

Verenkierron MMP-entsyymien ja Fas-ligandin yhteydet eri-ikäisten naisten kehonkoostumukseen ja hormonaaliseen tilaan

Jan Koski
Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia
14.03.2016

Alkusanat

Tämän pro gradu -tutkielman laboratoriotyön osuus tehtiin Jyväskylän yliopistossa Terveystieteiden laitoksella biokemian laboratoriossa. Työ on osa laajempaa tutkimuskokonaisuutta, jossa olin mukana selvittämässä estrogeenin, systeemisten MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien ja kehonkoostumuksen välisiä yhteyksiä.

Haluaisin kiittää erittäin paljon ohjaajiani Vuokko Kovasta ja Eija Pöllästä työn ohjaamisesta, tieteellisen taustan pohjustamisesta sekä tuesta työn kirjoittamisessa. Lisäksi haluaisin kiittää Reeta Kangasta avustamisessa laskennallisessa osuudessa, Mia Horttanaista avusta menetelmän kehittämisessä sekä koko laboratorion henkilökuntaa auttavasta, kannustavasta työilmapiiristä ja työn tukemisestä.

Lopuksi vielä kiittäisin perhettäni, ystäviäni ja kaikkia mukana olleita avusta ja kannustuksesta.

Jyväskylässä 14.03.2016

Jan Koski

Tekijä:	Jan Koski
Tutkielman nimi:	Verenkierron MMP-entsyymien ja Fas-ligandin yhteydet eri-ikäisten naisten kehonkoostumukseen ja hormonaaliseen tilaan
English title:	Systemic MMP-enzyme and Fas-ligand associations for body composition and hormonal differences in women at different ages
Päivämäärä:	14.03.2016 Sivumäärä: 42 + 1
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solu ja molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	Vuokko Kovanen ja Eija Pöllänen

Tiivistelmä:

Ikääntyvillä ihmisillä kehon koostumuksen muuttuminen yhdessä lihaksiston heikentymisen kanssa on merkittävä toimintakykyyn ja elämänlaatuun vaikuttava tekijä. Ikääntyessä yleisesti vaikeutunut liikkuminen, korkeampi kaatumisen riski sekä metaboliseen oireyhtymään ja/tai tyyppin II diabetekseen sairastuminen voivat olla seurauksia heikentyneestä toimintakyvystä. Naisilla vaihdevuosien aikana estrogeenin tuotanto vähenee huomattavasti, ja estrogeenin vähenemisen on havaittu olevan yhteydessä rasvakudoksen määrän lisääntymiseen, lihasten koon pienenemiseen ja lihasvoiman heikkenemiseen. Vaihdevuosien oireita hoidetaan mm. estrogeenia sisältävällä hormonikorvaushoidolla, mutta estrogeenin vaikutuksen tarkkoja mekanismeja luustolihasistoon tai sen säätelyyn ei kuitenkaan tunneta. Fas-ligandi (FasL) on yksi lymfosyyttien pinnalla sijaitseva kohdesolujen apoptoosia aktivoiva tekijä, jonka metalloproteiinaasi-entsyymit MMP-3 ja MMP-7 voivat pilkkoa liukoiseen muotoon. Seerumin liukoisen FasL:n pitoisuus laskee ikääntyessä, ja tämän on havaittu korreloivan seerumin estrogeeni-pitoisuuden kanssa. MMP-entsyymeistä puolestaan MMP-2 -entsyymi on keskeisessä roolissa mm. rasva- ja lihaskudoksissa solujen tyvikalvon rakenteen säätelyssä, joten sillä voi olla toiminnallinen yhteys kehon rasva- ja lihaskudosten ominaisuuksiin. Tässä tutkimuksessa selvitettiin, ovatko premenopausaalisten naisten (n=15) ja postmenopausaalisten hormonikorvaushoitoa käyttävien kaksossisarien (n=11) hormonikorvaushoitoa käyttämättömiä sisariaan (n=11) merkittävästi matalammat seerumin FasL-pitoisuudet yhteydessä seerumin MMP-entsyymien määrään ja/tai aktiivisuuteen. Lisäksi selvitettiin MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien yhteyttä estrogeenitasoihin, kehonkoostumukseen ja ikään. MMP-2, -3 ja -7 -molekyylien pitoisuudet määritettiin käyttäen ELISA-menetelmää. Tällä menetelmällä mitattiin kyseisten entsyymien kokonaismäärää mutta ei niiden aktiivisuutta. MMP-entsyymien pro- ja aktiivisten muotojen pitoisuuksien mittaamiseen käytettiin zymografiamenetelmää, jonka herkkyys ei kuitenkaan riittänyt määrittämiin tutkimuksen seeruminäytteistä. Näin ollen tuloksia käsitellään vain entsyymien kokonaispitoisuuksien perusteella. Tutkimuksessa premenopausaalisten naisten seerumin MMP-2 -entsyymien pitoisuus korreloi negatiivisesti kehon rasvattomaan pehmytkudoksen osuuteen ($r=-0,550$ ja $p=0,03$). Lisäksi havaittiin, että premenopausaalisten ryhmässä MMP-3 ja MMP-7 entsyymien välillä oli positiivinen korrelaatio ($r=0,550$ ja $p=0,03$). Postmenopausaalisten naisten vaihdevuosioireisiin käytetty estrogeenia sisältävä hormonikorvaushoito vähensi rasvakudoksen osuutta koko kehon painosta ($p=0,022$), mutta hormonikorvaushoidolla ja iällä ei ollut yhteyttä tutkittujen MMP-entsyymien kokonaismääriin verenkierrossa. MMP-entsyymien kokonaismäärät eivät myöskään olleet yhteydessä sFasL:n pitoisuuksiin. MMP-7 tunnetusti aktivoi MMP-3:n pro-muodosta aktiiviseen muotoon, mikä selittää näiden entsyymien korrelaation. Tuloksissa kehon rasvattoman painon negatiivinen yhteys seerumin MMP-2:n pitoisuuteen tukee käsitystä MMP-2:n stimuloivasta vaikutuksesta mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisessa rasvasoluiksi. MMP-2:n yhteyttä kehon rasvattomaan painoon ei kuitenkaan voitu osoittaa enää vaihdevuosi-ikä ohittaneilla naisilla, mihin todennäköisesti liittyy vaihdevuosien yhteydessä tapahtuvat hormonaaliset muutokset.

Avainsanat: MMP-2, MMP-3, MMP-7, sFasL, hormonikorvaushoito, rasvakudos, lihaskudos

Author: Jan Koski
Title of thesis: Systemic MMP-enzyme and Fas-ligand associations for body composition and hormonal differences in women at different ages

Finnish title: Verenkierron MMP-entsyymien ja Fas-ligandin yhteydet eri-ikäisten naisten kehon koostumukseen ja hormonaaliseen tilaan

Date: 14.03.2016 **Pages:** 42 + 1

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisor(s): Vuokko Kovanen and Eija Pöllänen

Abstract:

In aging, changes in body composition including a decrease in muscle mass, and the related reduced muscle strength and the increase in adipose tissue with their ramifications are major problems of public health worldwide. Ramifications e.g. impaired mobility, type II diabetes and the metabolic syndrome are related to impaired functional capacity and the quality of life. In menopause, estrogen production is greatly reduced, which has been shown to be associated with lower muscle volume and strength. Menopausal symptoms are commonly treated with estrogen containing hormone replacement therapy (HRT). However, specific molecular mechanisms of estrogen on skeletal muscles are not precisely known. Fas-ligand-receptor-complexes activate apoptosis inducing signaling pathways, however matrix metalloproteinases (MMP) can cleave Fas-ligand-receptor-complexes from the cell surface and form soluble FasL molecules (sFasL). The serum concentration of sFasL declines with age, and it has been shown to correlate with serum estrogen levels. Hypothesis of this study is that MMP enzyme level is estrogen dependent and connected with the sFasL level. The total concentrations of MMP-2, -3 and -7 were determined by the ELISA-method from the sera of postmenopausal twin sister pairs (n=11, age 54-62 years), where one sister was current HRT user while her co-twin had never used HRT, and from a premenopausal fertile age control group (n=15, age 30-40 years). The results showed that the concentrations of serum MMPs did not correlate with estrogen nor Fas-ligand concentrations. However, MMP-2 correlated negatively with the fat-free lean body mass (LBM) in premenopausal group ($r=-0.550$ and $p=0.03$). In the same group, MMP-7 correlated with MMP-3 ($r=0.550$ and $p=0.03$). MMP-3 and MMP-7 cleave FasL to its soluble form and MMP-7 acts as an activator for MMP-3. HRT does not seem to be part of their regulation. In premenopausal women, the negative correlation of LBM with MMP-2 is in agreement with the previous studies showing that MMP-2 stimulates mesenchymal stem cells to differentiate into adipocytes. However, the correlation between MMP-2 and LBM was not observed in postmenopausal groups. One limitation in this study was that the actual activities of the MMP enzymes in circulation remained undetermined. Thus further studies are needed to figure out what role the different levels of circulating FasL plays in HRT using and non-using postmenopausal women.

Keywords: MMP-2, MMP-3, MMP-7, sFasL, hormone replacement therapy, adipose tissue, muscle tissue

Sisällysluettelo

Alkusanat	2
Tiivistelmä	3
Englanninkielinen tiivistelmä	4
Sisällysluettelo	5
Lyhenteet	7
1. Johdanto	8
1.1 Kehonkoostumus	8
1.1.1 Rasvakudos	8
1.1.2 Lihaskudos	9
1.2 Apoptoosi	10
1.2.1 Fas-reseptori ja -ligandi	10
1.3 Vaihdevuodet ja hormonaaliset muutokset	11
1.3.1 Estrogeeni	12
1.3.2 Hormonikorvaushoito	12
1.3.3 Sarkopenia	13
1.4 MMP-entsyymit	14
1.4.1 MMP-2.....	14
1.4.2 MMP-3.....	14
1.4.3 MMP-7.....	15
1.5 MMP:t, FasL ja estrogeeni	15
1.6 MMP:t ja ylipaino	15
2. Tutkimuksen tavoitteet	17
3. Materiaalit ja menetelmät	18
3.1 Tutkimusasetelma ja tutkittavat	18
3.2 ELISA-menetelmä.....	20

3.3	Gelatiinizymografia.....	21
3.4	Tilastolliset analyysit	23
4.	Tulokset	24
4.1	Tutkittavien antropometriset ominaisuudet.....	24
4.2	Estradioli-, MMP- ja FasL-pitoisuudet	26
4.3	Estradioli-, MMP- sekä FasL-pitoisuuksien ja kehonkoostumuksen väliset yhteydet.....	31
5.	Tulosten tarkastelu	33
5.1	Systeemisten MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien kokonaismäärät ovat samalla tasolla 30-40 ja 54-62 -vuotiailla naisilla.	33
5.2	HRT:n käyttö ei ole yhteydessä systeemisiin MMP-2, -3 tai -7 -entsyymien kokonaismääriin postmenopausaalisilla naisilla	34
5.3	Systeemisten MMP-3 ja MMP-7 -entsyymien pitoisuudet eivät olleet yhteydessä liukoisen Fas-ligandin pitoisuuteen	35
5.4	Systeemisten FasL:n ja MMP-entsyymien yhteys kehonkoostumukseen	36
5.5	Yhteenveto	38
	Lähdeluettelo	40
	Liitteet	43

Lyhenteet

BMI	Painoindeksi (<i>engl.</i> Body mass index)
CRP	C-reaktiivinen proteini (<i>engl.</i> C-reactive protein)
CT	Tietokonetomografia (<i>engl.</i> Computational Tomography)
DISC	<i>engl.</i> Death Inducing Signaling Complex
ECM	Soluväliaine (<i>engl.</i> extracellular matrix)
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	<i>engl.</i> Fas-associated death domain
Fas	Fas-reseptori (<i>engl.</i> Fas-receptor)
FasL	Fas-ligandi (<i>engl.</i> Fas-ligand)
HRT	Hormonikorvaushoito (<i>engl.</i> hormone replacement therapy)
IL-6	Interleukiini-6 (<i>engl.</i> Interleukin-6)
LBM	Rasvattoman pehmytkudoksen paino (<i>engl.</i> lean body mass)
MMP	Soluväliaineen metalloproteinaasi (<i>engl.</i> matrix metalloproteinase)
NF- κ B	<i>engl.</i> Nuclear factor kappa beta
sFasL	Liukoinen Fas-ligandi (<i>engl.</i> soluble Fas-ligand)
TGF-B	<i>engl.</i> Transforming growth factor beta
TIMP	<i>engl.</i> Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	<i>engl.</i> Tumor necrosis factor
WHO	Maailman terveysjärjestö (<i>engl.</i> World Health Organization)

1. Johdanto

1.1 Kehonkoostumus

Fyysinen kunto yhdessä psyykkisen kunnan ja sosiaalisen ympäristön vuorovaikutusten kanssa luovat perustan ihmisen terveydelle (WHO, 2004). Näistä tekijöistä fyysinen kunto on suoraan yhteydessä kehonkoostumukseen ja fysiologiaan. Ihmisen elimistö koostuu monen tyyppisistä kudoksista, joista kehonkoostumuksen muutoksia voidaan seurata kehon veden, rasvakudoksen, lihaksiston ja luuston prosentuaalisten osuuksien perusteella. Nämä kudokset voidaan jakaa pehmytkudoksiin ja luustoon. Pehmytkudoksiin luokitellaan sisäelimet, lihaksisto ja rasvakudos. Tässä työssä rasvattomasta pehmytkudoksesta käytetään englanninkielisestä termistä *lean body mass* muodostuvaa lyhennettä LBM. Koska sisäelinten paino on pieni suhteessa lihasten painoon, voidaan LBM:ia pitää indikaattorina koko kehon lihasten painosta.

1.1.1 Rasvakudos

Rasvakudos voidaan jakaa kolmeen eri tyyppiin: ruskeaan ja vaaleaan sekä näiden välimuotoon beigeen rasvakudokseen. Näistä ruskeaa rasvakudosta esiintyy vastasyntyneillä lapsilla koko kehon alueella ja aikuisilla niskan alueella. Ruskea rasvakudos toimii kehossa lämmöneristeenä ja energianlähteenä, kuitenkin esimerkiksi insuliinin vaikutus siihen on voimakkaampi kuin vaaleaan rasvakudokseen (Stanford ym., 2012). Vaalea rasvakudos puolestaan toimii endokriinisenä elimenä, joka rasvakudoksen välittäjäaineiden, adipokiinien, tuotannon lisäksi toimii ruskean rasvakudoksen tavoin elimistön suojana, lämmöneristeenä ja energianlähteenä ja -varastona.

