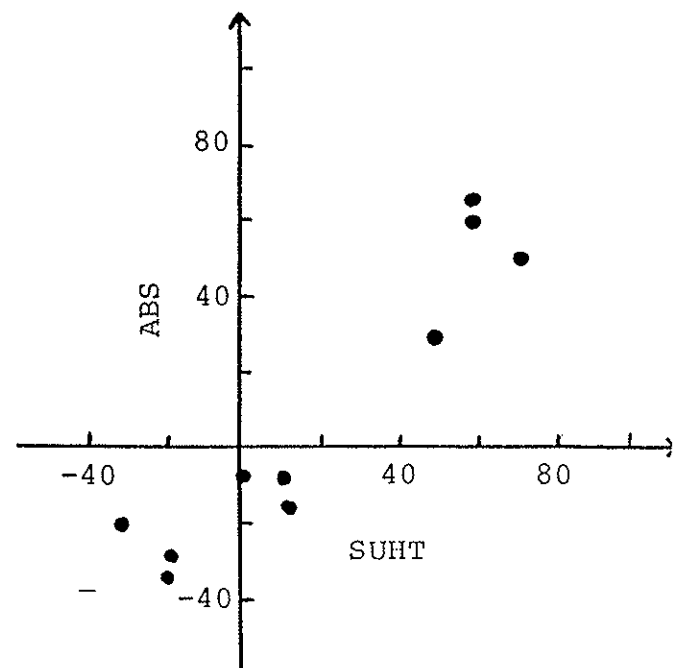
$$y = 1.027 \cdot X + 0.958$$



Katepsiini C

$$r = 0.985$$

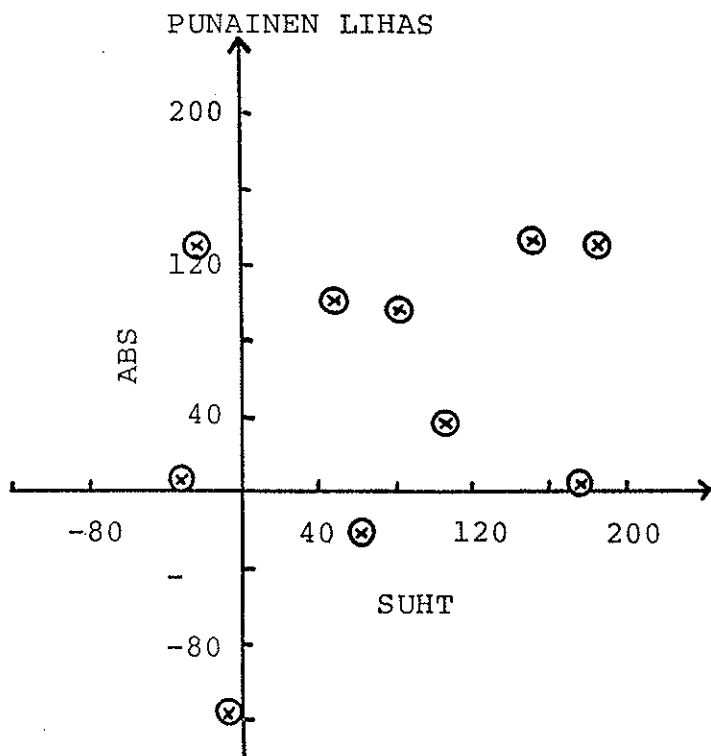
$$y = 0.947 \cdot X + 4.372$$



Katepsiini C

$$r = 0.948$$

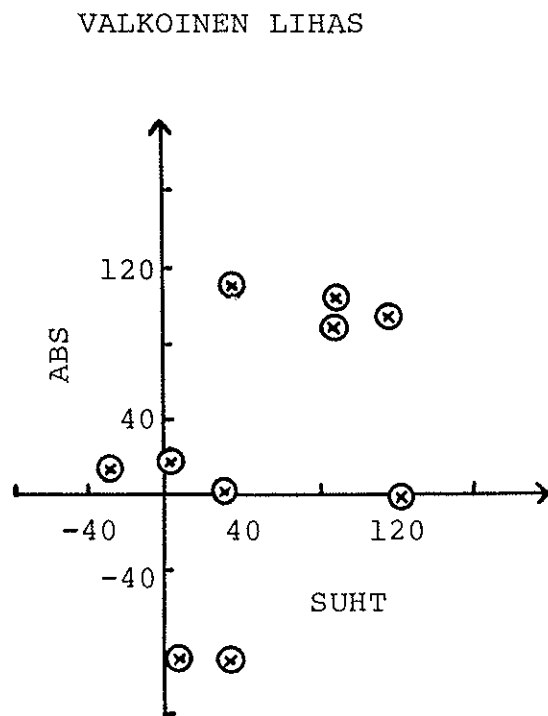
$$y = 0.934 \cdot X + 11.092$$



Katepsiini D

$$r = 0.347$$

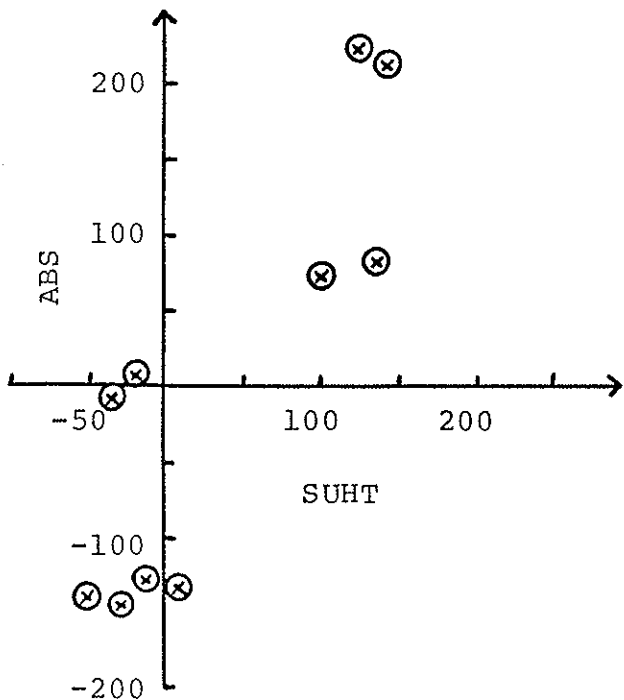
$$y = 0.339 \cdot X + 60.362$$



Katepsiini D

$$r = 0.243$$

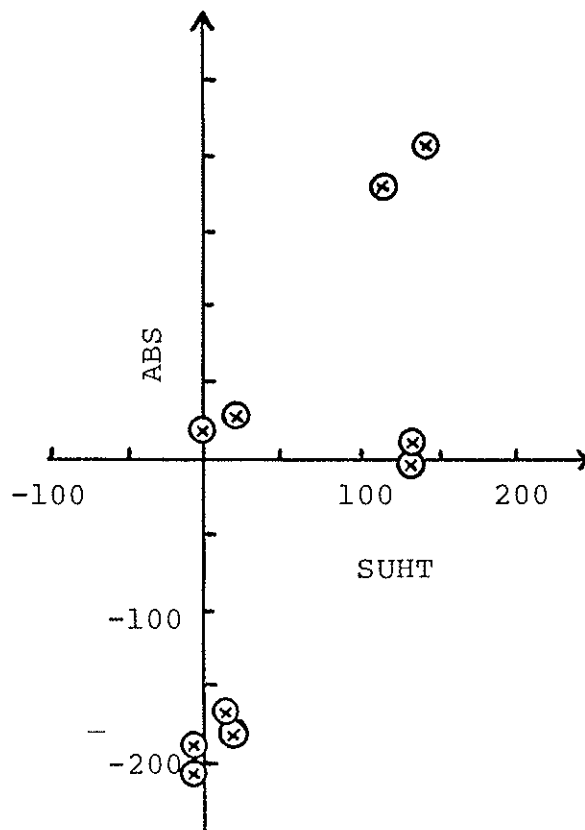
$$y = 0.163 \cdot X + 37.622$$



Hapan ribonukleaasi

$$r = 0.873$$

$$y = 0.495 \cdot X + 36.015$$

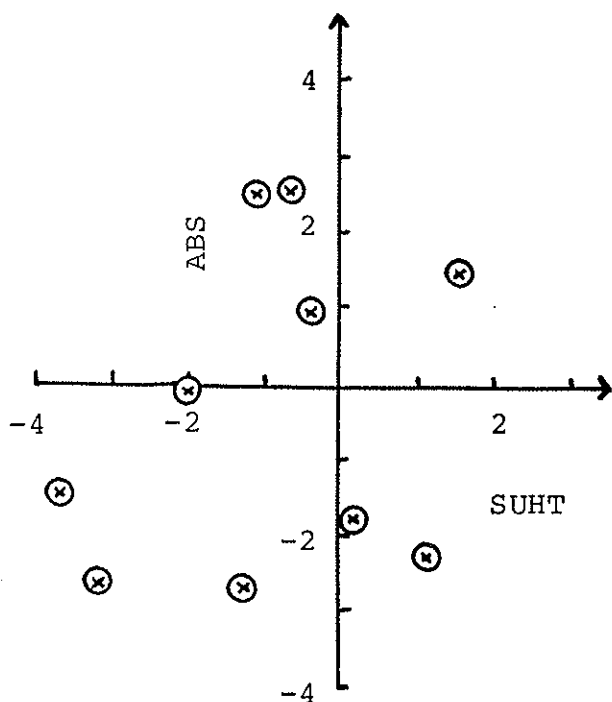


Hapan ribonukleaasi

$$r = 0.747$$

$$y = 0.325 \cdot X + 66.927$$

PUNAINEN LIHAS

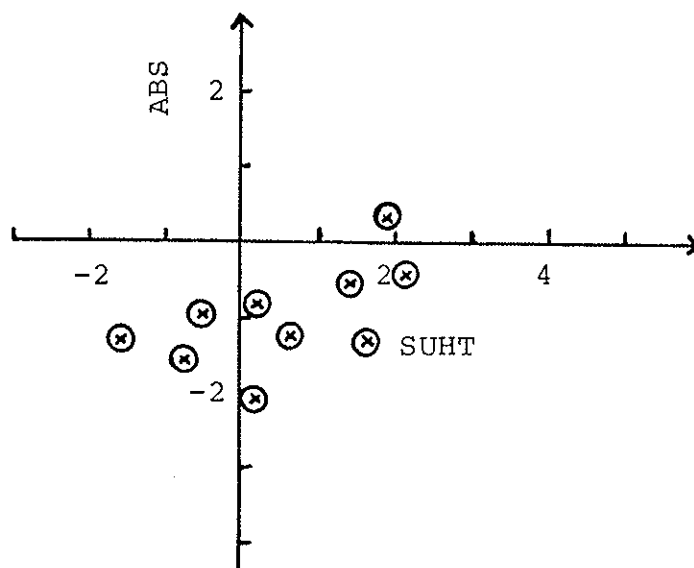


Proteiinipitoisuus

$$r = 0.602$$

$$y = 0.459 \cdot X - 1.570$$

VALKOINEN LIHAS



Proteiinipitoisuus

$$r = 0.500$$

$$y = 0.270 \cdot X - 1.058$$

