

**VAPAA-AJAN FYYSISEN AKTIIVISUUDEN YHTEYS KOKO KEHON JA
LUUSTOLIHASTEN BIOLOGISEEN IKÄÄN KESKI-ikäISILLÄ NAISILLA**

Aini Paavilainen

Gerontologian ja kansanterveyden pro gradu -
tutkielma

Liikuntatieteellinen tiedekunta

Jyväskylän yliopisto, Kevät 2019

TIIVISTELMÄ

Paavilainen, A. 2019. Vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden yhteys koko kehon ja luustolihasen biologiseen ikään keski-ikäisillä naisilla. Liikuntatieteellinen tiedekunta, Jyväskylän yliopisto, gerontologian ja kansanterveystieteen pro gradu –tutkielma, 67 s.

Fyysisellä aktiivisuudella on monia positiivisia vaikutuksia keski-ikäisten naisten terveyteen, kuten verenkiertoelimistön parantunut toiminta, vahvistunut luusto sekä pienentynyt riski kroonisille sairauksille. Fyysinen aktiivisuus edistää terveenä ikääntymistä ja fyysisesti aktiivisilla on pidempi elinajanodote kuin liikuntaa harrastamattomilla. Vielä ei kuitenkaan tiedetä, vaikuttaako vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus ihmisen biologiseen ikääntymisprosessiin, sillä ihmisen ikääntyminen selittyy sekä lukuisilla ympäristötekijöillä että yksilöllisellä geneettisellä perimällä. DNA:n metylaatio on yksi epigeneettisistä tekijöistä, jolla säädellään geenien ilmenemistä. DNA:n metylaatiolla tarkoitetaan metyyliyhdyntien liittymistä DNA:n sytosiini-fosfaattiguaniini -emäspariin (CpG). Epigeneettinen kello eli DNA-metylaatioikä on lupaava biologisen ikääntymisen biomarkeri, jolla voidaan määrittää yksilön biologinen ikä eri kudoksissa. Pääsääntöisesti DNA-metylaatioikä korreloi voimakkaasti kronologisen iän kanssa. Yhteyden voimakkuus voi kuitenkin olla erilainen riippuen siitä, minkä kudostyyppin biologista ikää arvioidaan. Fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikä on tutkittu toistaiseksi vain muutamassa tutkimuksessa ja nämä tutkimukset ovat arvioineet aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikä koko kehon (veri) tasolla. Tämän pro gradu –tutkielman tarkoituksena on verrata yksilöiden biologisen ikääntymisen etenemistä veren valkosoluissa ja luustolihas kudoksessa. Lisäksi selvitetään, onko vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus yhteydessä yksilön biologiseen ikään, ja onko yhteys erilainen veren valkosoluissa ja luustolihas kudoksessa sekä selittääkö painoindeksi tutkittua yhteyttä.

Tässä pro gradu -tutkielmassa käytetään Estrogeeni, vaihdevuodet ja toimintakyky (ERMA) -tutkimuksen osaineistoa. Otokseen kuuluu 30 ERMA-tutkimukseen osallistunutta keski-ikäistä naista, joille on tehty DNA-metylaatioikämittaukset veren valkosoluista ja luustolihas kudoksesta. Tutkittavilta otetuista veren valkosoluista ja luustolihasnäytteistä eristetystä DNA:sta selvitettiin EPIC array –analyysillä 353 ikäspesifin DNA-kohdan metyloituminen. Raakadata syötettiin vapaasti saatavilla olevaan ohjelmaan, joka spesifiä laskenta-algoritmia käyttäen arvioi henkilön DNA-metylaatioiän vuosissa. Epigeneettinen ikääntymisnopeus (age acceleration) eli biologisen iän ja kronologisen iän ero, määritettiin lineaarisen regressioanalyysin jäännöksistä. Keski-ikäisten naisten fyysisen aktiivisuuden taso arvioitiin validoidulla kyselyllä. Muuttujien normaalijakautuneisuutta tarkasteltiin Shapiro-Wilkin testillä. Analyysimenetelminä käytettiin Pearsonin korrelaatiokertoimien tulkintaa, parittaisten otosten T-testiä ja yksisuuntaista varianssianalyysiä.

Kronologinen ikä korreloi kohtalaisen voimakkaasti veren valkosolujen DNA-metylaatioiän kanssa ($r=0,43$, $p=0,019$), mutta ei ollut yhteydessä luustolihas kudoksen DNA-metylaatioikä (= $r=0,24$, $p=0,194$). Fyysisen aktiivisuuden määrä ei selittänyt epigeneettistä ikääntymisnopeutta veren valkosoluissa ($p=0,444$), mutta fyysinen aktiivisuus oli yhteydessä luustolihas kudoksen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen ($p=0,047$). Keskiarvovertailussa havaittiin fyysisesti passiivisten koehenkilöiden luustolihas kudoksen epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan hidastunut verrattuna aktiivisempiin henkilöihin. Tilastollisesti merkitsevä ero hävisi kehon painoindeksillä vakioinnin jälkeen ($p=0,098$).

Fyysisesti passiivisten henkilöiden hidastunut luustolihas kudoksen epigeneettinen ikääntymisnopeus on tuloksena yllättävä ja osittain päinvastainen aiemman tutkimustiedon kanssa, jonka mukaan terveelliset elämäntavat ovat useimmiten hidastaneet biologista ikääntymistä. Fyysisen aktiivisuuden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen tulisi jatkossa tutkia suuremmilla tutkimusjoukoilla ottaen kattavasti huomioon sekoittavien tekijöiden ja kudostyyppin vaikutuksen tutkittuun aiheeseen. Jatkotutkimuksissa tulisi selvittää etenkin lihaskudoksen DNA-metylaatioikä yhteydessä olevia tekijöitä.

Asiasanat: DNA-metylaatioikä, epigeneettinen kello, epigeneettinen ikääntymisnopeus, biologinen ikääntyminen, fyysinen aktiivisuus, keski-ikä

ABSTRACT

Paavilainen, A. 2019. The association between leisure-time physical activity and biological aging in whole body and in skeletal muscle among middle-aged women. Faculty of Sport and Health Sciences, University of Jyväskylä, Gerontology and Public Health, Master's Thesis, 67 pages.

Physical activity has many health benefits for middle-aged women; for example, improved function of the circulatory system, strengthened bones and a smaller risk of chronic diseases. Physical activity has also been shown to promote healthy aging, and physically active people have a higher life expectancy compared to inactive people. However, it is not yet known, if physical activity is associated with individual biological aging process, which is known to be an interaction between numerous environmental factors and unique genotype. DNA methylation is an epigenetic mechanism that cells use to control gene expression. It is characterized by the biochemical addition of a methyl group to the cytosine-phosphate-guanine -sites (CpG). The epigenetic clock, also known as DNA methylation age, is a new promising biomarker of biological aging. In most cases DNA methylation age correlates strongly with chronological age. However, DNA methylation age may differ depending on the studied tissue type. Few studies have investigated associations between physical activity and DNA methylation age and these studies have estimated the association in whole body level (blood). The purpose of the study was to investigate, if physical activity is associated with DNA methylation age at whole body level (blood leukocytes) and in skeletal muscle tissue. The second aim was to examine potential differences in DNA methylation age in leukocytes and skeletal muscle tissue with respect to physical activity and to study whether body mass index explains this potential association.

The study sample is part of the Estrogenic Regulation of Muscle Apoptosis (ERMA) –study. Current analysis included 30 middle aged women who had taken part in ERMA-study and who had undergone tissue sampling from blood and skeletal muscle and respective DNA methylation age measurements. DNA methylation age of leukocytes and skeletal muscle was calculated from 353 specific CpG-sites known to be associated with aging based on their methylation and using EPIC array analysis. The output was submitted to the online DNA methylation age calculator. The level of physical activity was estimated with validated questionnaire. The normality of the data was examined through Shapiro-Wilk test. The data was analyzed using the Pearson correlation coefficient, paired T-test and univariate analysis of variance test.

Chronological age had moderate positive correlation with DNA methylation age of leukocytes ($r=0,43$, $p=0,019$) but there was no association between chronological age and DNA methylation age in the skeletal muscle ($r=0,24$, $p=0,194$). Age acceleration in leukocytes was not associated with amount of physical activity ($p=0,444$), but age acceleration in skeletal muscle tissue was associated with the level of physical activity ($p=0,047$). In inactive study participants, age acceleration of skeletal muscle was lower compared to active study participants. After adjusting the model with body mass index, statistically significant difference disappeared ($p=0,098$).

Inactive study participants' lower age acceleration of skeletal muscle as a result is a surprising and inconsistent with previous, although very scarce, research data where in most of the cases healthy lifestyles has slowed biological aging. In the future this topic should be studied with larger sample sizes and taking into account several confounding factors and type of human body tissue. Further research is needed to assess factors associated with DNA methylation age in skeletal muscle.

Key words: DNA methylation age, epigenetic clock, age acceleration, biological aging, physical activity, middle age

KÄYTETYT LYHENTEET

CpG sytosiini-fosfaatti-guaaniini-emäspari

WHO World Health Organization, Maailman terveysjärjestö

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO.....	1
2 BIOLOGINEN IKÄÄNTYMINEN	3
3 EPIGENETIIKKA.....	5
3.1 DNA:n metylaatio.....	5
3.2 Ikääntymismuutosten ja ympäristöaltistusten vaikutukset DNA:n metylaatioihin ...	6
4 DNA-METYLAATIOIKÄ ELI EPIGENEETTINEN KELLO BIOLOGISEN IKÄÄNTYMISEN MARKKERINA	9
4.1 DNA-metylaatioiän suhde kronologiseen ikään ja yhteys kuolleisuuteen	12
4.2 DNA-metylaatioikä eri kudoksissa.....	14
5 FYYSINEN AKTIIVISUUS KESKI-ikäisillä NAISILLA.....	17
5.1 Fyysisen aktiivisuuden terveystvaikutukset ja riskit keski-ikäisillä naisilla	17
5.2 Keski-ikäisten liikuntasuositukset	20
5.3 Fyysisen aktiivisuuden mittaaminen	21
6 FYYSISEN AKTIIVISUUDEN, MUIDEN ELINTAPOJEN JA YMPÄRISTÖN YHTEYS DNA-METYLAATIOIKÄÄN JA EPIGENEETTISEEN IKÄÄNTYMISNOPEUTEEN	25
6.1 Fyysisen aktiivisuuden ja toimintakyvyn yhteys DNA-metylaatioikään ja epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen.....	25
6.2 Muiden elintapojen ja ympäristötekijöiden yhteys DNA-metylaatioikään	27
7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	30
8 AINEISTON KERUU JA MENETELMÄT	31
8.1 Tutkittavat, tutkimusasetelma ja muuttujat	31
8.2 Tilastolliset analyysit.....	34

9 TULOKSET	35
9.1 Kronologisen iän yhteys DNA-metylaatioikään.....	36
9.2 Fyysisen aktiivisuuden yhteys epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen	39
10 POHDINTA.....	41
LÄHTEET	52

1 JOHDANTO

Epigenetiikka on geenien ilmenemisen säätelymekanismi, joka ohjaa geenien aktiivisuutta aktivoimalla tai hiljentämällä niiden toimintaa (Barros & Offenbacher 2009; Zhang & Pradhan 2014). Tutkituin ja tunnetuin epigeneettisistä mekanismeista on DNA:n metylaatio (Portin 2012; Zhang & Pradhan 2014; Hurme 2015; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015; Jung ym. 2017). DNA:n metylaatioissa on havaittu tapahtuvan muutoksia sattumanvaraisesti ja hyvin systemaattisesti. Systemaattisissa DNA:n metylaatioiden muutoksissa metylaatioiden määrä nousee tai laskee hyvin lineaarisesti ikääntymisen vaikutuksesta läpi elämän (Horvath 2013; Zampieri ym. 2015). DNA:n metylaatioon voi ikääntymisen lisäksi vaikuttaa erilaiset ympäristötekijät ja geneettiset tekijät (Fraga ym. 2005; Jones ym. 2015).

Epigeneettinen kello eli DNA-metylaatioikä on vuonna 2012 kehitetty uusi, lupaava biologisen ikääntymisen mittari (Horvath 2013), jonka on todettu korreloivan voimakkaasti kronologisen iän kanssa (Christiansen ym. 2016; Sehl ym. 2017) sekä ennustavan kuoleman riskiä paremmin kuin kronologinen ikä (Marioni ym. 2015a; Chen ym. 2016; Christiansen ym. 2016). DNA-metylaatioikä voidaan määrittää yksilöltä DNA-kohdan päälle tarttuneiden metyyliyhymien perusteella käyttäen apuna laskenta-algoritmia, joka arvioi henkilön DNA-metylaatioiän vuosissa (Horvath 2013). DNA-metylaatioiän ja kronologisen iän erotus kertoo, onko henkilön biologinen ikääntyminen edennyt nopeasti vai hitaasti muihin samanikäisiin verrattuna (Horvath ym. 2015; Breitling ym. 2016; Chen. 2016; Marioni ym. 2018). DNA-metylaatioikä voidaan määrittää lähes mistä tahansa kudostyyppistä (Horvath 2013). DNA-metylaatioikäalgoritmeista tutkituin on Horvathin veren DNA-metylaatioikä (Khoury ym. 2018). Pääosa tutkimuksista on käyttänyt DNA-metylaatioiän määrittämiseen verinäytteitä ja muilla kudoksilla tehtyjä tutkimuksia on vähemmän. Luustolihasen biologista ikääntymistä DNA-metylaatioiän avulla on toistaiseksi tutkittu hyvin harvassa tutkimuksessa (Sillanpää ym. 2018).

Myös elintapatekijöiden vaikutusta DNA-metylaatioikään on tutkittu vasta niukasti (Quach ym. 2017; Sillanpää 2017). Aiemmissa tutkimuksissa esimerkiksi tupakoinnin (Beach ym. 2014), ylipainon (Horvath ym. 2014; Quach ym. 2017) ja stressin (Boks ym. 2014) on todettu kiihdyttävän DNA-metylaatioikää. Fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikään on toistaiseksi tutkittu vain muutamassa tutkimuksessa ja nämä tutkimukset ovat selvittäneet fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikään koko kehon (veri) tasolla. Tutkimusten tulokset aiheesta ovat keskenään ristiriitaisia: Quach ym. (2017) totesivat tutkimuksessaan fyysisesti aktiivisemmilla olevan alhaisempi DNA-metylaatioikä verrattuna inaktiivisiin, kun taas Gale ym. 2018 totesivat poikkileikkaustutkimuksessaan, ettei alhaisempi DNA-metylaatioikä ollut yhteydessä askelmittarilla mitattuun fyysisen aktiivisuuden määrään (Gale ym. 2018).

Tämän pro gradu –tutkielman tarkoituksena on tutkia, eroavatko veren valkosolujen (koko kehon) ja luustolihaksen DNA-metylaatioiät sekä kronologinen ikä toisistaan. Tutkielmassa selvitetään, ensimmäistä kertaa, fyysisen aktiivisuuden yhteyttä luustolihaksen DNA-metylaatioikään sekä verrataan fyysisen aktiivisuuden yhteyttä veren valkosolujen sekä luustolihaksen DNA-metylaatioikään ja epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen, joka kuvaa tutkittavien DNA-metylaatioiän ja kronologiseen iän eroa (Marioni ym. 2015b; Chen ym. 2016; Quach ym. 2017; Gale ym. 2018). Lisäksi tarkastellaan, selittääkö painoindeksi tutkittua yhteyttä. Pro gradu -tutkielmassa käytetään Estrogeeni, vaihdevuodet ja toimintakyky (ERMA) -tutkimuksen osa-aineistoa, johon kuuluu 30 ERMA-tutkimukseen osallistunutta keski-ikäistä, 48-54-vuotiasta naista.

2 BIOLOGINEN IKÄÄNTYMINEN

Ikääntyminen on asteittainen ja luonnollinen tapahtuma ihmisen elämässä (Jung ym. 2017). Ikääntymistä voi myös kuvata biologiseksi prosessiksi, joka vääjäämättä koskettaa lähes kaikkia eläviä olentoja (Xi ym. 2013). Yksi gerontologian tutkimusalan suurimmista tavoitteista on luoda validi biologisen ikääntymisen mittaamenetelmä (Burch ym. 2014). Mittarin tulisi pystyä arvioimaan yksilöllistä riskiä sairastua ikääntymisen myötä yleistuviin sairauksiin ja toimintakyvyn laskuun sekä kuoleman riskiä tai eliniän pituutta (Levine ym. 2018).

Vaikka geneettiset- ja molekyylibiologiset ikääntymisen tutkimusmenetelmät ovat kehittyneet viime vuosina (Davidovic ym. 2010; Kunlin 2010), mikään olemassa olevista ikääntymisen teorioista tai mittareista ei ole pystynyt selittämään ikääntymisen monimuotoista ja monimutkaista prosessia täydellisesti (Jung ym. 2017). Ikääntymisen tutkimuksessa on kuitenkin otettu suuria askeleita eteenpäin, kun on selvitetty solu- ja molekyyli-tason tekijöiden vaikutuksia ikääntymiseen (Jung ym. 2017).

Biologiset vanhenemisteoriat. Biologiset vanhenemisteoriat jakautuvat pääsääntöisesti kolmeen pääryhmään: ohjelmoituihin teorioihin, virheistä ja vaurioista johtuviin teorioihin (stokastiset teoriat) sekä evoluutioteorioihin (Baltes ym. 2012). Ohjelmoitujen vanhenemisteorioiden mukaan vanheneminen on geneettisesti ennalta ohjelmoitua, ja se etenee tietyn biologisen aikataulun mukaan (Kunlin 2010; Baltes ym. 2012), joka esimerkiksi säätelee lapsuuden ja nuoruuden kasvua ja kehitystä sekä myöhemmin ikääntymistä (Kunlin 2010). Stokastisten teorioiden mukaan ikääntyminen johtuu ympäristötekijöiden aiheuttamista kudosten ja elinten DNA-vaurioista, jotka kumuloituvat iän myötä (Kunlin 2010). Alun perin Charles Darwinin kehittämän evoluutioteorian mukaan heikommät ja vanhimmat karsiutuvat luonnonvalinnalla antaen nuorille ja voimakkaammille tilaa (Goldsmith 2014). Biologisista vanhenemisteorioista tunnetuin on evoluutioteoria. Viime vuosina on kuitenkin keskitytty tutkimaan monimutkaisempien vanhenemisteorioiden paikkansapitävyyttä (Shou ym. 2015).

Lupaavimmat biologisen ikääntymisen biomarkkerit. Viimeisten vuosikymmenten aikana on kehitelty lukuisia erilaisia biologisen ikääntymisen markkereita. Tällä hetkellä lupaavimpina biologisen iän markkereina pidetään telomeerien pituutta ja epigeneettistä kelloa eli DNA-metylaatioikää (Jylhävä ym. 2017; Sillanpää 2017). Näistä molempia on tutkittu useampien kudosten osalta ja monissa toisistaan riippumattomissa kohorteissa. Molempien, telomeerien pituuden ja epigeneettisen kellon, on todettu korreloivan voimakkaasti kronologisen iän kanssa, ennustavan kuoleman riskiä sekä olevan yhteydessä sairastavuuteen (Jylhävä ym. 2017).

Kromosomien päissä sijaitsevat telomeerit lyhenevät aina solunjakautumisen yhteydessä. Telomeerien ollessa liian lyhyitä DNA:han tulee virheitä, jolloin solun toiminta heikkenee, ja sen elinaika lyhenee (Xi ym. 2013; Dean ym. 2017). DNA:ta suojaavien telomeerien pituuden on esitetty kertovan solujen biologisesta ikääntymisestä ja toimivan hyvänä biologisen ikääntymisen markkerina (Xi ym. 2013; Dean ym. 2017; Jylhävä ym. 2017), koska useimmissa kudoksissa telomeerit lyhenevät henkilön ikääntyessä (Dean ym. 2017). Monissa tutkimuksissa on havaittu yhteys telomeerien pituuden ja kronologisen iän välillä (Xi ym. 2013; Magi ym. 2018). Dean ym. (2017) havaitsivat lyhyempien telomeerien lisäävän yleistä kuolleisuusriskiä sekä riskiä kuolla krooniseen sairauteen tai sydän- ja verisuonitauteihin. Pidempien telomeerien on todettu olevan yhteydessä parempaan terveydentilaan (Njajou ym. 2009) ja väheisempään määrään ikääntymiseen liitettyjä sairauksia kuten immuunijärjestelmän sairauksia sekä syöpiä (Xi ym. 2013).

3 EPIGENETIIKKA

Epigenetiikka tarkoittaa geenien ilmentymisen säätelymekanismeja, jotka eivät perustu DNA:n emäsjärjestyksen muutoksiin (Tieva & Peltomäki 2012; Hurme 2015; Pacchierotti & Spano 2015). Epigeneettinen säätely ei siis vaikuta geenien emäsjärjestykseen, mutta se voi jättää DNA-juosteen pinnalle väliaikaisia, epigeneettisiä merkkejä (Jaenisch & Bird 2003; Häkkinen ym. 2015). Itse geneeissä ei tapahdu muutoksia, vaan geenien ohjautuvuus muuttuu, jolloin eri geenit joko aktivoituvat tai hiljenevät (Barros & Offenbacher 2009; Pulkkinen 2013). Epigeneettisistä mekanismeista tunnetuin on DNA:n metylaatio (Portin 2012; Zhang & Pradhan 2014; Hurme 2015; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015; Jung ym. 2017). Muita epigeneettisiä mekanismeja ovat muun muassa DNA:han sitoutuvien proteiinien modifikaatiot (Tieva & Peltomäki 2012) ja vaihtoehtoisten histonien käyttö (Taipale 2006).

Epigeneettiset mekanismit mahdollistavat saman identtisen perimän sisältävien solujen erilaistumisen lukuisiksi erilaisiksi solutyypeiksi, joten ne ovat edellytys ihmisen normaalille kasvulle ja kehitykselle (Christensen ym. 2012; Sillanpää 2017). Geenitoiminnan epigeneettisen säätelyn takia geenit voivat toimia erilaisella tehokkuudella eri yksilöissä ja eri kehitysvaiheiden aikana (Häkkinen ym. 2015). Epigeneettisten tekijöiden on todettu olevan yhteydessä monien tautien syntyyn (Portela & Esteller 2010; Heard & Martienssen 2014), sillä monet sairaudet johtuvat geenien toiminnan virheistä (Portin 2012).

3.1 DNA:n metylaatio

Epigeneettisistä mekanismeista löydettiin ensimmäisenä DNA:n sytosiiniemäksen metylaatio (Holliday & Pugh 1975), joka on myös tutkituin ja tunnetuin epigeneettisistä mekanismeista (Portin 2012; Zhang & Pradhan 2014; Hurme 2015; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015; Jung ym. 2017). DNA:n sytosiiniemäksen metylaatioissa metyyliiryhmät liittyvät DNA:n sytosiini-fosfaatti-guaaniini -emäspariin (CpG) (Portin 2012; Hurme 2015; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015; Jung ym. 2017). CpG-kohtien metylaatioissa tapahtuu muutoksia sattumanvaraisesti ja systemaattisesti. Systemaattisilla DNA:n metylaatioiden muutoksilla

tarkoitetaan DNA:n metylaatioiden määrän lineaarista kasvua ja vähenemistä ikääntymisen vaikutuksesta läpi elämän (Horvath 2013; Zampieri ym. 2015).