Kehon rasvakudoksen määrä muuttuu, jos saadun energian määrä suhteessa kulutetun energian määrään muuttuu. Painon suhdetta kehon kokoon voidaan arvioida laskemalla painoindeksi (*engl.* BMI; body mass index), joka määritetään jakamalla paino pituuden neliöllä (kg/m^2). Normaali- ja ylipaino sekä lihavuus voidaan jaotella BMI-luokituksen mukaisesti. Luokittelu on esitetty liitteessä 1. Tutkimusten perusteella pienikin muutos BMI:ssä lisää monien sairauksien riskiä, ja vain 5 % painonpudotus voi vähentää riskiä

huomattavasti (ks. yleiskatsaus Davis ym., 2012). Lihavuuden on todettu olevan yhteydessä muun muassa ateroskleroosiin, tyypin 2 diabetekseen ja metaboliseen oireyhtymään, jotka ovat pääsääntöisesti elintapoihin liittyviä sairauksia (Välimäki ym., 2009). Ylipaino ja siihen liittyvä lihavuus on yksi kasvavista terveyden riskitekijöistä Suomessa ja maailmalla.

1.1.2 Lihaskudos

Ihmisen lihaskudos voidaan jakaa kolmeen eri pääryhmään: sileään lihaskudokseen, sydänlihaskudokseen ja poikkijuovaiseen lihaskudokseen. Sileät lihassolut ja sydänlihassolut ovat yksitumaisia ja poikkijuovaiset lihassolut monitumaisia. Sileä- ja sydänlihaskudos ovat autonomisesti säädeltäviä, jatkuvaan supistumiseen kykeneviä lihaskudoksia. Sileää lihaskudosta esiintyy esimerkiksi verisuonten seinämissä ja sisäelimissä kuten suolistossa. Sydänlihaskudosta esiintyy sydämessä, ja sen säätely perustuu sinussolmukkeeseen kautta kulkevaan hermoratasäätelyyn.

Ihmisen elimistön lihaskudoksista suurin osa on tahdonalaista poikkijuovaista lihaskudosta. Poikkijuovaisen lihassolun supistuva osa koostuu myofibrilleistä (lihassäikeet), jotka muodostuvat perättäisistä sarkomeereista. Sarkomeeriksi luokitellaan Z-levyjen rajaama tila, ja yksittäiset sarkomeerit koostuvat lomittaisista aktiini- ja myosiinifilamenttirakenteista. (Alberts ym., 2008) Lihaksen supistuessa sarkomeerit lyhenevät aktiini- ja myosiinifilamenttien liukuessa syvemmälle vastakkaisia Z-levyjä kohti. Poikkijuovaisessa lihaskudoksessa yksittäisten hermosolujen kautta yhteydessä olevat lihassolut muodostavat motorisia yksiköitä, joiden koordinoitu aktivoiminen säätelee koko lihaksen toimintaa. Motoristen yksiköiden toistuvan aktivoimisen on havaittu olevan merkittävä tekijä lihasten toimintakyvyn ylläpitämiselle. Ikääntymiseen liittyvän neuronikadon yhteydessä näiden yksiköiden määrä vähenee (Tilvis ym., 2010).

1.2 Apoptoosi

Apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema on elimistön menetelmä, joka uudistaa kehon kudoksia poistamalla normaaliin toimintaan kykenemättömät ja virheelliset solut. Terveillä ihmisillä solut jakautuvat samalla nopeudella kuin huonompia soluja poistetaan. Tämä reaktioreitti tukee elimistön normaalia homeostasiaa ja mahdollistaa elimistön jatkuvan toiminnan. Apoptoosi aktivoituu solun ulkopuolelta tai solussa sisäisesti, ja sen yhteydessä solu tuottaa fagosytointiin eli solusyöntiin liittyviä merkkimolekyylejä. Tällainen molekyyli on esimerkiksi solun pinnalla esiintyvä fosfatidyyliseriini, jonka avulla makrofagit tunnistavat apoptoottisen, fagosytoitavan solun (Valerie ym., 1998). Tällöin solu voidaan hävittää ilman immunologista vastetta (Alberts ym., 2008).

Ihmisen elämänkaaren aikana apoptoosin säätely vaikuttaa eri kudosten, kuten lihaksiston ja elinten, kasvuun ja pienenemiseen. Sikiön ja lapsen kehityksessä apoptoosin määrä on pienempi suhteutettuna jakautuvien solujen määrään. Kehitysvaiheessa erilaiset kudokset kasvavat ja niissä toimivat solut kypsyvät. Aikuisen kudoksissa apoptoosin määrä on samalla tasolla solujen jakautumisen määrän kanssa. Erilaisiin toimintoihin erikoistuneet ja rakenteellisesti kokonsa osalta kehittyneet kudokset, kuten lihaksisto, eivät kehitysvaiheen jälkeen kasva tai pienene ilman ulkoista ärsykettä. Näissä kudoksissa solujen määrä ja kudosten koko kehittyvät tarpeen mukaan, ja apoptoosin tehtävänä on pitää kudokset toimintakykyisinä poistamalla vioittuneet solut (Alberts ym., 2008). Ikääntyessä solujen apoptoosin määrää lisääntyy kuitenkin lisäämättä uusien solujen muodostumista. Apoptoottista solujen vähenemistä tapahtuu kaikissa parenkyymielimissä, jolloin näiden elinten soluista, mukaan lukien lihaksiston solut, 20–40 % on vähentynyt 75–80 vuoden iässä täysikasvuiseen nuoreen ihmiseen verrattuna (Tilvis ym., 2010).

1.2.1 Fas-reseptori ja -ligandi

Fas-molekyylit ovat osa TNF (*engl.* tumor necrosis factor) -proteiiniperhettä. Fas-ligandin (FasL/CD95L) reseptoreita (Fas/CD95) esiintyy useimpien solujen solukalvolla, missä ne toimivat ulkoisena solukuoleman (apoptoosi) käynnistävinä kuolonreseptoreina (*engl.* cell death receptors). Verenkierrossa FasL esiintyy trimeerisessä muodossa sekä liukoosena (sFasL) että immuunipuolustuksen solujen, kuten lymfosyyttien solukalvon pinnalle

sitoutuneena. Liukoiset ja transmembraaniset FasL:t sitoutuvat Fas-reseptoriin aktivoiden FADD-liitännäproteiinin (*engl.* Fas-associated death domain) ja kaspasi 8:n. Nämä muodostavat solukuolemaa indusoivan signaalikompleksin DISC:in (*engl.* death inducing signaling complex). DISC aktivoi kaspasi-entsyymien ketjun joko suoraan tai mitokondrion kautta sytokromi c:n välityksellä. Kaspasi-entsyymit taas aktivoivat proteolyyttisen ketjun, joka hajottaa tumaa tukevan tumalevyn proteiinirakenteen: endonukleaasia sitova proteiinirakenne poistetaan, ja endonukleaasi vapautuu pilkkoen DNA-juosteen. Muita mekanismin vaikutuksia ovat muun muassa solujen välisten adheesioproteiinien pilkkominen, jolloin solu irrottautuu ympäristöstä, ja mahdollistaa fagosytoivan solun toiminnan (Alberts ym., 2008). Apoptoosin lisäksi joissakin solutyypeissä Fas-reseptori ja (s)FasL osallistuvat sekä sisäisen että ulkoisen säätelyn vaikutuksesta solun vaihtoehtoiseen, tulehdusta voimistavan sytokiinituotannon aktivointiin NF- κ B -reitin kautta (Ponton ym., 1996; Ahn ym., 2001).

1.3 Vaihdevuodet ja hormonaaliset muutokset

Suomalaisilla naisilla kuukautisten keskimääräinen loppumisikä (menopaussi) on 51 vuotta. Menopaussia edeltää ns. premenopausaalinen ja perimenopausaalinen vaihe. Menopaussin jälkeistä aikaa seuraa postmenopaussi. Suomenkielessä siirtymävaiheesta käytetään käsitettä vaihdevuodet. Premenopausaalisilla naisilla on normaali säännöllinen kuukautiskierto ja siihen liittyvä naissukuhormonien vaihtelu. Perimenopaussi on siirtymävaihe premenopausista postmenopausiin. Perimenopausin kesto on hyvin yksilöllinen ja voi kestää 5-10 vuotta. Perimenopausin aikana kuukautiskierto muuttuu epäsäännölliseksi, kun munasarjojen toiminta heikkenee vähitellen johtaen biologisesti aktiivisimman estrogeenin, estradiolin, erityksen merkittävään vähenemiseen. Estradiolin tuotannon vähenemisen yhteydessä sen negatiivinen palautevaikutus hypotalamuksessa ja aivolisäkkeessä pienenee, jonka seurauksena follikkeliä stimuloivan hormonin (FSH) ja lutenisoivan hormonin (LH) tuotanto lisääntyy. Estradiolin määrän vähenemisellä on todettu olevan yhteys naisilla muun muassa hikoiluun, ärtymiseen ja masentuneisuuteen ja siten elämänlaadun heikkenemiseen. Lopulta munasarjojen estradiolituotanto pysähtyy kokonaan, jolloin munarakkulat eivät enää kypsy eikä ovulaatiota tapahdu. Ovulaation loppumisen jälkeisiä vuosia kutsutaan postmenopausiksi. (Tilvis ym., 2010)

1.3.1 Estrogeeni

Estrogeeni on sekä naisten että miesten elimistöissä muodostuva sukuhormoni, joka ohjaa sukupuoliominaisuuksien määräytymistä. Estrogeenit voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään: estradioliin, estroniin ja estrioliin, joista estradioli on biologisesti tehokkain. Kasvuikässä estrogeeni osallistuu naisilla sukupuoliominaisuuksien kehittymiseen ja sukukypsässä iässä niiden ylläpitämiseen. Estrogeenireseptoreita on lähes kaikissa kudoksissa, ja siten sen vaikutukset ulottuvat lisääntymisominaisuuksien säätelyn lisäksi muihinkin kudosten säätelymekanismeihin. Estrogeenin on todettu olevan yhteydessä muun muassa naisten luuntiheyden ylläpitoon (Garcia ym., 2013) sekä lihasten koon ja suorituskyvyn säätelyyn (Sipilä ym., 2001; Ronkainen ym., 2009). Estrogeenillä näyttäisi myös olevan yhteys seerumin FasL:n pitoisuuteen (Kangas ym., 2014).

1.3.2 Hormonikorvaushoito

Vaihevuosiin liittyviä oireita hoidetaan estrogeenia sisältävällä hormonikorvaushoidolla (*engl.* HRT; hormone replacement therapy), joka kompensoi estrogeenin vähentyntä tuotantoa. Estrogeenihoidolle on useita erilaisia vaihtoehtoja, joista Suomessa yleisimmät ovat erilaiset iholle laitettavat laastarit, levitettävät geelit tai perinteiset suun kautta otettavat tabletit. HRT:na voidaan antaa pelkkää estrogeenivalmistetta tai estrogeenin ja progesteronin yhdistelmävalmistetta. Pelkkää estrogeenia sisältävän valmisteen pitkäaikainen käytön on todettu lisäävän kohdun syöpäriskiä, ja siksi yhdistelmävalmisteet ovat yleisimpiä käytettyjä HRT:n muotoja. (Välimäki ym., 2009)

Vähentyneen estrogeenin erityksen on havaittu olevan yhteydessä moniin fysiologisiin muutoksiin. Esimerkiksi neuropsykologisten toimintojen muutokset, kuten mielialan vaihtelut ja mahdollisesti masennus, on yhdistetty estrogeenin määrän romahtamiseen. (Välimäki ym., 2009) Estrogeenituotannon vähenemisen on myös todettu olevan yhteydessä fyysisiin muutoksiin, kuten lihaksiston ja luuston heikkenemiseen (Ronkainen ym., 2009; Mikkola ym., 2011). HRT:n on puolestaan todettu korreloivan negatiivisesti rasvakudoksen määrän sekä positiivisesti BMI:n ja LBM:n kanssa (Sipilä ym., 2001; Ronkainen ym., 2009; Taaffe ym., 2005).

1.3.3 Sarkopenia

Lihasmassan vähentyminen ja siihen liittyvä lihasvoiman heikkeneminen (sarkopenia) on yksi ikääntymiseen liittyvistä ongelmista sekä Suomessa että maailmanlaajuisesti. Naisilla lihasten ikääntymismuutokset kiihtyvät vaihdevuosi-iässä. Sarkopenia altistaa ikääntyvän ihmisen liikkumiskyvyn heikkenemiselle, kaatumisille ja niihin liittyville luumurtumille, sekä lisää riskiä sairastua muun muassa tyypin II diabetekseen ja metaboliseen oireyhtymään (ks. yleiskatsaus Mayer ym., 2011). Sarkopenia seurannaisvaikutuksineen on merkittävä kansanterveydellinen uhka, ja se aiheuttaa huomattavan osan terveydenhuollon kustannuksista.

Sarkopeniassa lihaksen rakenteessa ja solujen anabolisissa ja katabolisissa reaktioissa tapahtuu muutoksia. Muutokset syntyvät, kun lihassolujen proteiinisynteesi ja proteiinien hajoaminen eivät enää korreloi uusien solujen muodostumisen tai jakaantumisen kanssa kuten nuoremmilla yksilöillä. Tähän vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa tulehdukselliset ja hormonaaliset tekijät, motoneuroninen kato ja oksidatiivinen stressi. (Tilvis ym., 2010) Tämän hetkisen tiedon mukaan solun jakautuessa genomien kopioitumisen yhteydessä tapahtuva telomeerien lyhentymisen vähentää solujen jakautumista. Estrogeenin on todettu hidastavan telomeerien lyhentymistä (Välimäki ym., 2009).

Varhaisessa vaihdevuosi-iässä käytetyllä HRT:lla on todettu olevan lihaksiston heikkenemistä hidastava vaikutus (Sipilä ym., 2001; Ronkainen ym., 2009). Estrogeenin kaikkia molekyyli-tason vaikutusmekanismeja luustolihasen toiminnassa ei kuitenkaan tunneta (Ronkainen ym., 2009, 2010; Pöllänen ym., 2007, 2010; ks. yleiskatsaus Dawn ym., 2010). Muita lihaksiston heikkenemiseen mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä ovat lihaksiston satelliittisolujen (lihasten kantasolujen) vähentynyt aktivaatio ja myostatiini, joka estää satelliittisolujen toimintaa (Tilvis ym., 2010). Satelliittisolujen määrän väheneminen on suoraan verrannollinen lihasten regeneraatiokykyyn (Tilvis ym., 2010).

