HERAPROTEIININ VAIKUTUS MYOSTATIININ JA SOLUSYKLIÄ SÄÄTELEVIEN GEENIEN ILMENTYMISEEN SEKÄ NÄIDEN YHTEYS ANDROGEENEIHIN VOIMA-HARJOITUKSEN YHTEYDESSÄ IKÄÄNTYNEILLÄ MIEHILLÄ

Inna Lisko

Pro gradu -tutkielma
LFYS008
Liikuntafysiologia
Liikuntabiologian laitos
Jyväskylän yliopisto
Kevät 2008
Työn ohjaajat: Antti Mero,
Juha Hulmi ja Heikki
Kainulainen

TIIVISTELMÄ

Lisko, Inna 2008. Heraproteiinin vaikutus myostatiinin ja solusykliä säätelevien geenien ilmentymiseen sekä näiden yhteys androgeneeihin voimaharjoituksen yhteydessä ikääntyneillä miehillä. Liikuntafysiologian Pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto. Liikuntabiologian laitos. 119 s.

Myostatiini estää luurankolihasten kasvua ja vaikutus perustuu suurelta osin satelliittisolujen solunjakautumisen ja erilaistumisen estämiseen. Tämä tapahtuu vaikuttamalla tiettyjen solusykliä säätelevien proteiinien (mm. Cdk2 ja p21) sekä myogeenisten säätelytekijöiden (mm. MyoD ja myogeniini) ilmentymiseen. Proteiinin ja erityisesti heran nauttimisen voimaharjoituksen yhteydessä on todettu lisäävän proteiinisynteesiä ja aiheuttavan positiivisen proteiinitasapainon. Proteiiniravinnon vaikutuksia myostatiiniin ja solusykliä säätelviin geeneihin voimaharjoituksen yhteydessä ei silti ole juurikaan tutkittu, ja tarkat mekanismit, joiden kautta proteiiniravinnon vaikutukset välittyvät, ovat vielä selvittämättä. Androgeenien tiedetään myös parantavan lihasvoimaa ja lisäävän lihaksen kokoa, mutta tarkat mekanismit, kuinka androgeenien vaikutukset välittyvät, ovat nekin vielä selvittämättä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ennen voimaharjoitusta ja sen jälkeen nautitun heraproteiinin akuutteja vaikutuksia myostatiinin ja solusykliä säätelevien geenien ilmentymiseen sekä näiden mahdollista yhteyttä androgeeneihin ikääntyneillä miehillä.

Tutkimuksen koehenkilöinä oli 18 ikääntynyttä (ikä 57–72 vuotta) miestä, joilla oli 21 viikon voimaharjoittelutausta. Heidät jaettiin proteiiniryhmään (PROT; 61,4 ± 4,3 vuotta; n = 9) sekä plaseboryhmään (PLA; 62,1 ± 4,2 vuotta; n = 9). Koehenkilöt suorittivat raskaan voimaharjoituksen (RE), joka sisälsi 5 x 10 toiston jalkaprässisarjan. Ennen RE:tä ja välittömästi sen jälkeen PROT nautti proteiinijuomaa (15 g heraa) ja PLA kaloritonta plasebojuomaa. Juomat annettiin koehenkilöille kaksoissokkomenetelmän periaatteella. Lihasbiopsiat vastus lateralis -lihaksesta otettiin levossa ennen RE:tä (pre) sekä 1 ja 48 tuntia RE:n päättymisen jälkeen (post 1h ja post 48h). Verinäytteet otettiin levossa ennen RE:tä (pre) sekä välittömästi (post 0 min), 15 min, 30 min ja 48 h RE:n jälkeen. Lisäksi tutkimuksessa oli mukana kuusi kontrollihenkilöä (ikä 66,5 ± 7,1 vuotta), joilla ei ollut voimaharjoittelutaustaa ja jotka osallistuivat vain pre ja post 1h biopsiaan. Myostatiinin ja siihen liittyvien geenien (AcvrIIb, FLRG, p21, p27, Cdk2, MyoD ja myogeniini) mRNA-tasot määritettiin real-time RT-PCR:llä ja tulokset normalisoitiin GAPDH:n mRNA:n suhteen. Seerumin kokonaistestosteronin pitoisuus määritettiin kemilumenesenssimenetelmällä ja seerumin vapaan testosteronin pitoisuus kokonaistestosteronin ja kemiluminesenssimenetelmällä määritetyn SHBG:n pitoisuuksiin perustuvalla laskentakaavalla (Vermeulen ym. 1999). Lihaksen androgeenireseptorien (AR) proteiinitaso määritettiin Western Blot -menetelmällä.