DNA:n metylaation avulla säädellään geenien ilmentymistä (Holliday & Pugh 1975; McCabe ym. 2009). Elimistön soluissa on samat geenit, mutta solujen toimintaan vaikuttaa, kuinka paljon ja mitä genejä ilmennetään (Jalanko ym. 1996). Muutokset geenien ilmenemisessä johtavat taas muutoksiin kudosten toiminnassa (Sonawane ym. 2017). DNA:n hypermetylaatioissa CpG-kohtien metylaatio on lisääntynyt ja hypometylaatioissa se on vähentynyt (Hurme 2015). CpG-kohdan ollessa geenin säätelyalueella lisääntynyt metylaatio (hypermetylaatio) saattaa johtaa useimmiten geenin ilmentymisen vaimentumiseen. Toisaalta joissakin geneissä ja säätelyalueen kohdissa se saattaa lisätä ilmentymistä (Hurme 2015). Metylaatio voi myös purkautua, jolloin tapahtuu demetylaatio eli metyyliiryhmän poisto (Portin 2012). CpG-kohtien metylaatiot voivat vaikuttaa genomiseen vakauteen, jolla voi olla vaikutusta muihin ikääntymisen biologisiin tekijöihin (Jung ym. 2017) kuten telomeerien lyhenemiseen (Deng & Chang 2007).

3.2 Ikääntymismuutosten ja ympäristöaltistusten vaikutukset DNA:n metylaatioihin

Iällä on todettu olevan suuri vaikutus DNA:n metylaatioon (Heyn ym. 2012; Horvath 2013; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015). Vastasyntyneillä on todettu olevan huomattavasti homogeenisemmät DNA:n metylaatiot verrattuna satavuotiaiden DNA:n metylaatioihin (Heyn ym. 2012). Useimmissa kudoksissa DNA:n metyloituminen on suurimmillaan ensimmäisten ikävuosien aikana, ja vähenee myöhäisen aikuisiän alkuvaiheessa, jolloin DNA:n metylaatiomuutokset usein hetkeksi tasaantuvat (Jones ym. 2015) Etenkin veren DNA:n metylaatioiden on todettu vähenevän myöhäisessä aikuisiässä (Horvath ym. 2013). Myös aivojen DNA:n metylaatioiden on todettu olevan suurimmillaan heti syntymän jälkeen, ja niiden määrä vähenee asteittain ikääntymisen myötä (Horvath ym. 2013).

DNA:n metylaatioon voi kasvun ja ikääntymisen (Fraga ym. 2005; Heyn ym. 2012; Jones ym. 2015) lisäksi vaikuttaa muun muassa ympäristöaltistukset ja geneettiset tekijät (Lee &

Pausova 2013; Pacchierotti & Spano 2015; Blake & Watson 2016; Jung ym. 2017). Toiset DNA:n metylaatiokohdat ovat herkempiä ympäristön ärsykeille, kun taas osa CpG-kohdista noudattaa tarkasti vanhemmilta saatua DNA:n perimätietoa (Rowlatt ym. 2016). Tutkimustekniikoiden kehittyessä on havaittu yhä suurempia eroja yksilöiden välillä DNA:n metylaatioissa (Jones ym. 2015). Kaksostutkimuksessa saatiin selville sisäposken limakalvoilta otettujen DNA-näytteiden metylaatioiden eroavan suuremmin toisistaan monotsygoottisilla kaksospareilla 18 kuukauden iässä kuin heti syntymän jälkeen (Martino ym. 2013). DNA:n metylaatioiden erot 18 kuukauden iässä arveltiin johtuvan ajan myötä kertyvistä ympäristön ja stokastisten tekijöiden vaikutuksista. Ensimmäisten kuukausien aikana DNA:n metylaatioihin näyttäisivät vaikuttavan lähinnä geneettiset tekijät (Martino ym. 2013).

Myös ruokavalio, tulehdukselliset ja karsinogeeniset tekijät voivat vaikuttaa DNA:n metylaatioihin johtaen esimerkiksi DNA:n hypermetylaatiosta johtuvaan geenin toimimattomuuteen (Christensen ym. 2009), jonka on todettu olevan yhteydessä mm. keuhkon adenokarsinoomien ilmenemiseen (Lyon ym. 2007). Jinin & Liun (2018) kirjallisuuskatsauksen mukaan tavallisuudesta poikkeavien DNA:n metylaatioprofiilien on todettu olevan yhteydessä monien tautien, kuten autoimmuunitautien ja metabolisten sekä neurologisten häiriöiden, syntyyn. Myös syöpäsoluissa DNA:n metylaatioiden on todettu olevan huomattavan vääristyneitä (McCabe ym. 2009). Vääristyneitä DNA:n metylaatioprofiileita ovat normaalista päinvastaisesti toimivat DNA:n metylaatiot eli esimerkiksi hypometylaatio tapahtuu geenien välisille alueille, kun taas hypermetylaatio tapahtuu kasvunrajoitegeenien promoottorialueille, vaikka nämä hypo- ja hypermetylaatiot kuuluisi tapahtua päinvastaisilla alueilla (McCabe ym. 2009).

Ympäristötekijöiden vaikutus DNA:n metylaatioihin voi vaihdella riippuen muun muassa siitä, missä elämänvaiheessa se tapahtuu. Esimerkiksi äidin raskaudenaikaisen tupakoinnin on todettu muuttavan suuresti sikiön DNA:n metylaatioita, kun taas aikuisiän tupakoinnilla ei ollut niin suurta vaikutusta DNA:n metylaatioihin (Lee & Pausova 2013). Ei kuitenkaan tiedetä tarkasti, kuinka paljon ympäristö vaikuttaa DNA:n metylaatioihin ja kuinka paljon ikääntymisen myötä ilmaantuvat muutokset DNA:n metylaatioissa ovat pelkästään ikääntymisprosessin seurausta (Jones ym. 2015).

Ympäristötekijöiden aiheuttamat DNA-metylaatiomallit; epigeneettiset tekijät, voivat periytyä fenotyyppinä sukupolvelta toiselle (Horvath 2013; Blake & Watson 2016). Epigeneettisessä periytymisessä ympäristö aiheuttaa geenien toiminnassa muutoksia, jotka ovat perinnöllisiä (Portin 2012). Periytyneet epigeneettiset tekijät voivat siirtyä suoraan sukupolvelta toiselle tai jopa periytyä useiden sukupolvien yli (Daxinger & Whitelaw 2012; Portin 2012; Pacchierotti & Spano 2015).

4 DNA-METYLAATIOIKÄ ELI EPIGENEETTINEN KELLO BIOLOGISEN IKÄÄNTYMISEN MARKKERINA

Horvathin epigeneettinen kello. DNA-metylaatioikä eli epigeneettinen kello on Steve Horvathin kehittämä, vuonna 2013 julkaistu uusi, biologisen ikääntymisen mittari. Horvath (2013) vertasi noin 8000 DNA-näytteen metylaatioita, joita oli otettu 51:stä eri kudoksesta ja solutyypistä ihmiskehossa terveiltä ja syöpää sairastavilta henkilöiltä. Horvath havaitsi DNA-metylaatioiden vaihtelevan iän ja terveydentilan mukaan. Horvathin mittausten perusteella kehitetyllä epigeneettisellä kellolla voidaan mitata yksilön ikävuodet hämmästyttävän tarkasti useimmista kudoksista ja soluista: DNA-metylaatioikä on lähellä nollaa sikiöillä ja se kasvaa lineaarisesti iän lisääntyessä. DNA-metylaatioikä määritetään laskenta-algoritmillä, johon on valittu 353 ikäriippuvaista CpG-kohtaa (Horvath 2013). Nämä CpG-kohdat näyttävät toimivan samalla tavalla eri kudoksissa, vaikka DNA:n metylaatiot vaihtelevat eri solutyypeissä (Horvath 2013; Hurme 2015).

DNA-metylaatioiän tarkka toimintatapa (Horvath ym. 2014; Lowe ym. 2016) ja sen suhde muihin solu- ja molekyyli-tason vanhenemismuutoksiin on vielä tuntematon (Lowe ym. 2016). DNA-metylaatioiän on ehdotettu mittaavan kumulatiivisia muutoksia epigeneettisissä tekijöissä (Horvath 2013; Horvath ym. 2014). Horvathin (2013) mukaan DNA-metylaatioikä ei kuitenkaan kerro eri solutyypeissä ikääntymisen myötä tapahtuvista rakenteen muutoksista. Hän on ehdottanut DNA-metylaatioiän mittaavan mekanismin toimintaa, joka ylläpitää epigeneettistä vakautta. DNA-metylaatioiän tarkemmat toimintamekanismit luultavasti selviävät seuraavien vuosien tutkimusten tuloksena (Jylhävä ym. 2017).

Hannumin ja Levinen epigeneettiset kellot. Myös Hannum ym. (2013) ovat kehittäneet DNA:n metylaatioiden CpG-kohtiin perustuvan biologisen ikääntymisen mittarin, josta myöskin käytetään nimitystä epigeneettinen kello. Mittari on määritetty 71:sta eri CpG-kohdasta ja sen on todettu toimivan parhaiten verinäytteistä (Jylhävä ym. 2017; Marioni ym. 2018). Hannumin ym. (2013) epigeneettinen kello korreloi korkeasti ($r=0.91$) kronologisen iän kanssa ja kellon on todettu ennustavan kuoleman riskiä paremmin kuin kronologinen ikä (Chen ym. 2016).

Viime vuonna on julkaistu uusi, Levinen ym. (2018) kehittämä epigeneettinen kello eli fenotyypin DNA-metylaatioikä (DNAm PhenoAge). Levinen ym. (2018) epigeneettisen kellon kehittelyyn on käytetty aineistoa, johon kuului koko kehon verikudoksen eli 20169 GpC-kohdan DNA:n metylaatiot. Lopulta päädyttiin määrittämään fenotyypin DNA-metylaatioikä DNA:n metylaatioiden 513 eri GpC-kohdasta, joiden on todettu olevan yhteydessä kuolleisuuteen, sairastavuuteen ja toimintakyvyn laskuun. Fenotyypin DNA-metylaatioikä ei pelkästään vertaa kronologista ikää DNA-metylaatioikään, vaan se kertoo myös henkilön terveydentilasta verrattuna muihin samanikäisiin. Levinen ym. (2018) tutkimuksen mukaan fenotyypin DNA-metylaatioiän ollessa kiihtynyt yhdellä vuodella on kuoleman riski lisääntynyt 9 %:lla, syöpään kuoleman riski on kasvanut 7 %:lla ja sydän- ja verisuonitauteihin menehtymisen riski on kasvanut 9 %:lla. Vaikka fenotyypin DNA-metylaatioiän kehittelyyn käytettiin vain verikudosta, on sen todettu korreloivan voimakkaasti kaikkien testattujen kudosten ja solujen kanssa, joten fenotyypin DNA-metylaatioikä voidaan määrittää eri kudoksista (Levine ym. 2018).

Epigeneettisten kellojen vertailua. Horvathin (2013) ja Hannumin ym. (2013) epigeneettisiä kelloja on ehdotettu vuonna 2017 saatavilla olevista mittareista tai menetelmistä tarkimmiksi biologista ikääntymistä mittaaviksi menetelmiksi (Jylhävä ym. 2017). Vaikka Horvathin (2013) ja Hannumin ym. (2013) kehittämät epigeneettiset kellot korreloivat voimakkaasti kronologisen iän ja monien ikääntymiseen liittyvien sairauksien kanssa (Horvath ym. 2014; Marioni ym. 2015a; Horvath ym. 2015; Horvath & Ritz 2015; Horvath ym. 2016), ovat tilastollisen vaikuttavuuden suuruudet (effect size) usein vain pieniä tai kohtalaisia (Levine ym. 2018). Tämä voi johtua DNA-metylaatioiän vertaamisesta kronologiseen ikään, jolloin voi jäädä huomioimatta CpG-kohdat, joissa ei tapahdu suuria muutoksia ajan kuluessa. Horvathin menetelmään verrattuna vuonna 2018 julkaistua Levinen ym. (2018) epigeneettistä kelloa on ehdotettu luotettavammaksi biologisen ikääntymisen mittariksi, koska siihen on sisällytetty mukaan CpG-kohtia, jotka kertovat myös henkilön terveydentilasta sekä toimintakyvystä. Näin ollen fenotyypin DNA-metylaatioikä kertoo myös henkilön kuoleman ja monisairastavuuden riskistä verrattuna muihin samanikäisiin henkilöihin eikä pelkästään vertaa DNA-metylaatioikää kronologiseen ikään. Levinen ym. (2018) epigeneettisellä kellolla kuoleman riski on pystytty määrittämään tarkemmin kuin Horvathin tai Hannumin ym. kelloilla.

Hannumin ym. (2013) kehittämä DNA-metylaatioikä pystytään määrittämään vain verikudoksesta (Jylhävä ym. 2017; Marioni ym. 2018), kun taas Levinen ym. (2018) ja Horvathin (2013) epigeneettiset kellot toimivat lähes kaikissa kudoksissa. Levinen ym. (2018) fenotyypin DNA-metylaatioiän määrittämiseen käytetään DNA:n metylaatioiden 513 GpC-kohtaa, joista 13 GpC-kohtaa on samoja kuin Horvathin epigeneettisessä kellossa. Horvathin epigeneettisessä kellossa on 353 GpC-kohtaa, kun taas Hannumin epigeneettisessä kellossa on vain 71 GpC-kohtaa. Horvathin, Hannumin ym. ja Levinen ym. epigeneettisissä kelloissa on 6 samaa GpC-kohtaa. Nämä 6 GpC-kohtaa korreloivat kronologisen iän kanssa erittäin voimakkaasti (Levine ym. 2018). Lisäksi Hannumin ym. ja Horvathin epigeneettisten kellojen on todettu korreloivan korkeasti ($r=0,76$) keskenään (Chen ym. 2016).

DNA-metylaatioiän ja epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittäminen. DNA-metylaatioiän määrittämiseen on olemassa muutamia erilaisia laskenta-algoritmeja. Laskenta-algoritmeista tähän mennessä käytetyimmät ovat Horvathin ja Hannumin kehittämät menetelmät (Jylhävä ym. 2017). Horvathin (2013) DNA-metylaatioiän määrittämisessä DNA:n metylaatiot mitataan Illuminan Infiniumia avustukseen perustuvalla 27k-, 450k- tai EPIC BeadChip-alustalla (Jylhävä ym. 2017). Illumina BeadChip-alusta mittaa CpG-kohtien metyloitumisen DNA-näytteestä mikrosiruanalytiikalla genomini laajuisesti. Raakadata syötetään Horvathin (2013) kehittämään vapaasti saatavilla olevaan ohjelmaan (<https://dnamage.genetics.ucla.edu>), joka spesifiä laskenta-algoritmia käyttäen arvioi henkilön DNA-metylaatioiän vuosissa.

DNA-metylaatioiän ja kronologisen iän erotus (Δ ikä) kertoo, onko henkilön biologinen ikääntyminen edennyt nopeasti vai hitaasti muihin samanikäisiin henkilöihin verrattuna (Horvath ym. 2015; Breitling ym. 2016; Chen. 2016; Marioni ym. 2018). Mikäli henkilön DNA-metylaatioikä on kronologista ikää pienempi, voidaan sanoa DNA-metylaatioiän hidastuneen ja henkilön olevan epigeneettisesti nuori. Jos taas DNA-metylaatioikä on suurempi kuin kronologinen ikä, voidaan sanoa DNA-metylaatioiän kiihtyneen ja henkilön olevan epigeneettisesti vanha (Gentilini ym. 2013).

Epigeneettinen ikääntymisnopeus (age acceleration) voidaan määrittää lineaariseen regressioanalyysin jäännöksistä, kun verrataan tutkittavien DNA-metylaatioikää kronologiseen ikään (Marioni ym. 2015b; Chen ym. 2016; Quach ym. 2017; Gale ym. 2018; Sillanpää ym. 2018). Epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittämiseen on kehitelty erilaisia laskentatapoja. Kaksi tunnetuinta ja käytetyintä keinoa on verrata lineaarisella regressioanalyysillä joko ¹⁾ Horvathin (2013) tai ²⁾ Hannumin ym. (2013) menetelmällä määritettyä DNA-metylaatioikää kronologiseen ikään, jolloin epigeneettinen ikääntymisnopeus määritetään regressioanalyysin jäännöksistä (Chen ym. 2016). Positiivinen tulos kertoo epigeneettisen iän olevan kiihtynyt eli suurempi verrattuna kronologiseen ikään (Horvath ym. 2014; Chen ym. 2016).

Lisäksi on kehitetty mittausmenetelmiä, joissa DNA:n metylaatiot mitataan ³⁾ verestä (intrinsic) tai ⁴⁾ veren mononukleaarista soluista (extrinsic). Sisäinen (intrinsic) epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittäminen ottaa huomioon DNA-metylaatioiän arvioimisessa henkilön verisolut ja kronologisen iän, jolloin saadaan selville solujen sisäinen vanheneminen (Chen ym. 2016; Quach ym. 2017; Gale ym. 2018). Sisäinen epigeneettinen ikääntymisnopeus (intrinsic) voidaan määrittää sekä Horvathin (2013) että Hannumin (2013) epigeneettisistä kelloista. Viides epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittäminen on ⁵⁾ Hannumin epigeneettisen kellon avulla määritetty ulkoinen (extrinsic) epigeneettinen ikääntymisnopeus, jossa aluksi arvioidaan vain verisolujen ikääntymismuutokset, ennen kuin tulos suhteutetaan kronologiseen ikään (Chen ym. 2016). Ulkoinen epigeneettinen ikääntymisnopeus kertoo verisolujen sisäisestä vanhenemisestä sekä verisoluissa ikääntymisen myötä tapahtuvista rakenteen muutoksista (Quach ym. 2017). Tällä määrittämiskeinolla saadaan selville henkilön immunologinen vanheneminen (Chen ym. 2016).

4.1 DNA-metylaatioiän suhde kronologiseen ikään ja yhteys kuolleisuuteen

DNA-metylaatioiän suhde kronologiseen ikään. Horvath (2013) on havainnut, että korrelaatio DNA-metylaatioiän ja kronologisen iän välillä on lapsuudessa ja nuoruudessa logaritminen, kun taas aikuisuudessa suhde on lineaarinen. DNA-metylaatioiän on todettu korreloivan voimakkaasti kronologisen iän kanssa (Christiansen ym. 2016; Sehl ym. 2017). Esimerkiksi

sikiöiden DNA-metylaatioiän on todettu olevan lähellä nollaa ja DNA-metylaatioikä suurenee iän lisääntyessä (Horvath 2013). Tanskalaisessa kaksostutkimuksessa DNA-metylaatioiän korrelaatio kronologisen iän kanssa oli hyvin voimakas ($r=0,97$) nuorilla ja keski-ikäisillä tutkittavilla (Christiansen ym. 2016). Satavuotiaiksi elävillä on todettu olevan kronologiseen ikään verrattuna hidastunut DNA-metylaatioikä eli he ovat epigeneettiseltä iältään nuoria (Gentilini ym. 2013; Marioni ym. 2018). Marionin (2018) ym. meta-analyysissä todettiin useissa kohorteissa DNA-metylaatioiän olevan hidastunut iäkkääksi eläneillä henkilöillä. Näyttäisi siis siltä, että kronologisen iän ja DNA-metylaatioiän välinen erotus eli Δ ikä hidastuu henkilön ikääntyessä.

DNA-metylaatioiän yhteys kuolleisuuteen. Monissa tutkimuksissa on todettu kiihtyneen DNA-metylaatioiän ennustavan kuoleman riskiä paremmin kuin kronologinen ikä (Marioni ym. 2015a; Chen ym. 2016; Christiansen ym. 2016). Viisi vuotta suuremman DNA-metylaatioiän verrattuna kronologiseen ikään on todettu ennustavan 35 % suurempaa kuoleman riskiä (Christiansen ym. 2016). Marioni ym. (2015a) taas totesivat tutkimuksessaan 5 vuotta suuremman DNA-metylaatioiän verrattuna kronologiseen ikään lisäävän kuoleman riskiä 16%:lla. Christiansen ym. (2016) mukaan DNA-metylaatioiän ja kuolemanriskin erot tutkimuksissa voivat johtua mm. eroista aineistojen koossa ja kohorteissa. Chenin ym. (2016) laajassa meta-analyysissä havaittiin, että DNA-metylaatioiällä oli itsenäinen kuoleman riskiä ennustava vaikutus eli kuoleman riski pystyttiin määrittämään riippumattomasti tyypillisistä kuoleman riskiä lisäävistä tekijöistä, kuten monisairastavuudesta sekä alkoholin ja tupakan käytön määristä.

Myös tyypilliset sukupuolten väliset elinajanodotteen erot ovat näkyneet DNA-metylaatioikä tutkimuksissa: miesten DNA-metylaatioiän on todettu olevan korkeampi kuin naisten (Hannum ym. 2013; Marioni ym. 2015a; Horvath ym. 2016). Vaikka julkaistuissa tutkimuksissa kuolleisuuden ja DNA-metylaatioiän yhteys näyttäisi olevan selkeä, asian tutkiminen on silti vielä alkutekijöissään ja voi olla mahdollista, että tilastollisesti merkitsemättömiä tutkimuksia on jätetty julkaisematta (Jylhävä ym. 2017). DNA-metylaatioiän yhteyttä kuolleisuuteen on tutkittu lähinnä verikudoksen DNA-metylaatioiästä, joten tutkimus muiden kudosten DNA-metylaatioiän yhteydestä kuolleisuuteen olisi tarpeellinen (Jylhävä ym. 2017).

4.2 DNA-metylaatioikä eri kudoksissa

Jokaisella kudoksella on erilainen epigeneettinen profiili eli eri kudosten DNA:n metylaatiot käyttäytyvät eri tavalla (Pacchierotti & Spano 2015). Horvath (2013) mittasi tutkimuksessaan 20 eri kudoksen DNA-metylaatioiän ja huomasi toisten kudosten DNA-metylaatioikäen vastaavan tarkemmin henkilön kronologista ikää. Esimerkiksi DNA-metylaatioikä korreloi voimakkaasti kronologisen iän kanssa eri aivoalueista (temporaalinen aivokuori, aivosilta, pikkuaivot) mitattuna (Horvath 2013). Saman tutkittavan eri aivoalueiden DNA-metylaatioiät eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi eli saman henkilön eri aivoalueiden DNA-metylaatioiät ovat hyvin lähellä toisiaan (Horvath 2013).

DNA-metylaatioikä on biologisen ikääntymisen mittarina validoitu suhteessa kronologiseen ikään ja kehityksellisesti vereen sopivaksi, vaikka sen on havaittu toimivan lähes kaikissa kudoksissa (Horvath 2013). Joissakin kudoksissa DNA-metylaatioikä korreloi kuitenkin heikommin kronologisen iän kanssa ja korrelaatioiden määrät ovat olleet vaihtelevia eri tutkimuksissa. DNA-metylaatioikä korreloi heikommin kronologisen iän kanssa esimerkiksi kohdun limakalvolta ($r=0,55$), luustolihasesta ($r=0,70$), ja sydäimestä ($r=0,77$) mitattuna (Horvath 2013). Monet tekijät voivat vaikuttaa kudosten erilaisiin DNA-metylaatioikiin mukaan lukien mm. solujen jakautumisen tahti, soluhengityksen aste, solun energiankulutuksen määrä sekä ympäristötekijät (Jones ym. 2015). DNA-metylaatioiän muutokset saattavat olla suurempia elimissä ja soluissa, joihin tietty riskikäyttäytyminen, esimerkiksi elämäntapatekijä, eniten vaikuttaa (Quach ym. 2017). Ylipainon on esimerkiksi havaittu kiihdyttävän DNA-metylaatioikää maksasoluissa (Horvath ym. 2014). Ylipainon on todettu muun muassa rasvoittavan maksaa ja altistavan rasvamaksalle (Mustajoki 2017; Bhatt & Smith 2015) sekä sokeriaineenvaihdunnan häiriöille (Bhatt & Smith 2015) lisäten esimerkiksi diabeteksen (Jansen 2012) sekä sydän- ja verisuonitautien riskiä (Akil & Ahmad 2011).