1.4 MMP-entsyymit

Soluväliaineen metalloproteinaaseja (*engl.* MMP; matrix metalloproteinase) tunnetaan tällä hetkellä 25. MMP:t ovat sinkkiriippuvaisia proteolyyttisiä entsyymejä. MMP-entsyymien yksi tunnetuimmista tehtävistä on kudoksissa solujen välitilan täyttävien soluväliaineen molekyylien (*engl.* ECM; extracellular matrix) pilkkominen ja siihen liittyvä kudosten muokkaaminen. ECM koostuu muun muassa elastiinista, kollageeneista, proteoglykaaneista ja glykoproteiineista (Alberts ym., 2008). MMP-entsyymit voidaan luokitella niiden toiminnan, rakenteen ja sijainnin perusteella yksilöllisiin ryhmiin, kuten kollageenaaseihin ja gelatinaaseihin. MMP:t pilkkovat ECM:n rakenteellisia proteiineja, mutta osallistuvat myös solujen, kuten lymfosyyttien, pintareseptorien ja -molekyylien pilkkomiseen. Ne voivat lisäksi aktivoida muita MMP-entsyymejä muokkaamalla entsyymin pro-muodon aktiiviseen muotoon.

1.4.1 MMP-2

MMP-2 (Gelatinase-A) pilkkoo muun muassa ECM:n fibronektiiniä, gelatiinia, säikeistä kollageenia ja elastiinia. *In vitro* -kokeissa MMP-2:n pitoisuuden lisääntymisen on todettu olevan yhteydessä mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumisessa rasvasoluiksi (Mannello ym., 2006). Ylipainoisilla naisilla on aiemmissa tutkimuksissa havaittu olevan pienempi systeeminen MMP-2:den kokonaispitoisuus kuin normaalipainoisilla (Kosmala ym., 2008). Veren plasman MMP-2 -pitoisuus korreloi positiivisesti ikääntymisen kanssa (Bonnema ym., 2007).

1.4.2 MMP-3

MMP-3 (Stromelysin-1) pilkkoo kollageeneja III, IV, IX, X, ja gelatiinia. Eläinkokeet ovat osoittaneet MMP-3 entsyymien pilkkovan luuta muodostavien osteoblastien solukalvolla olevaa FasL:a liukoiseen muotoon ja sitä kautta indusoivan luuta hajottavien osteoklastien apoptoosia (Garcia ym., 2013). Estrogeenireseptori α :n kautta vaikuttava estradioli indusoi *in vitro* luusoluviljelmissä MMP-3 -entsyymien määrän nousua (Garcia ym., 2013). Estrogeenin on siten osoitettu olevan yhteydessä luuston ylläpitoon. MMP-3:lla ja estradiolilla on siten tärkeä rooli luuston rakenteen ylläpidossa.

1.4.3 MMP-7

MMP-7 (Matrilysin) osallistuu FasL-Fas-reseptorikompleksin pilkkomiseen liukoiseen muotoon, ja siten solujen ja kudosten säätelymekanismeihin. MMP-7 on yhteydessä muun muassa endoteelisolujen erilaistumiseen, ja sitä kautta osallistuu ihmisillä angiogeneesin säätelyyn (ks. yleiskatsaus Masanori ym., 2015). Solujen pintamolekyylien pilkkomisessa MMP-7 stimuloi liukoisen FasL:n muodostumista (ks. yleiskatsaus Li ym., 2006). Ihmisillä veren plasman MMP-7:n pitoisuuden on todettu MMP-2:n tavoin korreloivan positiivisesti ikääntymisen kanssa (Bonnema ym., 2007).

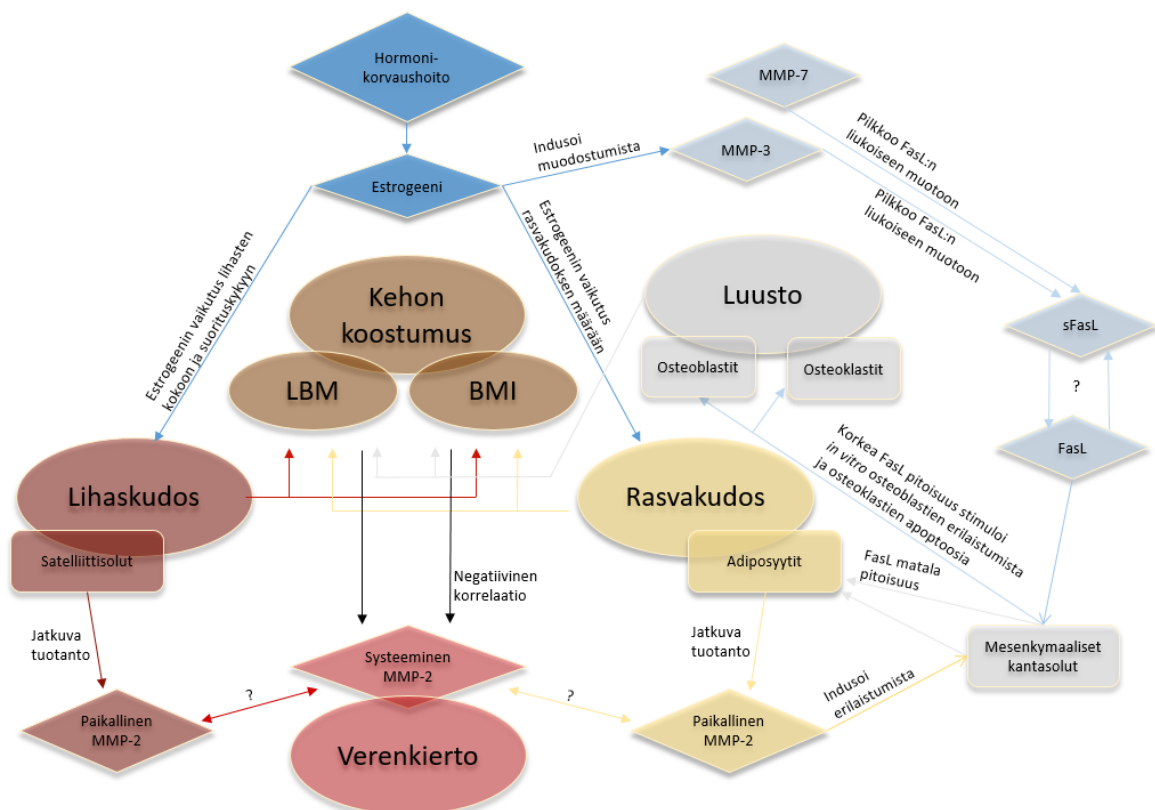
1.5 MMP:t, FasL ja estrogeeni

FasL vapautuu solujen pinnalta MMP-entsyymien toiminnan seurauksena. Yleisesti MMP-entsyymit vaikuttavat solun ulkopuoliseen kudusrakenteeseen sekä solujen ja niiden ulkopuolisen soluväliaineen väliseen viestintään vapauttamalla proteiineja, jotka aktiivisesti vaikuttavat solujen toimintaan (Alberts ym., 2008; ks. yleiskatsaus Batra ym., 2013). Toisin sanoen vapauttamalla solukalvolta proteiineja liukoiseen muotoon, MMP-entsyymit aktivoivat solujen ulkoisia proteiineja, mukaan lukien reseptoriin sitoutuneen FasL:n (Garcia ym., 2013). Soluviljelyolosuhteissa FasL:n pitoisuuden on havaittu olevan yhteydessä siihen, miten mesenkymaaliset kantasolut erilaistuvat (Rippo ym., 2013). Korkeampi FasL:n pitoisuus stimuloi kantasoluja erilaistumaan osteoblasteiksi (luuta rakentaviksi luusoluiksi), kun taas matalampi pitoisuus stimuloi kantasolujen erilaistumisen adiposyyteiksi (rasvasoluiksi). Ikääntymisen yhteydessä sFasL:n määrä seerumissa vähentyy (Kavathia ym., 2009). Systemisen sFasL-pitoisuuden on havaittu olevan yhteydessä seerumin estradiolipitoisuuteen, ja sillä näyttäisi olevan vahva geneettinen tausta (Kangas ym., 2014).

1.6 MMP:t ja ylipaino

Kehon rasvakudos muokkautuu koko ihmisen eliniän ajan. Rasvasolujen ja -kudoksen määrän lisääntyminen edellyttää muun muassa MMP-molekyylien toimintaa kudoksen laajenemisen mahdollistamiseksi. Eläinkokeissa on osoitettu, että MMP-2:n ja sen inhibiittorin TIMP-1:n (*engl.* tissue inhibitor of metalloproteinase) -entsyymien

puuttuminen vähentää rasvakudoksen muodostumista *in vivo*, kun taas MMP-3 -entsyymien puuttuminen lisää sitä (Lijnen, 2011). MMP-2:n osalta vastaavan kaltaisia tuloksia on saatu myös ihmisillä (Kosmala ym., 2007). MMP-entsyymien lisäksi rasvakudoksen laajeneminen on yhteydessä fibrinolyttiseen systeemiin ja angiogeneesin säätelyyn rasvasolujen toiminnan ylläpitämiseksi (Lijnen, 2011). MMP:t ovat myös oleellisessa osassa esimerkiksi angiogeneesissä verisuonelle vaadittavan soluvälitilan koostumuksen muokkaamisessa (Lijnen, 2011). Kokonaiskuva MMP-molekyylien toiminnasta yhdistettynä edellä käsiteltyihin osa-alueisiin on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Kaavakuva tutkimuksen muuttujiin vaikuttavista tekijöistä. Kuvassa on esitetty yksinkertaistettu malli tutkimuksen eri osa-alueista ja niihin liittyvistä tekijöistä. Nuolet kuvaavat kyseessä olevien solujen tai kudosten toimintaa ja välittävien molekyylien todennettuja yhteyksiä niihin. Luusto, rasva- ja lihaskudos määrittelevät kehonkoostumuksen ja siihen liittyvät suureet BMI:n ja LBM:n.

2. Tutkimuksen tavoitteet

Tämä pro gradu -tutkimus liittyy laajempaan SAWEs (Sarcopenia, Aging, Women and Estrogen) -tutkimukseen, jossa on selvitetty estrogeenia sisältävän HRT:n yhteyttä lihasten ominaisuuksiin sekä niitä molekulaarisia mekanismeja, joilla HRT:n vaikutukset välittyvät vaihdevuosi-ikäisten naisten lihaksistoon (Ronkainen ym. 2009). Tutkittavina on ollut identtisiä vaihdevuosi-ikäisiä kaksossisaria, jotka ovat HRT:n suhteen diskordantteja. Toisin sanoen toinen sisar on HRT:n monivuotinen käyttäjä, kun taas toinen sisar ei ole koskaan käyttänyt HRT:a. SAWEs-tutkimuksen aikaisemmat tulokset osoittavat, että verenkierrosta mitatut FasL-pitoisuudet ovat merkitsevästi matalammat HRT:a käyttävillä sisarilla verrattuna heidän HRT:a käyttämättömiin sisariinsa. Lisäksi seerumin FasL-proteiinin pitoisuudella on vahva geneettinen tausta (Kangas ym., 2014).

Tämän pro gradu -tutkimuksen tarkoitus on selvittää seerumin MMP-entsyymien mahdollista yhteyttä verenkierrossa vapaana olevan FasL:n määrän säätelyyn. Tutkimuksen kysymykset voidaan esittää tarkemmin seuraavasti:

- 1) Ovatko naisten systeemisten MMP-entsyymien (seerumin MMP-2, -3 ja -7) pitoisuudet erilaiset ennen vaihdevuosi-ikää kuin vaihdevuosien jälkeen?
- 2) Ovatko naisten systeemisten MMP-entsyymien (seerumin MMP-2, -3 ja -7) pitoisuudet vaihdevuosien jälkeen erilaiset estrogeenia sisältävää HRT:a käyttävillä kuin heidän HRT:a käyttämättömillä identtisillä kaksossisarillaan?
- 3) Ovatko systeemisten MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien määrät yhteydessä seerumin FasL-proteiinin määrään?
- 4) Ovatko systeemiset FasL-pitoisuudet ja/tai MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien pitoisuudet yhteydessä kehonkoostumukseen?

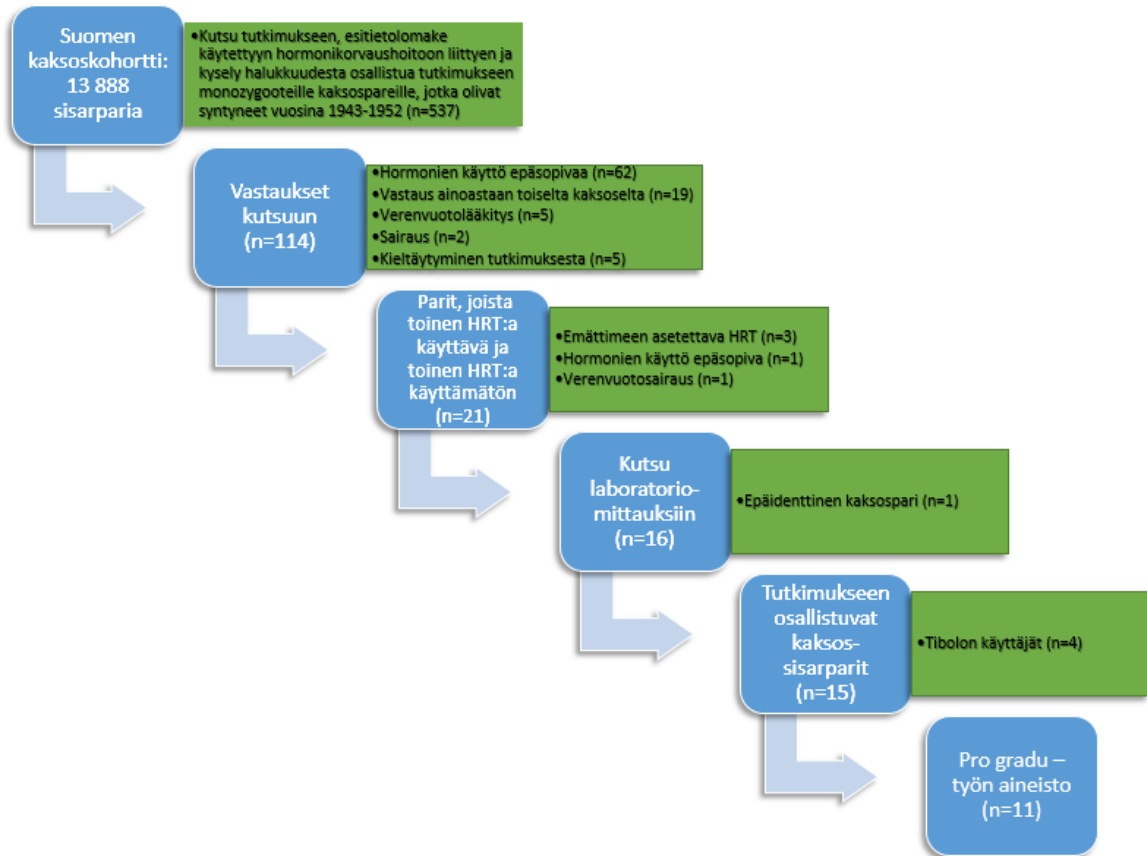
3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Tutkimusasetelma ja tutkittavat