Myostatiinin mRNA-taso laski merkitsevästi vain PLA:lla ($p \leq 0,05$). Puolestaan myostatiiniin sitoutuvan proteiinin FLRG:n sekä Cdk2:n mRNA-tasot nousivat merkitsevästi vain PROT:lla ($p \leq 0,05$). p21:n mRNA nousi tunti RE:n päättymisestä PLA:lla ($p \leq 0,05$) ja PROT:lla oli myös trendi nousulle ($p = 0,08$). Proteiinilla ei ollut vaikutusta RE:n jälkeisiin AcvrIIb:n, myogeniinin, MyoD:n tai p27:n muutoksiin ($p > 0,05$). Kontrollihenkilöillä ei kahden tunnin kontrollijakson aikana havaittu muutoksia missään tutkitussa mRNA-muuttujassa. Myostatiinin mRNA-taso post 48h korreloi negatiivisesti vapaan testosteronin post 30 min - post 48h muutoksen kanssa (yhdistetyllä ryhmällä $r = -0,720$ ja $p = 0,027$). Lisäksi myostatiinin mRNA:n absoluuttinen taso 48h RE:n jälkeen korreloi PROT:lla ja yhdistetyllä ryhmällä negatiivisesti AR-proteiinin absoluuttisten tasojen kanssa (post 1h yhdistetyllä ryhmällä $r = -0,633$ ja $p = 0,009$). Myostatiinin post 48h muutosprosentti korreloi puolestaan positiivisesti kokonaistestosteronin post 0 min - post 30 min keskiarvopitoisuuden kanssa korrelaation ollessa merkitsevä sekä PLA:lla että PROT:lla (yhdistetyllä ryhmällä $r = 0,694$ ja $p = 0,001$).

Tämä tutkimus osoitti, että proteiinin nauttiminen näyttää estävän voimaharjoituksen yhteydessä tapahtuvan myostatiinin mRNA:n ekspression laskun ikääntyneillä miehillä sekä lisäävän myostatiinin sitojaproteiinin FLRG:n ja solusyklin säätelyyn osallistuvan Cdk2:n ekspressiota 48 tuntia voimaharjoituksen jälkeen mitattuna. Lisäksi myostatiinin ekspressio voimaharjoituksen yhteydessä näyttää mahdollisesti olevan yhteydessä seerumin testosteronipitoisuuteen ja lihaksen AR-proteiinitasoon.

Avainsanat: myostatiini, androgeenit, satelliittisolut, Cdk2, p21, p27, FLRG, tyypin II aktiviinireseptori, voimaharjoitus, luurankolihas, proteiiniravinto

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ 1
SISÄLTÖ 2
SANASTO 5
1 JOHDANTO 7
2 GEENIEN ILMENTYMISEN PERUSTEET 9
2.1 Geenistä proteiiniksi 9
2.2 Geenien ilmentymisen säätely 10
3 PROTEIINIT JA FYYSINEN HARJOITTELU 13
3.1 Proteiinit ja aminohapot 13
3.1.1 Rakenne ja tehtävät 13
3.1.2 Pilkkominen ja imeytyminen 14
3.1.3 Aminohappojen sisäänotto luurankolihaksiin 15
3.2 Proteiinin tarve ja suositukset fyysisen harjoittelun yhteydessä 16
3.3 Proteiinivalmisteet - hera 18
3.3.1 Proteiinivalmisteet yleisesti 18
3.3.2 Heraproteiinit 18
4 SOLUJEN VIESTINVÄLITYS JA SOLUSYKLI 20
4.1 Solujen välinen signalointi 20
4.1.1 Solusignaloinnin mekanismit 20
4.1.2 Signaalimolekyylit – hormonit ja kasvutekijät 21
4.2 Solujen sisäiset signalointireitit 24
4.2.1 Solunsisäiset toisiolähetit 25
4.2.2 Fosfaattiryhmien siirto 26
4.3 Solusykli 26
5 LUURANKOLIHASTEN MASSAAN VAIKUTTAVAT SOLU- JA MOLEKYYLIBIOLOGISET TEKIJÄT 29
5.1 Luurankolihasten rakenteelliset tekijät 29
5.1.1 Luurankolihas ja sen rakenne yleisesti 29
5.1.2 Satelliittisolut 31
5.1.3 Lihasvoimaan ja tehoon liittyvät tekijät 32
5.2 Kasvutekijät ja hormonit 33
5.2.1 Myostatiini 33