Naisen rintakudoksen DNA-metylaatioikä on todettu suurentuneen verrattuna samojen henkilöiden veren DNA-metylaatioikään ja verrattuna kronologiseen ikään (Sehl ym. 2017; Horvath 2013). Horvathin (2013) tutkimuksessa rintakudoksen DNA-metylaatioiän keskivirhe

oli melko suuri (SE=13 vuotta), mikä tarkoittaa, että tutkittavien rintakudoksen DNA-metylaatioiässä oli paljon vaihtelua. Sehlin ym. (2017) tutkimuksessa nuorilla, premenopausaalisilla naisilla, rintakudoksen DNA-metylaatioiän todettiin olevan keskimäärin jopa 17,5 vuotta suurempia kuin veren DNA-metylaatioikä (Sehl ym. 2017). Iäkkäämmillä, postmenopausaalisilla naisilla veren DNA-metylaatioiän ja rintakudoksen DNA-metylaatioiän erot eivät olleet enää niin suuria (Sehl ym. 2017). Nuorten naisten kiihtynyt DNA-metylaatioikä rintakudoksessa saattaa johtua nuorten naisten suuremmasta estrogeenin erityksestä verrattuna iäkkäämpiin, postmenopausaalsiin naisiin (Sehl ym. 2017), joten hormonaalisilla tekijöillä (Horvath 2013; Sehl ym. 2017) ja vaihdevuosilla saattaa olla vaikutusta DNA-metylaatioiän eroihin eri kudoksissa (Levine ym. 2016; Sehl ym. 2017).

Koska DNA-metylaatioiät voivat vaihdella suuresti eri kudoksissa, erilaisissa tutkimusasetelmissä kannattaa pohtia, mistä kudoksesta DNA-metylaatioikä kannattaa määrittää eli mikä kudoksesta kertoo tutkitusta aiheesta parhaiten (Jylhävä ym. 2017). Esimerkiksi luustolihasen DNA-metylaatioikä luultavasti ennustaa paremmin fyysistä toimintakykyä kuin veren DNA-metylaatioikä (Marioni ym. 2015b; Sillanpää ym. 2018) ja kognitiivisesta kyvykkyydestä saadaan luultavasti tietoa aivojen DNA-metylaatioikää tutkimalla (Marioni ym. 2015b).

DNA-metylaatioikä veressä. Eri kudosten DNA:n metylaatioista veri on eniten tutkittu (Pacchierotti & Spano 2015) ja suurimmassa osassa epigeneettisiä kelloja käsittelevistä tutkimuksista biologiset iä; DNA-metylaatioiät, on määritetty verestä (Khoury ym. 2018; Sillanpää ym. 2018). Veren DNA-metylaatioiän on todettu korreloivan korkeammin kronologisen iän kanssa verrattuna muiden kudosten DNA-metylaatioikiin. Horvathin (2013) tutkimuksessa kronologinen ikä korreloi korkeasti perifeeristen verisolujen DNA-metylaatioiän kanssa ($r=0,96$) ja koko verikudoksen DNA-metylaatioiän kanssa ($r=0,95$). Muiden mitattujen solujen ja kudosten DNA-metylaatioiän ja kronologisen iän väliset korrelaatiot olivat alhaisempia, korrelaatiokertoimien vaihdellen välillä $r=0,55-0,90$ (Horvath 2013).

Ihmisen verisolujen elinajat vaihtelevat. Esimerkiksi CD14-monosyytit: veressä kiertävät valkosolut elävät vain muutaman viikon, kun taas valkosolujen ryhmään kuuluvat imusolu CD4-lymfosyytit voivat elää kuukausia tai jopa vuosia (Horvath 2013). Tästä huolimatta Horvathin (2013) tutkimuksessa terveiden mies-tutkittavien eri verisolujen DNA-metylaatioiät eivät kuitenkaan eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Tämä tulos viittaa siihen, ettei DNA-metylaatioikä biologisen iän mittausmenetelmänä mittaa soluissa tapahtuvia muutoksia, vaan sen toiminta perustuu epigeneettisissä mekanismeissa tapahtuviin muutoksiin (Horvath 2013).

DNA-metylaatioikä luustolihasessa. Luustolihasen DNA-metylaatioikä on tutkittu vasta hyvin vähän. Horvath (2013) havaitsi tutkimuksessaan, että luustolihas kudoksesta DNA-metylaatioikää mitattaessa keskivirhe on melko suuri (SE=18 vuotta). Suuri vaihtelu tutkittavien luustolihasen DNA-metylaatioiässä saattaa johtua luustolihas kudoksessa olevien kantasolujen, satelliittisolujen, nuorentavasta eli DNA-metylaatioikää hidastavasta vaikutuksesta. Myöskään kronologisen iän ja luustolihas kudoksen DNA-metylaatioiän korrelaatio ($r=0,70$) ei ollut kovin korkea verrattuna kronologisen iän ja veren DNA-metylaatioiän välisiin hyvin korkeisiin korrelaatioihin (Horvath 2013). Tosin Horvathin ym. (2014) toisessa tutkimuksessa saatiin korkea korrelaatio kronologisen iän ja luustolihas kudoksen DNA-metylaatioiän välille, ($r=0,90$).

Luustolihasen DNA-metylaatioikä saattaa ennustaa paremmin fyysistä toimintakykyä kuin esimerkiksi veren DNA-metylaatioikä (Marioni ym. 2015b; Sillanpää ym. 2018). Tulevaisuudessa luustolihasen DNA-metylaatioiän ja fyysisen toimintakyvyn yhteyksien tutkiminen voi antaa tärkeää tietoa mekanismeista ja geeneistä, jotka johtavat iän myötä ilmenevään fyysisen toimintakyvyn heikkenemiseen ja sairauksien syntyyn (Sillanpää ym. 2018). Aiheen tutkiminen on tarpeellista, jotta pystytään tulevaisuudessa puuttamaan haitallisten ikääntymismuutosten taustalla oleviin solutason ilmiöihin, jonka kautta voitaisiin pyrkiä lisäämään terveyttä ja toimintakykyä ikääntyessä (Marttila 2016).

5 FYYSINEN AKTIIVISUUS KESKI-ikäisillä naisilla

Caspersen ym. (1985) ja myöhemmin mm. World Health Organization (2010) ovat määritelleet fyysisen aktiivisuuden olevan mitä tahansa luustolihasen tuottamaa tahdonalaista ja energiankulutusta lisäävää toimintaa. Fyysinen aktiivisuus voi liittyä esimerkiksi työhön, urheiluun, kotitöihin tai kunnon ylläpitämiseen. Fyysiselle aktiivisuudelle rinnakkainen käsite on liikunta, joka kuvaa myös lihasten tahdonalaista ja henkilön energiankulutusta lisäävää toimintaa, mutta on lisäksi suunniteltua, toistuvaa ja terveyden sekä kunnon ylläpitämiseen tai parantamiseen tähtäävää (Caspersen ym. 1985). Fyysisen aktiivisuuden vastakohta on fyysinen inaktiivisuus, joka tarkoittaa niin vähäistä fyysistä aktiivisuutta, mikä aiheuttaa elinjärjestelmien rakenteiden heikkenemistä ja toimintojen huononemista (Vuori 2005).

Fyysinen aktiivisuus on tärkeää keski-ikäisille naisille myös vaihdevuosien ja niihin liittyvien oireiden näkökulmasta (Moilanen ym. 2010; Mishra ym. 2011). Vaihdevuodet alkavat naisilla usein keski-ikässä; keskimäärin 51 vuoden iässä (Tiitinen 2017) ja aiheuttavat naisten kehon toimintaan huomattavia muutoksia estrogeenin tuotannon vähenemisen vuoksi (Tiitinen 2017). Fyysinen aktiivisuus hidastaa vaihdevuosista aiheutuvia terveydelle haitallisia muutoksia, kuten esimerkiksi luuston (Hojan ym. 2013) ja lihasten haurastumista (Mishra ym. 2011). Fyysisellä aktiivisuudella voidaan vähentää myös vaihdevuosiin liittyviä oireita, kuten kuumia aaltoja (Gibson ym. 2014), unihäiriöitä sekä masennusta (Sternfeld ym. 2014).

5.1 Fyysisen aktiivisuuden terveysvaikutukset ja riskit keski-ikäisillä naisilla

Fyysisen aktiivisuuden yhteys kroonisiin tauteihin ja kuolleisuuteen. Fyysisesti aktiivisten on todettu elävän terveempinä kuin fyysisesti passiivisten henkilöiden (Warburton ym. 2006; Wen ym. 2011). Warburton ym. (2006) totesivat kirjallisuuskatsauksessaan fyysisen aktiivisuuden olevan lineaarisessa yhteydessä tutkittavien terveydentilaan, suuremman määrän fyysistä aktiivisuutta selittäessä parempaa terveydentilaa. Kaikista suurimpia fyysisen aktiivisuuden hyödyt ja muutokset terveydentilan parantumisessa olivat tutkittavilla, jotka olivat alunperin inaktiivisia, mutta lisäsivät fyysisen aktiivisuuden määrää tutkimuksen aikana (Warburton ym. 2006).

Fyysinen aktiivisuus toimii hyvänä primääri- ja sekundaäriehkäisijänä monien kroonisten tautien synnyssä (Warburton ym. 2006; Grindler & Santoro 2015). Fyysisen aktiivisuuden on todettu ennaltaehkäisevän esimerkiksi ylipainolta ja siihen liitetyiltä sairauksilta kuten diabetekseltä ja dyslipidemiaalta (Grindler & Santoro 2015). Fyysisen terveyden lisäksi fyysisellä aktiivisuudella on positiivisia vaikutuksia myös psyykkiseen terveyteen. Fyysinen aktiivisuus parantaa muun muassa mielialaa sekä vähentää ahdistusoireita (Grindler & Santoro 2015) ja stressiä (Mishra ym. 2011). Fyysisen aktiivisuuden on todettu myös suojaavan ennenaikaiselta kuolemalta (Warburton ym. 2006; Wen ym. 2011; Gebel ym. 2015). Gebel ym. (2015) totesivat raskaan fyysisen aktiivisuuden harrastamisen määrän olevan käänteisessä yhteydessä kuolleisuuteen keski-ikäisillä ja iäkkäillä tutkittavilla. Mitä enemmän fyysistä aktiivisuutta henkilö harrasti, sitä pienempi oli hänen riskinsä kuolla.

Fyysisen aktiivisuuden vaikutukset lihaksiin ja toimintakykyyn. Naisilla lihasvoiman menetys kiihtyy vaihdevuosi-ikässä estrogeenin tuotannon vähentyessä (Maltais ym. 2009; Mishra ym. 2011), jolloin etenkin nopeiden (tyypin II) lihassolujen määrä vähenee (Maltais ym. 2009). Vaihdevuosien jälkeen ilmenevä lihasten surkastuminen on suuri uhka henkilön toimintakyvylle (Maltais ym. 2009). Fyysinen aktiivisuus auttaa ylläpitämään lihasten kuntoa ja toimintakykyä, jolla on suurta merkitystä koko kehon fyysiselle toimintakyvylle (Maltais ym. 2009; Chou ym. 2012; Yorston ym. 2012; Cartee ym. 2016) ja henkilön elämänlaadulle (Maltais ym. 2009). Heikomman lihaskunnan on todettu lisäävän toiminnanvajausten riskiä (Rantanen ym. 1999) sekä heikentävän päivittäisistä askareista selviytymistä (Vasconcelos Rocha ym. 2016). Liikunta aiheuttaa muutoksia sekä lihaksen rakenteessa että toiminnassa. Eri liikuntamuodot saavat erilaisia vaikutuksia aikaiseksi lihaskudoksessa (Wilson ym. 2012). Voimaharjoittelun vaikutuksesta lihassolujen koko ja määrä kasvaa. Kasvu on nopeinta nopeissa (tyypin II) lihassoluissa, mutta voimaharjoittelu saa pieniä muutoksia aikaan myös hitaissa lihassoluissa (Verdjik ym. 2009). Kestävyysliikunta kasvattaa enimmäkseen hitaiden lihassolujen (tyypin I) määrää ja aerobista kapasiteettia (Wilson ym. 2012).

Fyysisen aktiivisuuden vaikutukset luustolle. Naisilla luun menetys kiihtyy vaihdevuosi-ikässä estrogeenin tuotannon vähentyessä. Tämän takia naisilla on suurempi riski luukadolle eli osteoporoosille kuin miehillä (Taylor & Johnson 2008). Henkilön harrastaessa liikuntaa luihin kohdistuu kuormitusta, joka aiheuttaa luun uudismuodostusta stimuloivan vaikutuksen

(Kannus 2016). Myös suuremman lihasmassan on todettu olevan yhteydessä suurempaan luuntiheyteen (Proctor ym. 2000; LeBrasseur ym. 2012). Suurempi lihasmassa aiheuttaa enemmän painetta luille, jonka vaikutuksesta luiden koostumus vahvistuu (Mishra ym. 2011). Lisäksi säännöllisesti harrastettu kohtuullinenkin fyysinen aktiivisuus voi osoittautua hyödylliseksi osteoporoottisten murtumien ehkäisyssä ylläpitämällä lihasten massaa ja suorituskykyä sekä tasapainoa, jotka ovat tärkeitä ominaisuuksia murtumien ennaltaehkäisyn kannalta (Suominen 2013).

Fyysisen aktiivisuuden vaikutukset verenkiertoelimistölle. Fyysisellä aktiivisuudella on tärkeä merkitys vaihdevuosi-ikäisille naisille verenkiertoelimistön toiminnan takia, sillä vaihdevuosien jälkeen naisilla on suurentunut riski sydän- ja verisuonitaudeille estrogeenituotannon loppumisen takia (Coulter 2011; Wellons ym. 2013). Estrogeenituotannon on havaittu suojaavan sydän- ja verisuonitaudeilta parantamalla muun muassa lipidiprofiileja ja endoteelista toimintaa (Coulter 2011). Säännöllisen fyysisen aktiivisuuden on todettu vahvistavan sydäntä ja parantavan sydän- ja verenkiertoelimistön kuntoa (Mishra ym. 2011; Grindler & Santoro 2015), esimerkiksi valtimoiden toiminta tehostuu fyysisen aktiivisuuden aiheuttaman kiihtyneen verenvirtauksen seurauksena (Hambrecht ym. 2003). Fyysinen aktiivisuus suurentaa hyvän kolesterolin, HDL:n (high density lipoprotein), määrää sekä vähentävän huonon kolesterolin, LDL:n (low density lipoprotein), triglyseridien ja fibrinogeenien määrää veressä (Mishra ym. 2011). Verenkiertoelimistön tehostuneen toiminnan ja hyvien kolesterolin- ja rasva-arvojen avulla (Mishra ym. 2011) säännöllinen fyysinen aktiivisuus ehkäisee sydän- ja verisuonitaudeilta, aivohalvaukselta sekä laskee verenpainetta (World health organization 2010; Mishra ym. 2011).

Fyysisen aktiivisuuden aiheuttamat terveysriskit. Vaikka fyysiseen aktiivisuuteen liittyy paljon positiivisia terveysvaikutuksia (Warburton ym. 2006; Grindler & Santoro 2015), voi siihen liittyvä myös joskus harvoin joitakin riskejä (Parkkari 2015). Esimerkiksi raskas liikuntasuoritus on joissain harvinaisissa tapauksissa johtanut ennakoimattomaan sydänperäiseen sairauskohtaukseen. Näiden kohtausten riski on suurempi ikääntyvillä ja henkilöillä, joilla on sydänperäisiä sairauksia (Thompson ym. 2007). Fyysinen aktiivisuus voi altistaa myös liikuntatapaturmille, kuten nyrjähdyksille, venähdyksille ja murtumille.

Useimmiten fyysisen aktiivisuuden hyödyt ovat kuitenkin suurempia kuin sen riskit (Parkkari 2015).

5.2 Keski-ikäisten liikuntasuositukset

UKK-instituutin (2016) laatiman liikuntasuositusten mukaan 18-64-vuotiaiden tulisi harrastaa kestävyysliikuntaa liikkumalla viikossa vähintään 150 minuuttia reippaasti tai vähintään 75 minuuttia rasittavasti täyttääkseen terveysliikuntasuositukset. Lisäksi tulisi kohentaa lihaskuntoa ja kehittää liikehallintaa ainakin kaksi kertaa viikossa (U.S. Department of Health and Human Services 2008; UKK-instituutti 2016). Nämä suositukset on päivitetty vastaamaan USA:n vuoden 2008 terveysministeriön sekä maailman terveysjärjestö WHO:n suosituksia (Husu ym. 2011).

Reippaaksi kestävyysliikunnaksi lasketaan esimerkiksi työmatkakävely tai –pyöräily (U.S. Department of Health and Human Services 2008; UKK-instituutti 2016). Rasittavaa kestävyysliikuntaa on taas esimerkiksi juoksu tai tennis (U.S. Department of Health and Human Services 2008; UKK-instituutti 2016). Lihaskuntoa ja liikehallintaa kehittäviä lajeja ovat muun muassa kuntosaliharjoittelu, pallopelit ja tanssi (UKK-instituutti 2016). Reippaan ja rasittavan liikunnan voi myös yhdistää esimerkiksi juoksemalla (raskas liikunta) 30 minuuttia ja tekemällä kävelylenkkejä (reipas liikunta) yhteensä 90 minuuttia viikon aikana (Husu ym. 2011).

Terveysliikuntasuositukset kuvaavat liikunnan minimimääriä (U.S. Department of Health and Human Services 2008; World health organization 2010; Husu ym. 2011). Jos halutaan merkittävästi parantaa kuntoa, vähentää kroonisten sairauksien riskiä tai estää lihomista, pitäisi liikkua jopa kaksinkertainen määrä terveysliikuntasuosituksiin verrattuna eli noin 300 minuuttia viikossa (U.S. Department of Health and Human Services 2008; World health organization 2010; Husu ym. 2011). Tutkimuksissa ei ole kuitenkaan pystytty osoittamaan yli 300 minuutin viikoittaisen fyysisen aktiivisuuden lisäävän terveyshyötyjä (World health organization 2010). Kaikkien aikuisten tulisi välttää inaktiivisuutta (U.S. Department of Health and Human Services 2008). Terveiden kannalta parempi vaihtoehto on harrastaa

liikuntaa edes vähän kuin olla kokonaan inaktiivinen (World health organization 2010; U.S. Department of Health and Human Services 2008).

Keski-ikäisten liikuntatottumukset. Borodulin ym. (2012) tekemän kansallisen FINRISKI-terveystutkimuksen mukaan työikäisten vapaa-ajan liikunnan harrastaminen on lisääntynyt viimeisten vuosikymmenten aikana, mutta fyysinen aktiivisuus arjessa ja työssä on vähentynyt (Borodulin & Jousilahti 2012). Etenkin naisten vähintään kaksi kertaa viikossa vapaa-ajalla liikuntaa harrastavien määrä on kasvanut kolmenkymmenen vuoden aikana (1978-2009) (Helakorpi ym. 2010). Työn fyysinen kuormittavuus on laskenut 70-luvulta lähtien ja yhä useampi tekee kevyttä istumatyötä. Vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus on selvästi yhteydessä ikään ja koulutustasoon; fyysistä aktiivisuutta harrastavat eniten nuoret ja korkeasti koulutetut. Myös työmatkaliikunta on vähentynyt, mikä johtuu luultavasti autoistumisen ja istumatyön lisääntymisestä (Borodulin & Jousilahti 2012).

Liikunnan harrastamisen on todettu vähenevän iän myötä; vain viisi prosenttia 55-64-vuotiaista täyttää terveysliikuntasuositukset (Husu ym. 2011). Lihaskunnan harjoittaminen vähenee iän lisääntyessä, etenkin miehillä. Yli 45-vuotiaat naiset täyttivät lihaskuntosuositukset hieman useammin kuin samanikäiset miehet (Husu ym. 2011). Suomalaiset aikuiset viettävät suuren osan (76%) jokapäiväisestä valveillaoloajastaan paikallaan (Husu ym. 2014). Istumisen määrän on todettu olevan itsenäinen kuoleman vaaraa lisäävä riskitekijä, vaikka henkilö myös harrastaisi liikuntaa säännöllisesti (Owen ym. 2010; Husu ym. 2011).

5.3 Fyysisen aktiivisuuden mittaaminen

Fyysistä aktiivisuutta mitattaessa arvioidaan usein fyysisen aktiivisuuden tyyppiä, useutta, kestoja ja intensiteettiä (Strath ym. 2013). Fyysistä aktiivisuutta mitattaessa voidaan lisäksi arvioida fyysisen aktiivisuuden määrän ja intensiteetin muutosta sekä liikunnan suhdetta muuhun fyysiseen aktiivisuuteen (Fogelholm 2016). Fyysistä aktiivisuutta voidaan mitata joko omaan arviointiin perustuvilla eli subjektiivisilla menetelmillä tai jonkin mittauslaitteen

käyttöön perustuvilla eli objektiivisilla menetelmillä (Vanhees ym. 2005; Strath ym. 2013; Fogelholm 2016).

Fyysisen aktiivisuuden mittaaminen objektiivisilla menetelmillä. Objektiiviset fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmät perustuvat yleensä jonkin mittauslaitteen käyttöön. Objektiivisuus viittaa siihen, ettei tutkittava itse pysty esimerkiksi arvoilla tai asenteilla vaikuttamaan mittauksen lopputulokseen (Fogelholm 2016). Objektiivisiä fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmiä ovat muun muassa kiihtyvyyssanturi, askelmittari, sykemittari ja energiankulutusta mittaavat menetelmät, kuten suora ja epäsuora kalorimetria sekä kaksoismerkitty vesi (Vanhees ym. 2005; Strath ym. 2013). Mittausmenetelmän valintaan vaikuttaa tutkimuskysymykset eli se, mitä tutkimuksessa on tarkoitus tutkia. Sopivaa mittaamenetelmää valittaessa tulee lisäksi ottaa huomioon, mitä fyysisen aktiivisuuden tyyppiä halutaan mitata, kuinka suuri on tutkimusjoukko sekä millaiset ovat mittausten kustannukset (Strath ym. 2013).

Kiihtyvyyssanturit mittaavat nimensä mukaisesti kehon kiihtyvyyttä. Kiihtyvyyssanturit pystyvät mittaamaan kehon kiihtyvyyden perusteella liikkeiden kestoa, intensiteettiä ja määrää. Kiihtyvyyssanturi voidaan kiinnittää esimerkiksi lonkkaan, ranteeseen tai nilkkaan (Strath ym. 2013). Kiihtyvyyssanturi voi olla yksi, kaksi tai kolmiakselinen. Yksiakseliset kiihtyvyyssanturit mittaavat kiihtyvyyttä pelkästään pystysuunnassa, kun taas kolmiakseliset anturit pystyvät mittaamaan kiihtyvyyttä vaaka-, sivu- ja pystysuunnassa (Chen & Bassett 2005).

Askelmittarit ovat pieniä mittareita, jotka mittaavat kehon liikkeitä pystysuunnassa. Askelmittaria pidetään useimmiten vyötäröllä (Vanhees ym. 2005). Askelmittarit on kehitetty mittaamaan erityisesti kävellen tai juosten tapahtuvaa fyysistä aktiivisuutta (Strath ym. 2013), mutta esimerkiksi pyöräilyä tai uimista se ei ole kykene kunnolla mittaamaan (Vanhees ym. 2005; Sallis 2010). Yksinkertaisemmat askelmittarit mittaavat pelkästään askelten määrää ja kuljetun matkan pituutta, mutta kehittyneemmissä askelmittareissa voi olla myös fyysisen aktiivisuuden intensiteettiä mittaavia ominaisuuksia (Strath ym. 2013).