Akseleitten arvot ovat entsyymien osalta pikomooleja minuutissa milligrammaa lihaksen märkää painoa kohti. Absoluuttiset arvot (ABS) tarkoittavat HK ryhmän sisäisiä aktiivisuustasomuutoksia harjoitusryhmien (0, 3, 6, 9, 15 kertaa harjoitelleet) välillä. Suhteelliset arvot (SUHT) tarkoittavat HK ja HL ryhmän aktiivisuustasojen suuruuseroja vertailtavien harjoitusryhmien välillä. Proteiinipitoisuus on ilmoitettu mikrogrammoina lihaksen märkää painoa kohti.

Liite 12: Muuttujien väliset korrelaatiot hiiren reisilihaksessa

1. Punaisen ja valkoisen lihaksen välillä

		PUNAINEN LIHAS			
MUUTTUJA		Beta-Gu	Kat C	Ribon	Kat D
VALKOINEN LIHAS	Beta-GU	.476	.501	.372	.260
	Kat C	.314	.559	.404	.175
	Ribon	.139	.269	.708	.202
	Kat D	.218	.143	.266	.701

2. Punaisessa lihaksessa

MUUTTUJA	Beta-GU	Kat C	Ribon	Kat D
Beta-GU	1.000			
Kat C	.785	1.000		
Ribon	.421	.467	1.000	
Kat D	.400	.230	.247	1.000

3. Valkoisessa lihaksessa

MUUTTUJA	Beta-GU	Kat C	Ribon	Kat D
Beta-GU	1.000			
Kat C	.806	1.000		
Ribon	.587	.634	1.000	
Kat D	.432	.349	.366	1.000