5.2.2 IGF-I / MGF 39
5.2.3 Insuliini 41
5.2.4 Kasvuhormoni 41
5.2.5 Androgeenit - testosteroni 42
5.2.6 Kortisoli 43
5.3 Kasvustimuluksen havaitsemiseen liittyvät signalointireitit 44
5.3.1 Yhteenveto signalointireiteistä 44
5.3.2 Kalsineuriini-signalointi 46
5.3.3 Mekaanis-kemiallinen signaalinsiirto 46
5.4 Ikääntymiseen liittyvät tekijät - sarkopenia 47
6 VOIMAHARJOITUKSEN JA RAVINNON VAIKUTUS LUURANKOLIHASTEN PROTEIINIEN SYNTEESIIN JA HAJOAMISEEN 49
6.1 Ravinnon vaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen 49
6.2 Voimaharjoituksen vaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen 51
6.3 Voimaharjoituksen ja ravinnon yhteisvaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen 51
7 VOIMAHARJOITTELUN VAIKUTUKSET MYOSTATIININ ILMENTYMISEEN 53
8 VOIMAHARJOITUKSEN AKUUTIT VAIKUTUKSET MYOSTATIININ JA SOLUSYKLIN SÄÄTELYTEKIJÖIDEN ILMENTYMISEEN 55
8.1 Voimaharjoituksen vaikutukset myostatiiniin 56
8.2 Voimaharjoituksen vaikutukset solusyklin säätelytekijöihin 57
8.2.1 Myogeeniset säätelytekijät 57
8.2.2 Sykliinit, Cdk-proteiinit sekä sykliini-inhibiittorit 58
9 RAVINNON VAIKUTUKSET MYOSTATIINIIN JA SOLUSYKLIN SÄÄTELYTEKIJÖIHIN LEPOTILASSA TAI VOIMAHARJOITUKSEN YHTEYDESSÄ 59
9.1 Ravinnon vaikutukset myostatiiniin lepotilassa 59
9.2 Ravinnon vaikutukset solusykliä sääteleviin tekijöihin lepotilassa 60
9.3 Ravinnon vaikutukset myostatiiniin ja solusykliä sääteleviin tekijöihin voimaharjoituksen yhteydessä 61
10 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT 62
11 MENETELMÄT 65
11.1 Koehenkilöt 65
11.2 Koeasetelma 66
11.3 Aineiston keräys ja analysointi 67

11.4 Tilastolliset menetelmät 71
12 TULOKSET 72
12.1 Voima- ja ravintomuuttujat 72
12.2 Lihaksen mRNA-tasot 72
12.3 Korrelaatiokertoimet tutkittujen mRNA-tasojen välillä 75
12.4 Testosteronin ja AR-proteiinin muutokset ja korrelaatiokertoimet 76
12.5 Testosteronin ja AR-proteiinin korrelaatiokertoimet myostatiinin kanssa 80
12.6 Testosteronin ja AR-proteiinin korrelaatiokertoimet solusyklin säätelytekijöiden, FLRG:n ja AcvrIIb:n kanssa 83
13 POHDINTA 84
LÄHTEET 98
LIITE 1. MITATTUJEN mRNA-TASOJEN MUUTOKSET 119