Suorassa kalorimetriassa määritetään kehosta poistuva lämmön määrä (Hipskind ym. 2011; Ndahimana & Eun-Kyung 2017). Poistuneen lämmön määrän perusteella saadaan selville energiankulutus ja sitä kautta fyysisen aktiivisuuden määrä (Walsberg & Hoffman 2005). Epäsuorassa kalorimetriassa mitataan hengityskaasuista hiilidioksidin tuotto ja hapenkulutus, joiden perusteella voidaan arvioida aerobinen energiankulutus (Hipskind ym. 2011; Walsberg & Hoffman 2005). Nykyisin on olemassa kannettavia epäsuoria kalorimetrioita, jotka mittaavat päivän aikana tapahtuneen energiankulutuksen (Hipskind ym. 2011). Suora ja epäsuora kalorimetria ovat melko tarkkoja fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmiä, mutta ne ovat kalliita, aikaa vieviä ja vaikeita toteuttaa suurille tutkimusjoukoille (Aparicio-Ugarriza ym. 2015).

Kaksoismerkityn veden menetelmässä tutkittavalle annetaan liuosta, joka sisältää tietyn määrän tunnettuja hapen (^{18}O) ja vedyn (^2H) isotooppeja. Fyysisen aktiivisuuden aikana, energiankulutuksen seurauksena syntynyt hiilidioksidi (CO_2) poistuu elimistöstä hengityksen mukana ja syntynyt vesi (H_2O) poistuu hikoilun, hengityksen ja haihtumisen mukana. Isotooppien poistumisnopeuden erotuksesta pystytään laskemaan henkilön kokonaisenergiankulutus (Vanhees ym. 2005; Strath ym. 2013; Westerterp ym. 2017). Kaksoismerkitty vesi mittaa hyvin tarkasti kokonaisenergiankulutusta, mutta menetelmänä se on kuitenkin hyvin kallis eikä sen avulla pystytä määrittämään, kuinka suuri osa energiankulutuksesta johtuu fyysisestä aktiivisuudesta ja kuinka suuri osa peruselintoimintojen ylläpidosta (Westerterp ym. 2017). Fyysisen aktiivisuuden objektiivisista arviointimenetelmistä tarkimpina pidetään suoraa ja epäsuoraa kalorimetriaa sekä kaksoismerkittyä vettä (Vanhees ym. 2005).

Fyysisen aktiivisuuden mittaaminen subjektiivisilla menetelmillä. Omaan arviointiin perustuvat eli subjektiiviset fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmät ovat käytetyimpiä tieteellisissä tutkimuksissa (Fogelholm 2016). Subjektiivisiin fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmiin kuuluvat kyselyt ja päiväkirjat (Vanhees ym. 2005; Strath ym. 2013). Kyselyjä toteutettaessa henkilö joko itse täyttää kyselylomakkeen tai kyselylomakkeen täyttämässä voidaan käyttää haastattelijan apua (Strath ym. 2013). Subjektiiviset fyysisen aktiivisuuden mittaamenetelmät voidaan jakaa takeneviin eli retrospektiivisiin ja eteneviin eli prospektiivisiin menetelmiin. Retrospektiivisiä menetelmiä ovat esimerkiksi kyselyt ja

haastattelut, kun taas liikuntapäiväkirja on prospektiivinen fyysisen aktiivisuuden mittausmenetelmä (Fogelholm 2016).

Kyselyjen etuna on nopeus, helppous, tehokkuus ja vähäiset kustannukset (Luoto 2009; Sallis 2010; Fogelholm 2016). Kyselytutkimuksen aikataulu ja kustannukset on helpompi arvioida kuin esimerkiksi kokeellisessa tutkimuksessa (Luoto 2009). Kysely sopii hyvin suurien tutkimusjoukkojen fyysisen aktiivisuuden arviointiin (Sallis 2010; Strath ym. 2013). Kyselylomakkeesta on eniten hyötyä, kun se on luotettavasti validoitu kohdejoukolle, selkeä, toistettavissa oleva ja tarvittaessa identifioiva (Luoto 2009). Kyselyiden on todettu mittaavan hyvin raskaan fyysisen aktiivisuuden määrää, mutta kyselyiden tarkkuus ei ole niin hyvä mitattaessa kevyttä ja keskiraskasta fyysistä aktiivisuutta (Strath ym. 2004).

Kyselytutkimuksen luotettavuutta voi heikentää kyselylomakkeen kysymysten johdattelevuus, kysymysten väärinymmärrykset, vastausten huono laatu tai pieni vastausprosentti (Luoto 2009) sekä fyysistä aktiivisuutta kysyttäessä tutkittavien taipumus suurennella fyysisen aktiivisuuden määriä (Sallis 2010). Kyselylomakkeen kysymysten tulisi olla selkeitä ja yksinkertaisia (Luoto 2009; Hirsjärvi ym. 2009) ja kysymyksissä tulisi kysyä vain yhtä asiaa kerrallaan (Hirsjärvi ym. 2009). Jos kysymys on epäselvä, vastaaja helposti jättää vastaamatta tai kirjoittaa vastaukseksi omia tulkintoja (Luoto 2009).

6 FYYSISEN AKTIIVISUUDEN, MUIDEN ELINTAPOJEN JA YMPÄRISTÖN YHTEYS DNA-METYLAATIOIKÄÄN JA EPIGENEETTISEEN IKÄÄNTYMISNOPEUTEEN

Terveellisten elintapojen kuten esimerkiksi fyysisen aktiivisuuden (Warburton ym. 2006; Chodzko-Zajko ym. 2009; Mishra ym. 2011; Grindler & Santoro 2015), monipuolisen ruokavalion (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014) sekä tupakoimattomuuden on todettu edistävän terveyttä (Gulliford ym. 2003) sekä mahdollisesti hidastavan ikääntymisprosessia ja edistävän terveenä ikääntymistä (Södergren 2013). Ympäristötekijöiden ja elintapojen yhteydestä biologiseen ikääntymiseen ei ole kuitenkaan vielä saatavilla yksiselitteistä tutkimustietoa. Koska DNA-metylaatioikä on melko uusi biologisen ikääntymisen mittari, sen yhteyttä elintapoihin ja ympäristötekijöihin on ehditty tutkimaan vasta hyvin vähän. Tiedetään, että ympäristötekijät vaikuttavat DNA:n metyloitumiseen, mutta ei tiedetä tarkasti, kuinka paljon ympäristö vaikuttaa niihin ja kuinka suuri osa ikääntymisen myötä ilmaantuvista muutoksista DNA:n metylaatioissa on esimerkiksi kasvun ja ikääntymisprosessin (Jones ym. 2015) sekä geneettisten tekijöiden (Pacchierotti & Spano 2015) seurausta. Aiemmat DNA-metylaatioikää käsittelevät tutkimukset ovat lähinnä keskittyneet tutkimaan DNA-metylaatioiän yhteyttä sairauksiin ja kronologiseen ikään, elintapojen yhteyksien tutkimisen biologiseen ikääntymiseen jäädessä vähemmälle (Quach ym. 2017).

6.1 Fyysisen aktiivisuuden ja toimintakyvyn yhteys DNA-metylaatioikään ja epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen

Fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikään ja epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen on tutkittu vain muutamassa tutkimuksessa ja tutkimusten tulokset ovat olleet ristiriitaisia (Gale ym. 2018). Quach ym. (2017) totesivat fyysisen aktiivisuuden ja veren ulkoisen (extrinsic) epigeneettisen ikääntymisnopeuden välillä olevan heikko, mutta tilastollisesti merkitsevä korrelaatio ($r=-0,07$, $p=2\times 10^{-5}$). Fyysisesti aktiivisimmilla tutkittavilla havaittiin olevan alhaisempi veren epigeneettinen ikääntymisnopeus verrattuna inaktiivisiin tutkittaviin (Quach ym. 2017). Myös Galen ym. (2018) tutkimuksessa veren

epigeneettinen ikääntymisnopeus oli yhteydessä aktiivisuusmittarilla mitattuun fyysisen aktiivisuuden määrään; hyvin vähän liikkuvilla todettiin olevan kiihtynyt epigeneettinen ikääntymisnopeus. Tosin tilastollisesti merkitsevä yhteys hävisi iällä, sukupuolella, kehon painoindeksillä, masennusstatuksella ja kroonisten tautien määrällä adjustoinnin jälkeen. Aktiivisuusmittarilla mitattu inaktiivisuus ei siis enää ollut yhteydessä kiihtyneeseen DNA-metylaatioikään adjustoinnin jälkeen, eikä suurempi fyysisen aktiivisuuden määrä myöskään hidastanut DNA-metylaatioikää. Gale ym. (2018) toteavat pohdinnoissaan, että aktiivisuusmittarin käyttö on saattanut muuttaa tutkittavien normaalia käytöstä ja fyysisen aktiivisuuden määriä, mikä voi olla tutkimuksen tuloksia vääristävä tekijä.

Kiihtyneen veren epigeneettisen ikääntymisnopeuden on todettu olevan yhteydessä huonommasta toimintakyvystä viittaaviin pienentyneeseen käden puristusvoimaan (Marioni ym. 2015b; Sillanpää ym. 2018), heikentyneeseen keuhkojen toimintaan ja heikentyneeseen kognitioon (Marioni ym. 2015b) sekä hauraus-raihnausoireyhtymään (Breitling ym. 2016). Sillanpää ym. (2018) mukaan kiihtynyt DNA-metylaatioikä oli yhteydessä alhaisempaan käden puristusvoimaan, muttei polven ojennusvoimaan eikä kävelynopeuteen. Käden puristusvoima mittaa luultavasti paremmin fyysistä ikääntymistä kuin kävelynopeus ja polven ojennusvoima, joihin voi vaikuttaa monia sekoittavia tekijöitä, kuten esimerkiksi henkilön liikunta-aktiivisuus ja kehonkoostumus. Tämä voi selittää kiihtyneen DNA-metylaatioiän yhteyttä pelkästään käden puristusvoimaan (Sillanpää ym. 2018). Käden puristusvoiman on havaittu aiemmissa tutkimuksissa heikkenevän iän myötä (Frederiksen ym. 2006) sekä ennustavan kuolleisuutta (Rantanen ym. 2003) ja sairastavuutta (Cheung ym. 2013). Epigeneettiset kellot eli DNA-metylaatioiät voivat antaa tietoa siitä, miksi toiset henkilöt ikääntyvät nopeammin ja ovat sen takia alttiimpia ikääntymisen kielteisille vaikutuksille, kuten lihasvoiman ja -massan menetykselle, mikä voi edelleen johtaa fyysisen toimintakyvyn menetykseen ja sairauksien lisääntymiseen (Sillanpää ym. 2018).

6.2 Muiden elintapojen ja ympäristötekijöiden yhteys DNA-metylaatioikään

Ravitsemustottumusten yhteyttä biologiseen ikääntymiseen on tutkittu vasta hyvin niukasti. Ravitsemussuositusten mukaan tulisi syödä runsaasti muun muassa hedelmiä, vihanneksia ja täysjyväviljatuotteita, kun taas tyydyttyneen rasvan saantia tulisi vähentää ruokavaliossa (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014). Ravitsemussuositukset perustuvat tutkimustuloksiin, joiden mukaan esimerkiksi kalan (Mozaffarian & Rimm 2006), siipikarjan, hedelmien ja vihannesten syömiseen voi mahdollisesti liittyä positiivisia terveysvaikutuksia (Valtion ravitsemusneuvottelukunta 2014; Whitton ym. 2018). Quachin ym. (2017) poikkileikkaustutkimuksessa havaittiin hidastuneen epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan yhteydessä kalan, siipikarjan, hedelmien ja vihannesten syömiseen, joten tämän tutkimuksen mukaan näyttäisi siltä, että ravitsemussuositusten mukainen ruokavalio hidastaa biologista ikääntymistä. Tutkimuksessa todettiin hidastuneen epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan yhteydessä myös paremmasta ravitsemuksellisesta tilasta viittaaviin laboratorioarvoihin (mm. plasman karotenoidit, rasvan triglyseridit ja beetakaroteenit).

Ylipainolla tiedetään olevan monia terveyshaittoja (Akil & Ahmad 2011; Jansen 2012; Bhatt & Smith 2015; Abdelaal ym. 2017; Mustajoki 2017) ja sen on todettu lisäävän kuolemanriskiä huomattavasti (Abdelaal ym. 2017). Quachin ym. (2017) tutkimuksessa suurentunut kehon painoindeksi (body mass index) oli yhteydessä kiihtyneeseen veren epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen ($r=0,09$). Yhteys oli kuitenkin paljon heikompi kuin Horvathin ym. (2014) raportoima ylipainon aiheuttama, kiihtynyt epigeneettinen ikääntymisnopeus maksassa ($r=0,42$, Quach ym. 2017). Horvathin ym. (2014) tutkimuksessa todettiin pelkästään maksakudoksen kiihtyneen epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan yhteydessä suurempaan kehon painoindeksiin. Samaa yhteyttä ei ollut havaittavissa veren, rasvan tai lihaskudoksen epigeneettisessä ikääntymisnopeudessa. Näyttäisi siltä, että DNA-metylaatioiän ja DNA-metylaatioiän avulla määritetyn epigeneettisen ikääntymisnopeuden muutokset saattavat olla suurempia elimissä ja soluissa, joihin tietty riskikäyttäytyminen, esimerkiksi elämäntapatekijä, eniten vaikuttaa (Quach ym. 2017). Lihavuuden yhteys kiihtyneeseen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen maksakudoksessa saattaa johtua jatkuvasta huonon ravinnon aiheuttamasta oksidatiivisesta stressistä sekä muiden metabolisten

kuormitusten vaikutuksesta epigeneettisiin muutoksiin maksakudoksessa (Horvath ym. 2014). Kiihtyneen DNA-metylaatioiän on myös todettu olevan yhteydessä suurempaan määrään metabolisen oireyhtymän oireita, joten kiihtyneellä DNA-metylaatioiällä voi olla yhteyttä metabolisten tekijöiden ikääntymismuutoksissa (Quach ym. 2017). Lihavuuden ja DNA-metylaatioiän välisten yhteyksien tutkiminen voi tulevaisuudessa valottaa syitä, miksi ylipainoiset henkilöt kärsivät enemmän monista ikääntymisen myötä ilmaantuvista sairauksista, kuten esimerkiksi maksasyövästä (Horvath ym. 2014).

Tupakoinnin yhteydestä epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen on saatu ristiriitaisia tuloksia. Quachin ym. (2017) ja Gaon ym (2016) tutkimuksissa ei todettu tupakoinnin kiihdyttävän DNA-metylaatioiän avulla määritettyä biologista ikääntymistä. Quachin ym. (2017) tutkimuksessa kysyttiin tutkimuksen aikaista tupakointia ja itseraportoidun tupakoinnin ei siis todettu olevan yhteydessä veren kiihtyneeseen DNA-metylaatioiään ($p=0.33$, Quach ym. 2017). Gaon ym. (2016) tutkimuksessa tupakointi määritettiin itseraportoidusti sekä mittaamalla seerumin kotiniinipitoisuus (=nikotiinin aineenvaihduntatuote, jota käytetään indikaattorina tupakansavulle altistumiselle) (Benowitz 1996), mutta tupakoinnin ei todettu olevan yhteydessä veren kiihtyneeseen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Toisaalta esimerkiksi Beachin ym. (2015) tutkimuksessa tupakoinnin todettiin kiihdyttävän veren DNA-metylaatioiää ja epigenettistä ikääntymisnopeutta. Jopa vähäinen tupakointi kiihdytti veren epigeneettistä ikääntymisnopeutta huomattavasti (Beach ym. 2015).

Kohtuullinen alkoholinkäyttö saattaa olla yhteydessä hitaampaan epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Tämä tulos havaittiin sekä Beachin ym. (2015) että Quachin ym. (2017) tutkimuksissa. Kohtuullisen alkoholin käytön todettiin hidastavan epigenettistä ikääntymisnopeutta, mutta yhteys ei ollut nähtävissä hyvin vähän tai alkoholia runsaasti nauttivilla (Beach ym. 2015). Quachin ym. (2017) tutkimuksessa havaittiin etenkin viinien ja oluiden kohtuullisen käytön olevan yhteydessä hidastuneeseen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Kohtuullisen alkoholinkäytön yhteyttä hidastuneeseen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen voi selittää aiempien tutkimusten tulokset, joissa kohtuullisen alkoholinkäytön on todettu lisäävän yleistä terveyttä (Sun ym. 2011) ja vähentävän kuolleisuutta (Fuller 2011). Terveyttä lisäävät vaikutukset voivat johtua esimerkiksi kohtuullisen alkoholinkäytön tulehdusta ehkäisevistä eli anti-inflammatorisista vaikutuksista,

joita näkyvät kohtuullisesti alkoholia käyttävien pienemmissä tulehdusarvoissa kuten CRP- ja interleukiini 6-arvoissa (Volpato ym. 2004).

Stressin on todettu olevan yhteydessä kiihtyneeseen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Sama ympäristöaltistus voi johtaa samanlaiseen epigeneettiseen muutokseen eri yksilöillä (Boks ym. 2014). Esimerkiksi Afganistanissa taistelleilla sotilaille on todettu olevan kiihtynyt epigeneettinen ikääntymisnopeus, jonka arveltiin johtuvan sodan aiheuttamasta stressistä ja traumasta (Boks ym. 2014). Zannasin ym. (2015) tutkimuksessa huomattiin kumulatiivisen stressin kiihdyttävän veren DNA-metylaatioikää ja epigeneettistä ikääntymisnopeutta. Aikuisilla tutkittavilla kiihtynyt epigeneettinen ikääntymisnopeus ei kuitenkaan ollut yhteydessä tutkimuksen aikaiseen stressiin eikä lapsuudessa tapahtuneeseen kaltoinkohteluun (Zannas ym. 2015).

7 TUTKIMUKSEN TARKOITUS JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän pro gradu –tutkielman tarkoituksena on selvittää, eroavatko veren valkosolujen ja luustolihasen biologisen iät eli DNA-metylaatioiät sekä kronologinen ikä toisistaan. Lisäksi tutkielmassa tarkastellaan, miten fyysinen aktiivisuus on yhteydessä biologiseen ikääntymiseen. Tutkielmassa selvitetään, kiihdyttääkö vai hidastaako fyysinen aktiivisuus veren valkosolujen ja luustolihasen biologista ikääntymistä, joka mitataan uuden biologisen ikääntymisen mittarin, DNA-metylaatioiän, avulla. Lopuksi tarkastellaan, selittääkö painoindeksi tutkittua yhteyttä.

Tutkimuskysymykset ovat:

1. Eteneekö yksilön biologinen ikääntyminen, jota mitataan DNA-metylaatioiän avulla, samaa vauhtia kronologisen iän kanssa sekä koko kehon tasolla (veren valkosolut) että luustolihas kudoksessa?
2. Onko vapaa-ajan fyysinen aktiivisuus yhteydessä veren valkosolujen ja/tai luustolihasen biologiseen ikääntymiseen keski-ikäisillä naisilla?
3. Säilyykö mahdollinen yhteys vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden ja biologisen ikääntymisen välillä, kun malli vakioidaan painoindeksillä?

8 AINEISTON KERUU JA MENETELMÄT

Tässä pro gradu -tutkielmassa käytettiin Estrogeeni, vaihdevuodet ja toimintakyky (ERMA) - tutkimuksen osa-aineistoa. Otokseen kuuluu 30 ERMA-tutkimukseen osallistunutta keski-ikäistä naista, joille on tehty DNA-metylaatioikämittaukset veri- ja luustolihas kudoksesta. ERMA-tutkimus toteutettiin vuosien 2014-2018 aikana Jyväskylän yliopiston Gerontologian tutkimuskeskuksessa. ERMA-tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää vaihdevuosiin liittyvän estrogeenivajeen merkitystä ja estrogeenin vaikutusmekanismeja kehon koostumukseen, lihasten suorituskykyyn ja psyykkiseen hyvinvointiin 47–54 -vuotiailla naisilla (Kovanen ym. 2018).

8.1 Tutkittavat, tutkimusasetelma ja muuttajat

ERMA-tutkimukseen osallistuvat keski-ikäiset naiset poimittiin tutkimuksen alkaessa satunnaisotannalla väestörekisteristä Jyväskylän kaupungin ja sen lähikuntien alueella asuvista 47–55 -vuotiaista naisista (n=6878, Kovanen ym. 2018). Kutsukirjeeseen vastasi 3229 naista, jonka jälkeen poissulkukriteerien perusteella tutkimuksesta poissuljettiin 988 henkilöä. Poissulkukriteereinä olivat raskaus tai imetys, munasarjojen monirakkulaoireyhtymä tai muu munasarjojen toimintaan vaikuttava sairaus, munasarjojen poisto, estrogeenia sisältävän valmisteiden käyttö tai muu munasarjojen toimintaan vaikuttava lääkitys, lihasten toimintaan vakavasti vaikuttava krooninen sairaus tai lääkitys sekä painoindeksi yli 35kg/m². Lisäksi muita tutkimuksen edetessä päätettyjä poissulkukriteerejä olivat krooninen sairaus, johon oli jatkuva sytostaatti-, tulehdus- tai kortisonilääkitys tai vakava mielenterveydenhäiriö sekä tuki- ja liikuntaelimestön sairaus, joka merkittävästi vähensi fyysistä aktiivisuutta tai toimintakykyä. Lopulta tutkittavia oli 787-1393 riippuen mitattavasta muuttujasta (Kovanen ym. 2018).

Tämän opinnäytetyön aineisto on kerätty 30:ltä ERMA-tutkimukseen osallistuneelta keski-ikäiseltä naiselta. Tutkittavilta on kerätty DNA-näytteet veri- ja luustolihas kudoksesta. Osa-aineisto valikoitiin ERMA-tutkimuksen aineistosta satunnaisotannalla niiden henkilöiden joukosta, joilta oli saatavilla DNA:sta sekä luustolihas- että verinäytteet, ja joilla ei ollut

puuttuvaa tai heikkolaatuista aineistoa ERMA-tutkimuksen aktiivisuus- ja suorituskykykyselyissä. Veren DNA-näyte on otettu valkosolukerroksesta (buffy coat), joka on valmistettu sentrifugoimalla valkosoluja ja verihiutaleita kokoveriyksiköstä (Bjälle ym. 2009; Neumüller ym. 2015). Luustolihaksen DNA-näyte on otettu ulomman reisilihaksen keskikohdasta, joka määritettiin tutkittavien ison sarvennoisen ja polvinivelen puolivälistä. Lihasbiopsian jälkeen näytteestä poistettiin rasvakudos ja muiden kudosten jäänteet. DNA-näytteet pakastettiin nestetyypessä ja säilöttiin -80 celsiusasteeseen odottamaan niiden analysointia. DNA:n eristäminen tehtiin käyttämällä DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Cat No./ID: 69504) -kittiä.

Fyysisen aktiivisuuden määrittäminen. Fyysistä aktiivisuutta arvioitiin kyselylomakkeella, jossa fyysisen aktiivisuuden taso määriteltiin 7-luokkaisen asteikon avulla (Hirvensalo ym. 1998). Fyysisen aktiivisuuden asteikko on muunnelmä alunperin Grimbyn (1986) kehittäämästä 4-luokkaisesta fyysisen aktiivisuuden jaottelusta, jota on mm. muunneltu aluksi 6-luokkaiseksi asteikoksi, jolloin siihen sisällytettiin mukaan kotiaskareiden teko fyysisenä aktiivisuutena (Mattiasson-Nilo ym. 1990), ja viimeisimpänä fyysisen aktiivisuuden jaottelu on muutettu kattavammaksi 7-luokkaiseksi asteikoksi (Hirvensalo ym. 1998).