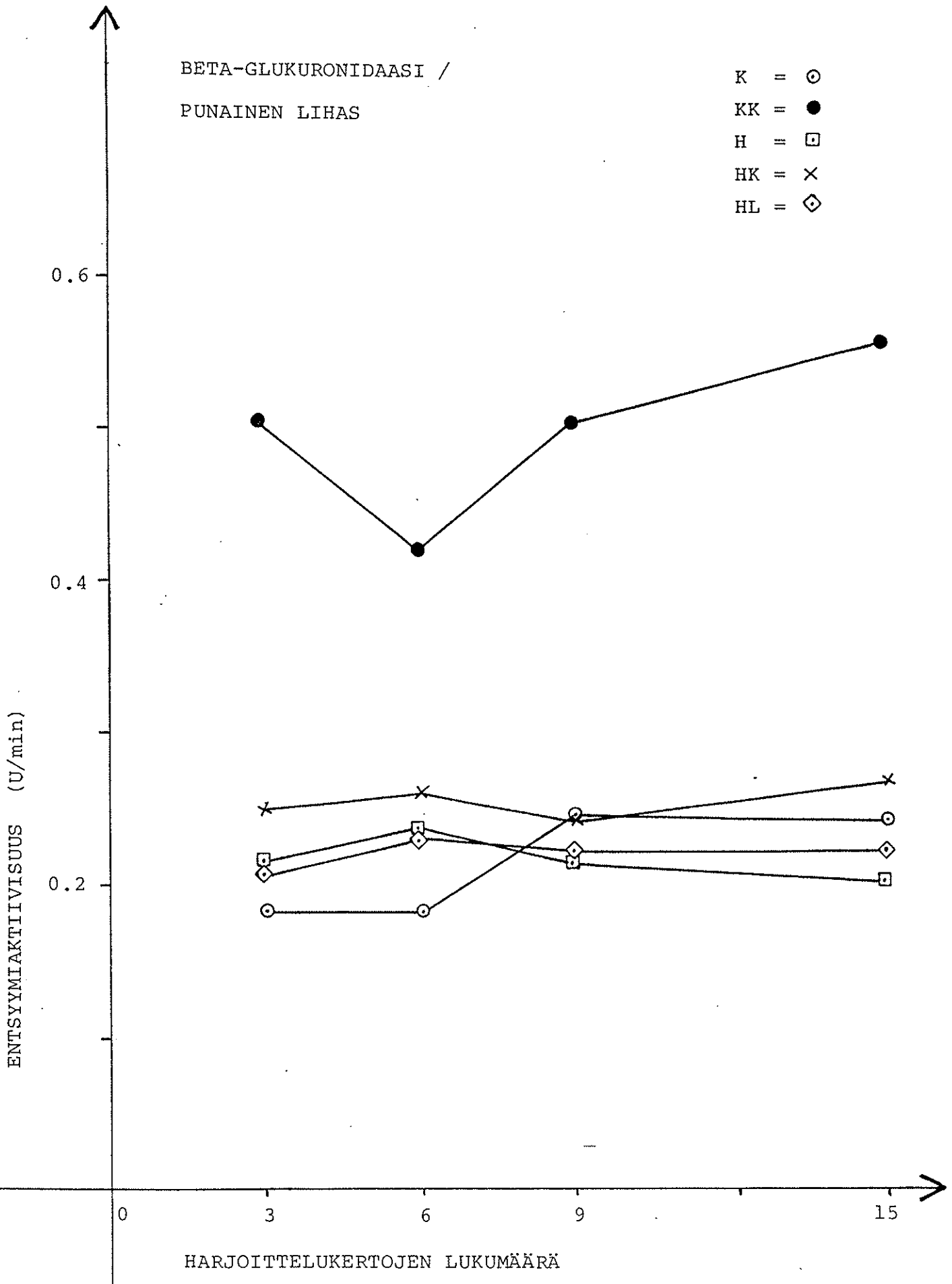
Havaintojen lukumäärä on 166. Puuttuva havainto on korvattu keskiarvolla. Korrelaatiot on laskettu koko aineistosta. Lukemat ovat korrelaatiokertoimien arvoja.

Lyhennysmerkinnät: Beta-GU on Beta-glukuronidaasi, Kat C on Katepsiini C, Ribon on Hapan ribonukleaasi ja Kat D on Katepsiini D.

Liite 13: Happamien hydrolaasien aktiivisuuskuvajat. Entsyymiaktiivisuudet on laskettu proteiininäärää kohti.