SANASTO

AcvrII	= type II activin receptor = tyypin II aktiviinireseptori
Alavirta	= Alavirran puoleisella säätelytekijällä viitataan tarkastellun muuttujan aiheuttamaan signalointireittiin liittyvää säätelytekijää (downstream)
AMPK	= adenosiinimonofosfaatista riippuvainen proteiinikinaasi
APC	= anaphase-promoting complex = anafaasia edistävä kompleksi
Apoptoosi	= ohjelmoitu solukuolema
AR	= androgeenireseptori
ARE	= androgen response element = sitoutumiselementti androgeeneille
ATP	= adenosiinitrifosfaatti
DHT	= dihydrotestosteroni
DNA	= deoksiribonukleiinihappo
BCAA	= branched chain amino acids = haaraketjuiset aminohapot
bHLH	= beta helix-loop-helix = transkriptiotekijöihin liittyvä kierre-silmukka-kierre motiivi (osa), joka tunnistaa spesifisiä kohtia DNA:ssa ja sitoutuu niihin.
BMI	= body mass index = kehon painoindeksi = kehon paino (kg) suhteutettuna pituuden neliöön (m^2)
cAMP	= syklinen adenosiinimonofosfaatti
Cdk	= cyclin-dependent kinase = sykliinistä riippuvainen kinaasi
cGMP	= syklinen guanosiinimonofosfaatti
DAG	= diasyyliglyseroli
DHT	= dihydrotestosteroni
Ekspressio	= ilmentyminen
ERK1/2	= extracellular signal-regulated kinase ½
FLRG	= follistatin-related gene
GAPDH	= gyseraldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi
GDF-8	= growth and differentiating factor 8 = kasvu- ja erilaistumistekijä 8
GH	= growth hormone = kasvuhormoni
IGF-1	= insulin-like growth factor 1 = insuliinin kaltainen kasvutekijä 1
IP_3	= inositolitrifosfaatti
JNK	= c-Jun N-terminal protein kinase = c-Jun N-terminaalinen proteiinikinaasi
LAP	= latency-associated peptide = latenssipeptidi
LH	= lutenisoiva hormoni
MAPK	= mitogen-activated protein kinase = mitogeeni-aktivoitu proteiinikinaasi
mRNA	= messenger RNA = lähetti-RNA
mTOR*	= mammalian target of rapamycin
MGF	= mechano growth factor = mekaaninen kasvutekijä
MRF	= myogenic regulatory factor = myogeeninen säätelytekijä
Mstn	= myostatiini

MyHC	= myosin heavy chain = myosiini raskasketju
NFAT	= nuclear factor of activated T-cells = aktivoitujen T-solujen tumatekijä
NF-κB	= nuclear factor κB = tumatekijä κB
PI3K	= fosfatidyli-inositoli-3 kinaasi
PKB/AKT	= proteinikinaasi B / AKT (PKB = AKT)
PKC	= proteiinikinaasi C
PLA	= plaseboryhmä
Proliferaatio	= solun jakautuminen
PROT	= proteiiniryhmä
p38	= p38 stress-activated protein kinase = p38 stressi-aktivoitu proteiinikinaasi
Rb	= retinoblastooma
RDA	= recommended dietary allowance = päivittäinen ravinnon saantisuositus
rRNA	= ribosomaalinen RNA
shRNA*	= short interfering hairpin RNA
RE	= resistance exercise = voimaharjoitus
Real-time RT-PCR	= real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction = reaaliajassa toimiva käänteistranskriptaasi polymeraasiketjureaktio
RNA	= ribonukleiinihappo
TGF-β	= Transforming growth factor β = transformoiva kasvutekijä β
Testo	= testosteroni
Ylävirta	= Ylävirran puoleisella säätelytekijällä viitataan tarkastellun muuttujan signalointireitissä jo aiemmin vaikuttaneeseen tekijään (upstream)
1RM	= yhden toistosuorituksen maksimitulos

*Kaikille sanoille ei ole suomenkielistä vastinetta.

1 JOHDANTO

Jo vuonna 1807 on ensimmäisen kerran tehty dokumentointia nautakarjalaeläimistä, joilla on poikkeuksellisen suuret lihakset. Rotu, jonka niin sanottua kaksoislihaksikkuutta on tutkittu eniten, on belgialainen Belgian Blue -rotu, ja vajaa kaksisataa vuotta myöhemmin sitä koskevasta ensimmäisestä raportoinnista selvisi tarkka syykin, mikä johtaa sen suureen lihasmassaan. Syyn nimi on myostatiini. Vuonna 1997 julkaistu McPherronin tutkimusryhmän hiirillä tehty tutkimus (McPherron ym. 1997) varmisti, että myostatiinigeenin tuhoaminen aiheuttaa eläimelle noin 2–3-kertaisen painon normaaliin lajitoveriin verrattuna ja nousu pohjautuu merkittävään lihasmassan lisäykseen. Belgian Blue -rodulla lihasten suuren koon taustalla on mutaatio myostatiinigeenissä, jonka seurauksena myostatiini ei pysty välittämään biologisia toimintojaan. Vuoden 1997 jälkeen myostatiinia koskevia julkaisuja on tehty runsaasti ja erityisesti myostatiinin ja lihasmassan välistä yhteyttä on tarkasteltu eri näkökulmista. Viesti on selvä: myostatiini estää lihasmassan kasvua. Näyttää jopa siltä, että myostatiini on yksittäinen merkittävin lihasmassaan kokoon vaikuttava tekijä.