Tässä tutkimuksessa käytettiin Jyväskylän yliopiston Terveystieteiden laitoksella vuonna 2007 kerätyn SAWEs-tutkimuksen tietoja ja näytteitä. SAWEs-tutkimus on poikkileikkaus- ja tapaus-verrokkitutkimus monivuotisen, keskimäärin 7 vuoden mittaisen, HRT:n käytön yhteydestä lihaksiston ominaisuuksiin ja toimintaan, kehonkoostumukseen sekä niihin molekulaarisiin mekanismeihin, joilla HRT:n lihasvaikutukset välittyvät. Koehenkilöt rekrytoitiin Suomalaisen kaksoskohortin tutkimustietokannasta (Kaprio ym., 1978), jonka avulla määriteltiin tutkimukseen sopivat sisarparit kutsuttavaksi tutkimuksiin. Tutkimukseen valittujen henkilöiden valinta- ja poissulkemiskriteerit ovat esitettyinä kuvassa 2. Laboratoriokokeisiin osallistui viisitoista 54-62 -vuotiasta identtistä kaksossisarparia, jotka olivat HRT:n suhteen diskordantteja, eli toinen sisko oli HRT:n pitkäaikainen käyttäjä, mutta toinen sisko ei ollut käyttänyt HRT:a koskaan. Tutkittavilta mitattiin laboratoriossa muun muassa kehonkoostumus, maksimaalinen kävelynopeus, lihasten rakenne ja koostumus sekä suorituskykyä kuvaavia ominaisuuksia. Tutkittavilta otettiin veri-, lihaskudos- ja rasvakudosnäytteet. Koska tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli selvittää estrogeeniä sisältävän HRT:n yhteyksiä verenkierron MMP-entsyymien määrään, jätettiin aineistosta pois neljä kaksosparia, joilla HRT-valmisteena oli ollut Tibolon. Tibolon-valmiste ei sisällä estrogeeniä, joten sen vaikutusmekanismi poikkeaa kahdesta muusta tutkittavien käyttämästä estrogeeni-perusteisesta valmiste-tyypistä. Näin ollen tutkittavia kaksospareja oli tässä pro gradu -työssä yhteensä 11.

Premenopausaalisenä ryhmänä käytettiin SAWEs-tutkimuksen yhteydessä vuonna 2007 kerätyn ”Fertile” -ryhmän näytteitä ja tietoja. Kyseisen ryhmän muodostivat 59 hormonaalisia ehkäisyvalmisteita käyttämätöntä 30-40 -vuotiasta naista. Tämän premenopausaalisen ”Fertile”-ryhmän naisilla oli normaali kuukautiskierto. Heiltä otettiin veri- ja kudospäätteet, ja heille tehtiin antropometrinen ominaisuuksien mittaukset kuten identtisille postmenopausaalille kaksossisarpareille. Premenopausaalisisessa ryhmässä kriteerit tutkimuksesta poissulkemiseen olivat samat kuin postmenopausaalisisilla kaksossisarpareilla. Tässä pro gradu-tutkimuksessa käytetään ”Fertile”-ryhmästä

osajoukkoa (n=15), joilla oli keskenään samanlainen kehonkoostumus, jotta rasvakudoksessa tapahtuvan steroidisynteesin määrään vaihtelu tutkittavien välillä saatiin minimoitua.



Kuva 2. Tutkimukseen kutsuttujen sisarparien pois-sulkemiskriteerit. Kuvassa on esitetty tutkimukseen kutsuttujen identtisten kaksossisarparien tutkimukseen osallistumisen poissulkemiskriteerit.

Tutkittavilta mitattiin kehonkoostumus käyttäen Inbody-laitteistoa (720, Biospace Co, Ltd., Seoul, Etelä-Korea). Pituuden ja painon mittaustulosten avulla laskettiin BMI-arvot. Premenopausaalisen ryhmän verinäytteet otettiin jonakin kuukautiskierron vuotopäivistä 1-5, jolloin estradiolitasot ovat matalimmillaan ja mahdollisimman vertailukelpoiset. Verinäytteet otettiin kaikilta yön yli kestäneen paaston jälkeen, ja näytteenottovaiheessa koehenkilöt olivat makuuasennossa kehon nestekierron vakioimiseksi. Tutkittujen veren estradiolipitoisuus oli aikaisemmin määritetty seeruminäytteistä käyttäen radioimmunologista (RIA) -menetelmää (Spectria Estradiol RIA, Orion Diagnostica, Finland).

Tutkimuksella on Keski-Suomen sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan puoltava lausunto (lupa no E0606/06), ja tutkimus toteutettiin Helsingin julistuksen ohjeistusten mukaisesti. Tutkittavat allekirjoittivat tutkimuksen suorittamiseen liittyvän suostumuksen, jossa tiedotettiin tutkimukseen liittyvistä mahdollisista riskitekijöistä, haitoista, hyödyistä, tutkimusmenetelmistä ja tutkimukseen liittyvistä julkaisuista.

3.2 ELISA-menetelmä

Pro gradu -tutkimuksessa käytettiin SAWEs-tutkimuksen seeruminäytteitä, joista määritettiin metalloproteinaasien (MMP-2, -3, ja -7) pitoisuudet. MMP-entsyymien pitoisuuksien määrittämisessä käytettiin kaupallisia tutkimuskäyttöön soveltuvia ELISA (*engl.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) -menetelmiä. Valitut määritysmenetelmät (Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit, Human Total MMP-3 Quantikine ELISA Kit ja Human Total MMP-7 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) perustuvat epäsuoraan ”sandwich” ELISA-menetelmään sen paremman tarkkuuden ja erottelukyvyn takia verrattuna suoraan ELISA-menetelmään. Käytettyjen kittien määritysherkkyydet ja näytteiden laimennoskertoimet ovat esitettyinä liitteessä 2. MMP-entsyymien pitoisuudet määritettiin seeruminäytteistä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

ELISA-analyseissä käytettiin kaupallisia esivalmistettuja 96-kuoppalevyjä, joiden kaivot olivat päällystetty analysoitavan MMP-entsyymin monoklonaalisella primaarivasta-aineella. Käytetyt reagenssit lämmitettiin huoneenlämpötilaan (+22°C) ja laimennettiin ohjeiden mukaisiin pitoisuuksiin. Tutkittavat seeruminäytteet laimennettiin kalibraattorin laimennusliuoksella (*engl.* calibrator diluent) liitteen 2 mukaisesti.

Kuoppalevyn sisäisen hajonnan selvittämiseksi kontrollinäytteenä käytettiin tutkimuksesta pois jääneestä kaksosparista toisen sisaren seeruminäytettä kuoppalevyjen alkupäässä, keskivaiheessa ja loppupäässä. Määrityksen inkuboinnit suoritettiin huoneenlämmössä taseoravistelijassa (1296-001 Plateshake, LKB, Wallac) nopeudella 500 kierrosta minuutissa valolta suojattuna lukuun ottamatta substraattiliuoksen inkubointia, jossa levyt inkuboitin ilman ravistelua. Kaivojen peseminen suoritettiin manuaalisesti käyttäen

monikanavapipettiä. Kuoppalevyt kuivattiin kaatamalla nesteet pois, ja lyömällä levyä voimakkaasti kuivia käsipapereita vasten.

Värireaktio pysäytettiin pysäytysliuksella, ja näytteen absorbanssit mitattiin välittömästi kuoppalevynlukijalla (Multiskan Go, Thermo Scientific) aallonpituudella 450 nm. Mittaustuloksen tarkentamiseksi käytettiin aallonpituuden korjauksena aallonpituutta 540 nm, joka vähennettiin saaduista tuloksista. Entsyymien pitoisuudet saatiin yksikkönä pg/ml. Saaduista tuloksista vähennettiin nolla-standardin arvo taustan poistamiseksi.

3.3 Gelatiinizymografia

Gelatiinizymografisen menetelmän avulla oli tarkoitus erotella MMP-2 -molekyylien aktiivinen ja inaktiivinen pro-muoto, ja määrittää niiden suhteelliset osuudet seeruminäytteistä mukailten Granello-Pierno A. ja Reich E. (1978) menetelmää. Seeruminäytteille ei löytynyt kirjallisuudesta valmista menetelmää, sillä gelatiinizymografisissa menetelmissä on aikaisemmin käytetty näytteinä lähinnä kudoslusyaatteja. Gelatiinizymografia perustuu SDS-PAGE -menetelmään (*engl.* Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Laemmli 1970), jonka avulla tutkittavat MMP-2 -molekyylit erotetaan muista proteiineista. Erottamisen jälkeen denaturoituneet MMP-molekyylit renaturoitiin takaisin aktiivisesti toimivaan konformaatioon. Aktivoimisen jälkeen MMP:t pilkkovat geeliin valamisvaiheessa lisätyn gelatiinin. MMP-aktiivisuus havaitaan geelistä värjäyksen jälkeen värjäytymättä jääneinä vaaleina alueina.

Testauksessa käytettiin itse valmistettuja 10% SDS-geelejä (30% akryyliamidi mix, 1,5M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% ammoniumpersulfaatti ja N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine), joissa osa Milli-Q -vedestä korvattiin 1% gelatiini-Milli-Q -vesiliuksella (Gelatiini Tyyppi A, 9000-70-8, Sigma-Aldrich), jolloin gelatiinin loppupitoisuus oli geelissä 0,1%. Kaupallisia SDS-geelejä (Criterion Precast 10% Zymogram, #345-0080, Bio-Rad) käytettiin välivaiheen testauksessa, ja niillä suoritettiin myös varsinainen näytteen elektroforeettinen erottelu.

Kontrollinäytteenä käytettiin CHO-soluissa (*engl.* Chinese Hamster Ovary) tuotettua puhdistettua ihmisen pro-MMP-2 -molekyyliä (PF037, Calbiochem, Merck Millipore). Kontrollinäyte laimennettiin 1:10 1X Zymogram kehityspuskurilla (10X Zymogram

Development buffer, #161-0766, Bio-Rad), koska kehityspuskuri vastasi alkuperäistä säilytysliuosta. Laimennettu kontrolli jaettiin 1 μ l säilytyseriin toistuvien sulatus-pakastus - syklien välttämiseksi. Jokaisen näyteajon yhteydessä kontrollit laimennettiin pitoisuuteen 1ng/ μ l. Kontrollina käytettiin 1ng/kaivo pro-MMP-2 -laimennosta.

Näyteajojen testauksessa käytettiin SAWEs-tutkimuksessa otettua seeruminäytettä, joka laimennettiin ennen jokaista geelijaota. Näytteiden laimennokset tehtiin käyttäen 1X Zymogram kehityspuskuria. Testatut laimennusvälit olivat 10:1,5 - 1:500. Geelille laitettun näytteen kokonaistilavuus yhdessä laimennusliuoksen ja 5X näytepuskurin (0,4M Tris, pH 6,8, 5% SDS, 20% Glyseroli ja 0,03% bromofenolisininen) kanssa olivat välillä 1,25 μ l - 12,5 μ l.

Geelajot suoritettiin jäähauteella +4°C asteessa laitteiston kuumenemisen ja proteiinien denaturoitumisen estämiseksi. Itse valmistetut geelit ajettiin Mini-PPROTEAN Tetra - laitteistolla (Bio-Rad) noin puoli tuntia (80 V) ylä- ja alageelin rajan saavuttamiseen asti, ja alageelissä noin kaksi tuntia (125V). Kaupalliset geelit ajettiin Criterion-laitteistolla (Bio-Rad) 150 minuuttia (125V). Molemmilla geelijomenetelmillä geelit ajettiin huomattavasti näyterintaman yli MMP-2 -molekyylien paremman erottuvuuden varmistamiseksi.

Ajon jälkeen MMP-entsyymit aktivoitiin renaturoimalla proteiinikonformaatiot. Renaturaatio suoritettiin 1X Zymogram kehityspuskurilla, johon oli lisätty Triton X- 100 -detergenttiä (loppupitoisuus 2,5%). Renaturaatiovaiheen jälkeen siirryttiin kehitysvaiheeseen, jonka aikana aktivoidut MMP-entsyymit pilkkovat gelatiinia. Renaturaatio- ja kehitysvaiheen inkubointiolosuhteita testattiin eri pituisilla ajoilla ja lämpötiloilla, joista renaturaatiovaiheeseen kokeiltiin vaihtoehtoja 2x20 ja 3x20 minuuttia +22°C ja +37°C asteessa (Hybridiser HB-1D, Techne) keinuttelussa (Compact Rocker CR100, Finepcr). Kehitysvaiheessa ensimmäinen inkubointi oli jokaisessa testissä 10 minuuttia +22°C asteessa keinuttelussa. Pidempää inkubaatioaikaa testattiin lämpötiloissa +4°C, +22°C ja +37°C asteessa sekä aikaväleillä 2 tuntia +22°C, 18 tuntia +4°C ja +37°C asteessa, 24 tuntia +22°C ja +37°C asteessa sekä 42 tuntia +37°C asteessa. Inkuboinnit suoritettiin pimeässä valon mahdollisen vaikutuksen estämiseksi.

Kehityksen jälkeisessä geelin värjäämisessä käytettiin alkoholipohjaista Coomassie-blue -värjäysliuosta (0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% Etanoli, 10% Etikkahappo). Väripoistoliuoksena käytettiin vastaavaa liuosta ilman Coomassie blue -väriä (40%

Etanoli, 10% Etikkahappo). Värjäys testattiin yhden tunnin ja kahden tunnin pituisilla värjäysajoilla +22°C asteessa keinuttelussa. Värinpoisto suoritettiin tarpeen mukaan. Itse tehdyissä geeleissä värjäys kesti 50 minuuttia, joihin 25 minuutin jälkeen vaihdettiin uusi liuos. Kaupallisissa geeleissä värinpoistoon riitti 20 minuuttia. Värjätyt geelit kuvattiin LI-COR Odyssey CLx -infrapunakuvantamislaitteistolla (LI-COR Biosciences, Ltd, Iso-Britannia). Mini-PPROTEAN Tetra -laitteistoon sopivissa itse valmistetuissa geeleissä MMP-2 -entsyymit olivat riittävän aktiivisia gelatiinin pilkkomisessa, mutta geelin kokoon liittyvä erottelukyky ei riittänyt kvantitoitavaan tulokseen. Kaupallisissa Criterion Precast 10% Zymogram -geeleissä erottelukyky oli huomattavasti parempi, mutta MMP-2 -entsyymien pilkkoman gelatiinin määrä ei ollut riittävä tulosten kvantitointiin. Zymografisen menetelmän kehitys vaatii lisää optimointia, eikä sen tuloksia ole esitetty tässä tutkielmassa.