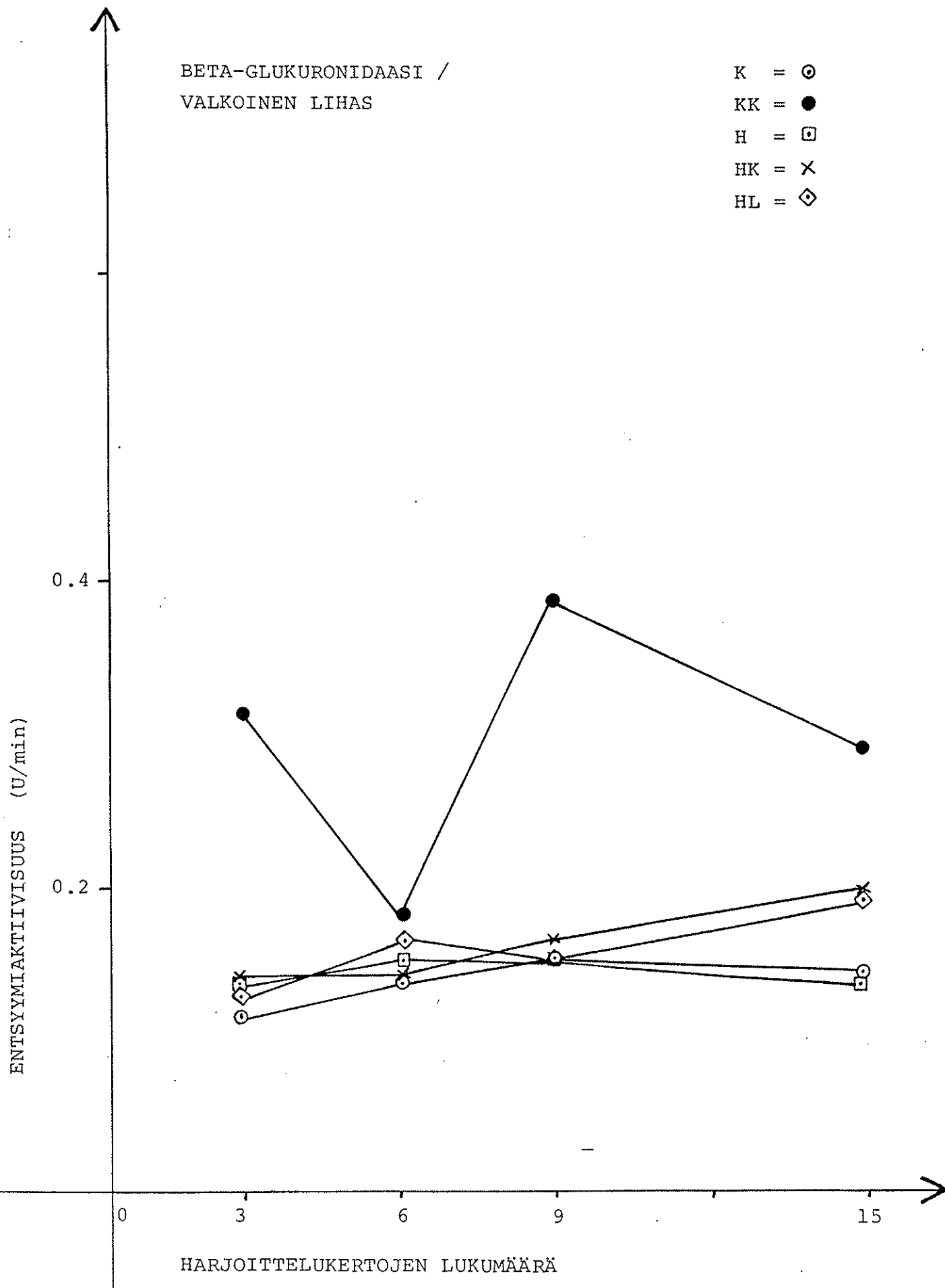
BETA-GLUKURONIDAASI /
PUNAINEN LIHAS

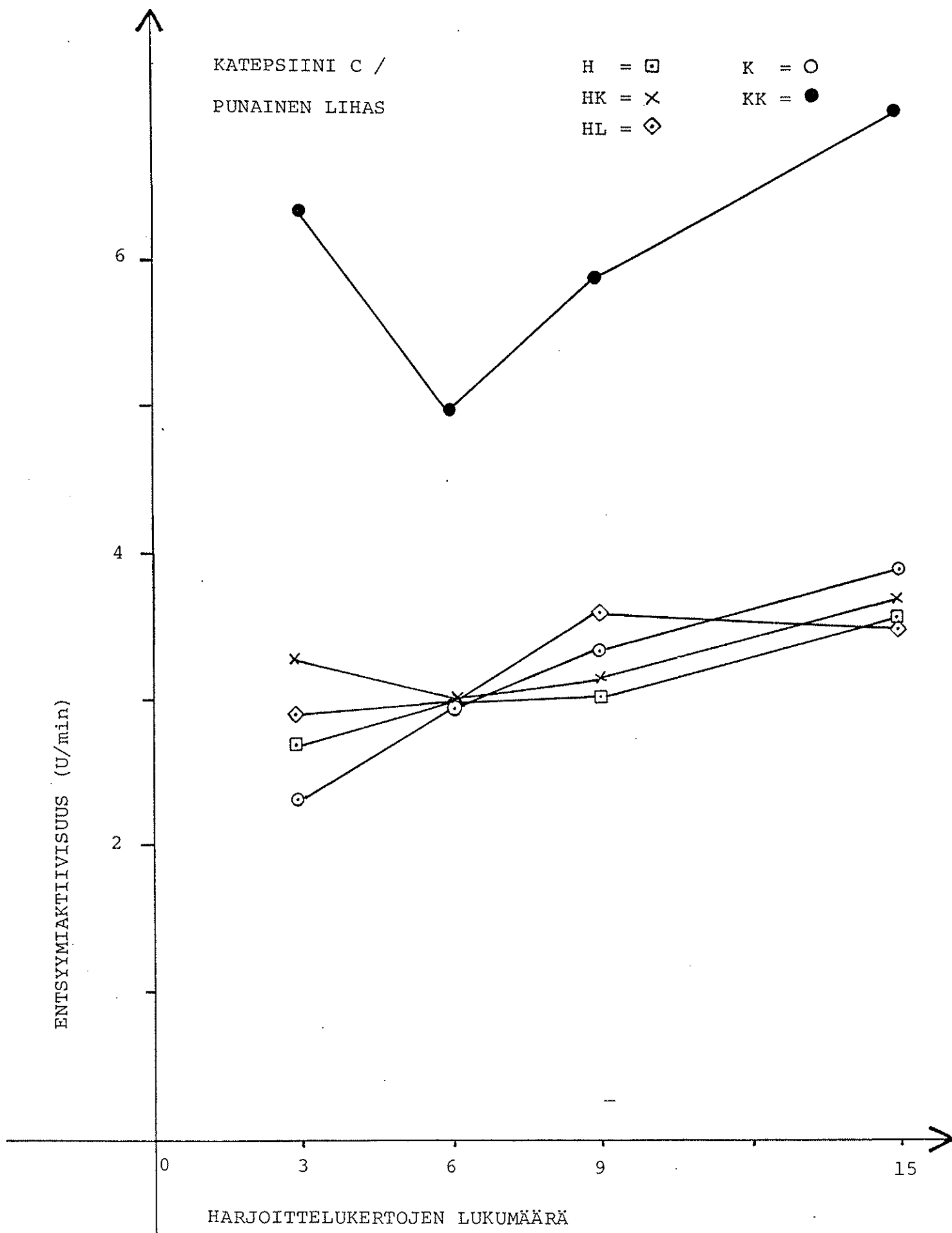
K = ○
KK = ●
H = □
HK = ×
HL = ◇

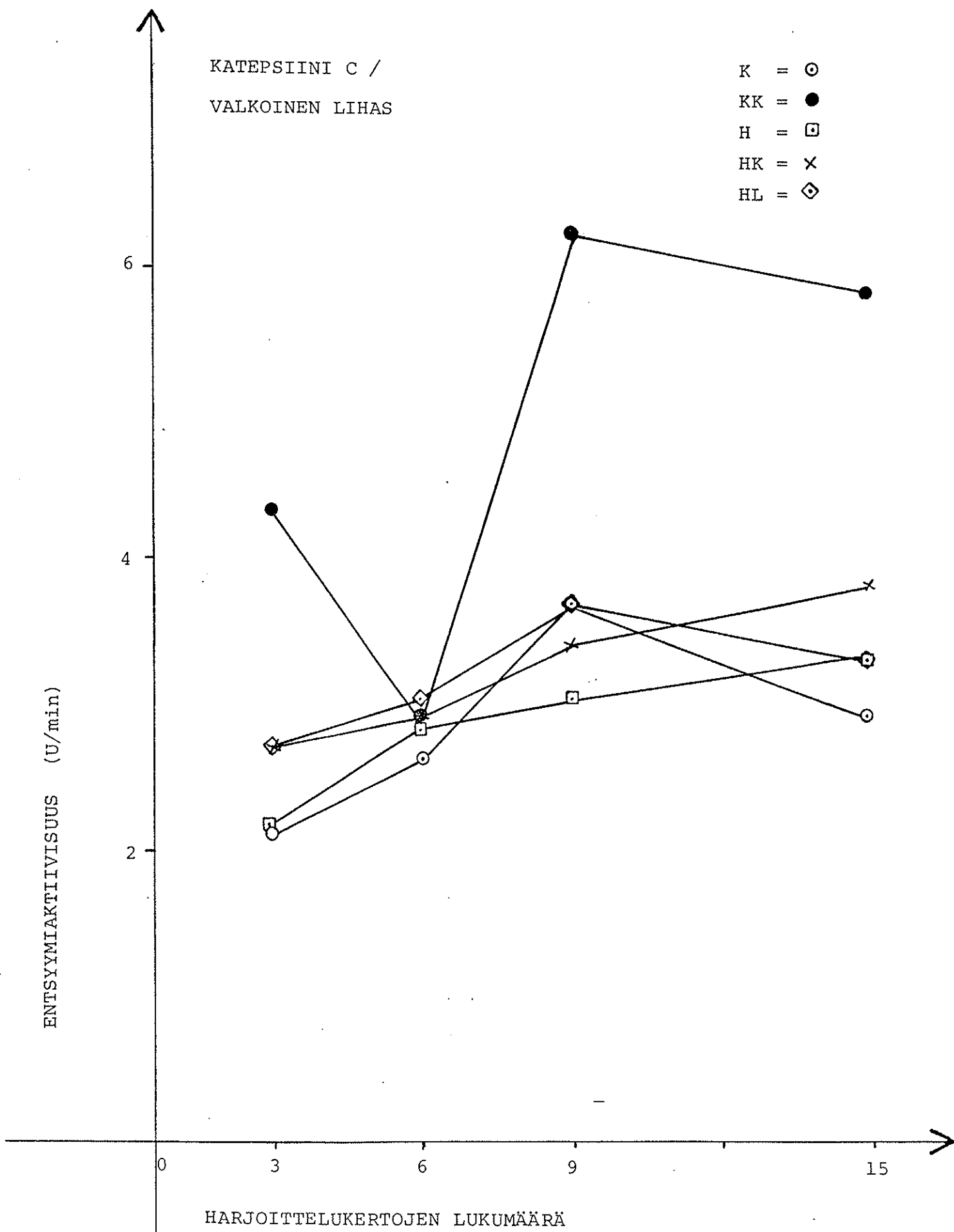