Myostatiinin vaikutuskohteisiin kuuluvat satelliittisolut, joiden toimintaa se estää (mm. Thomas ym. 2000; Ríos ym. 2001; McCroskery ym. 2003; Langley ym. 2002; Yang ym. 2007). Satelliittisoluja voidaan kutsua niin sanotuiksi lihaksen kantasoluiksi. Ne osallistuvat syntymän jälkeiseen lihasten kasvuun, vaurioiden korjaukseen ja lihaskudoksen ylläpitoon. Erityisen tärkeän satelliittisoluista tekee se, että ne vastaavat lihassolujen tumien lukumäärän lisäämisestä lihaskasvun yhteydessä, mikä näyttää olevan välttämätöntä lihaksen kasvun eli hypertrofian kannalta. Tumien lisäys edellyttää satelliittisolujen akivoitumista lepotilasta ja siirtymistä solusykliin sekä erilaistumista. Satelliittisolujen aktivoitumiseen myostatiini vaikuttaa vähentämällä tiettyjen solusyklin käynnistymiseen vaadittavien proteiinien toimintaa, kuten sykliini D1:n ja Cdk2:n, ja puolestaan lisäämällä solusykliä estävien säätelytekijöiden, kuten p21:n toimintaa. Satelliittisolujen erilaistumiseen myostatiini vaikuttaa estämällä myogeenisten säätelytekijöiden MyoD:n, myogeniinin ja Myf-5:n toimintaa.

Lihaksen kokoon vaikuttaa suuri määrä erilaisia säätelytekijöitä, jotka ovat vuorovaikutuksessa keskenään. Satelliittisolujen ohella merkittävin lihaksen kasvua edistävä tekijä näyttää olevan anaboliset prosessit, joita vaaditaan kasvua edellyttävien luurankolihasproteiinien muodostumiseen. Anabolisiin prosesseihin puolestaan vaikuttaa hormoneiden ohella ravinto sekä lihasten mekaaninen ärsytys, joka on seurausta esimerkiksi voimaharjoituksesta. Tutkimuksissa on selkeästi osoitettu, että aminohappojen nauttiminen voimaharjoituksen yhteydessä joko vapaassa muodossa (Børsheim ym. 2002; Miller ym. 2003; Tipton ym. 2003; Tipton ym. 1999) tai kokonaisina proteiineina (Tipton ym. 2004) lisää proteiinisynteesiä ja aiheuttaa positiivisen proteiinitasapainon (synteesiä tapahtuu enemmän kuin hajoamista). Erityisesti hera-/maitoproteiinien nauttiminen voimaharjoituksen jälkeen on osoittautunut kannattavaksi keinoksi lisätä lihaksen kasvua (Andersen ym. 2005; Burke ym. 2001) ja parantaa proteiinitasapainoa (Tipton ym. 2007). Kuitenkaan tarkat mekanismit, joiden kautta proteiiniravinnon vaikutukset välittyvät, eivät ole selvillä. Hormoneiden osalta muun muassa testosteronin (androgeenien) tiedetään parantavan lihasvoimaa ja lisäävän lihaksen kokoa, mutta tarkat mekanismit, joiden välityksellä androgeenien vaikutukset välittyvät, eivät nekään ole selvillä.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ennen voimaharjoitusta ja sen jälkeen nautitun heraproteiinin akuutteja vaikutuksia myostatiinin ja solusykliä säätelevien geenien ilmentymiseen sekä näiden mahdollista yhteyttä androgeeneihin ikääntyneillä miehillä. Tutkimus liittyy siinäkin mielessä tärkeään aiheeseen, että lihasmassan kokoon vaikuttavien säätelyreittien ymmärtäminen auttaa kehittämään entistä tehokkaampia hoitomuotoja esimerkiksi sairauden tai korkean iän vuoksi heikoista lihaksista kärsiville henkilöille.