Tässä tutkielmassa käytetyssä 7-luokkaisessa jaottelussa 0 kuvaa aktiivisuustasoa, jossa ei liikuta enempää kuin on tarpeen päivittäisistä toiminnoista selviämiseksi, luokka 1 kuvaa kevyttä ulkoilua ja kävelyä 1-2 kertaa viikossa, luokka 2 kevyttä ulkoilua ja kävelyä useita kertoja viikossa. Luokka 3 kuvaa reipasta liikuntaa, joka aiheuttaa jonkin verran hengästymistä ja hikoilua 1–2 kertaa viikossa, luokka 4 reipasta liikuntaa, joka aiheuttaa jonkin verran hengästymistä ja hikoilua 3–5 kertaa viikossa, luokka 5 kuntoliikuntaa useita kertoja viikossa hikoillen ja hengästyen melko voimakkaasti ja luokka 6 kilpaurheilua ja kunnan ylläpitoa säännöllisellä harjoittelulla (Kovanen ym. 2018). Tätä pro gradu –tutkielmaa varten nämä 7 luokkaa yhdistettiin neljäksi luokaksi, jotka ovat passiivinen (luokka 0), jonkin verran aktiivinen (luokat 1–2), aktiivinen (luokat 3–4) ja hyvin aktiivinen (luokat 5–6).

DNA-metylaatioiän määrittäminen. DNA-metylaatioikä on biologisen iän mittari, joka tiettyjen DNA-kohtien metyloitumisen perusteella arvioi henkilön biologisen iän vuosissa

matemaattista mallia apuna käyttäen. Tutkittavilta otetuista laskimoveri- ja lihasbiopsianäytteistä eristetystä DNA:sta selvitettiin EPIC array –analyysillä 353 ikäspesifin DNA-kohtien metyloituminen (Horvath 2013). Raakadata syötettiin Horvathin (2013) kehittämään vapaasti saatavilla olevaan ohjelmaan (<https://dnamage.genetics.ucla.edu>), joka spesifiä laskenta-algoritmia käyttäen arvioi henkilön DNA-metylaatioiän vuosissa.

Epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittäminen. Epigeneettinen ikääntymisnopeus kertoo, onko kudoksesta otettu näyte nopeasti vai hitaasti suhteessa kronologiseen ikään (Chen ym. 2016). Jos tulos on positiivinen, epigeneettinen ikääntymisnopeus on kiihtynyt eli suurempi verrattuna kronologiseen ikään (Horvath ym. 2014; Chen ym. 2016). Veri- ja luustolihas kudoksen epigeneettinen ikääntymisnopeus (age acceleration) määritettiin lineaarisen regressioyhtälön jäännöksistä, kun verrattiin tutkittavien DNA-metylaatioikää kronologiseen ikään (Marioni ym. 2015b; Chen ym. 2016; Quach ym. 2017; Gale ym. 2018).

Taustamuuttujat. Tutkittavien pituus ja paino mitattiin laboratoriossa. Mittausten perusteella määriteltiin kunkin tutkittavan kehon painoindeksi (kg/m²). Muita taustamuuttujia tutkielmassa ovat koulutusaste ja siviilisääty, joista tiedot on saatu ERMA-tutkimuksen kyselyllä. Tutkittavilta kysyttiin heidän korkeinta koulutustasoa. Vastausvaihtoehdot kyselyssä olivat 1 peruskoulu, 2 lukio tai ammatillinen koulutus, 3 opistoasteen ammatillinen koulutus, 4 ammattikorkeakoulu, 5 alempi korkeakoulututkinto, 6 ylempi korkeakoulututkinto, 7 lisensiaatti- tai tohtorintutkinto sekä 8 muu, mikä. Luokat yhdistettiin kolmeen luokkaan siten, että vastausvaihtoehdot 1-3 sekä 8, 4-5 ja 6-7 yhdistettiin, kutakuinkin ensimmäisen, toisen ja kolmannen asteen koulutuksen mukaisesti (Kovanen ym. 2018).

Siviilisäätykysymyksessä vastausvaihtoehdot olivat 1 naimaton, 2 avioliitossa tai rekisteröidyssä parisuhteessa, 3 uudessa avioliitossa, 4 avoliitossa, 5 eronnut tai asumuserossa sekä 6 leski (Kovanen ym. 2018). Tätä tutkielmaa varten avioliitossa tai rekisteröidyssä parisuhteessa, avoliitossa sekä uudessa avioliitossa (vastausvaihtoehdot 2, 3 ja 4) olevat yhdistettiin yhdeksi luokaksi, jolloin tutkittavat jakautuivat siviilisäätynsä perusteella kolmeen

eri luokkaan: 1 naimattomiin, 2 naimisissa, rekisteröidyssä parisuhteessa tai avoliitossa oleviin sekä 3 eronneisiin. Yhtään leskeä ei ollut tässä pro gradu -tutkielmassa mukana.

8.2 Tilastolliset analyysit

Aineiston analyysit suoritettiin IBM SPSS Statistics 24 -ohjelmistolla. Tilastollisten analyysien merkitsevyytasoksi määritettiin kaikissa testeissä $p < 0,05$. Muuttujien normaalijakautuneisuutta tarkasteltiin Shapiro-Wilkin testillä sekä tulkitsamalla jakaumien vinoutta ja huipukkuutta. Kronologisen iän sekä veren valkosolujen ja luustolihas kudoksen keskiarvojen eroja verrattiin parittaisella T-testillä. Kronologisen iän sekä veren valkosolujen ja luustolihas kudoksen DNA-metylaatioiän yhteyksiä tarkasteltiin Pearsonin korrelaatiokertoimella.

Veren valkosolujen ja luustolihas kudoksen epigeneettisen ikääntymisnopeuden keskiarvojen eroja fyysisen aktiivisuuden eri luokissa tarkasteltiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Yksisuuntaisen varianssianalyysin oletukset olivat voimassa; varianssien yhtäsuuruus oli voimassa Levenen testin mukaan ($p = 0,078$ eli $p > 0,05$ veren valkosolut ja $p = 0,650$ eli $p > 0,05$ luustolihas). Yksisuuntaisessa varianssianalyysissä käytettiin Bonferroni-korjausta. Yksisuuntaiseen varianssianalyysiin lisättiin lopuksi kehon painoindeksi kovariaattina, jolloin testattiin, vaikuttaako kehon painoindeksi tutkittuun yhteyteen.

9 TULOKSET

Perustiedot tutkittavista (n=30) on esitetty taulukossa 1. Tutkittavien ikä vaihteli 48 ja 55 vuoden välillä. Tutkittavat olivat keskimäärin 1,66 metriä pitkiä ja painoivat keskimäärin 72,03 kilogrammaa. Tutkittavien kehon painoindeksi oli keskiarvoltaan hieman yli lievän ylipainon rajan: 25,69 kg/m².

TAULUKKO 1. Tutkittavien perus- ja taustatiedot.

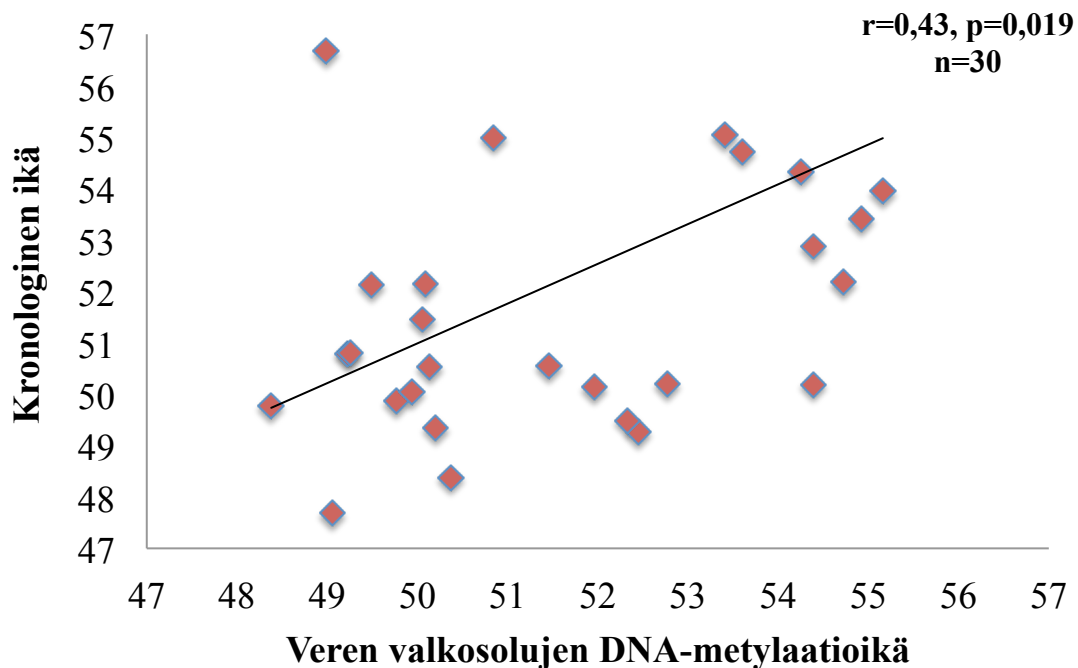
Muuttuja	ka	kh
Ikä	51.8	2.2
Pituus (m)	1.66	0.28
Paino (kg)	72.03	9.99
Painoindeksi (kg/m ²)	25.69	3.26
Koulutusaste (n, %)		
Ensimmäinen aste	2	6,7
Toinen aste	16	53,3
Kolmas aste	12	40
Siviilisääty (n, %)		
Naimisissa, rekisteröidyssä parisuhteessa, avoliitossa	20	66,7
Naimaton	5	16,7
Eronnut tai asumuserossa	5	16,7
Fyysinen aktiivisuus (n, %)		
Passiivinen	5	16,7
Jonkin verran aktiivinen	8	26,7
Aktiivinen	13	43,3
Hyvin aktiivinen	4	13,3

ka=keskiarvo, kh=keskihajonta

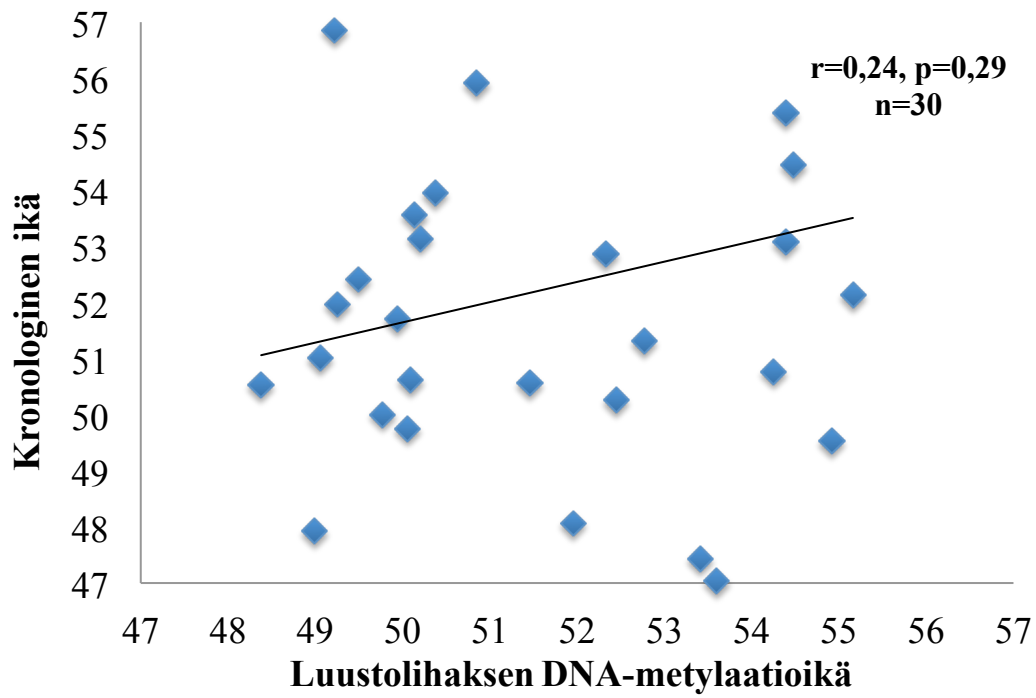
9.1 Kronologisen iän yhteys DNA-metylaatioikä

Tutkittavien kronologinen ikä oli keskimäärin 51,8 vuotta. DNA-metylaatioiän keskiarvot olivat hieman korkeampia veren valkosoluista (52,9 vuotta) ja luustolihaksesta mitattuna (52,3 vuotta), mutta eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi kronologisesta iästä (p-arvot 0,116 ja 0,467). Tutkittavien verestä ja luustolihaksesta mitatussa DNA-metylaatioiässä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa (p=0,419).

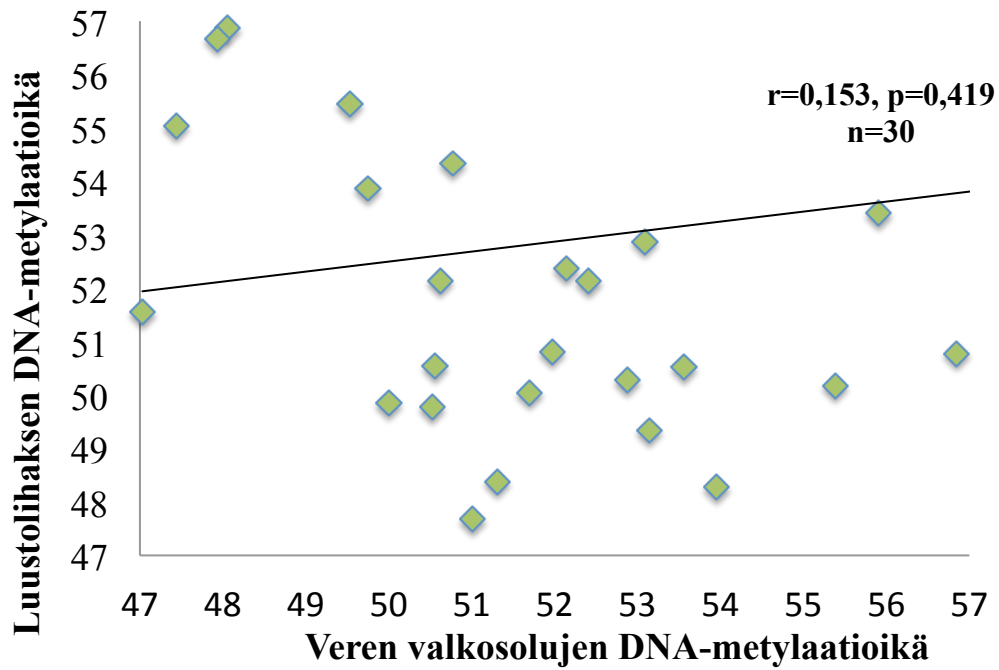
Kronologinen ikä korreloi kohtalaisesti veren valkosolujen DNA-metylaatioiän kanssa (r=0,43, p=0,019, kuvio 1). Kronologisen iän ja luustolihakseen DNA-metylaatioiän välillä oli heikko positiivinen korrelaatio, joka ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä (r=0,24, p=0,194, kuvio 2). Myöskään veren DNA-metylaatioikä ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi luustolihakseen DNA-metylaatioiän kanssa (r=0,153, p=0,419, kuvio 3).



KUVIO 1. Kronologisen iän ja veren valkosolujen DNA-metylaatioiän välinen korrelaatio.



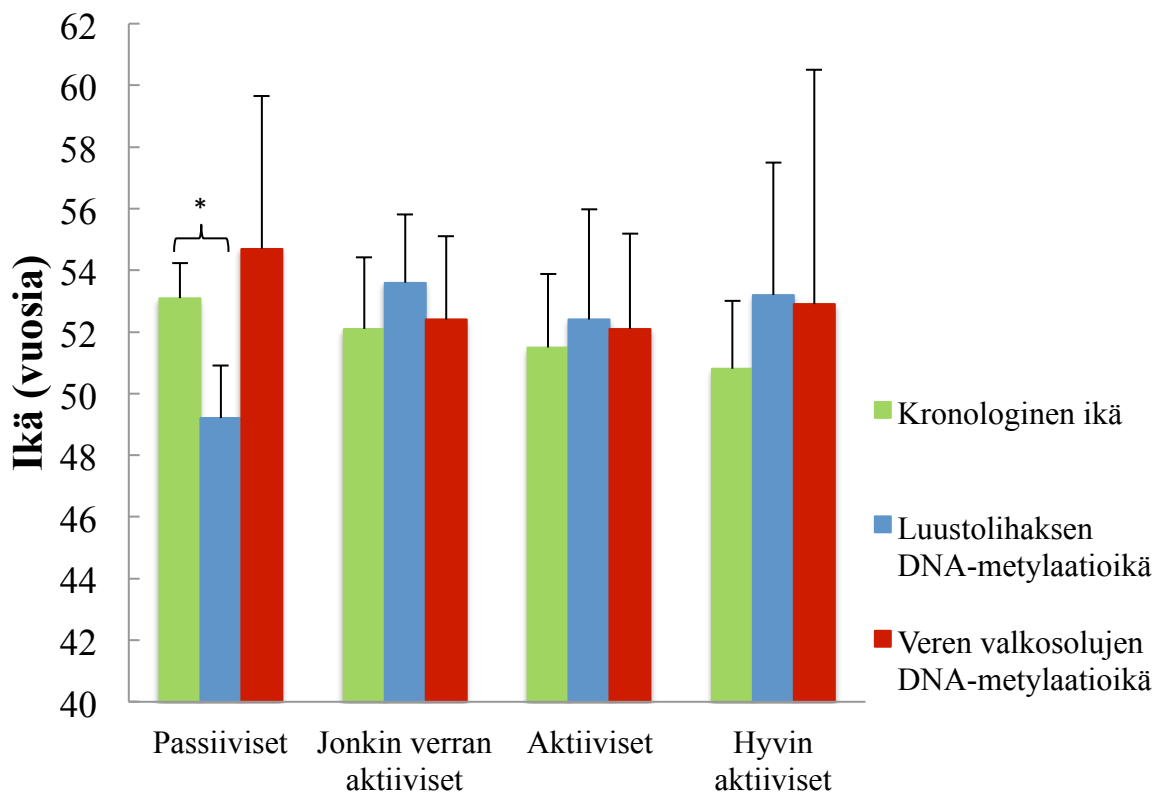
KUVIO 2. Kronologisen iän ja luustolihasen DNA-metylaatioiän välinen korrelaatio.



KUVIO 3. Luustolihasen DNA-metylaatioiän ja veren valkosolujen DNA-metylaatioiän välinen korrelaatio.

Tätä pro gradu –tutkielman analyysiä varten tutkittavat jaettiin neljään ryhmään kyselyllä mitatun vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden mukaan. Ryhmät olivat fyysisesti passiiviset (n=5), jonkin verran aktiiviset (n=8), aktiiviset (n=13) ja hyvin aktiiviset (n=4). Tutkittavien kronologinen ikä ei ollut yhteydessä fyysisen aktiivisuuden määrään (p=0,448).

Veren valkosolujen DNA-metylaatioikä ei eronnut kronologisesta iästä missään fyysisen aktiivisuuden luokassa. Myöskään veren valkosolujen ja luustolihasen DNA-metylaatioiät eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan missään fyysisen aktiivisuuden luokassa. Liikunnallisesti passiivisten ryhmässä luustolihasen DNA-metylaatioikä oli alhaisempi kuin kronologinen ikä (53,1 vs. 49,2 vuotta, p=0,029, kuvio 3), muiden aktiivisuusluokkien välillä erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, kun verrattiin kronologista ikää DNA-metylaatioikään.

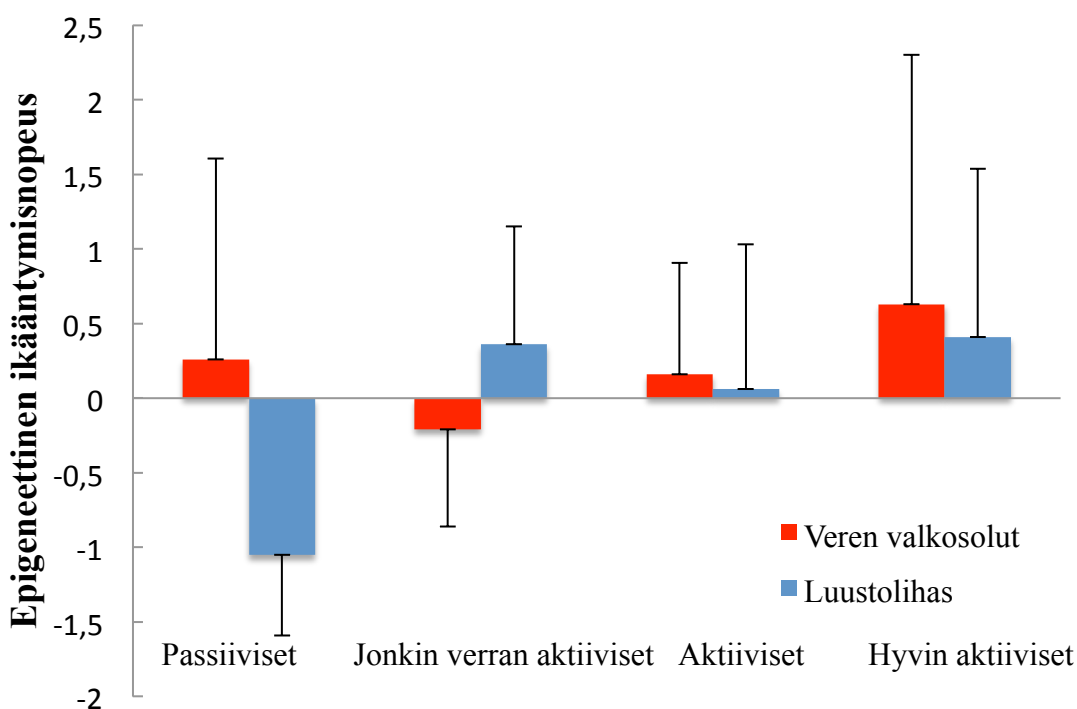


KUVIO 3. Tutkittavien kronologisen iän sekä veren valkosolujen ja luustolihasen DNA-metylaatioiän vaihtelu fyysisen aktiivisuuden eri luokissa. Arvot ovat keskiarvoja, hajontapylväät kuvaavat keskihajontaa. * tilastollisesti merkitsevä ero (p=0,029) kronologisen iän ja luustolihasen DNA-metylaatioiän välillä.

9.2 Fyysisen aktiivisuuden yhteys epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen

Epigeneettinen ikääntymisnopeus kuvaa eroa kudoksen DNA-metylaatioiän ja yksilön kronologisen iän välillä. Fyysisen aktiivisuuden määrä ei ollut yhteydessä veren valkosolujen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen ($p=0.444$, Taulukko 2).

Fyysinen aktiivisuus oli yhteydessä luustolihasen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen ($p=0,047$). Kuvio 4 näyttää, että passiivisten luustolihasen epigeneettinen ikääntymisnopeus on hidastunut verrattuna aktiivisempiin henkilöihin. Post hoc -testien parittaisissa vertailuissa ei kuitenkaan ollut minkään aktiivisuusryhmän välillä tilastollisesti merkitsevää eroa (Taulukko 2). Kehon painoindeksillä vakioinnin jälkeen, fyysinen aktiivisuus ei ollut enää yhteydessä luustolihasen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen ($p=0,098$, Kuvio 4).



KUVIO 4. Veren valkosolujen ja luustolihasen epigeneettinen ikääntymisnopeus eri fyysisen aktiivisuuden luokissa. Arvot ovat keskiarvoja, hajontapylväät kuvaavat keskihajontaa. Tilastollisesti merkitsevä ero ($p=0,047$) luustolihasen epigeneettisessä ikääntymisnopeudessa eri aktiivisuus luokkien välillä.