3.4 Tilastolliset analyysit

Tulosten analysointiin käytettiin SPSS-tilasto-ohjelmaa (IBM SPSS Statistics, versio 20, Chicago, IL). Aineiston normalisuus testattiin käyttäen Shapiro-Wilk- testiä. Parametriset arvot mitattiin käyttäen riippumattoman otoksen t-testiä. Ei-parametrisissä testauksissa käytettiin premenopausaalisen ja molempien postmenopausaalisten ryhmien vertailussa Mann-Whitney U -testiä, ja postmenopausaalisten ryhmien välisessä vertailussa käytettiin Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testiä. Eri muuttujien väliset yhteydet ryhmien sisällä analysoitiin käyttäen Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrointa.

4. Tulokset

4.1 Tutkittavien antropometriset ominaisuudet

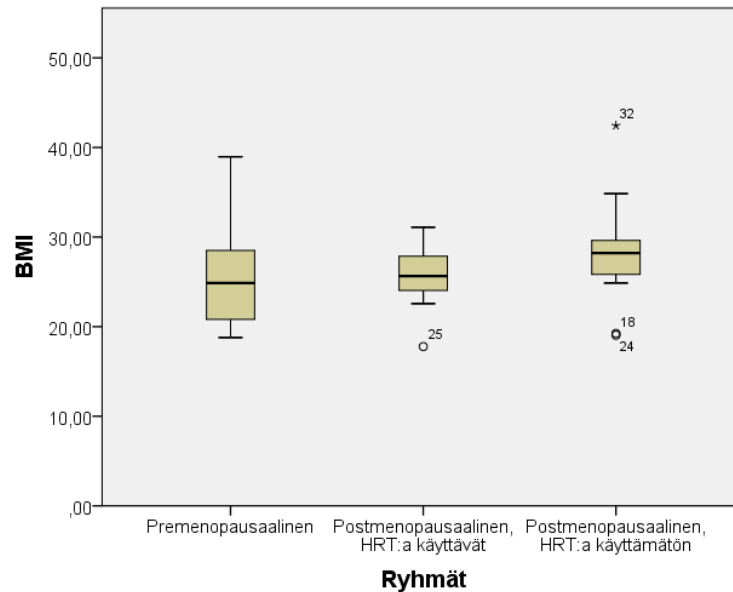
Tutkittavien antropometriset ominaisuudet on esitetty taulukossa 1 ja BMI, rasva-% sekä LBM-arvojen box plot -kuvaajat kuvissa 3–5. HRT:a käyttävien ja käyttämättömien postmenopausaalisten naisten rasvaprosentit olivat 6,2 % ja 21,8 % suuremmat kuin premenopausaalisilla naisilla. HRT:a käyttämättömien rasvaprosentti oli 14,7 % suurempi kuin HRT:a käyttävien kaksossisariensa. Tämä ero oli tilastollisesti merkitsevä.

HRT:a käyttävien kaksossisarten BMI-arvo on 9,7 % suurempi kuin HRT:a käyttämättömien sisarten, mutta arvojen välinen ero ei ole kuitenkaan tilastollisesti merkitsevä. Myös premenopausaaliseen ryhmään verrattuna tulos oli samaa luokkaa: HRT:a käyttämättömien naisten BMI-arvo oli 10,2 % suurempi. Premenopausaalisten ja HRT:a käyttävien postmenopausaalisten naisten BMI-arvoissa ei myöskään ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. Premenopausaalisten naisten ryhmässä rasvattoman massan osuus kehon painosta (LBM) oli 2,5 % suurempi verrattuna HRT:a käyttäviin naisiin ja 2,1 % suurempi kuin HRT:a käyttämättömillä naisilla. HRT:a käyttämättömien kaksossisarten LBM oli 0,2 % suurempi verrattuna HRT:a käyttäviin kaksossisariin. LBM-arvojen eroissa ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja tutkittujen ryhmien välillä.

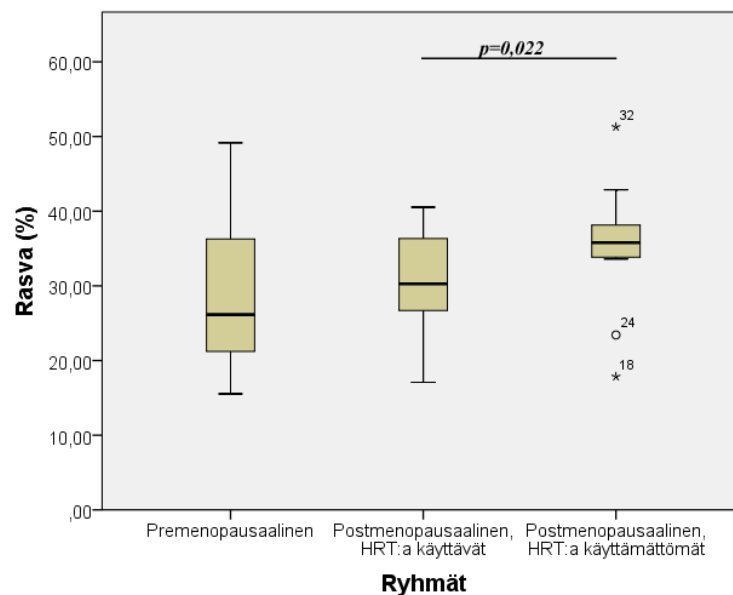
Taulukko 1. Kehon antropometristen ominaisuuksien arvot premenopausaalisten naisten (Pre) ja postmenopausaalisten identtisten kaksossisarparien ryhmissä. Postmenopausaalisista kaksossisarista toinen sisar käytti HRT:a (HRT) ja toinen sisar ei käyttänyt (ei HRT).

	Pre (n=15)	HRT (n=11)	ei HRT (n=11)	Pre- vs. ei HRT <i>p</i> -arvo ^a	Pre vs. HRT <i>p</i> -arvo ^a	HRT vs. ei HRT <i>p</i> -arvo ^b
Ikä (vuosia)	32,1 ± 1,9	57,6 ± 1,9	57,6 ± 1,9	-	-	-
Pituus (cm)	164,0 ± 3,5	162,4 ± 4,7	161,8 ± 4,4	-	-	-
Paino (kg)	68,8 ± 15,5	67,6 ± 8,7	73,6 ± 15,3	-	-	-
BMI (kg/m²)	25,6 ± 5,9	25,7 ± 3,8	28,2 ± 6,5	0,301	0,960	0,084
Rasva (%)	28,9 ± 10,3	30,7 ± 7,1	35,2 ± 8,9	0,119	0,631	0,022
LBM (kg)	44,6 ± 3,7	43,5 ± 3,3	43,7 ± 4,3	0,571	0,468	0,896

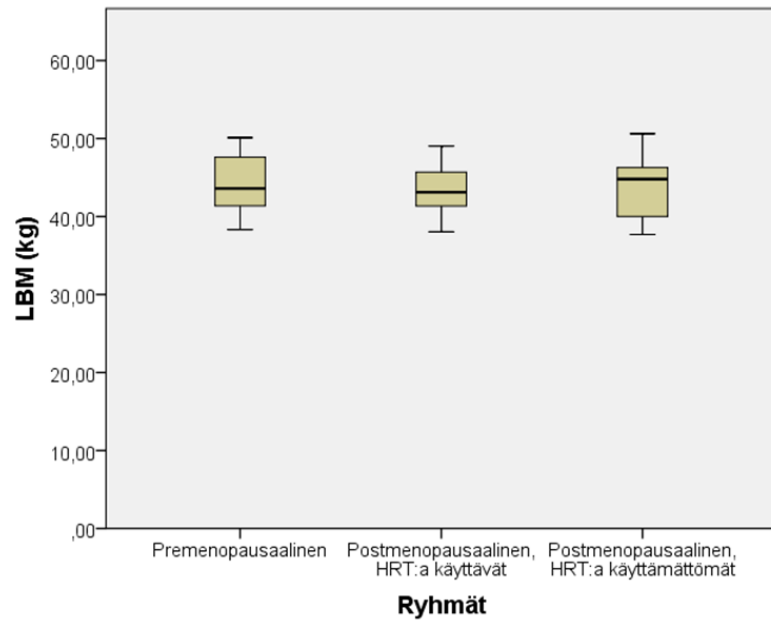
BMI: body mass index, LBM: lean body mass. Arvot: keskiarvo ± keskiarvon keskihajonta. Tilastollisesti merkitsevät arvot ovat esitetty lihavoituna. Käytetyt testit ovat merkattuina yliviitteillä a ja b: Mann-Whitney U -testi on merkattu a:lla ja Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testi b:llä.



Kuva 3. BMI-arvojen vaihtelu pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Premenopausaalisten naisten ryhmässä on suurin hajonta muihin ryhmiin verrattuna. Kuvassa esitetyt ryhmät eivät keskiarvoltaan eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi, mutta HRT:a käyttämättömien sisarten (ei HRT) BMI-arvon mediaani on arvoltaan suurempi muihin ryhmiin verrattuna. Kuva esittää arvot box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.



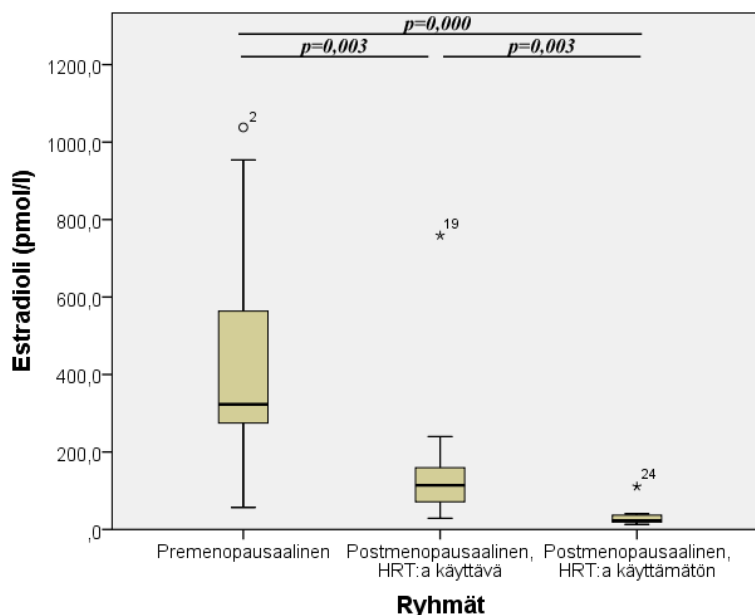
Kuva 4. Rasvan %-osuuksien vaihtelu pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Kuvassa HRT:a käyttävien ja käyttämättömien sisarten välillä on tilastollisesti merkitsevä ero ($p=0,022$). Premenopausaalisten ryhmässä on nähtävissä mediaaniltaan pienin rasvaprosentti. Tässä ryhmässä on kuitenkin suurin hajonta muihin ryhmiin verrattuna. HRT:a käyttämättömien sisarten rasvaprosentin mediaani on suurin ja HRT:a käyttävien sisarten mediaani sijoittuu kahden muun ryhmän arvojen väliin. Kuva esittää arvot box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.



Kuva 5. LBM-määrien vaihtelu pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Eri ryhmien välillä LBM-arvoissa ei ole tilastollisesti merkitsevää eroa. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.

4.2 Estradioli-, MMP- ja FasL-pitoisuudet

Estradioli-, MMP- ja FasL-analyysien tulokset näkyvät taulukossa 2 ja box plot -kuvaajat kuvissa 6-10. Suurin ero tutkittujen ryhmien välillä on odotetusti seerumista mitatussa estradiolipitoisuudessa. Premenopausaalisen ryhmän seerumin estradiolin pitoisuuksien keskiarvo on noin 2,6 kertaa suurempi HRT:a käyttäviin sisäriin verrattuna ja 13,4 kertainen HRT:a käyttämättömiin sisäriin verrattuna. HRT:a käyttävien sisarten estradiolin pitoisuus on 5,2 kertaa suurempi HRT:a käyttämättömiin kaksosisariinsa verrattuna.



Kuva 6. Estradiolipitoisuuksien vaihtelu seerumissa pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Premenopausaalisisessa ryhmässä on huomattavasti korkeampi estradiolipitoisuuksien mediaani kuin muilla ryhmillä. Samalla ryhmällä on myös suurin hajonta. HRT:a käyttämättömien sisarten estradiolipitoisuudet ovat hyvin alhaiset ja HRT:a käyttävien sisarten hieman suuremmat. Kaikkien ryhmien välillä oli tilastollisesti merkitsevä tai erittäin merkitsevä ero. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.

Postmenopausaalisten sisarparien ja premenopausaalisen naisten seeruminäytteistä mitattiin estradioli- ja FasL-pitoisuudet ja MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien pitoisuudet. Taulukossa 2 on esitettyinä tutkittujen ryhmien keskiarvot sekä keskiarvojen keskihajonnat.

Seerumista mitatussa estradiolipitoisuudessa on tilastollisesti merkitsevä ero kaikkien ryhmien välillä. Premenopausaalisisessa ryhmässä seerumin estradiolipitoisuudet ovat keskiarvoisesti huomattavasti muita ryhmiä suurempia, ja HRT:a käyttävien arvot sijoittuvat premenopausaalisten ja HRT:a käyttämättömien sisarten arvojen väliin.