2 GEENIEN ILMENTYMISEN PERUSTEET

2.1 Geenistä proteiiniksi

Geenin alkuperäinen merkitys on ollut geneettisen tiedon perusyksikkö, jonka mukana periytyy yksi havaittavissa oleva ominaisuus. Nykyään geeni mielletään DNA-juosteen jaksoksi, joka sisältää yhden tai useamman toiminnallisen biologisen yksikön valmistukseen tarvittavan informaation. Yleensä tämä toiminnallinen yksikkö on proteiini, mutta se voi myös olla RNA-molekyyli. Vielä vuonna 2000 ihmisellä arveltiin olevan noin 100 000 geeniä, mutta nykytietämyksen mukaan ihmisen geenien lukumääräksi arvioidaan noin 32 000. Ne jakautuvat 23 kromosomipariin eli yhteensä 46 kromosomiin, jotka löytyvät kaikista tumallisista soluista. Sana genomi viittaa solujen sisältämään geneettiseen informaatioon kokonaisuudessaan. (Nelson & COX 2000, 905–908, 1072,; Heino & Vuento 2004, 43; Mooren & Völker 2005, 42.)

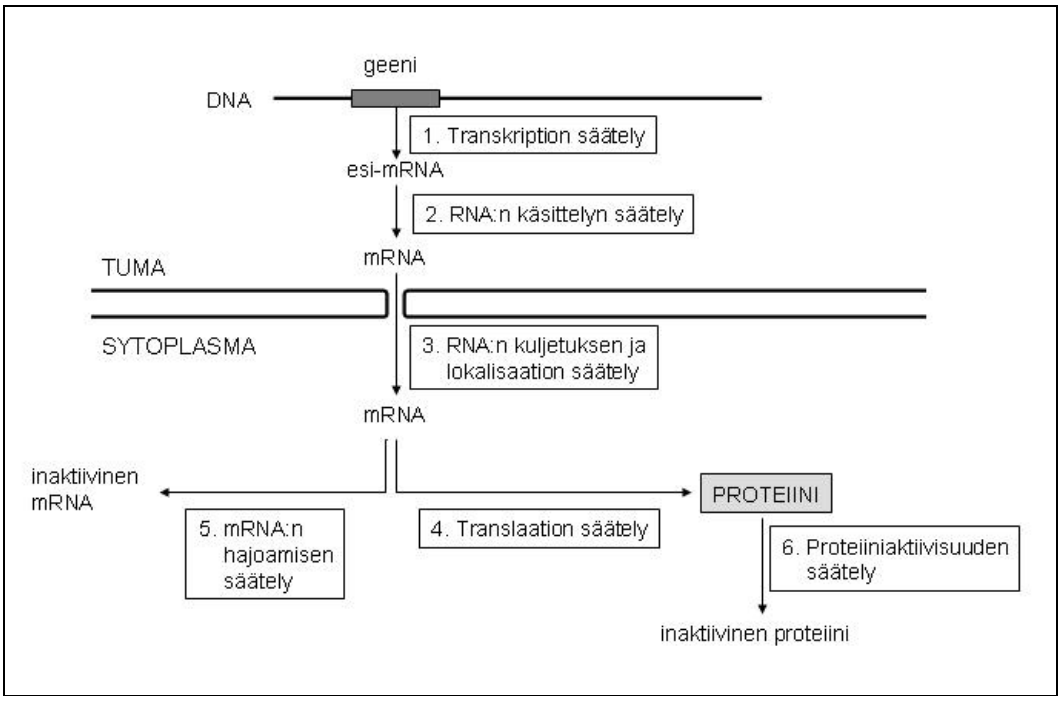
DNA (deoksiribonukleiinihappo) ja RNA (ribonukleiinihappo) koostuvat nukleotideistä, jotka sisältävät pentoosisokerin, fosfaattiryhmän ja emäksen. Emäksistä adeniini, tymiini ja guaniini löytyvät sekä DNA:sta että RNA:sta, kun puolestaan DNA:sta löytyvä tymiini on korvattu RNA:ssa urasiililla. Nukleotidit ovat liittyneenä toisiinsa fosfodiesterisidoksella muodostaen polymeerejä. Luonnollisessa muodossa oleva DNA sisältää kaksi komplementaarista juostetta. Nämä kaksijuosteiset DNA-molekyylit ovat helikaalisia, eli ne muodostavat kierreportaita muistuttavan rakenteen, jossa kierteen keskellä ovat juosteiden välille muodostuneet emäsparit ja kierteen laidoilla kovalenttiset sokeri-fosfaatti-sokeri-fosfaatti-vuorottelulla rakentuneet ketjut. (Lodish ym. 2004, 101–108; Heino & Vuento 2001, 40.)