TAULUKKO 2. Fyysisen aktiivisuuden eri luokkien parittaisten Post Hoc –testien tulokset (p-arvot ja luottamusväli) fyysisen aktiivisuuden yhteydestä luustolihasen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen.

		p-arvo	95 %:n luottamusväli	
Passiiviset	Jonkin verran aktiiviset	0,62	-2,86	0,05
	Aktiiviset	0,16	-2,45	0,23
	Hyvin aktiiviset	0,13	-3,17	0,25
Jonkin verran aktiiviset	Aktiiviset	1,00	-0,85	1,44
	Hyvin aktiiviset	1,00	-1,62	1,50
Hyvin aktiiviset	Aktiiviset	1,00	-1,10	1,81

10 POHDINTA

Tämä on ensimmäinen julkaistu tutkimus, jossa verrataan fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikään sekä veren valkosoluissa että luustolihasessa. Tässä pro gradu – tutkielmassa selvitettiin, eroavatko keski-ikäisten naisten veren valkosolujen ja luustolihasen DNA-metylaatioiät sekä kronologinen ikä toisistaan sekä miten fyysinen aktiivisuus on yhteydessä DNA-metylaatioiän avulla määritettyyn epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Lisäksi tarkasteltiin, selittääkö kehon painoindeksi tutkittua yhteyttä. Tulosten perusteella kronologinen ikä ei ollut tilastollisesti merkitsevästi yhteydessä luustolihasen DNA-metylaatioikään, mutta kronologisen iän ja veren valkosolujen DNA-metylaatioiän välillä oli havaittavissa kohtalainen yhteys. Fyysinen aktiivisuus ei selittänyt veren valkosolujen epigeneettistä ikääntymisnopeutta, mutta fyysinen aktiivisuus oli yhteydessä luustolihasen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Keskiarvovertailussa havaittiin passiivisten luustolihasen epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan hidastunut verrattuna aktiivisempiin henkilöihin. Tilastollisesti merkitsevä yhteys hävisi kehon painoindeksillä vakioinnin jälkeen.

Aiemmissa, suuria kohortteja käsittelevissä tutkimuksissa on havaittu merkitseviä yhteyksiä kronologisen iän ja *veren* DNA-metylaatioiän välille (Horvath 2013; Horvath ym. 2014, Belsky ym. 2016; Chen ym. 2016). Tässä pro gradu –tutkielmassa havaittiin heikompi yhteys kronologisen iän ja veren valkosolujen DNA-metylaatioiän välille kuin aiemmissa tutkimuksissa; yhteyden suuruus oli kohtalainen ($r=0,43$, $p=0,019$). Kronologisen iän ja *luustolihasen* DNA-metylaatioiän välisiä yhteyksiä on selvitetty vain muutamassa aiemmassa tutkimuksessa. Näissä, myöskin suuria kohortteja käsittelevissä tutkimuksissa yhteyksien suuruudet ovat olleet vaihtelevia, mutta tilastollisesti merkitseviä (Horvath 2013; Horvath ym. 2014). Tässä tutkielmassa luustolihasen DNA-metylaatioiän ja kronologisen iän välinen yhteys ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tutkielman pieni ja verrattain suppea tutkimusjoukko ($n=30$), johon kuului ainoastaan keski-ikäisiä naisia, voi selittää matalampia ja tilastollisesti merkitsemättömiä yhteyksiä kronologisen iän sekä veren valkosolujen ja luustolihasen DNA-metylaatioiän välillä verrattuna aiempaan tutkimustietoon.

Tässä pro gradu –tutkielmassa ei todettu *veren valkosolujen* epigeneettisen ikääntymisnopeuden olevan yhteydessä fyysisen aktiivisuuden määrään. Tulos on vastakkainen verrattuna Quach ym. (2017) tutkimukseen, jossa todettiin kyselyllä mitatun fyysisen aktiivisuuden olevan yhteydessä veren ulkoiseen (extrinsic) epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen, fyysisesti aktiivisemmilla havaittiin olevan alhaisempi veren epigeneettinen ikääntymisnopeus verrattuna passiivisiin tutkittaviin. Tosin yhteys fyysisen aktiivisuuden ja veren epigeneettisen ikääntymisnopeuden välillä oli hyvin heikko. Quachin ym. (2017) tutkimuksen luotettavuutta verrattuna tämän pro gradu –tutkielman tuloksiin tukee muun muassa laajempi ja huomattavasti suurempi tutkimusjoukko (n=4466) sekä sekoittavien tekijöiden kattava huomioon ottaminen aineiston analyysissä.

Myös Galen ym. (2018) mukaan veren ulkoinen (extrinsic) ja sisäinen (intrinsic) epigeneettinen ikääntymisnopeus oli yhteydessä aktiivisuusmittarilla mitattuun fyysisen aktiivisuuden määrään iäkkäillä tutkittavilla (n=248), hyvin vähän liikkuvilla todettiin olevan kiihtynyt epigeneettinen ikääntymisnopeus. Tosin tilastollisesti merkitsevä ero hävisi iällä, sukupuolella, kehon painoindeksillä, masennusstatuksella ja kroonisten tautien määrällä vakioinnin jälkeen. Fyysisen aktiivisuuden yhteydestä veren DNA-metylaatioikään on saatavilla vain näiden muutamien tutkimusten tulokset (Quach ym. 2017; Gale ym. 2018), jotka ovat keskenään ristiriitaisia ja lisäksi aiheen yleistettävyyttä vähentää se, että fyysisen aktiivisuuden mittaaminen on tapahtunut näissä tutkimuksissa eri menetelmillä. Quachin ym. (2017) ja Galen ym. (2018) tutkimuksissa epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrittäminen on tehty samalla menetelmällä: ulkoisella (extrinsic) ja sisäisellä (intrinsic) epigeneettisen ikääntymisnopeuden määrityskeinolla (Chen ym. 2016). Mikä toisaalta lisää näiden kahden tutkimuksen vertailtavuutta keskenään, mutta vähentää tulosten vertailtavuutta tähän tutkielmaan, jossa epigeneettinen ikääntymisnopeus määritettiin lineaarisen regressioyhtälön jäännöksistä käyttämällä Horvathin laskenta-algoritmia DNA-metylaatioiän määrittämiseen (Chen ym. 2016).

Osassa epigeneettisiä kelloja käsittelevissä tutkimuksissa veren DNA-metylaatioiät on määritetty kokoveriyräyksiköstä, kun taas tässä tutkielmassa DNA-metylaatioiät määritettiin veren valkosoluista. Eri verisolulla on erilaisia tehtäviä vaihdellen esimerkiksi tautien torjumisesta verihyytymien muodostamiseen (Bjälje ym. 2009) ja verisolujen elinajat

vaihtelevat viikoista vuosiin (Horvath 2013). Tästä huolimatta Horvathin (2013) tutkimuksessa verisolujen DNA-metylaatioiät olivat hyvin lähellä toisiaan: eri verisolutyyppeiden (mm. CD14-monosyyttien ja CD4-lymfosyyttien) DNA-metylaatioiät eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Horvathin (2013) tutkimuksen tulos tukee näkemystä, että tämän tutkielman tulokset olisivat veren valkosolujen osalta vertailtavissa aiempiin tutkimuksiin, joissa DNA-metylaatioiät on määritetty kokoverestä tai eri verisolutyypeistä kuin veren valkosolut. Hänen tutkimuksen tulos myös tukee tietoa siitä, ettei DNA-metylaatioikä mittaa soluissa tapahtuvia muutoksia, vaan sen toiminta perustuu epigeneettisissä mekanismeissa tapahtuviin muutoksiin (Horvath 2013).

Fyysisen aktiivisuuden yhteyttä veren biologiseen ikääntymiseen on tutkittu myös veren valkosolujen telomeerien pituuksista, joita tutkimalla ei myöskään ole saatu yksiselitteistä vastausta fyysisen aktiivisuuden yhteydestä veren biologiseen ikääntymiseen. Cherkasin ym. (2008), Latifovin ym. (2016) ja Tuckerin ym. (2017) tutkimuksista saatiin päinvastainen tulos kuin tästä tutkielmasta; kyselyn avulla mitattu itseraportoitu fyysisen aktiivisuus oli yhteydessä veren valkosolujen biologiseen ikääntymiseen. Heidän tutkimuksissa fyysinen aktiivisuus oli yhteydessä pidempiin veren valkosolujen telomeereihin (Cherkas ym. 2008; Latifovic ym. 2016; Tucker ym. 2017), jotka kertovat hidastuneesta biologisesta ikääntymisestä (Xi ym. 2013). Toisaalta esimerkiksi Dingin ym. (2018) tutkimuksessa fyysinen aktiivisuus ei ollut yhteydessä veren valkosolujen biologiseen ikääntymiseen, samoin kuin tässä tutkielmassa.

Muutamissa tutkimuksissa on todettu kiihtyneen veren DNA-metylaatioiän olevan yhteydessä heikommasta toimintakyvystä viittaaviin tekijöihin. Kiihtyneen veren DNA:n metylaatioihin perustuvan epigeneettisen ikääntymisnopeuden on todettu olevan yhteydessä muun muassa pienentyneeseen käden puristusvoimaan (Marioni ym. 2015b; Sillanpää ym. 2018) sekä vaimentuneeseen keuhkojen toimintaan ja heikentyneeseen kognitiiviseen suorituskykyyn (Marioni ym. 2015b), joten alustavaa näyttöä näyttäisi olevan siitä, että DNA-metylaatioikä saattaisi antaa viitettä henkilön toimintakyvystä. Vaikka tässä tutkielmassa ei todettu terveellisen elämäntavan, fyysisen aktiivisuuden, hidastavan veren DNA-metylaatioikä on aiemmissa tutkimuksissa terveellisten elintapojen todettu useimmiten, mutta ei aina, hidastavan veren DNA-metylaatioiän avulla määritettyä biologista ikääntymistä. Esimerkiksi

monipuolisen ruokavalion (Quach ym. 2017), tupakoimattomuuden (Beach ym. 2015) ja kohtuullisen alkoholinkäytön (Beach ym. 2015; Quach ym. 2017) on havaittu olevan yhteydessä hidastuneeseen veren DNA-metylaatioikään. Tosin esimerkiksi Quachin ym. (2017) ja Gaon ym. (2016) tutkimuksissa havaittiin ettei tupakointi epäterveellisenä elämäntapana ollut yhteydessä hidastuneeseen veren DNA-metylaatioikään.

Tutkielman tulosten mukaan fyysinen aktiivisuus ei ollut yhteydessä *luustolihasen* epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen kehon painoindeksillä vakioinnin jälkeen, mutta p-arvo ($p=0,098$) ei ole kovin kaukana tilastollisesta merkitsevyydestä ja keskiarvoja tarkasteltaessa passiivisten hidastunut epigeneettinen ikääntymisnopeus on melko selvästi havaittavissa. Aiheena fyysisen aktiivisuuden yhteys biologiseen ikääntymiseen on haastava tutkia, koska biologiseen ikääntymiseen voivat vaikuttaa monet sekoittavat tekijät kuten esimerkiksi muut elämäntapatekijät sekä perimä (Passarino ym. 2016). Adjustoinnin vaikutus p-arvoon osoittaa sen, että tutkittavien kehon painoindeksit ovat voineet toimia tuloksia vääristävänä tekijänä. Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu korkean kehon painoindeksin olevan yhteydessä kiihtyneeseen veren (Quach ym. 2017; Nevalainen ym. 2017) ja maksan (Horvath ym. 2014) epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Ylipainon tiedetään mm. rasvoittavan maksaa ja sitä kautta altistavan sokeriaineenvaihdunnan häiriöille (Bhatt & Smith 2015) lisäksi esimerkiksi diabeteksen (Jansen 2012) sekä sydän- ja verisuonitautien riskiä (Akil & Ahmad 2011). Lisäksi ylipainon on todettu lisäävän toimintakyvyn vajausten (Janssen 2012) ja kuoleman riskiä (Peeters 2003).

Fyysisen aktiivisuuden ja toimintakyvyn yhteyttä luustolihasen DNA-metylaatioikään ja epigeneettisen ikääntymisnopeuteen ei ole selvitetty aiemmin julkaistuissa tutkimuksissa, joten fyysisen aktiivisuuden yhteydestä luustolihasen biologiseen ikääntymiseen tiedetään toistaiseksi vähän. Vaikka fyysinen passiivisuus ei tämän pro gradu -tutkielman tulosten mukaan näyttäisi kiihdyttävän luustolihasen DNA-metylaatioikää, vaan päinvastoin (ilman adjustointia) hidastavan sitä, on lihasten käyttämättömyyden todettu monissa tutkimuksissa olevan uhka terveenä ikääntymisellä lisäten esimerkiksi ongelmia toimintakyvyssä (Rantanen ym. 1999; Chou ym. 2012). Aiemmissa tutkimuksissa on todettu ettei fyysisellä aktiivisuudella pystytä pysäyttämään ikääntymistä (Chodzko-Zajko ym. 2009; Hurley & Reuter ym. 2011), mutta se voi hidastaa iän mukana tulevia terveydelle haitallisia muutoksia

(Chodzko-Zajko ym. 2009; Mishra ym. 2011) kuten fyysisiä ja kognitiivisia muutoksia (Chodzko-Zajko ym. 2009). Fyysinen aktiivisuus muun muassa hidastaa naisilla vaihdevuosisien jälkeen alkavaa luuston haurastumista (Proctor ym. 2000; Mishra ym. 2011; LeBrasseur ym. 2012; Kannus 2016) sekä pienentää riskiä kroonisille sairauksille (Warburton ym. 2006; Grindler & Santoro 2015) ja kognition heikkenemiselle (Cass 2017). Fyysisesti aktiivisten on todettu elävän pidempään (Warburton ym. 2006; Wen ym. 2011; Gebel ym. 2015) ja toimintakykyisempinä kuin passiivisten henkilöiden (Rantanen ym. 1999; Chodzko-Zajko ym. 2009; Chou ym. 2012). Toisaalta on myös ehdotettu, että geneettiset tekijät saattavat osaltaan selittää fyysisen aktiivisuuden ja eliniän yhteyttä. Geneettisten tekijöiden on todettu olevan yhteydessä aerobiseen kapasiteettiin (Karvinen ym. 2015) ja fyysisen aktiivisuuden harrastamisen määrään (Stubbe ym. 2006; de Geus ym. 2014; Karvinen ym. 2015), jolloin pitkä elinikä ei välttämättä johdu pelkästään fyysisestä aktiivisuudesta vaan geneettiset tekijät ohjaavat fyysisen aktiivisuuden pariin, jolloin yhteys olisi alun perin geenien aiheuttama (Karvinen ym. 2015).

Tutkielman luotettavuus. Tässä tutkielmassa selvitettiin vain *keski-ian* fyysisen aktiivisuuden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen. Tutkielmassa ei otettu huomioon lapsuuden ja nuoruuden fyysisen aktiivisuuden yhteyttä DNA-metylaatioikään, mikä voi osaltaan vääristää tutkielman tuloksia. DNA:n metylaatioissa tapahtuu muutoksia koko elämän ajan (Pacchierotti & Spano 2015) geneettisten tekijöiden, ympäristötekijöiden (Lee & Pausova 2013; Pacchierotti & Spano 2015; Blake & Watson 2016; Jung ym. 2017) ja ikääntymisen vaikutuksesta (Heyn ym. 2012; Horvath ym. 2013; Jones ym. 2015; Pacchierotti & Spano 2015), joten jatkossa olisi oleellista selvittää myös varhain lapsuudessa aloitetun ja koko elämän aikaisen fyysisen aktiivisuuden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen. Lapsuus ja nuoruus ovat suuria kehitysvaiheita biologisesti, koska suurin osa ihmisen solunjakautumisesta ja erilaistumisesta tapahtuu näinä kiivaan kasvun vuosina (Malina ym. 2004).

Tutkielmassa käytetyn Horvathin epigeneettisen kellon kehittämissä käytettiin sillä hetkellä saatavilla olevaa aineistoa tutkittavien DNA:n metylaatioista, eikä epigeneettisen kellon kehittämissä tehty toistomittauksia, jolloin biologisen iän mittaria kehitettäessä ei ole tarkasti paneuduttu DNA:n metylaatioissa ajan myötä tapahtuviin muutoksiin (Khoury ym. 2018). Horvathin epigeneettisessä kellossa ei luultavasti ole otettu kattavasti huomioon CpG-kohtia,

joissa tapahtuu muutoksia hyvin iäkkäillä henkilöillä (Khoury ym. 2018; Levine ym. 2018). Horvathin epigeneettisen kellon on havaittu systemaattisesti aliarvioivan biologisen ikääntymisen määrän iäkkäillä, yli 60-vuotiailla henkilöillä (Marioni ym. 2015b; Khoury ym. 2018). Lisäksi Horvathin epigeneettiseen kelloon kuuluu 353 CpG-kohtaa, joka vastaa vain $1.15 \times 10^{-5}\%$ ihmisen DNA:n metylaatioista (Khoury ym. 2018). Uutta Levinen ym. (2018) epigeneettistä kelloa on ehdotettu luotettavammaksi biologisen ikääntymisen mittariksi kuin Horvathin menetelmää. Levinen ym. kelloon kuuluu CpG-kohtia vähän enemmän kuin Horvathin kelloon, yhteensä 513 CpG-kohtaa. Levinen kellon avulla on pystytty määrittämään tarkemmin henkilön kuoleman ja monisairastavuuden sekä toiminnanvajausten riski kuin Horvathin epigeneettisellä kellolla (Levine ym. 2018). Viimeisimmän tutkimustiedon mukaan näyttäisi siltä, että tähän tutkielmaan olisi saatu biologisesta ikääntymisestä luotettavampaa tietoa Levinen ym. epigeneettisellä kellolla kuin Horvathin kellolla. Vaikuttaisi siltä, että epigeneettisiä kelloja kehitetään koko ajan tarkemmin biologista ikääntymistä mittaaviksi ja tutkimustiedon kasvaessa osataan ottaa entistä enemmän huomioon biologiseen iän määrittämiseen vaikuttavia tekijöitä.

DNA-metylaatioikä on kehitetty ensisijaisesti veren biologista ikääntymistä mittaavaksi menetelmäksi, vaikka sen on todettu toimivan useimmista kudoksista (Horvath 2013). Vielä ei kuitenkaan olla varmoja sen toimivuudesta kaikkien kudosten osalta, mukaan lukien luustolihaskudos, jonka biologista ikääntymistä on tutkittu vasta niukasti. Veri- ja lihassolut toimivat ja muodostuvat eri tavoin: verisoluja muodostuu nopealla tahdilla kantasolujen jakautuessa (Bjälje ym. 2009), kun taas lihassolut jakautuvat huomattavasti hitaammin ja lihaskasvu tapahtuu satelliittisolujen aktivoitumisen kautta (Hurme ym. 1993). Eri kudosisolu- ja solutyypeillä näyttäisi olevan myöskin erilainen epigeneettinen säätely (Pacchierotti & Spano 2015), jolla on todennäköisesti vaikutusta DNA-metylaatioikiin. Lisäksi esimerkiksi luustolihaskudoksessa olevat satelliittisolut voivat aiheuttaa DNA-metylaatioiän hidastumista (Horvath 2013). Nämä kaikki tekijät yhdessä voivat heikentää luustolihaksen DNA-metylaatioiän luotettavuutta biologisen ikääntymisen mittarina, joten etenkin luustolihaksen DNA-metylaatioiän osalta tämän tutkielman tuloksiin täytyy suhtautua pienellä varauksella. Veren DNA-metylaatioikä luultavasti kertoo biologisen ikääntymisen määrän tarkemmin kuin luustolihaksen DNA-metylaatioikä muun muassa sen takia, että epigeneettisen kellon kehittelyyn on käytetty verikudosta (Horvath 2013; Khoury ym. 2018), veren DNA-

metylaatioiät ovat huomattavasti tutkitumpia (Khoury ym. 2018) ja veren DNA-metylaatioiät korreloivat korkeammin kronologisen iän kanssa (Horvath 2013).

Lisäksi DNA-metylaatioikään voivat vaikuttaa esimerkiksi hormoneihin vaikuttavat tekijät kuten imetys (Sehl ym. 2017) ja vaihdevuodet (Levine ym. 2016; Sehl ym. 2017), mikä voi heikentää DNA-metylaatioiän tarkkuutta biologisen ikääntymisen mittarina etenkin hormonipitoisista kudoksista ja soluista (Horvath 2013; Sehl ym. 2017). Aikaisten vaihdevuosien on todettu kiihdyttävän epigeneettistä ikääntymisnopeutta (Levine ym. 2016). Tosin syy-seuraus suhteet ovat vielä epäselvät eli johtuuko kiihtynyt biologinen ikääntyminen vaihdevuosista vai aiheuttaako kiihtynyt biologinen ikääntyminen vaihdevuodet. Tässä pro gradu –tutkielmassa tutkielmassa tutkittavat olivat keski-ikäisiä, vaihdevuosi-ikäisiä naisia. Vaihdevuosilla (Levine ym. 2016) ja niiden vaikutuksilla hormonaalisiin tekijöihin kuten estrogeenin erityksen vähenemiseen (Sehl ym. 2017) on saattanut olla vaikutusta tutkittavien DNA-metylaatioikiin, mikä on huomioitava pohdittaessa tämän tutkielman tulosten yleistettävyyttä perusjoukkoon.

Pitää myös muistaa, ettei DNA:n metylaatiot ole ainoa epigeneettinen mekanismi, joka vaikuttaa geenien ilmentymiseen ja kudosten toimintaan, vaan myös muilla epigeneettisillä mekanismeilla on niihin vaikutusta (Marttila 2016). DNA-metylaatioikä biologisen ikääntymisen mittarina mittaa vain DNA:n metylaatioissa tapahtuvia muutoksia (Horvath 2013; Khoury ym. 2018), mutta se ei mittaa muita epigeneettisiä mekanismeja kuten esimerkiksi DNA:han sitoutuvien proteiinien modifikaatioita (Tieva & Peltomäki 2012) ja vaihtoehtoisten histonien käyttöä (Taipale 2006), joilla voi myös olla vaikutusta kudosten ja solujen toimintaan sekä henkilön biologiseen ikääntymiseen. Ideaalinen biologisen iän mittari kykenisi ottamaan huomioon kaikki epigeneettiset tekijät. Ideaalista biologisen ikääntymisen mittaria ei ole vielä kehitetty, mutta sen kehittäminen voi olla mahdollista tulevaisuudessa (Khoury ym. 2018).

Tässä tutkielmassa kyselylomakkeen käyttöön liittyviä heikkouksia fyysisen aktiivisuuden arvioinnissa ovat mahdolliset väärinymmärrykset kysymyksissä, eikä voida olla täysin varmoja vastaajan huolellisuudesta (Luoto 2009) ja rehellisyydestä kyselylomaketta täyttäessä

(Sallis 2010). Fyysistä aktiivisuutta kysyttäessä tutkittavilla voi olla taipumusta suurennella fyysisen aktiivisuuden määriä (Sallis 2010). Kyselyiden on todettu mittaavan hyvin raskaan fyysisen aktiivisuuden määrää, mutta kyselyiden tarkkuus ei ole yhtä hyvä mitattaessa kevyttä ja keskiraskasta fyysistä aktiivisuutta (Strath ym. 2004), mikä on myöskin syytä ottaa huomioon pohdittaessa tulosten luotettavuutta.