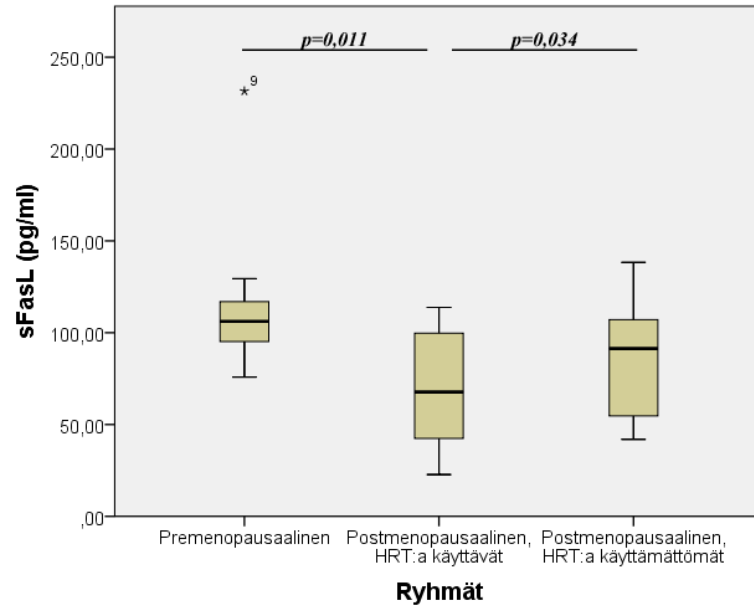
Seerumin FasL-pitoisuus on HRT:a käyttävillä sisarilla pienin muihin ryhmiin verrattuna. HRT:a käyttämättömien sisarten mitatut pitoisuudet asettuvat premenopausaalisen ja HRT:a käyttävien sisarten väliin. Näistä ryhmistä premenopausaalisten ja HRT:a käyttävien väliset sekä HRT:a käyttävien ja käyttämättömien arvojen väliset erot ovat tilastollisesti merkitseviä.

MMP-2 -entsyymien pitoisuus oli HRT:a käyttävillä sisarilla hieman pienempi kuin kahdella muulla ryhmällä, joiden MMP-2 pitoisuudet olivat suunnilleen samalla tasolla. Kuitenkin HRT:a käyttävien sisarten sisäinen hajonta oli muihin ryhmiin nähden pienempi. MMP-2, -3, -7 -molekyylipitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa eri ryhmien välillä.

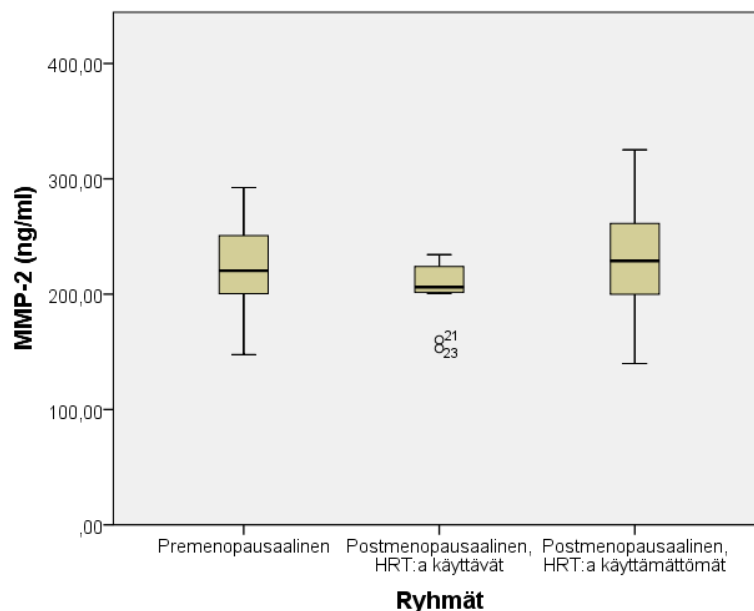
Taulukko 2. Seerumin estradiolin, MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien ja sFasL:n pitoisuudet premenopausaalisten naisten (Pre) ja postmenopausaalisten identtisten kaksossisarparien ryhmissä. Postmenopausaalista kaksossisarista toinen sisar käytti HRT:a (HRT) ja toinen sisar ei käyttänyt (ei HRT).

	Pre (n=15)	ei HRT (n=11)	HRT (n=11)	Pre vs. ei HRT <i>p</i> -arvo ^a	Pre vs. HRT <i>p</i> -arvo ^a	HRT vs. ei HRT <i>p</i> -arvo ^b
Estradioli (pmol/l)	445,5 ± 302,8	33,3 ± 27,4	172,9 ± 203,2	0,00	0,003	0,003
sFasL (pg/mol)	112,3 ± 36,2	85,6 ± 33,8	71,7 ± 32,4	0,134	0,011	0,034
MMP-2 (ng/ml)	220,8 ± 40,8	229,3 ± 50,4	204,7 ± 26,5	0,640	0,265	0,088
MMP-3 (ng/ml)	12,3 ± 5,9	13,2 ± 5,5	11,3 ± 4,0	0,646	0,838	0,182
MMP-7 (ng/ml)	3,0 ± 0,6	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,6	0,077	0,054	0,722

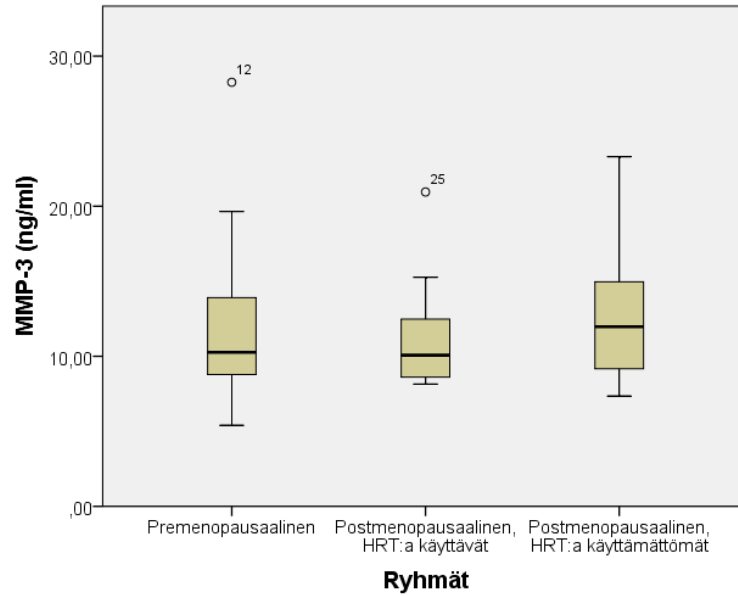
sFasL: seerumin Fas-ligandi, MMP: Soluväliaineen metalloproteiinaasi. Arvot: keskiarvo ± keskiarvon keskihajonta. Tilastollisesti merkitsevät arvot ovat lihavoitu. Käytetyt testit ovat merkattuina yläviitteillä a ja b: Mann-Whitney U -testi on merkattu a:lla ja Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testi b:llä.



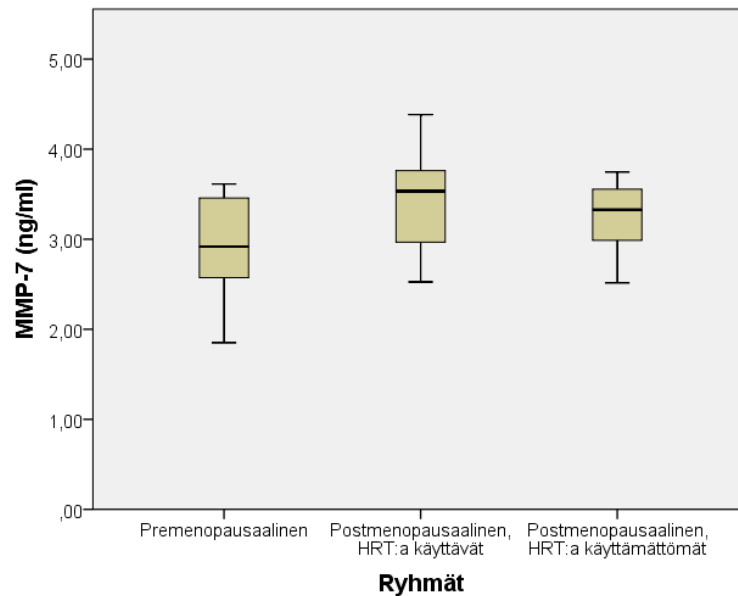
Kuva 7. sFasL-pitoisuuksien vaihtelu seerumissa pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Premenopausaalisen ja HRT:a käyttävien sisarien sekä HRT:a käyttävien ja käyttämättömien sisarten välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero sFasL-pitoisuuksissa. HRT:a käyttämättömien sisarten sFasL-pitoisuuksien mediaani sijoittuu kahden muun ryhmän väliin, ja premenopausaalisen ryhmän arvot olivat mediaaniltaan korkeimmat. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna on mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.



Kuva 8. MMP-2 -pitoisuuksien vaihtelu seerumissa pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. HRT:a käyttävien sisarten MMP-2 -pitoisuuksien hajonta on huomattavasti pienempi kuin muilla ryhmillä. Tutkittujen ryhmien väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna on mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.



Kuva 9. MMP-3 -pitoisuuksien vaihtelu seerumissa pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. HRT:a käyttävien sisarten MMP-3 -pitoisuuksien hajonta on pienempi kuin kahden muun ryhmän hajonnat. HRT:a käyttämättömien sisarten mediaani on hieman korkeampi kuin muiden ryhmien, mutta erot eivät olleet eri ryhmien välillä tilastollisesti merkitseviä. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna on mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.



Kuva 10. MMP-7 -pitoisuuksien vaihtelu seerumissa pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä. Postmenopausaalisten ryhmien MMP-7 -pitoisuuksien mediaanit ovat korkeammat kuin premenopausaalisen ryhmän, mutta eri ryhmien välillä ei kuitenkaan havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja. Kuva esittää tulokset box plot -kuvaajina, joissa keskilukuna on mediaani. Mediaanin lisäksi kuvassa näkyvät kvartaalivälit sekä suurin ja pienin arvo. Arvoista 1,5-3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot ovat merkitty ympyröillä ja yli 3 kertaa kvartaaliväliä suuremmat arvot tähdillä.

4.3 Estradioli-, MMP- sekä FasL-pitoisuuksien ja kehonkoostumuksen väliset yhteydet

Estradiolin, MMP-entsyymien ja sFasL:n väliset korrelaatiot pre- ja postmenopausaalisten naisten ryhmissä muuttujien välillä ovat esitettyinä taulukossa 3. Taulukosta nähdään, että MMP-3:n ja MMP-7:n välillä on premenopausaalisessa ryhmässä tilastollisesti merkitsevä yhteys ($r=0,550$ ja $p=0,03$). Muiden tutkittujen tekijöiden väliset korrelaatiot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Taulukko 3. Seerumin estradioli-, MMP- ja FasL-pitoisuuksien väliset korrelaatiot premenopausaalisten naisten (Pre) ja postmenopausaalisten identtisten kaksossisarparien ryhmissä. Postmenopausaalisista kaksossisarista toinen sisar käytti HRT:a (HRT) ja toinen sisar ei käyttänyt (ei HRT).

		Pre (n=15)		HRT (n=11)		ei HRT (n=11)	
		<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo	<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo	<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo
Estradioli	sFasL	0,125	0,657	0,118	0,73	0,223	0,509
	MMP-2	-0,118	0,676	0,400	0,22	0,301	0,369
	MMP-3	-0,375	0,168	-0,264	0,43	0,178	0,601
	MMP-7	-0,154	0,585	-0,264	0,43	0,310	0,354
sFasL	MMP-2	-0,182	0,52	0,473	0,14	0,273	0,42
	MMP-3	-0,036	0,90	-0,136	0,69	0,355	0,29
	MMP-7	0,182	0,52	-0,227	0,50	0,336	0,31
MMP-2	MMP-3	0,357	0,19	0,382	0,25	0,509	0,11
	MMP-7	0,114	0,69	0,164	0,63	0,018	0,96
MMP-3	MMP-7	0,550	0,03	0,045	0,89	0,373	0,26

sFasL: seerumin Fas-ligandi, MMP: Soluväliaineen metalloproteiinaasi. Taulukon *r*- ja *p*-arvot ovat laskettu ei-parametrisellä Spearmanin korrelaatiotestillä. Tilastollisesti merkitsevät arvot ovat lihavoitu.

Pre- ja postmenopausaalisten ryhmien antropometristen ominaisuuksien yhteys seerumista määritettyjen molekyylien pitoisuuksiin näkyy taulukossa 4. LBM:n ja MMP-2 -molekyylien välillä on premenopausaalissa ryhmässä tilastollisesti merkitsevä negatiivinen korrelaatio ($r=-0,550$ ja $p=0,03$).

Taulukko 4. Kehon rasvattoman massan (LBM), rasvan prosentuaalisen osuuden (rasva %), seerumin MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien sekä FasL-pitoisuuksien väliset korrelaatiot premenopausaalisten naisten (Pre) ja postmenopausaalisten identtisten kaksossisarparien ryhmissä. Postmenopausaalista kaksossisarista toinen sisar käytti HRT:a (HRT) ja toinen sisar ei käyttänyt (ei HRT).

		Pre (n=15)		HRT (n=11)		ei HRT (n=11)	
		<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo	<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo	<i>r</i> -arvo	<i>p</i> -arvo
LBM	FasL	0,493	0,06	0,118	0,73	-0,100	0,77
	MMP-2	-0,550	0,03	0,255	0,45	0,164	0,63
	MMP-3	-0,136	0,63	0,091	0,79	-0,073	0,83
	MMP-7	-0,125	0,66	0,373	0,26	0,464	0,15
Rasva %	FasL	0,475	0,07	-0,491	0,13	-0,473	0,14
	MMP-2	-0,500	0,06	-0,364	0,27	0,255	0,45
	MMP-3	-0,011	0,97	-0,509	0,11	-0,355	0,28
	MMP-7	0,232	0,41	-0,055	0,87	-0,236	0,48

FasL: Fas-ligandi, MMP: Soluväliaineen metalloproteiinaasi. Taulukon *r*- ja *p*-arvot on laskettu ei-parametrisellä Spearmanin korrelaatiokertoimella. Tilastollisesti merkitsevät arvot ovat lihavoitu.

5. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa määritettiin systeemisten MMP-2, -3, -7 -entsyymien ja FasL:n -pitoisuudet, ja selvitettiin näiden yhteyttä kehonkoostumukseen premenopausaalisten naisten ja postmenopausaalisten identtisten kaksossisarten ryhmissä. Postmenopausaalisten kaksossisarten ryhmässä sisaret olivat estrogeenia sisältävän HRT:n suhteen diskordantteja. Merkittävin tulos oli MMP-2 -entsyymin ja LBM:n välinen positiivinen korrelaatio, mikä viittaa MMP-2:n ja rasva- ja lihaskudosten määrän väliseen yhteyteen. Postmenopausaalisen HRT:a käyttävän ryhmän suurempi seerumin estradiolin pitoisuus ei ollut yhteydessä tutkittuihin MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien kokonaismääriin verenkierrossa. HRT:a käyttävien kaksossisarten LBM-arvo oli kuitenkin suurempi ja rasvaprosentti pienempi kuin HRT:a käyttämättömien sisarten. Rasvaprosentin ero oli näissä ryhmissä tilastollisesti merkitsevä.