Geenien ilmentyminen käynnistyy solun tumassa, jossa lähetti-RNA-molekyyli (mRNA), tai sen esiaste, syntyy DNA:n *transkriptiossa*, jossa DNA:n ohjaama RNA-polymeraasi muodostaa kyseistä geeniä koodaavalle DNA-säikeelle RNA-kopion. Tämä perustuu DNA:n ja RNA:n väliseen emäsparien muodostumiseen, minkä perusteella RNA-polymeraasi tietää, mikä nukleotidi sen täytyy seuraavaksi lisätä kasvavaan RNA-ketjuun. Ensiksi muodostuva mRNA, esi-mRNA, sisältää informaatiota DNA:n

koodaavien jaksojen eli eksonien lisäksi koodaamattomilta jaksoilta, introneilta. Intronit kuitenkin pilkotaan pois RNA:n *silmukoinniksi* kutsutussa tapahtumassa. Valmiit mRNA:t kuljetetaan sytoplasmaan ribosomeille, joissa siirtäjä-RNA-molekyylien (tRNA) avulla geneettinen koodi käännetään aminohappojärjestykseksi. Tässä mRNA:n ohjaamassa tapahtumassa eli *translaatiossa*, jossa aminohappoja liitetään toisiinsa, on siis kyse *proteiinisynteesistä*. Geeni puolestaan on täysin ilmentynyt, kun sen biologinen tuote on valmistunut ja aktiivinen. (Nelson & Cox 2000, 325, 1021, G-4; Heino & Vuento 2004, 43–45.)

2.2 Geenien ilmentymisen säätely

Solussa tyypillisesti ilmentyy vain murto-osa sen geeneistä, ja eri solutyypit muodostuvat monisoluisessa eliössä sen mukaan, mitkä geenit soluissa ilmentyvät. Solu reagoi ympäristössään tapahtuviin muutoksiin, kuten muista soluista saapuviin signaaleihin, minkä seurauksena geenien ilmentymistä voi muuttaa. Proteiinin valmistuminen solussa sisältää useita välivaiheita, joita kaikkia pystytään pääsääntöisesti säätelemään. (Alberts ym. 2002, 379.) Nämä välivaiheet ovat (kuvio 1):



KUVIO 1. Proteiinin valmistumisen säätely solussa (mukaeltu Alberts ym. 2002, 379).

1) *Transkription säätely* eli milloin ja kuinka usein tietyn geenin transkriptiota tapahtuu.

2) *RNA:n käsittelyn säätely* eli kuinka transkriptoitu RNA pilkotaan tai muulla tavoin käsitellään.

3) *RNA:n kuljetuksen ja lokalisaation säätely* eli valikoidaan, mitkä valmiit mRNA:t kuljetetaan solun tumasta sytosoliin ja päätetään, minne ne sytosolissa sijoitetaan.

4) *Translaation säätely* eli valikoidaan, mitkä mRNA:t sytoplasmassa ovat translaation kohteena.

5) *mRNA:n hajoamisen säätely* eli valikoidaan, mitkä sytoplasman mRNA-molekyyleistä muutetaan epästabiiliksi.

6) *Proteiiniaktiivisuuden säätely* eli aktivoidaan, inaktivoidaan, hajotetaan tai sijoitetaan tiettyjä proteiinimolekyylejä sen jälkeen, kun ne on valmistettu.

Useimmille geeneille transkription säätely on tärkein säätelyvaihe. (Alberts ym. 2002, 379.) Puolestaan translaation säätelyssä erityisesti initiaatiolla (aloituksella) on tärkeä asema. Initiaation tehokkuuden säätelyssä kaksi proteiinia ovat avainasemassa: eIF4E:hen (eucaryotic initiation factor 4E) sitoutuva proteiini 4E-BP sekä $p70^{S6K}$ (70 kDa ribosomaalinen proteiini S6 kinaasi tai S6K). (Mooren & Völker 2002, 59.)