Tässä pro gradu -tutkielmassa fyysinen aktiivisuus kartoitettiin subjektiivisen kyselyn avulla, jossa ei kuitenkaan tarkasti eritelty, minkä tyyppistä fyysistä aktiivisuutta henkilöt harrastavat. Pro gradu -tutkielmassa käytetyn kyselylomakkeen väitteet kuten ”harrastan kevyttä kävelyä ja ulkoilua 1-2 kertaa viikossa” ja ”harrastan useita kertoja viikossa sellaista reipasta liikuntaa (esim. pihatöitä, kävelyä, pyöräilyä), joka aiheuttaa jonkin verran hengästymistä ja hikoilua” kartoittavat enemmän kestävyystyypin, aerobisen fyysisen aktiivisuuden harjoittamista kuin lihasvoimaharjoittelun. Vaikka kestävyysliikunta on monella tapaa hyödyllistä terveydelle (Leiros-Rodriguez ym. 2018), se ei estä lihasvoiman surkastumista niin kattavasti kuin lihasvoimaharjoittelu (Willis ym. 2012). Lihasvoimaharjoittelun on todettu olevan hyödyllistä ikääntyville (Law ym. 2016) ja etenkin vaihdevuosi-ikäisille naisille (Mishra ym. 2011; Grindler & Santoro 2015), jotta lihasvoiman määrä saadaan ylläpidettyä vaihdevuosien aiheuttamasta estrogeenin vajeesta huolimatta (Mishra ym. 2011). Lisäksi lihasvoimaharjoittelu on tärkeä ehkäisy- ja hoitokeino sarkopeniaan; ikääntyessä ilmenevään lihasmassan ja -voiman menetykseen (Maltais ym. 2009; Law ym. 2016). Riittävä lihasvoima on suuri tekijä, joka auttaa selviytymään päivittäisistä askareista itsenäisesti (Vasconcelos Rocha ym. 2016). Lihasvoiman mittaaminen olisi tuonut tähän pro gradu -tutkielmaan oleellista lisäarvoa. Saattaa olla mahdollista, että tähän tutkielmaan osallistuneet henkilöt ovat harrastaneet enimmäkseen kestävyysliikuntaa, joka ei ole kuitenkaan ollut riittävää lihasmassan ylläpidon ja suotuisampien terveys- ja ikääntymismuutosten hallinnan kannalta luustolihaskudoksessa.

Tässä tutkielmassa käytettiin fyysisen aktiivisuuden kartoituksessa alun perin Grimbyn (1986) 4-luokkaista fyysisen aktiivisuuden asteikkoa muunneltuna 7-luokkaiseksi asteikoksi (Hirvensalo ym. 1998). Asteikko on yleisesti käytössä oleva, reliabiliteetiltaan ja validiteetiltaan hyväksi todettu sekä mittarin on havaittu mittaavan etenkin ikääntyvillä henkilöillä hyvin fyysisen aktiivisuuden tasoa (Grimby & Frändin 2017). Nämä 7 luokkaa

jaettiin kuitenkin tätä tutkielmaa varten neljään eri luokkaan: passiivisiin, jonkin verran aktiivisiin, aktiivisiin ja hyvin aktiivisiin, mikä voi heikentää tulosten luotettavuutta ja lisätä virhetulkintojen riskiä. Tutkielman vahvuuksina on validoidun kyselylomakkeen käyttö (Grimby & Frändin 2017) fyysisistä aktiivisuutta kartoittaessa sekä aineiston tarkka analysointi ja lähdekirjallisuuden huolellinen raportointi.

Horvathin (2013) laskenta-algoritmin on todettu olevan vuonna 2017 saatavilla olevista biologisen ikääntymisen mittareista telomeerien piteuden ohella tarkimmaksi biologista ikääntymistä mittaavaksi menetelmäksi (Jylhävä ym. 2017), joten kritiikistään huolimatta Horvathin menetelmää voidaan kuitenkin pitää melko luotettavana biologisen ikääntymisen mittarina. Laskenta-algoritmi on kaikkien vapaasti käytettävissä (Horvath 2013) ja Horvathin epigeneettinen kello on ollut käytetyin menetelmä epigeneettisistä kelloista (Khoury ym. 2018), mikä lisää tulosten vertailtavuutta muihin, aiemmin julkaistuihin tutkimuksiin.

Tutkielman eettisyys. Tätä pro gradu –tutkielmaa tehdessä eettisyydestä on huolehdittu asianmukaisesti sekä tutkielma ja ERMA-tutkimus on toteutettu Hyvän tieteellisen käytännön mukaisesti (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012). ERMA-tutkimus on hyväksytty Keski-Suomen sairaanhoitopiirin eettisessä lautakunnassa. Ennen ERMA-tutkimuksen alkua tutkittavat saivat tietoa tutkimuksesta ja siihen liittyvistä riskeistä ja epämukavuuksista, sekä tutkittavat allekirjoittivat suostumuksensa tutkimukseen osallistumisesta. Tutkija sai käyttöönsä vain tähän pro gradu –tutkielmaan tarvittavan ERMA-tutkimuksen osa-aineiston. Tutkija ei itse ollut mukana aineistonkeruussa, mikä lisää tulosten analysoinnin objektiivisuutta. Toisaalta voidaan pohtia, onko tutkijalla ollut tarpeeksi kattavaa tietoa aineiston keruusta sekä tutkimuksen eri vaiheista. Mahdollinen puutteellinen tiedonkulku tutkijan ja tutkimusryhmän jäsenten välillä on saattanut heikentää tutkimuksen luotettavuutta. Anonyymista aineistosta tutkittavien tiedot jäivät täysin tunnistamattomiksi, koska tutkijalla ei ollut kontaktia tutkittaviin. Tutkimuksen aineistoa on käsitelty ja säilytetty huolellisesti eikä ulkopuolisilla ole ollut siihen pääsyä.

Jatkotutkimushaasteet. Biologisen ikääntymisen mittausmenetelmät ja tutkimus on vasta alkutekijöissään (Belsky ym. 2016; Jylhävä ym. 2017). DNA-metylaatioikä on vuonna 2013

julkaistu biologisen ikääntymisen mittari, joten uutuutensa takia DNA-metylaatioikä ja sen yhteyksiä muihin tekijöihin ei ole vielä kovin tarkasti ehditty tutkia. Vielä ei olla täysin varmoja, miten luotettava biologisen ikääntymisen mittari DNA-metylaatioikä on, vaikka sitä on pidetty telomeerien pituuden ohella saatavilla olevista biologisen ikääntymisen mittareista lupaavimpana (Jylhävä ym. 2017). Epäselvää on, miten ikääntyessä ilmaantuvat DNA:n metylaatiot vaikuttavat geenien ilmiasuun eli fenotyyppiin sekä vaikuttavatko ne muihin genomisiin kontrollimekanismeihin kuten esimerkiksi histonien sääntelyyn (Jylhävä ym. 2017). Myös DNA-metylaatioiän suhde muihin solu- ja molekyyllitason vanhenemismuutoksiin on vielä osittain tuntematon (Lowe ym. 2016), eikä myöskään täysin varmasti tiedetä, mitkä ovat DNA-metylaatioiän fysiologiset ja solujen vanhenemiseen liittyvät mekanismit (Jylhävä ym. 2017). Jatkotutkimushaasteena olisi tarpeen systemaattisesti arvioida eri biologisen ikääntymisen mittareita, eri menetelmillä määritettyjä DNA-metylaatioikä eli epigeneettisiä kelloja sekä kehittää näitä menetelmiä tarkemmin biologista ikääntymistä mittaaviksi (Belsky ym. 2016). Jotta tähän pystytään, olisi oleellista selvittää DNA-metylaatioiän tarkka toimintamekanismi (Lowe ym. 2016).

Lisäksi tärkeimpiä selvittämättömiä ongelmia on, mikä aiheuttaa yksilöllisiä eroja DNA-metylaatioiässä (Marioni ym. 2018) sekä voiko DNA-metylaatioikä eli biologisen ikääntymiseen vaikuttaa ja jos voi, miten se on mahdollista (Jylhävä ym. 2017). Tässä pro gradu –tutkielmassa selvitettiin yhden elintapatekijän, fyysisen aktiivisuuden, yhteyttä veren valkosolujen ja luustolihasen DNA-metylaatioikä. Jatkotutkimushaasteena aihetta tulisi tutkia molemmilla sukupuolilla sekä suuremmilla tutkimusjoukoilla ottaen kattavasti huomioon sekoittavien tekijöiden vaikutuksen tutkittuun aiheeseen. Fyysistä aktiivisuutta tulisi mitata erilaisilla ja luotettavilla fyysisen aktiivisuuden mittausten menetelmillä. DNA-metylaatioikä ja siihen yhteydessä olevia tekijöitä tulisi tutkia monipuolisesti eri kudosten osalta. Tässä tutkielmassa selvitettiin vain keski-ikäisen fyysisen aktiivisuuden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen, jatkossa tulisi selvittää koko elämänaikaisen fyysisen aktiivisuuden yhteyttä biologiseen ikääntymiseen. Tämän pro gradu –tutkielman pohjalta herää erityisesti kiinnostusta tutkia tarkemmin luustolihasen DNA-metylaatioiän yleistettävyyttä koko kehon biologisen ikääntymisen määrään ja luustolihasen biologiseen ikään vaikuttavia tekijöitä. Lisäksi luustolihasen DNA-metylaatioiän tutkiminen voi tulevaisuudessa valoittaa tietämystä geneista ja mekanismeista, jotka johtavat vanhenemisen

myötä ilmenevien sairauksien syntyyn ja toimintakyvyn laskuun (Sillanpää ym. 2018). Tutkimus vanhenemisen solutason mekanismeista on tarpeen, jotta tulevaisuudessa pystytään puuttumaan haitallisten vanhenemismuutosten taustalla oleviin solutason ilmiöihin, jonka kautta voitaisiin pyrkiä lisäämään terveyttä ja toimintakykyä ikääntyessä (Marttila 2016).

Johtopäätökset. Tämän tutkielman tulosten mukaan fyysinen aktiivisuus ei ollut yhteydessä veren valkosolujen epigeneettiseen ikääntymisnopeuteen. Passiivisuus näyttäisi hidastavan luustolihasen epigeneettistä ikääntymisnopeutta, vaikka tulos ei ollut enää merkitsevä kehon painoindeksillä vakioinnin jälkeen. Passiivisten hidastunut luustolihasen epigeneettinen ikääntymisnopeus on tuloksena yllättävä ja osittain päinvastainen aiemman tutkimustiedon kanssa, jonka mukaan terveelliset elämäntavat ovat useimmiten, mutta toisaalta eivät aina, hidastaneet biologista ikääntymistä. Lisäksi fyysisen aktiivisuuden on todettu hidastavan ikääntymisprosessin myötä ilmaantuvia terveydelle haitallisia muutoksia (Chodzko-Zajko ym. 2009; Mishra ym. 2011) ja fyysisen aktiivisuuden terveyshyödyt ovat kattavat (Warburton ym. 2006; World health organization 2010; Grindler & Santoro 2015). Etenkin luustolihas kudoksen DNA-metylaatioin osalta tuloksiin täytynee suhtautua pienellä varauksella, koska luustolihasen DNA-metylaatioikää on tutkittu vasta niukasti, eikä vielä olla varmoja DNA-metylaatioin toimivuudesta biologisen ikääntymisen mittarina vähän tutkittujen kudosten osalta. Fyysisen aktiivisuuden yhteys biologiseen ikääntymiseen vaatii vielä runsaasti lisätutkimusta. Lähivuosien aikana teknologian kehittyessä saadaan luultavasti tarkempaa tietoa DNA-metylaatioin toiminnasta (Jylhävä ym. 2017) ja biologiseen ikääntymiseen yhteydessä olevista tekijöistä.

LÄHTEET

- Abdelaal, M., le Roux, C. W. & Docherty, N. G. 2017. Morbidity and mortality associated with obesity. *Annals of translational medicine* 5 (7), 161.
- Akil, L. & Ahmad, H. A. 2011. Relationships between obesity and cardiovascular disease in four states and Colorado. *The journal of health care for the poor and underserved* 22 (4), 61-72.
- Aparicio-Ugarriza, R., Mielgo-Ayuso, J. M., Benito, P. J., Pedrero-Chamizo, R., Ara, I. & Gonzalez.Gross, M. Physical activity assessment in the general population; instrumental methods and new technologies. *Nutricion hospitalaria* 31 (3), 219-26.
- Baltes, B. B., Rudolph, C. W. & Bal, A. C. 2012. A review of aging theories and modern work perspectives. Teoksessa J. W. Hedge & W. C. Borman (toim.) *The Oxford Handbook of work and aging*. New York: Oxford University Press, 117-136.
- Barros, S. P. & Offenbacher, S. Epigenetics: Connecting environment and genotype to phenotype and disease. *Journal of dental research* 88 (5), 400-408.
- Beach, S. R., Dogan, M. V., Lei, M-K., Cutrona, C. E., Gerrard, M., Gibbons, F. X., Simons, R. L., Brody, G. H. & Philibert, R. A. 2015. Methylomic aging as windows onto the influence of lifestyle: tobacco and alcohol use alter the rate of biological aging. *Journal of the American geriatrics society* 63 (12), 2519-2525.
- Belsky, D. W., Moffitt, T. E., Cohen, A. A., Corcoran, D., Levine, M. E., Prinz, J., Schaefer, J., Sugden, K., Williams, B., Poulton, R. & Caspi, A. 2016. Telomere, epigenetic clock, and biomarker-composite quantifications of biological aging: Do they measure the same thing? *Biorxiv* doi.org/10.1101/071373.
- Benowitz, N. L. 1996. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiologic Reviews* 18 (2), 188-203.
- Bhatt, H. B. & Smith, R. J. 2015. Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 4 (2), 101-108.
- Bjälle, J. G., Haug, E., Sand, O., Sjaastad, Ø, V. & Toverud, K. C. 2009. Ihminen, fysiologia ja anatomia. 1-6 painos. Helsinki: Werner Söderström osakeyhtiö, 187-218, 268-280.

- Blake, G. E. & Watson, E. D. 2016. Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Current opinion in chemical biology* 33, 101-107.
- Boks, M. P., Mierlo, H. C., Rutten, B. P., Radstake, T. R., De Witte, L., Geuze, E., Horvath, S., Schalkwyk, L. C., Vinkers, C. H., Broen, J. C. & Vermetten, E. 2014. Longitudinal changes of telomere length and epigenetic age related to traumatic stress and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* 51, 506–512.
- Borodulin, K. & Jousilahti, P. 2012. Liikunta vapaa-ajalla, työssä ja työmatkalla 1972-2012. Tutkimuksesta tiiviisti 5, marraskuu 2012. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, 2-4.
- Borodulin, K., Levälähti, E., Saarikoski, L., Lund, L., Juolevi, A., Grönholm, M., Jula, A., Laatikainen, T., Männistö, S., Peltonen, M., Salomaa, V., Sundvall, J., Taimi, M., Virtanen, S. & Vartiainen, E. 2013. Kansallinen FINRISKI 2012 –terveystutkimus – Osa 2: Tutkimuksen taulukkoliite. Terveiden ja hyvinvoinnin laitos, 202-209.
- Breitling, L. P., Saum, K.-U., Perna, L., Schöttker, B., Holleczeck, B., & Brenner, H. 2016. Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort. *Clinical Epigenetics*, 8, 21 doi.org/10.1186/s13148-016-0186-5.
- Burch, J. B., Augustine, A. D., Frieden, L. A., Hadley, E., Howcroft, T. K., Johnson, R., Khalsa, P. S., Kohanski, R. A., Li, X. L., Macchiarini, F., Niederehe, G., Oh, Y. S., Pawlyk, A. C., Rodriguez, H., Rowland, J. H., Shen, G. L., Sierra, F. & Wise, B. C. 2014. Advances in geroscience: impact on healthspan and chronic disease. *The journals of gerontology series a: biological sciences and medical sciences* 69 (1), 1-3.
- Cartee, G. D., Hepple, R. T., Bamman, M.M. & Zierath, J. R. 2016. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. *Cell metabolism* 23 (6), 1034-1047.
- Caspersen, C. J., Powell, K. E., & Christenson, G. M. 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public health reports* 100(2), 126.
- Cass, S. P. 2017. Alzheimer's Disease and exercise: a literature review. *Current sports medicine reports*, 16 (1), 19-22.
- Chen, K. Y. & Bassett, D. R. 2005. The technology of accelerometry-based activity monitors: current and future. *Medicine & science in sports & exercise* 37 (11), 490-500.
- Chen, B. H., Marioni, R. E., Colicino, E., Peters, M. J., Ward-Caviness, C. K., Tsai, P. C., Roetker, N. S., Just, A. C., Demerath, E. W., Guan, W., Bressler, J., Formage, M.,

- Studenski S., Vandiver, A. R. ym. 2016. DNA methylation-based measure of biological age: meta- analysis predicting time to death. *Aging* 8 (9), 1844-1865.
- Cherkas, L. F., Hunkin, J. L., Kato, B. S., Richards, J. B., Gardner, J. P., Surbulescu, G. L., Kimura, M., Lu, X., Spector, T. D. & Aviv, A. 2008. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *JAMA Internal Medicine* 168 (2), 154-158.
- Cheung, C-L., Nguyen, U-S., Au, E., Tan, K. C. & Kung, A. W. 2013. Association of handgrip strength with chronic diseases and multimorbidity: A cross-sectional study. *Age* 35 (3), 929-941.
- Chodzko-Zajko, W. J., Proctor, D. N., Fiatarone Singh, M. A., Minson, C. T., Nigg, C. R., Salem, G. J., Skinner, J. & American college of sports medicine position stand. 2009. American college of sports medicine position stand: Exercise and physical activity for older adults. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 41 (7), 1510–1530.
- Chou, C. H., Hwang, C. L. & Wu, Y. T. 2012. Effect of exercise on physical function, daily living activities, and quality of life in the frail older adults: a meta-analysis. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 93 (2), 237-244.
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, J. F., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., Yeh, R-F., Wiencke, J. K. & Kelsey, K. T. 2009. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLOS genetics* 5 (8). doi.org/10.1371/journal.pgen.1000602.
- Christensen, B. C., Marsit, C. J. & Kelsey, K. T. 2012. Influence of environmental factors on the epigenome. *Epigenetic epidemiology*, 197-224.
- Christiansen, L., Lenart, A., Tan, Q., Vaupel, J.W., Aviv, A., McGue, M., & Christensen, K. 2016. DNA methylation age is associated with mortality in a longitudinal Danish twin study. *Aging Cell* 15 (1), 149–154.
- Coulter, S. A. 2011. Heart disease and hormones. *Texas heart institute journal* 38 (2), 137-141.
- Daxinger L. & Whitelaw E. 2012. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics* 13, 153–162.
- Davidovic, M., Sevo, G., Svorcan, P., Milosevic, D. P., Despotovic, N. & Erceg, P. 2010. Old age as a privilege of the "selfish ones". *Aging and Disease* 1, 139-146.

- Dean, S. G., Zhang, C., Gao, J., Roy, S., Shinkle, J., Sabarinathan, M., Argos, M., Tong, L., Ahmed, A., Islam, M. T., Islam, T., Rakibuz-Zaman, M., Sarwar, G., Shahriar, H., Rahman, M., Yunus, M., Graziano, J. H. ym. 2017. The association between telomere length and mortality in Bangladesh. *Aging* 15 (6), 1537-1551.
- de Geus, E. J., Barteles, M., Kaprio, J., Lightfoot, J. T. & Thomis, M. 2014. Genetics of regular exercise and sedentary behaviors. *Twin research and human genetics* 17 (4), 262-71.
- Deng, Y. & Chang, S. 2007. Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Laboratory investigation* 87, 1071-1076.
- Ding, L. X., Zhang, Y. H., Yu, X. Z., Zhang, J., Sung, M., Liu, D., Zhao, Z. Y., Zhang, Q. & Wang, Y. X. 2018. Association between physical activity and telomere length in a north chinese population: a china suboptimal health cohort study. *Biomedical and environmental sciences* 31 (5), 394-398.
- Fogelholm, M. 2016. Fyysisen aktiivisuuden ja liikunnan arviointi. Teoksessa Vuori, I., Taimela, S. & Kujala, U. (toim.) *Liikuntalääketiede*. 3.-8. painos Helsinki: Duodecim. s. 77-91.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L. ym. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120(30), 10604-9.
- Frederiksen, H., Hjelmberg, J., Mortensen, J., McGue, M., Vaupel, J. W. & Christensen, K. 2006. Age trajectories of grip strength: cross-sectional and longitudinal data among 8,342 Danes aged 46 to 102. *Annals of Epidemiology* 16 (7), 554-562.
- Fuller, T. D. 2011. Moderate alcohol consumption and the risk of mortality. *Demography* 48 (3), 1105-1125.
- Gale, C., R., Marioni, R. E., Cukic, I., Chastin, S. F., Dall, P. M., Dontje, M. L., Skelton, D. A. & Deary, I. J. 2018. The epigenetic clock and objectively measured sedentary and walking behavior in older adults: the Lothian Birth Cohort 1936. *International Journal of Epidemiology* 44 (4), 1388-1396.
- Gao, X., Yan, Z., Breitling, L. P. & Brenner, H. 2016. Relationship of tobacco smoking and smoking-related DNA methylation with epigenetic age acceleration. *Oncotarget* 7 (30), 46878-46889.

- Gebel, K., Ding, D., MAppStats, T. C., Stamatakis, E., Brown, W. J. & Bauman, A. E. 2015. Effect of moderate to vigorous physical activity on all-cause mortality in middle-aged and older Australians. *JAMA Intern Med.* 175 (6), 970-977.
- Gentilini, D., Mari, D., Castaldi, D., Remondini, D., Ogliari, G., Ostan, R., Bucci, L., Sirchia, S. M., Tabano, S., Cavagnini, F., Monti, D., Franceschi, C., Di Blasio, A. M. & Vitale, G. 2013. Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age* 35 (5), 1961–1973.
- Gibson, C., Matthews, K. & Thurston, R. 2014. Daily physical activity and hot flashes in the study of women's health across the nation FLASHES study. *Fertility and sterility* 101 (4). 1110-1116.
- Grimby, G. 1986. Physical activity and muscle training in the elderly. *Acta medica Scandinavica* 711, 233-7.
- Grimby, G. & Frändin, K. 2017. On the use of six-level scale for physical activity. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 28 (3), 819-825.
- Grindler, N.M. & Santoro, N.F. 2015. Menopause and exercise. *The journal of the North American menopause society* 22 (12), 1351–1358.
- Goldsmith, T. C. 2014. *An Introduction to Biological Aging Theory*. Toineen painos Crownsville: Azinet Press, 7. Goldsmith
- Gulliford, M. C. 2003. Cigarette smoking, health status, socio-economic status and access to health care in diabetes mellitus: a cross-sectional survey. *BMC Health services research* 3. doi.org/10.1186/1472-6963-3-4.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Mohr, F. W. & Schuler, G. 2003. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107 (25), 3152-3158.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J-B, Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T. & Zhang, K. 2013. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell resource* 49 (2), 359-367.
- Heard, E. & Martienssen, R. 2014. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 157(1), 95–109.