Koska tässä työssä käytetyllä gelatiinizymografialla ei onnistuttu määrittämään tutkimuksen kohteina olleiden MMP-entsyymien aktiivisten muotojen määrää verenkierrossa, tutkimustulosten tarkastelu on kohdennettu vain entsyymien kokonaismääriin, mikä selkeästi rajoittaa alkuperäisiin tutkimuskysymyksiin vastaamisen mahdollisuutta. Zymografia-menetelmän laajempi optimoiminen ei ollut mahdollista tämän pro gradu -työn puitteissa.

5.1 Systeemisten MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien kokonaismäärät ovat samalla tasolla 30-40 ja 54-62 -vuotiailla naisilla.

Tutkittujen MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien kokonaispitoisuuksissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja premenopausaalisten 30-40 -vuotiaiden ja vaihdevuosi-ikä ohittaneiden 54-62 -vuotiaiden hormonikorvaushoitoa käyttämättömien naisten välillä. Tämän tutkimusasetelman perusteella naisten ikä ei ole suoraan yhteydessä tässä työssä mitattujen MMP-entsyymien kokonaismääriin verenkierrossa.

Pre- ja postmenopausaalisten ryhmien MMP-entsyymien pitoisuudet olivat keskimääräisesti samaa tasoa, mutta premenopausaalisisessa ryhmässä systeemisen MMP-3:n havaittiin korreloivan positiivisesti MMP-7:n kanssa. MMP-7 -entsyymeille on ominaista muiden MMP-entsyymien pilkkominen pro-muodosta aktiiviseen muotoon,

mikä todennäköisesti selittää tässä tapauksessa positiivisen korrelaation. Naisilla MMP-3 -entsyymiä esiintyy kohdun limakalvon strooman alueella ja MMP-7 -entsyymiä sen epiteelikudoksessa. MMP-3 ja MMP-7 ovat osa kohdun limakalvon säätelyä: ne osallistuvat limakalvon pilkkomiseen kuukautiskierron alussa, minkä jälkeen kierron ensimmäisinä päivinä niiden pitoisuus on korkeimmillaan (Rodgers ym., 1994). Tämän hetkisen tutkimustiedon vähäisyyden takia avoimeksi kysymykseksi kuitenkin jää, ovatko systeemiset pitoisuudet yhteydessä kohdun paikallisiin pitoisuuksiin, vai onko näiden MMP-entsyymien välinen korrelaatio riippuvainen muista tekijöistä.

Postmenopausaalisten HRT:a käyttämättömien naisten ryhmässä MMP-3 ja -7 -entsyymien pitoisuudet eivät korreloineet toistensa kanssa, mikä voi johtua muun muassa ikääntymiseen liittyvistä hormonaalisista muutoksista. Ikääntyessä naisilla ilmenee hormonitasojen muutosten lisäksi muitakin tyypillisiä tunnusmerkkejä; muun muassa paikallisista solu- ja kudostason muutoksista, mutta niiden esiintyvyys on yksilökohtaista. Tällaisia tunnusmerkkejä ovat esimerkiksi ihon rakenteelliset muutokset (Varani ym., 2006), sydämen toiminnan muutokset ja mahdolliset infarktit (ks. yleiskatsaus Thompson ja Squire, 2002), ja joissakin tapauksissa muutokset munuaisissa, kuten jäykistyminen ja fibroosi (Slusarz ym., 2005). Näissä tunnusmerkeissä MMP-entsyymien toiminnan on esitetty olevan oleellisessa osassa (Varani ym., 2006; ks. yleiskatsaus Thompson ja Squire, 2002; Slusarz ym., 2005). Esitettyjen tunnusmerkkien mekanismit sekä niihin liittyvät MMP-entsyymien paikallisten ja systeemisten pitoisuuksien erot näyttävät olevan kudokohtaisia, eikä MMP-entsyymien tarkempaa yhteyttä ikääntymiseen ja vaihdevuosiin tunneta.

5.2 HRT:n käyttö ei ole yhteydessä systeemisiin MMP-2, -3 tai -7 -entsyymien kokonaismääriin postmenopausaalisilla naisilla

Verenkierrosta mitattujen MMP-2, -3 ja -7 -entsyymien kokonaispitoisuuksien erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä estrogeenia sisältävää HRT:a käyttävien ja HRT:a käyttämättömien identtisten kaksossiskojen välillä. Estradiolin, joka on tässä tutkimuksessa tutkittavien käyttämän HRT:n pääkomponentti, on todettu osteoblasteissa, *in vitro*, stimuloivan MMP-3:n muodostumista estrogeenireseptori α :n signaloinnin välityksellä. Seerumin estradioli-pitoisuudet olivat odotetusti merkitsevästi suuremmat HRT:a

käyttävillä sisarilla, mutta tässä tutkimuksessa estradiolin osuus MMP-3:n stimuloinnissa on voinut olla paikallinen tai se ei ole ollut riittävä muihin vaikuttaviin tekijöihin nähden.

Hormonikorvaushoidolla pyritään kompensoimaan vaihdevuosien yhteydessä pienentyneen estradiolin ja progesteronin pitoisuuksia, mutta näiden molekyylien tarkkoja vaikutusmekanismeja elimistössä ei kaikilta osin tunneta. Tutkittujen MMP-entsyymien (-2, -3 ja -7) systeemiset pitoisuudet eivät eronneet HRT:a käyttävien ja ei-käyttävien siskojen välillä, vaikka MMP-entsyymien kohdemolekyylin, FasL:n, pitoisuuksissa oli merkitsevä ero.

5.3 Systeemisten MMP-3 ja MMP-7 -entsyymien pitoisuudet eivät olleet yhteydessä liukoisen Fas-ligandin pitoisuuteen

Premenopausaalisisessa ja HRT:a käyttävien sisarten ryhmässä systeemisen FasL:n pitoisuuksien erot korreloivat ryhmien välillä merkitsevästi. MMP-3 ja MMP-7 ovat tunnetusti entsyymejä, jotka pilkkovat FasL:n liukoiseen muotoon. Näistä MMP-entsyymeistä MMP-7 on pilkkomisessa tehokkaampi (Vargo-Gogola ym., 2002). Tämän tutkimuksen tuloksissa MMP-3 tai MMP-7 ja sFasL eivät kuitenkaan korreloineet keskenään.

Sitoutuneen FasL:n pilkkominen solujen pinnalta korostaa MMP-entsyymien osuutta erilaisten yksittäisten solujen ja kudosten säätelymekanismeissa paikallisesti, ja toisaalta sFasL:n kautta systeemisesti. Estrogeenin on havaittu olevan yhteydessä muun muassa lihaksiston koon ja suorituskyvyn säätelyyn (Sipilä ym., 2001; Ronkainen ym., 2009), ja estradiolin systeemisellä pitoisuudella olevan yhteys systeemisen FasL:n pitoisuuden kanssa (Kangas ym., 2014). Liukoinen sFasL aktivoi apoptoosia reseptoriin sitoutuneen FasL:n tavoin, mutta huomattavasti hitaammin. Vapautetun sFasL:n on kuitenkin todettu aktivoivan apoptoosia suurina pitoisuuksina, mutta myös inhiboivan sitä kilpailemalla apoptoosia tehokkaammin indusoivan FasL:n kanssa (Schneider ym., 1998). Tietyissä solutyypeissä sFasL osallistuu apoptoosin aktivoinnin sijasta vaikuttavana komponenttina solujen immunologiseen säätelyyn. Vaihtoehtoisena toimintana sFasL:n on havaittu toimivan kemotaktisena tekijänä muun muassa neutrofiileilla (Seino ym., 1998) ja indusoivan T-solujen nopeaa proliferaatiota (Alderson ym., 1993). Vaikka MMP-3 ja

MMP-7 tunnetusti pilkkovat FasL:n liukoiseen muotoon, ei tässä tutkimusasetelmassa saatu viitteitä tutkittujen MMP-entsyymien pitoisuuden ja FasL:n määrän yhteydestä systeemisessä kierrossa.

5.4 Systemisten FasL:n ja MMP-entsyymien yhteys kehonkoostumukseen

Premenopausaalisilla naisilla LBM oli yhteydessä systeemisen MMP-2 -entsyymin määrään. MMP-2 ja LBM korreloivat negatiivisesti, toisin sanoen matala seerumin MMP-2 on yhteydessä suurempaan rasvattomaan kehon painoon. Postmenopausaalisten naisten ryhmässä MMP-2 -entsyymin yhteyttä kehonkoostumukseen ei havaittu. HRT:a käyttävillä postmenopausaalisilla naisilla on kuitenkin todettu olevan pienempi BMI-arvo kuin heidän HRT:a käyttämättömillä identtisillä kaksossisarillaan.

Kosmala ym. (2007) on tutkinut MMP-2:n systeemisen pitoisuuden yhteyttä kehonkoostumukseen kahdessa eri fertiili-ikäisten naisten ryhmässä. Toinen näistä ryhmistä koostui normaalipainoisiksi (BMI 17,6-21,5) ja toinen lihaviksi luokitelluista (BMI >30) naisista. Tutkimus osoitti, että plasman MMP-2 korreloi negatiivisesti BMI:n kanssa, minkä mukaan rasvakudoksen määrän lisääntyminen olisi yhteydessä plasman MMP-2:n pitoisuuteen. Kosmala ym. (2007) tutkimuksessa tutkittiin myös TIMP-1:n ja MMP-9 -entsyymin toimintaa. TIMP-1:n on osoitettu toimivan MMP-2:n inhibiittorina sitomalla MMP-2:n pro- tai aktiivisen muodon inaktiiviseen muotoon. Tutkimuksessa plasman MMP-9:n ja TIMP-1:n pitoisuudet suurensivat MMP-2:n pitoisuuden pienentyessä. MMP-2 ja MMP-9 ovat muun muassa gelatiinia (denaturoitu kollageeni) ja tyypin IV kollageenia pilkkovia entsyymejä. Kosmalan ym. (2007) esittivät, että MMP-2, MMP-9 ja TIMP-1 toimivat rasva- ja lihassoluja ympäröivän tyvikalvon rakenteen ja/tai kehonkoostumuksen säätelyssä. MMP-2:n määrän vähenemisen arvioitiin avustavan ECM-rakenteen lisäämistä, joka tässä tapauksessa oli yhteydessä rasvakudoksen määrään säätelyyn. Toinen samankaltainen tulos saatiin eläinkokeissa Skittonen ym. (2008) tutkimuksessa, jossa hiirten lihassmassaa kasvatettiin aktiivisella voimaharjoittelulla. Tutkimuksessa havaittiin MMP-2:n pitoisuuden korreloivan negatiivisesti suhteessa lihassmassan kasvuun. Myös Lijnen (2011) tutkimuksen eläinkokeissa havaittiin, että korkearasvaisella ruokavaliolla MMP-2 -poistogeenisillä hiirillä MMP-2:den puuttuminen

heikentää rasvakudoksen kehittymistä villityyppisiin kontrollihiiriin verrattuna. Tutkimuksen perusteella MMP-2 on mahdollisesti yksi tekijä, joka vaikuttaa kehon pienempään rasvan ja suurempaan lihasmassan määrään.

MMP-2 -entsyymien pitoisuudet elimistössä vaihtelevat erilaisten tekijöiden mukaan. Aikaisemmissa tutkimuksissa tällaiseksi tekijäksi on havaittu muun muassa eräät sytokiinit. Tyypillinen rasvakudoksen säätelyyn yhdistetty sytokiini on leptiini, mikä vähentää näläntunnetta stimuloimalla hypotalamuksen hermosolujen näläntunteeseen vaikuttavaa signalointia (Zhang ym., 1994). Leptiinin on todettu stimuloivan MMP-2 -entsyymien muodostumista (Park ym., 2001). Bouloumién ym. (2001) tutkimuksessa MMP-2:n havaittiin indusoivan mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista adiposyyteiksi *in vitro*. Leptiinin tavoin myös estrogeeni vaikuttaa näläntunteeseen sitä vähentävänä tekijänä (ks. yleiskatsaus Gao ja Horvath, 2008). MMP-2 -entsyymien pitoisuus seerumissa laskee rasvakudoksen määrän kasvaessa elimistössä, minkä pitäisi vähentää mesenkymaalisten kantasolujen erilaistumista adiposyyteiksi (Mannello ym., 2006) systeemisen signaloinnin välityksellä.

Systeemisten MMP-entsyymien säätelymekanismi ei kuitenkaan ole yksiselitteinen. MMP-entsyymejä esiintyy systeemisen kierron lisäksi kudoksissa paikallisesti tuotettuina. MMP-2 -entsyymien paikallisen tuotannon osalta Guêrinin ym. (1995) -tutkimuksessa lihaksiston satelliittisolujen havaittiin tuottavan jatkuvasti MMP-2 -entsyymiä *in vitro*. Tämän arveltiin olevan yhteydessä myogeneesiin liittyvään tyvikalvon säätelyyn lihaskudoksen kasvun yhteydessä. Samankaltainen tulos saatiin rasvakudoksen adiposyyteistä: Bouloumién ym. (2001) tutkimuksessa havaittiin *in vitro* -kokeissa adiposyyttien tuottavan MMP-2 ja MMP-9 -entsyymejä. Paikallisesti tuotettujen ja systeemisen kierron MMP-2 ja MMP-9 -entsyymien yhteydestä ja toiminnasta rasva- ja lihaskudosten säätelyssä on vain vähän tutkimustietoa, joten näiden MMP-entsyymien toiminnan ymmärtäminen vaatii kattavampaa tutkimusta.

5.5 Yhteenveto

MMP-entsyymejä on tutkittu monesta eri näkökulmasta eri kudoksissa ja erilaisissa tehtävissä. Tämän ja aikaisempien tutkimusten (Skittone ym., 2008; Kosmala ym., 2007) tulosten perusteella systeemisen MMP-2 -entsyymin pitoisuus pienenee elimistön lihasmassan määrän kasvaessa, ja puolestaan rasvakudoksen määrän suurentuessa MMP-2:n pitoisuus suurenee. Rasvakudoksen säätelyn osalta tulosta tukevat myös muut tekijät, kuten leptiini, jonka on havaittu osallistuvan MMP-2 -entsyymin säätelyyn (Park ym., 2001). Huomattavan ylipainon yhteydessä kysymykseen kuitenkin tulee paikallinen säätely, eli adiposyyttien tuottamat MMP-2 -entsyymit, ja niiden vaikutus kehonkoostumuksen säätelyyn seerumin MMP-2 -pitoisuuden vähentyessä. SAWEs-tutkimuksessa lihassolujen estrogeenituotannon paikallisissa pitoisuuksissa ei ole havaittu eroa postmenopausaalisten HRT:a käyttävien ja HRT:a käyttämättömien identtisten kaksosisarten välillä (Pöllänen ym., 2015). Toisaalta MMP-2 -entsyymien systeemisissä pitoisuuksissa ei myöskään havaittu eroja pre- tai postmenopausaalisissa ryhmissä, joten rasva- ja lihaskudoksen MMP-2 -entsyymien toiminnan säätely vaatii lisää tutkimusta.