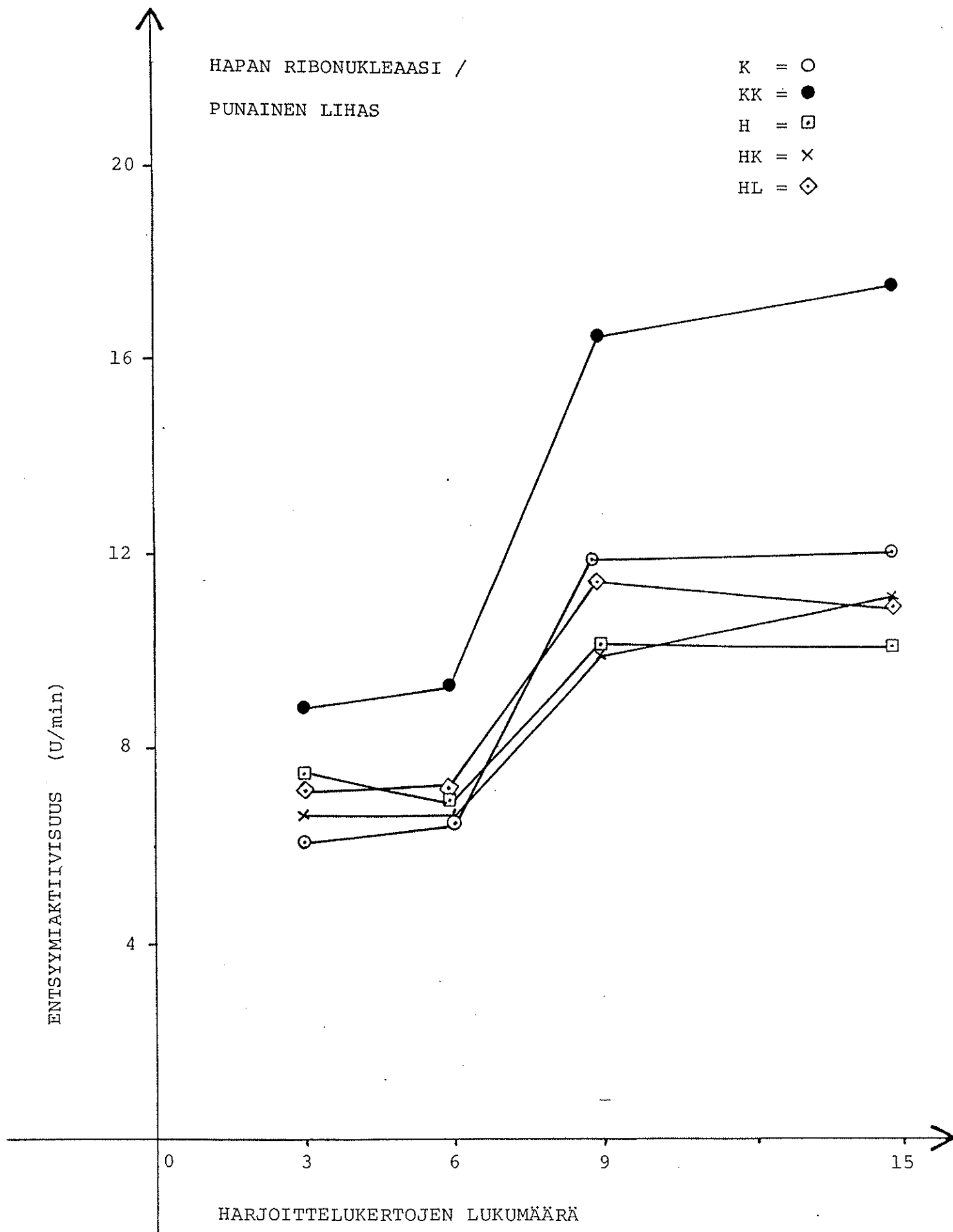
BETA-GLUKURONIDAASI /
VALKOINEN LIHAS

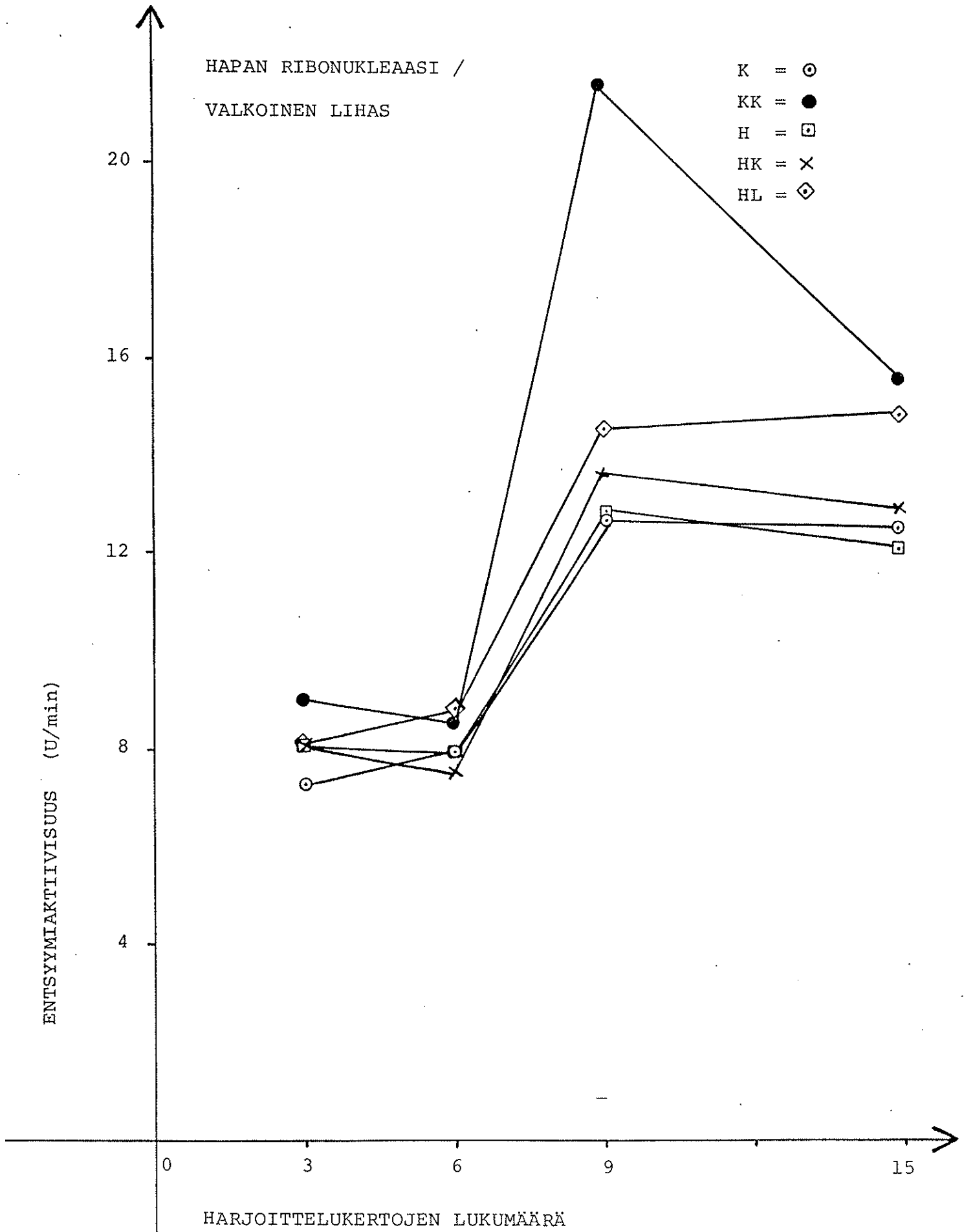
K = ⊙
KK = ●
H = □
HK = ×
HL = ◇