- Helakorpi, S., Laitalainen, E. & Uutela, A. 2010. Suomalaisen aikuisväestön terveystäyttyminen ja terveys, kevät 2009. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Raportti 7/2010, 18-20.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., Setien, F., Carmona, F. J., Puca, A. A., Sayols, S., Pujana, M. A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A. F., Fraga, M. F. ym. 2012. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *PNAS* 109 (26), 10522-10527.
- Hipskind, P., Glass, C., Charlton, D., Nowak, D. & Dasarathy, S. 2011. Do hand-held calorimeters have a role in assessment of nutrition needs in hospitalized patients? A systematic review of literature. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American society for parenteral and enteral nutrition* 26 (4), 426-433.
- Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi, 193-203.
- Hirvensalo, M., Lampinen, P. & Rantanen, T. 1998. Physical exercise in old age: An eight-year follow-up study on involvement, motives, and obstacles among persons age 65-84. *Journal of aging and physical activity* 6 (2), 157-168.
- Hoeijmakers, J. H. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *The new England journal of medicine* 361 (15), 1475-85.
- Hojan, K., Milecki, P., Molińska-Glura, M., Roszak, A. & Leszczyński, P. 2013. Effect of physical activity on bone strength and body composition in breast cancer premenopausal women during endocrine therapy. *European journal of physical and rehabilitation medicine* 49 (3), 331-339.
- Holliday, R. & Pugh, J. E. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187 (4173), 226-232.
- Horvath, S. 2013. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- Horvath, S., Erhart, W., Brosch, M., Ammerpohl, O., von Schönfels, W., Ahrens, M., Heits, N., Bell, J. T., Tsai, P-C., Spector, T. D. & Deloukas, P. ym. 2014. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(43),15538-43.
- Horvath, S., Gurven, M., Levine, M. E., Trumble, B. C., Kaplan, H., Allayee, H., Ritz, B. R., Chen, B., Lu, A.T., Rickabaugh, T. M., Jamieson, B. D., Sun, D., Li, S., Chen, W.,

- Quintana-Murci, L. ym. 2016. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex and coronary heart disease. *Genome biology* 17(1). doi.org/10.1186/s13059-016-1030-0.
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., Di Blasio, A.M., Delledonne, M., Mari, D., Arosio, B., Monti, D. & Passarino, G. ym. 2015. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring *Aging (Albany NY)* 7(12),1159-1170.
- Horvath, S. & Ritz, B. R. 2015. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients. *Aging (Albany NY)* 7, 1130-1142.
- Horvath, S., Zhang, Y., Langfelder, P., Kahn, R. S., Boks, M. P., van Eijk, K., van den Berg, L. H., Ophoff, R. A. 2012. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biology*. 13 (10) doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r97.
- Hurley, B. & Reuter, I. 2011. Aging, physical activity and disease prevention. *Journal of aging research* <http://dx.doi.org/10.4061/2011/782546>.
- Hurme, M. 2015. Epigeneettinen kello käy – ihminen vanhenee. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 131 (17), 1535-6.
- Hurme, T., Kalimo, H., Rantanen, J., Lehto, M. & Järvinen, M. 1993. Poikkijuovainen lihasregeneraation voimahahmo. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 109 (4), 290.
- Husu, P., Suni, J., Vähä-Ypyä, H., Sievänen, H., Tokola, K., Valkeinen, H., Mäki-Opas, T. & Vasankari, T. 2014. Suomalaisten aikuisten kiihtyvyyssmittarilla mitattu fyysinen aktiivisuus ja liikkumattomuus. *Suomen lääkärilehti* 25-32 (69), 1860-1866.
- Husu, P., Paronen, O., Suni, J. & Vasankari, T. 2011. Suomalaisten fyysinen aktiivisuus ja kunto 2010: Terveystä edistävän liikunnan nykytila ja muutokset. Opetus- ja kulttuuriministeriö. Opetus- ja kulttuuriministeriön julkaisuja 2011, 15-17.
- Häkkinen, H., Miettinen, A., Mikkonen, A-M., Pitkämäki, T., Sovelius, S. & Varjola, S. 2015. Epigenetiikka haastaa käsityksiämme periytymisestä ja evoluutiosta. *Tieteessä tapahtuu* 33 (2), 13-19.
- Jablonka, E. & Raz, G. 2009. Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology* 84(2), 131–176.
- Jaenisch, R. & Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* 33, 245-254.

- Jalanko, A., Ranki, M. & Palotie, L. 1996. Geenivirheet ja taudit. *Lääketieteellinen aikakausikirja Duodecim* 112 (4), 307.
- Janssen, I. 2012. Morbidity and mortality risk associated with an overweight BMI in older men and women. *Obesity: A research journal* 15 (7), 1827-1840.
- Jin, Z. & Liu, Y. 2018. DNA methylation in human diseases. *Genes & diseases* 5 (1), 1-8.
- Jones, M. J., Goodman, S. J. & Kobor, M. S. 2015. DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell* 14(6), 924-932.
- Jung, S-E., Shin, K-J. & Lee, H. Y. 2017. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB reports* 50 (11), 546-553.
- Jylhävä, J., Pedersen, N. L. & Hägg, S. 2017. Biological Age Predictors. *EBioMedicine* 21, 29-36.
- Kannus, P. 2016. Osteoporoosi, kaatumiset ja murtumat. Teoksessa I. Vuori, S. Taimela, & U. Kujala, (toim). *Liikuntalääketiede*. 3.-8. painos. Helsinki: Duodecim, 297-302.
- Karvinen, S., Waller, K., Silvennoinen, M., Koch, L. G., Britton, S. L., Kaprio, J., Kainulainen, H. & Kujala, U. M. 2015. Physical activity in adulthood: genes and mortality. *Scientific Reports* 5. doi:10.1038/srep18259.
- Khoury, L. E., Gorrie-Stone, T., Smart, M., Hughes, A., Bao, Y., Andrayas, A., Burrage, J., Hannon, E., Kumari, M., Mill, J. & Schalkwyk, L. C. 2018. Properties of the epigenetic clock and age acceleration. *Research Gate*. doi:10.1101/363143.
- Kovanen, V., Aukee, P., Kokko, K., Finni, T., Tarkka, I. M., Tammelin, T., Kujala, U. M., Sipilä, S. & Laakkonen, E. K. 2018. Design and protocol of estrogenic regulation of muscle apoptosis (ERMA) study with 47-55-year-old women's cohort: novel results show menopause-related differences in blood count. *Menopause: the journal of the North American menopause society* 25 (9). doi: 10.1097/GME.0000000000001117.
- Kunlin, J. 2010. Modern biological theories of aging. *Aging and Disease* 1 (2), 72-74.
- Law, T. D., Clark, L. A. & Clark, B. C. 2016. Resistance exercise to prevent and manage sarcopenia and dynapenia. *Annual review of gerontology & geriatrics* 36 (1), 205-228.
- Latifovic, L., Peacock, S. D., Massey, T. E. & King, W. D. 2016. The influence of alcohol consumption, cigarette smoking, and physical activity on leukocyte telomere length. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 25 (2), 374-380.

- LeBrasseur, N. K., Achenbach, S. J., Melton, L. J., Amin, S. & Khosla, S. Skeletal muscle mass is associated with bone geometry and microstructure and serum IGFBP-3 levels in adult women and men. *Journal of bone mineral research* 27 (10), 2159-2169.
- Lee & Pausova. 2013. Cigarette smoking and DNA methylation. *Frontiers in genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00132>.
- Leiros-Rodriguez, R., Soto-Rodriguez, A., Perez-Ribao, I. & Garcia-Soidan, J. Comparisons of the health benefits of strength training, aqua-fitness, and aerobic exercise for the elderly. *Rehabilitation research and practise*. <https://doi.org/10.1155/2018/5230971>.
- Levine, M. E., Lu, A. K., Quach, A., Chen, B., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L. & Horvath, S. 2018. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging* 10(4), 573-591.
- Levine, M. E., Lu, A. K., Chen, B. H., Hernandez, D. G., Singleton, A. B., Ferrucci, L., Bandelli, S., Salfati, E., Manson, J. E., Quach, A., Kusters, C. D., Kuh, D., Wong, A., Teschendorff, A. E., Widschwendter, M., Ritz, B. R., Absher, D., Assimes, T. L. & Horvath, S. 2016. Menopause accelerates biological aging. *PNAS* 113 (33), 9327-9332.
- Lowe, D., Horvath, S. & Raj, K. 2016. Epigenetic clock analyses of cellular senescence and aging. *Oncotarget* 7 (8), 8524-8531.
- Luoto, R. 2009. Kyselytutkimuksen suunnittelu. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 125, 1647-53.
- Lyon, C. M., Klinge, D. M., Liechty, K. C., Gentry, F. D., March, T. H., Kang, T., Gilliland, F. D., Adamova, G., Rusinova, G., Telnov, V. & Belinsky, S. A. 2007. Radiation-induced lung adenocarcinoma is associated with increased frequency of genes inactivated by promoter hypermethylation. *Radiation Research* 168 (4), 409-414.
- Magi, F., Dimauro, I., Margheritini, F., Duranti, G., Mercatelli, N., Fantini, C., Ripani, F. R., Sabatini, S. & Caporossi, D. Telomere length is independently associated with age, oxidative biomarkers, and sport training in skeletal muscle of healthy adult males. *Free radical research* 52 (6), 639-647.
- Malina, R. M., Bouchard, C. & Bar-Or, O. 2004. Growth, maturation and physical activity. *Toinen painos*. Champaign Illinois: Human kinetics.

- Maltais, M. L., Desroches, J. & Dionne, I. J. 2009. Changes in muscle mass and strength after menopause 9 (4), 186-197.
- Marioni R.E., Shah, S., McRae, A.F., Chen, B.H., Colicino, E., Harris, S.E., Gibson, J., Henders, A.K., Redmond, P., Cox, S.R., Pattie, A., Corley, J., Murphy, L., Martin, N.G., & Montgomery, G.W ym. 2015a. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biology* 16 doi.org/10.1186/s13059-015-0584-6.
- Marioni, R. E., Shah, S., McRae, A. F., Ritchie, S. J., Muniz-Terrera, G., Harris, S.E., Gibson, J., Redmond, P., Cox, S. R. & Pattie, A. ym. 2015b. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *International Journal of Epidemiology* 44 (4),1388-139.
- Marioni, R. E., Suderman, M., Chen, B. H., Horvath, S., Bandinelli, S., Morris, T., Beck, S., Ferrucci, L., Pedersen, N. L., Relton, C. L., Deary, I. J. & Hägg, S. 2018. Tracking the epigenetic clock across the human life course: A meta-analysis of longitudinal cohort data. *The journals of gerontology*. doi.org/10.1093/gerona/gly060.
- Martino, D., Loke, Y. J., Gordon, L., Ollikainen, M., Cruickshank, M. N., Saffery, R. & Craig, J. M. 2013. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. *Genome Biology* 14 (5). doi.org/10.1186/gb-2013-14-5-r42.
- Marttila, S. 2016. Ageing-associated changes in gene expression and DNA methylation. University of Tampere. *Acta universitatis Tamperensis* 2150.
- Mattiasson-Nilo, I., Sonn, U., Johannesson, K., Gosman-Hedström, G., Persson, G. B., Grimby, G. 1990. Domestic activities in elderly women and men. *Aging* 2 (2), 191-198.
- McCabe, M. T., Brandes, J. C & Vertino, P. M. 2009. Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research* 15 (12), 3927-3937.
- Mishra, N., Mishra, V. N. & Devanshi. 2011. Exercise beyond menopause: dos and don'ts. *Journal of mid-life health* 2 (2), 51-56.
- Moilanen, J., Aalto, A. M., Hemminki, E., Aro, A. R., Raitanen, J. & Luoto, R. 2010. Prevalence of menopause symptoms and their association with lifestyle among Finnish middle-aged women. *Maturitas* 67 (4), 368-374.

- Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. 2006. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 296 (15), 1885-1899.
- Mustajoki, P. 2017. Rasvamaksa. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim*. Viitattu 14.12.2018. www.terveyskirjasto.fi
- Nevalainen, T., Kananen, L., Marttila, S., Jylhävä, J., Mononen, N., Kähönen, M., Raitakari, O. T., Hervonen, A., Jylhä, M., Lehtimäki, T. & Hurme, M. 2017. Obesity accelerates epigenetic aging in middle-aged but not in elderly individuals. *Clinical epigenetics* 9. doi:10.1186/s13148-016-0301-7.
- Neumüller, J., Ellinger, A. & Wagner, T. 2015. Transmission electron microscopy of platelets from apheresis and buffy-coat-derived platelet concentrates. *The transmission electron microscope – Theory and applications*, 255-284.
- Njajou, O. T., Hsueh, W-C., Blackburn, E., Newman, A. B., Wu, S-H., Li, R., Simonsick, E. M., Harris, T. M., Cummings, S. R. ym. 2009. Association Between Telomere Length, Specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population – based cohort study. *The journals of gerontology* 64 (8), 860-864.
- Owen, N., Healy, G. N., Matthews, C. E., & Dunstan, D. W. 2010. Too Much Sitting: The Population-Health Science of Sedentary Behavior. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 38 (3), 105–113.
- Pacchierotti, F. & Spano, M. 2015. Environmental impact on DNA methylation in the germline: state of the art and gaps of knowledge. *Biomed research international*. doi:10.1155/2015/123484.
- Parkkari, J. 2015. Liikuntatapatukset Suomessa. *Terveysliikuntautiset 2015: Liikkeellä turvallisesti*. Tampere: UKK-instituutti, 3-4.
- Passarino G, De Rango F, Montesanto A. 2016. Human longevity: Genetics or Lifestyle? It takes two to tango. *Immun Ageing* 13 (12). doi:10.1186/s12979-016-0066-z.
- Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Mamun, A. A., Bonneux, L. ym. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: A life-table analysis. *Annals of internal medicine* 138, 24-32.
- Portela A. & Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology* 28, 1057–1068.

- Portin, P. 2012. Mullistaako epigeneettinen periytyminen evoluutioteorian perusteet? *Tieteessä tapahtuu* 30 (2), 26-34.
- Proctor, D. N., Melton, L. J., Khosla, S., Crowson, C. S., O'Connor, M. K. & Riggs, B. L. 2000. Relative influence of physical activity, muscle mass and strength on bone density 11 (11), 944-952.
- Pulkkinen, K. 2013. Epigenetiikka linkittää ympäristön ja sairaudet. *Kemia* (4), 12-16.
- Quach, A., Levine, M. E., Tanaka, T., Lu, A.T., Chen, B. H., Ferrucci, L., Ritz, B., Bandinelli, S., Neuhauser, M. L. & Beasley, J. M. ym. 2017. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging* 9 (12), 419-446.
- Rantanen, T., Guralnik, J. M., Sakari-Rantala, R., Leveille, S., Simonsick, E. M., Ling, S. & Fried, L. 1999. Disability, physical activity and muscle strength in older women: the women's health and aging study. *Archives of physical medicine and rehabilitation* 80 (2), 130-135.
- Rantanen, T., Volpato, S., Ferrucci, L., Heikkinen, E., Fried, L. P. & Guralnik, J. M. 2003. Handgrip strength and cause-specific and total mortality in older disabled women: exploring the mechanism. *Journal of the American Geriatrics Society* 51 (5), 636-641.
- Rowlatt, A., Hernandez-Suarez, G., Sanabria-Salas, M. C., Serrano-Lopez, M., Rawlik, K., Hernandez-Illan, E., Alenda, C., Castillejo, A., Soto, J. L., Haley, C. S. & Tenesa, A. 2016. The heritability and patterns of DNA methylation in normal human colorectum. *Human molecular genetic* 25 (12), 2600-2611.
- Sallis, J. F. 2010. Measuring physical activity: practical approaches for program evaluation in native American communities. *Journal of public health management and practice* 16 (5), 404-410.
- Sehl, M. E., Henry, J. E., Storniolo, A. M., Ganz, P. A., Horvath, S. 2017. DNA methylation age is elevated in breast tissue of healthy women. *Breast Cancer Research and Treatment* 164 (1), 209-219.
- Shou, W., Bergstrom, C. T., Chakraborty, A. K. & Skinner, F. K. 2015. Theory, models and biology. *Elife*. Doi:10.7554/elife.07158.
- Sillanpää, E., Laakkonen, E. K., Vaara, E., Rantanen, T., Kovanen, V., Sipilä, S., Kaprio, J. & Ollikainen, M. 2018. Biological clocks and physical functioning in monozygotic female twins. *BMC Geriatrics*. doi.org/10.1186/s12877-018-0775-6.
- Sillanpää, E. 2017. Voiko liikunta hidastaa ikääntymistä? *Liikunta & Tiede* 54 (4), 38-41.

- Sonawane, A. R., Platig, J., Fagny, M., Chen, C. Y., Paulson, J. N., Lopes-Ramos, C. M., DeMeo, D. L., Quackenbush, J., Glass, K. & Kuijjer, M. L. 2017. Understanding tissue-specific gene regulation. *Cell reports* 21 (4), 1077-1088.
- Strath, S. J., Bassett, D. R. & Swartz, A. M. 2004. Comparison of the College Alumnus Questionnaire physical activity index with objective monitoring. *Annals of Epidemiology* 14 (6), 409–415.
- Strath, S. J., Kaminsky, L.A., Ainsworth, B.E., Ekelund, U., Freedson, P.S., Gary, R.A., Richardson, C.R., Smith, D.T., Swartz, A.M. 2013. Guide to the assessment of physical activity: clinical and research applications: a scientific statement from the American heart association. *Circulation* 128 (20), 2259–2279.
- Sternfeld, B., Guthrie, K. A., Ensrud, K. E., LaCroix, A. Z., Larson, J. C., Dunn, A. L., Anderson, G. L., Seguin, R. A., Carpenter, J. S., Newton, K. M., Reed, S. D., Freeman, E. W., Cohen, L. S., Joffe, H., Roberts, M. & Caan, B. J. 2014. Efficacy of exercise for menopausal symptoms: a randomized controlled trial. *Menopause* 21 (4), 330-338.
- Stubbe, J. H., Boomsma, D. I., Vink, J. M., Cornes, B. K., Martin, N. G., Skytthe, A., Kyvik, K. O., Rose, R. J., Kujala, U. M., Kaprio, J., Harris, J. R., Pedersen, N. L., Hunkin, J., Spectos, T. D. & Geus, E. J. 2006. Genetic influences on exercise participation in 37,051 twin pairs from seven countries. *Plos one* 1 (1). doi:10.1371/journal.pone.0000022.
- Sun, Q., Townsend, M. K., Okereke, O. I., Rimm, E. B., Hu, F. B., Stampfer, M. J. & Grodstein, F. 2011. Alcohol consumption at midlife and successful ageing in women: a prospective cohort analysis in the nurses' health study. *Plos medicine*. doi.org/10.1371/journal.pmed.1001090.
- Suominen, H. 2013. Luuston kunto. Teoksessa J. Jyrkämä & T. Rantanen, (toim.) *Gerontologia*. 3. uudistettu painos Helsinki. Duodecim, 135-140.
- Södergren, M. 2013. Lifestyle predictors of healthy ageing in men. *Elsevier* 75 (2), 113-117.
- Taipale, M. 2006. Epigenetiikka, geeninsäätely ja syöpä. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 122(21), 2611-8.
- Taylor, A.W. & Johnson, M.J. 2008. *Physiology of exercise and healthy aging*. Champaign, IL: Human Kinetics, 91-100.

- Tieva, A. & Peltomäki, P. 2012. Epigeneettiset muutokset syövässä. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 128 (1), 62-71.
- Tiitinen, A. 2017. Vaihdevuodet. *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim*. Viitattu 8.8.2018. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00179.
- Thompson, P. D., Franklin, B. A., Balady, G. J., Blair, S. N., Corrado, D., Estes, N. A., Fulton, J. E., Gordon, N. F., Haskell, W. L., Link, M. S., Maron, B. J., Mittleman, M. A., Pelliccia, A., Wenger, N. K., Willich, S. N. & Costa, F. 2007. Exercise and acute cardiovascular events. *Circulation* 115 (17), 2358-2368.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2013. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan ohje 2012. Helsinki. Viitattu 1.12.2018. www.tenk.fi
- Tucker, L. A. 2017. Physical activity and telomere length in U.S men and women: An NHANES investigation. *Preventive medicine* 100, 145-151. doi.org/10.1016/j.ypmed.2017.04.027.
- UKK-instituutti. 2016. Terveysliikuntaa ja kuntoliikuntaa. Viitattu 22.2.2018. www.ukkinstituutti.fi.
- U.S. Department of Health and Human Services. 2008. Physical Activity Guidelines for Americans. ODPHP Publication no. U0036, 21-26.
- Vanhees, L., Lefevre, J., Philippaerts, R., Martens, M., Huygens, W., Troosters, T. & Beunen, G. 2005. How to assess physical activity? How to assess physical fitness? *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation* 12 (2), 102-114.
- Valtion ravitsemusneuvottelukunta. 2014. Terveyttä ruoasta: Suomalaiset ravitsemussuositukset 2014, 8-23.
- Vasconcelos Rocha, S., Souza dos Santos, S., Carneiro Vasconcelos, L. R. & Alves dos Santos, C. 2016. Strength and ability to implement the activities of daily living in elderly resident in rural areas. *Colombia Medica* 47 (3), 167-171.
- Volpato, S., Pahor, M., Ferrucci, L., Simonsick, E. M., Guralnik, J. M., Kritchevsky, S. B., Fellin, R. & Harris, T. B. 2004. Relationship of alcohol intake with inflammatory markers and plasminogen activator inhibitor-1 in well-functioning older adults: the health, aging and body composition study. *Circulation* 109 (5), 607-612.
- Vuori, I. 2005. Liikunta, kunto ja terveys. Teoksessa I. Vuori, S. Taimela, U. Kujala (toim.) *Liikuntalääketiede*. Helsinki: Duodecim, 16-29.

- Walsberg, G. E. & Hoffman, T. C. 2005. Direct calorimetry reveals large errors in respirometric estimates of energy expenditure. *The journal of experimental biology* 208, 1035-1043.
- Warburton, D. E., Nicol, C. W. & Bredin, S. S. 2006. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 174 (6), 801-809.
- Wen, C. P., Wai, J. P., Tsai, M. K., Yang, Y. C., Cheng, T. Y., Lee, M-C., Chan, H. T., Tsao, C. K., Tsai, S. P. & Wu, X. 2011. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and expectancy: a prospective cohort study. *The lancet* 378 (9798), 1244-1253.
- Wellons, M., Ouyang, P., Schreiner, P. J., Herrington, D. M., & Vaidya, D. 2012. Early menopause Predicts Future Coronary Heart Disease and Stroke: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Menopause* 19 (10), 1081-1087.
- Westerterp, K. R. 2017. Doubly labelled water assessment of energy expenditure: principle, practise, and promise. *European journal of applied physiology* 117 (7), 1277-1285.
- Whitton, C., Rebello, S. A., Lee, J., Tai, E. S. & van Dam, R. M. A healthy Asian a posteriori dietary pattern correlates with a priori dietary patterns and is associated with cardiovascular disease risk factors in a multiethnic Asian population. *The journal of nutrition* 148 (4), 616-623.
- Willis, L. H., Slentz, C. A., Bateman, L. A., Shields, A. T., Piner L. W., Bales, C. W., Houmard, J. A. & Kraus, W. E. 2012. Effects of aerobic and/or resistance training on body mass and fat mass in overweight or obese adults. *Journal of applied physiology* 113 (12), 1831-1837.
- World Health Organization. 2010. *Global Recommendations on Physical Activity for Health*, 9-11, 23-31.
- Xi, H., Li, C., Ren, F., Zhang, H. & Zhang, L. 2013. Telomere, aging and age-related diseases. *Aging clinical and experimental research* 25 (2), 139-146.
- Yorston, L. C., Kolt, G. S. & Rosenkranz, R. R. 2012. Physical activity and physical function in older adults: the 45 and up study. *Journal of the American geriatrics society* 60 (4), 719-725.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Calabrese, R., Franceschi, C., Burkle, A. & Caiafa, P. 2015. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mechanisms of ageing and development* 151, 60-70.

- Zannas, A. S., Arloth, J., Carillo-Roa, T., Lurato, S., Röh, S., Ressler, K. L., Nemeroff, C. B., Smith, A. K., Bradley, B., Heim, C., Menke, A. ym. 2015. Lifetime stress accelerates epigenetic aging in an urban, African American cohort: relevance of glucocorticoid signaling. *Genome biology* 16. doi.org/10.1186/s13059-015-0828-5.
- Zhang, G. & Pradhan, S. 2014. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB life* 66 (4), 240-56.