Satelliittisoluisissa paikallisesti tuotetun MMP-2 -entsyymin rooli premenopausaalisessa ryhmässä on todennäköisesti yhteydessä lihaskudoksen kasvun säätelyyn, minkä lisäksi systeemisen pitoisuuden pieneneminen liittyy rasvasolujen vähentyvään erilaistumiseen. Samoja tuloksia ei havaittu postmenopausaalisissa ryhmissä, joten vaihdevuosien hormonaaliset muutokset, ja tässä tapauksessa todennäköisesti estrogeenin vähentynyt systeeminen vaikutus, on yhteydessä lihaksiston heikkenemiseen ja mahdollisesti vanhuuteen liittyvään lihaksiston rasvoittumiseen.

MMP-2, -3 -7 -entsyymien pitoisuudet olivat samalla tasolla premenopausaalisella ja postmenopausaalisilla ryhmillä, eikä ikäryhmien välillä ollut eroa tutkittujen MMP-entsyymien pitoisuuksissa. Näiden molekyylien pitoisuuksien mediaaneissa oli kuitenkin hieman eroa, joten pitoisuudet olisi hyvä testata vielä isommassa otoskoossa. MMP-3:n ja -7:n on todettu olevan yhteydessä FasL:n pilkkomiseen liukoiseen muotoon, mutta tässä tutkimuksessa näiden entsyymien systeemiset pitoisuudet eivät korreloineet. Systeemisen sFasL:n osuus apoptoosissa ja vaihtoehtoisessa aktivoinnissa sekä näiden säätelyssä vaatii vielä lisää tutkimusta.

MMP-entsyymien ja niiden inhibiittoreiden säätelyn mekanismeja tunnetaan toistaiseksi hyvin vähän. MMP-entsyymien säätelyn mekanismeja tutkitaan suurimmalta osin syöpätutkimuksessa, missä MMP-entsyymien on havaittu olevan merkittävässä roolissa syöpäkudoksen kasvussa, kudosten läpäisevyydessä ja metastaasien leviämisessä. MMP-entsyymejä on myös tutkittu osana angiogeneesiä, sydämen toimintaa ja ihon sairauksia, mutta tämän hetkisen tiedon vähyyden vuoksi niiden tarkempi toiminta ja toiminnan säätely ovat vielä osittain selittämättä.

Lähdeluettelo

- Ahn, J.-H., S.-M. Park, H.-S. Cho, M.-S. Leel, J.-B. Yoon, J. Vilcek ja T. H. Lee. 2001. Non-apoptotic Signaling Pathways Activated by Soluble Fas Ligand in Serum-starved Human Fibroblasts. Mitogen-activated Protein Kinases and NF- κ B-Dependent Gene Expression. *J Cell Biol.* 276:47100-47106.
- Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts ja P. Walter. 2008. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science, Taylor & Francis Group. USA. 1268pp.
- Alderson, M. R., R. J. Armitage, E. Maraskovsky, T. W. Tough, E. Roux, K. Schooley, F. Ramsdell, ja D. H. Lynch. 1993. Fas Transduces Activation Signals in Normal Human T Lymphocytes. *J Exp Med.* 178:2231-2235.
- Batra, J., A. S. Soares, C. Mehner ja E. S. Radisky. 2013. Matrix Metalloproteinase-10/TIMP-2 Structure and Analyses Define Conserved Core Interactions and Diverse Exosite Interactions in MMP/TIMP Complexes. *PLoS One.* 8:9:e75836.
- Bonnema, D.D., C. S. Webb, W. R. Pennington, R. E. Stroud, A. E. Leonardi, L. L. Clark, C. D. McClure, L. Finklea, F. G. Spinale ja M. R. Zile. 2007. Effects of Age on Plasma Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs). *J Card Fail.* 13:7.
- Bouloumié A., C. Sengenès, G. Portolan, J. Galitzky, and M. Lafontan. 2001. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9. Involvement in Adipose Differentiation. *Diabetes.* 50:2080-2086
- Davis, S., C. Castelo-Branco, P. Chedraui, M. Lumsden, R. Nappi, D. Shah ja P. Villaseca. 2012. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric.* 15:419-429.
- Dawn, L., K. Baltgalwis ja S. Greising. 2010. Mechanisms Behind Estrogen's Beneficial Effect on Muscle Strength in Females. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 38:2 pp. 61-67.
- Gao, Q. ja T. L. Horvath. 2008. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294:E817-E826
- Garcia, A., C. Tom, M. Guemes, G. Polanco, M. Wend, G. Miranda-Carboni ja S. Krum. 2013. ER α Signaling Regulates MMP3 Expression to induce FasL Cleavage and Osteoclast Apoptosis. *J Bone Miner Res.* 28:283-290.
- Granello-Pierno A. ja E. Reich. 1978. A Study of Proteases and Protease-Inhibitor Complexes in Biological Fluids. *J Exp Med.* 148:223-234.
- Guêrin C. ja P. Holland. 1995. Synthesis and Secretion of Matrix-Degrading Metalloproteases by Human Skeletal Muscle Satellite Cells. *Dev Dyn.* 202:91-99.
- Kangas, R., E. Pöllänen, M.R. Rippo, C. Lanzarini, F. Prattichizzo, P. Niskala, J. Jylhävä, S. Sipilä, J. Kaprio, A.D. Procopio, M. Capri, C. Franceschi, F. Olivieri ja V. Kovanen. 2014. Circulating miR-21, miR-146a and Fas ligand respond to postmenopausal estrogen-based hormone replacement therapy--a study with monozygotic twin pairs. *Mech Ageing.* 15:143-144:1-8.
- Kaprio, J., S. Sarna, M. Koskenvuo, ja I. Rantasalo. 1978. The Finnish Twin Registry: formation and compilation, questionnaire study, zygosity determination procedures, and research program. *Progr Clin Biol Res.* 24:179-184.
- Kavathia, N., A. Jain, J. Walston, B. A. Beamer ja N. S. Fedarko. 2009. Serum markers of apoptosis decrease with age and cancer stage. *Aging.* 1:7.

- Kosmala, W., R. Plaksej, M. Przewlocka-Kosmala, J. Kuliczowska-Plaksej, G. Bednarek-Tupikowska ja W. Mazurek. 2008. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 in premenopausal obese women: relationship to cardiac function. *Int J Obes.* 32:763-771.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Li, M., H. Yamamoto, Y. Adachi, Y. Maryama ja Y. Shinomura. 2006. Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Exp Biol Med.* 231: 20-27.
- Lijnen, H. R. 2011. Murine models of obesity and hormonal therapy. *Thromb Res.* 127:S17–S20.
- Mannello F., G. Tonti, G. Bagnara ja S. Papa. 2006. Role and Function of Matrix Metalloproteinases in the Differentiation and Biological Characterization of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 24:475–481.
- Masanori, L., H. Yamamoto, Y. Adachi, Y. Maruyama ja Y. Shinomura. 2015. Role of Matrix Metalloproteinase-7 (Matrilysin) in Human Cancer Invasion, Apoptosis, Growth, and Angiogenesis. *Exp Biol Med.* 231:20–27.
- Mayer, F., F. Scharhag-Rosenberger, A. Carlsohn, M. Cassel, S. Müller ja J. Scharhag. 2011. The Intensity and Effects of Strength Training in the Elderly. *Dtsch Arztebl Int.* 108:2e: 359–64
- Mikkola, T.M., A. Heinonen, V. Kovanen, S. Cheng, U.M. Kujala, H. Suominen, M. Alén, J. Puolakka, C. Ankarberg-Lindgren, P. H. Ronkainen, M. Koskenvuo, J. Kaprio, T. Rantanen ja S. Sipilä. 2011. Influence of long-term postmenopausal hormone-replacement therapy on estimated structural bone strength: A study in discordant monozygotic twins. *J Bone Miner Res.* 26:546-552.
- Park, H.Y., H. M. Kwon, H. J. Lim, B. K. Hong, J. Y. L, B. E. Park, Y. Jang, S. Y. Cho ja H.-S. Kim. 2001. Potential Role of Leptin in Angiogenesis: Leptin Induces Endothelial Cell Proliferation and Expression of Matrix Metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med.* 33:2:95-102.
- Ponton, A., M.-V. Clément ja I. Stamenkovic. 1996. The CD95 (APO-1/Fas) Receptor Activates NF- κ B Independently of Its Cytotoxic Function. *J Biol Chem.* 271:8991-8995.
- Pöllänen, E., R. Kangas, M. Horttanainen, P. Niskala, J. Kaprio, G. Butler-Browne, V. Mouly, S. Sipilä, V. Kovanen. 2015. Intramuscular sex steroid hormones are associated with skeletal muscle strength and power in women with different hormonal status. *Aging Cell.* 14:236-248.
- Pöllänen, E., P. Ronkainen, M. Horttanainen, T. Takala, J. Puolakka, H. Suominen, S. Sipilä ja V. Kovanen. 2010. Effects of combined hormone replacement therapy or its effective agents on the IGF-1 pathway in skeletal muscle. *Growth Horm IGF Res.* 10:372-9.
- Pöllänen, E., P. Ronkainen, H. Suominen, T. Takala, S. Koskinen, J. Puolakka, S. Sipilä ja V. Kovanen. 2007. Muscular transcriptome in postmenopausal women with or without hormone replacement. *Rejuvenation Res.* 10:485-500.
- Rodgers, W., L. Matrisian, L. Giudice, B. Dsupin, P. Cannon, C. Svitek, F. Gorstein ja K. Osteen. 1994. Patterns of Matrix Metalloproteinase Expression in Cycling Endometrium Imply Differential Functions and Regulation By Steroid Hormones. *J Clin Invest.* 94:946-953.
- Ronkainen, P., V. Kovanen, M. Alen, E. Pöllänen, E. Palonen, C. Ankarberg-Lindgren, E. Hämäläinen, U. Turpeinen, U. Kujala, J. Puolakka, J. Kaprio ja S. Sipilä. 2009. Postmenopausal hormone replacement therapy modifies skeletal muscle composition and function: a study with monozygotic twin pairs. *J Appl Physiol.* 107:25-33.
- Ronkainen, P., E. Pöllänen, M. Alen, R. Pitkanen, J. Puolakka, U. Kujala, J. Kaprio, S. Sipila ja V. Kovanen. 2010. Global gene expression profiles in skeletal muscle of monozygotic female twins discordant for hormone replacement therapy. *Aging Cell.* 9:1098-1110.

- Schneider, P., N. Holler, J. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana ja J. Tschopp. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 20:1205-1213.
- Seino, K., K. Iwabuchi, N. Kayagaki, R. Miyata, I. Nagaoka, A. Matsuzawa, K. Fukao, H. Yagita, ja K. Okumura. 1998. Chemotactic Activity of Soluble Fas Ligand Against Phagocytes. *J Immunol.* 161:4484-4488.
- Sipilä, S., D. Taaffe, S. Cheng, J. Puolakka, J. Toivanen ja H. Suominen. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond).* 101:147-157.
- Skittone, L. K., X. Liu, A. Tseng ja H. T. Kim. 2008. Matrix Metalloproteinase-2 Expression and Promoter/Enhancer Activity in Skeletal Muscle Atrophy. *J Orthop Res.* 26:3:357-363.
- Slusarz, A., L.A. Nichols, E.A. Grunz-Borgmann, G. Chen, A.D. Akintola, J.M. Catania, R.C. Burghardt, J.P. Trzeciakowski ja A.R. Parrish. 2005. Overexpression of MMP-7 increases collagen 1A2 in the aging kidney. *Physiol Rep.* 1:5.
- Stanford, K. I., R.J.W. Middelbeek, K.L. Townsend, D. An, E.B. Nygaard, K.M. Hitchcox, K.R. Markan, K. Nakano, M.F. Hirshman, Y.-H. Tseng ja L.J. Goodyear. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 123:215-223.
- Taaffe, D., A. Newman, C. Haggerty, L. Colbert, N. de Rekeneire, M. Visser, B. Goodpaster, M. Nevitt, F. Tylavsky ja T. Harris. 2005. Estrogen replacement, muscle composition, and physical function: The Health ABC Study. *Med Sci Sports Exerc.* 37:1741-1747.
- Thompson, M.M. ja I.B. Squire. 2002. Matrix metalloproteinase-9 expression after myocardial infarction: physiological or pathological? *Cardiovasc Res.* 54:495-498.
- Tilvis, R., K. Pitkälä, T. Strandberg, R. Sulkava ja M. Viitanen (toim.). 2010. *Geriatrics.* Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 484pp.
- Valerie, A.F., D.L. Bratton, A. Konowal, P. W. Freed, J. Y. Westcott ja P. M. Henson. 1998. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF β , PGE $_2$, and PAF. *J Clin Invest.* 101:4:890-898.
- Varani, J., M.K. Dame, L. Rittie, S.E.G. Fligel, S. Kang, G.J. Fisher, ja J.J. Voorhee. 2006. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *Am J Pathol.* 168:6.
- Vargo-Gogola, T., H. Crawford, B. Fingleton ja L. Matrisian. 2002. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys.* 408:155-161.
- Välimäki, M., T. Sane ja L. Dunkel (toim.). 2009. *Endokrinologia.* Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 928 pp.
- WHO. 2004. ICF, Toimintakyvyn, toimintarajoitteiden ja terveyden kansainvälinen luokitus. Sosiaali ja terveystieteiden tutkimus- ja kehittämiskeskus. Stakes julkaisut. Helsinki.
- Zhang Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold ja J. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.

Liitteet

Liite 1.

Taulukko 5. Painoindeksin (BMI) luokittelu (Välimäki ym., 2009).

BMI (kg/m²)	Luokittelu
18.5 – 24.9	Normaali paino
>25	Ylipaino
25.0 – 29.9	Lievä lihavuus
30.0 – 34.9	Merkittävä lihavuus
35.0 – 39.9	Vaikea lihavuus
40 tai enemmän	Sairaalloinen lihavuus

Liite 2.

Taulukko 6. Taulukossa on esitettyä tutkimuksessa käytetyt ELISA-kitit, niiden määrittämisalueet ja käytettyjen seeruminäytteiden laimennussuhteet.

ELISA-kitti	Määrittämisalue (ng/ml)	Näytelaimennos
Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)	0,5 - 32	1:20
Human Total MMP-3 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)	0,156 - 10	1:10
Human Total MMP-7 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)	0,156 - 10	1:2