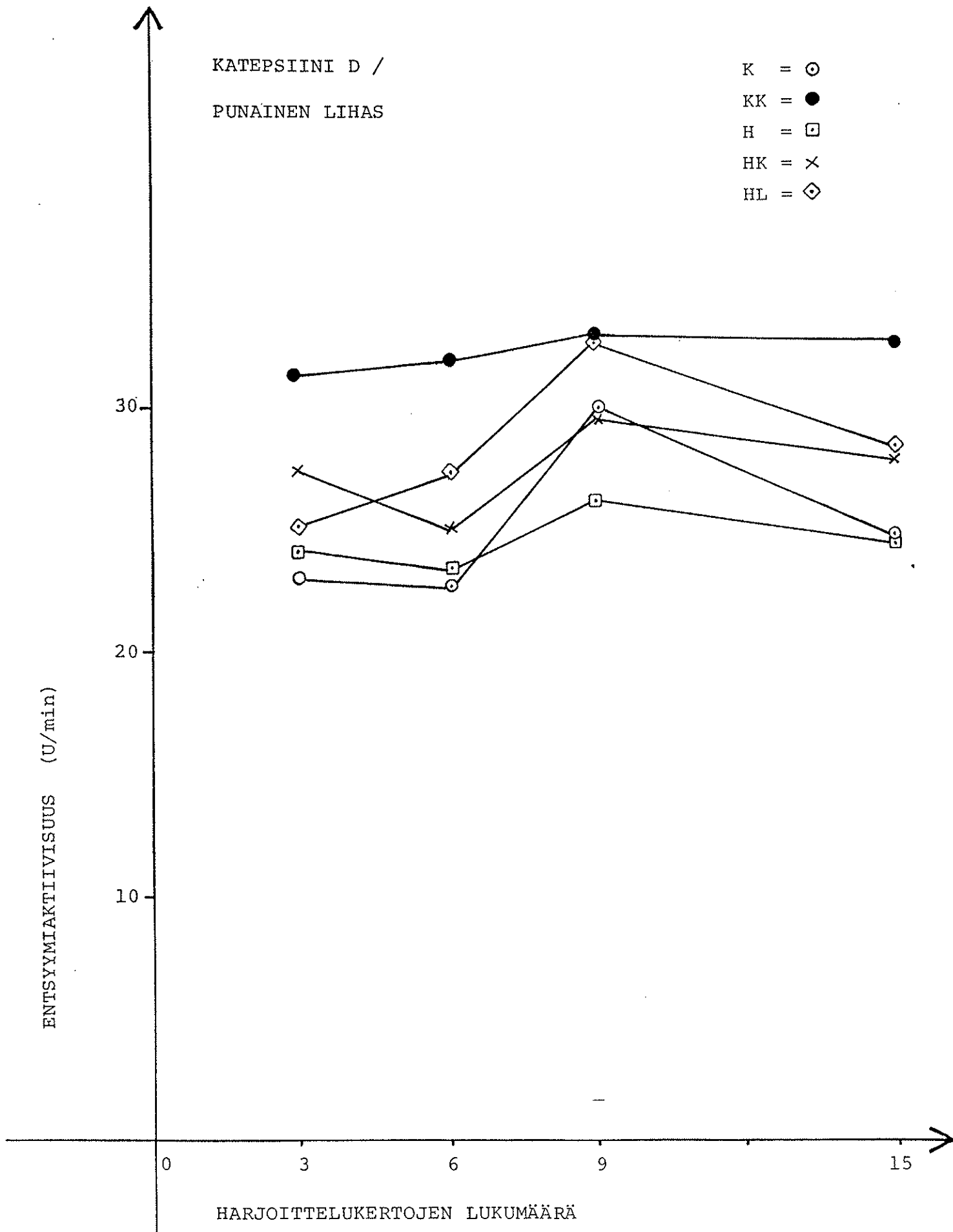


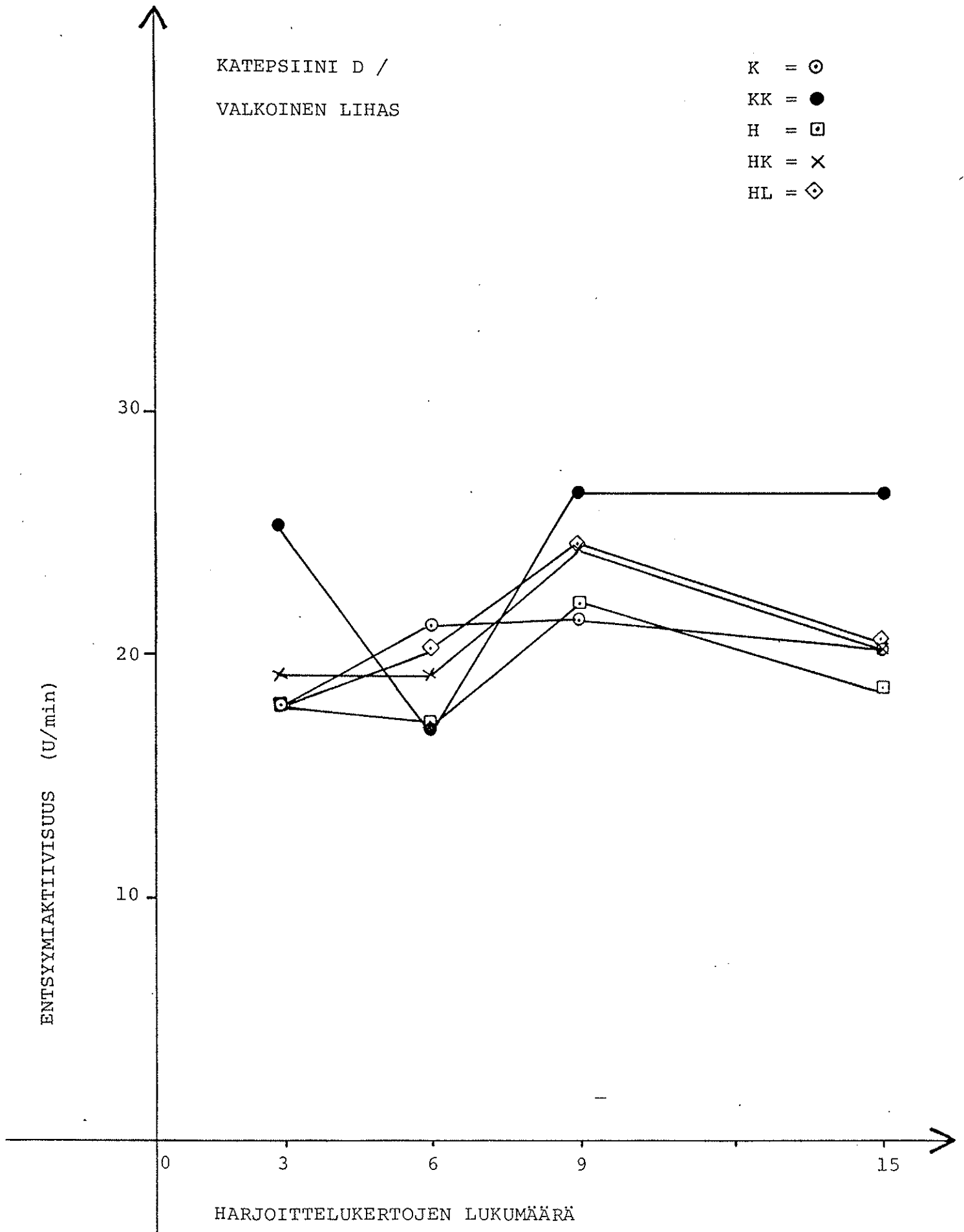




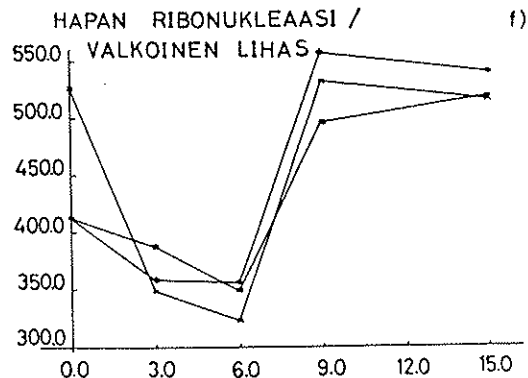
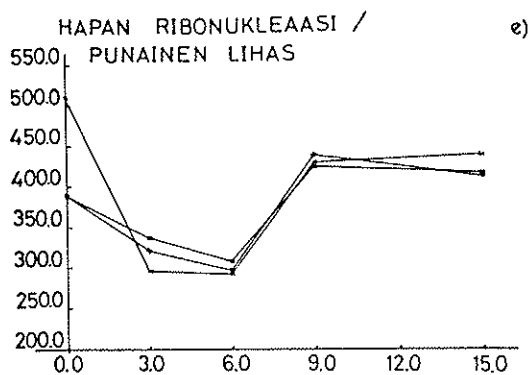
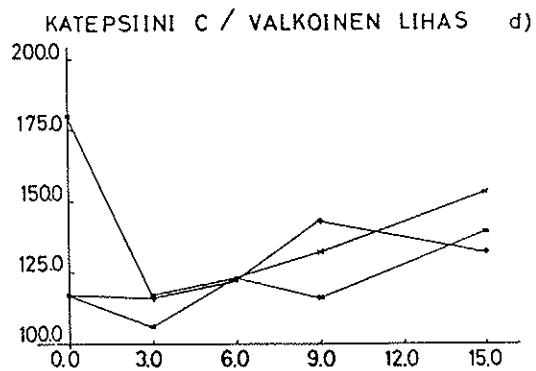
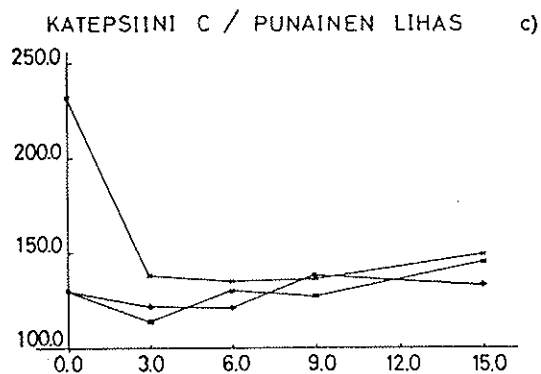
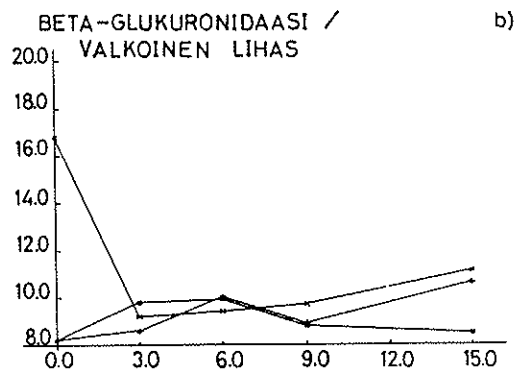
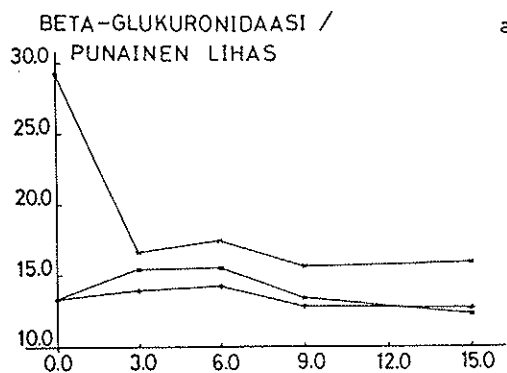
KATEPSIINI D /
PUNAINEN LIHAS

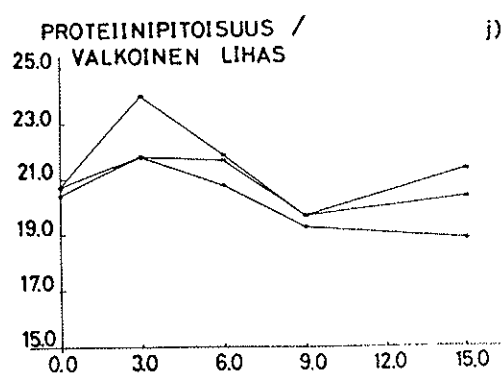
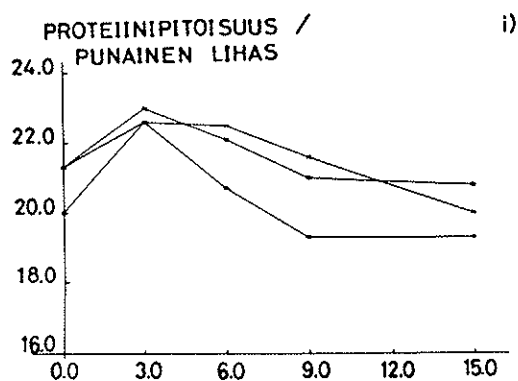
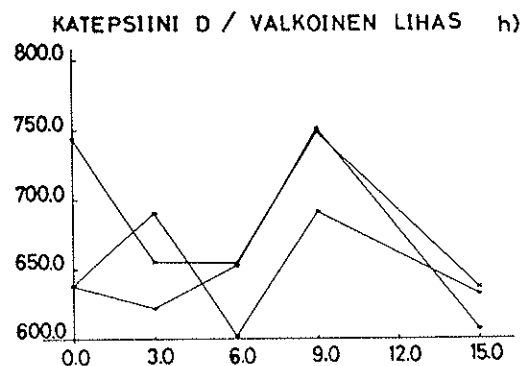
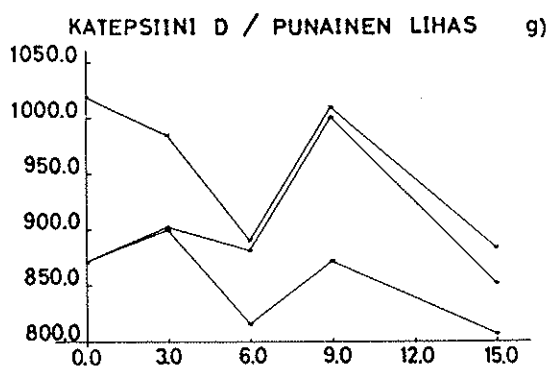
K = ○
KK = ●
H = □
HK = ×
HL = ◇





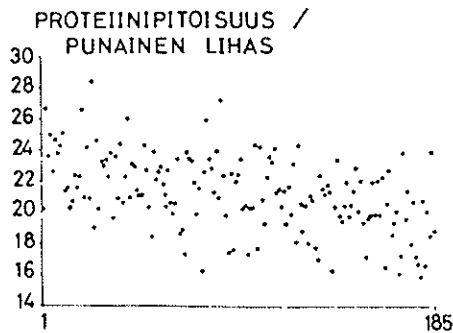
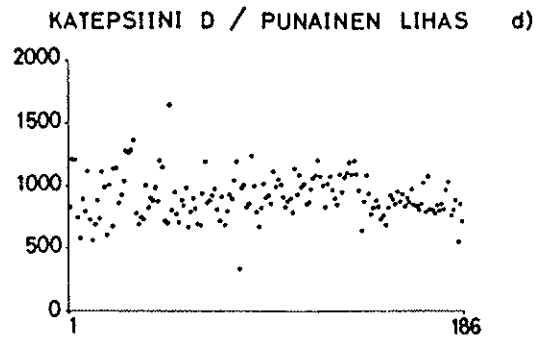
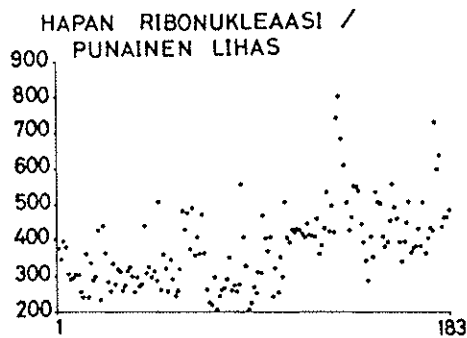
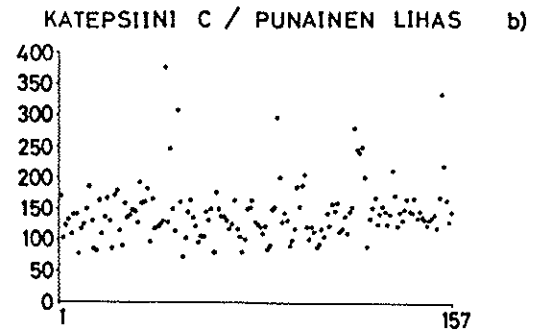
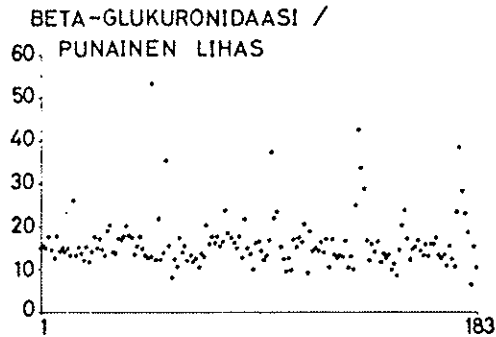
Liite 14: Happamien hydrolaasien aktiivisuuskuvaajat ja proteiinipitoisuus. Entsyymiaktiivisuudet ja proteiinimäärä on laskettu lihaksen märkápainoa kohti.





Entsyymiaktiivisuudet ja proteiinipitoisuus on ilmoitettu, kuten taulukoissa 1, 2 ja 3. Vaaka-akseli ilmoittaa harjoittelukertojen lukumäärän. Symbolit ovat kuten liitteessä 13. K- ja KK-ryhmät kuvaavat nollahetken tilannetta.

Liite 15: Hiiren nelipäisen reisilihaksen yksittäiset entsyymiaktiivisuusmääritykset ja proteiinipitoisuuden mittaukset



Entsyymiaktiivisuudet ja proteiinipitoisuudet ovat kuten taulukoissa 1, 2 ja 3. Jokainen piste on mittaustulos ja määritykset on tehty liitteen 6 mukaisesti.