Solun ulkopuolelta tulevien tai sen sisällä syntyvien viestien on usein muutettava geenien ilmentymistä, jotta haluttu vaikutus solun toimintaan voitaisiin saavuttaa. Geenin alkupäässä sijaitsevaa geenien säätelyyn osallistuvaa DNA-jaksoa kutsutaan promoottoriksi. Transkription säätely perustuu promoottoriin kiinnittyvien proteiinien yhteistoimintaan. Promoottorin ympärille kertyy suuri joukko perustranskriptiotekijöiksi kutsuttuja proteiineja ja lisäksi joukko muita transkriptioon osallistuvia tekijöitä. Tätä perustranskriptiotekijöiden yhdistymää kutsutaan transkription aloituskompleksiksi. Perustranskriptiotekijöiden toimintaan vaikuttavat kutakin geeniä säätelevät muut transkriptiotekijät. Ne voivat joko vaimentaa tai kiihdyttää mRNA:n synteesiä. Nämä transkriptiotekijät kiinnittyvät DNA:ssa vain tarkasti määrättyihin kohtiin, joiden

emäsjärjestyksen ne tunnistavat esimerkiksi erityisen kierre-silmukka-kierrerakenteen (helix-loop-helix) avulla. Näitä kohtia kutsutaan geenin luentaa lisääviksi (enhancer) tai vaimentaviksi (silencer) kohdiksi. Yksittäisen geenin säätelyyn osallistuu siis useita transkriptiotekijöitä, joista monet kuuluvat suuriin geeniperheisiin. mRNA:n transkriptionopeus määräytyy näiden tekijöiden yhteisvaikutuksesta. (Heino & Vuento 2004, 237–238.)

3 PROTEIINIT JA FYYSINEN HARJOITTELU

3.1 Proteiinit ja aminohapot

3.1.1 Rakenne ja tehtävät

Proteiinit ovat makromolekyylejä, jotka koostuvat aminohapoista. Aminohapot puolestaan ovat molekyylejä, jotka sisältävät aminoryhmän (-NH_2) ja karboksyyliryhmän (-COOH) kiinnittyneenä samaan hiiliatomiin, johon on kiinnittyneenä myös vety sekä kullekin aminohapolle ominainen sivuketju. Aminohapot liittyvät toisiinsa peptidisidoksella. Kun kaksi aminohappoa on liittyneenä toisiinsa, on kyse dipeptidistä, ja vastaavasti kolme toisiinsa liittynyttä aminohappoa muodostaa tripeptidin. Kun useita aminohappoja on liittyneenä toisiinsa, puhutaan polypeptidistä ja vasta kun aminohapot ovat muodostaneet vähintään noin sata aminohappoa sisältävän polypeptidiketjun, voidaan käyttää nimitystä proteiini. Valmis proteiini voi koostua useammastakin alayksiköstä, ja kaikilla proteiineilla on myös kolmiulotteinen rakenne, konformaatio, jota tukevat useat heikot ja vahvat vuorovaikutukset. (Nelson & Cox 2000, 115–129; Ganong 1999, 280.)

Proteiinit koostuvat yhteensä 20 mahdollisesta standardi aminohaposta ja niiden johdannaisista. Nimitystä standardi voidaan käyttää erottamaan standardi aminohapot vähemmän yleisistä aminohappojen johdannaisista, jotka ovat syntyneet proteiinisynteesin jälkeisessä modifioinnissa, sekä useista muista aminohapoista, joita löytyy elävästä organismista, mutta ei proteiineista. Aminohapot voidaan jaotella välttämättömiin ja ei-välttämättömiin aminohappoihin (taulukko 1 seuraavalla sivulla). Välttämättömiä aminohappoja elimistö ei pysty itse tuottamaan, ja niitä tulee saada säännöllisesti ravinnosta, kun puolestaan ei-välttämättömiä aminohappoja elimistö pystyy itse syntetisoimaan. (Nelson & Cox 2000, 115–129, 637.)

Taulukko 1. Välttämättömät ja ei-välttämättömät aminohapot (Nelson & Cox 2000, 637).

Välttämättömät aminohapot	**Ei-välttämättömät aminohapot**
Fenyylialaniini	Alaniini
Histidiini	Arginiini*
Isoleusiini	Asparagiini
Leusiini	Aspartaatti
Lysiini	Glutamaatti
Metioniini	Glutamiini
Treoniini	Glysiini
Typtofaani	Kysteiini
Valiini	Proliini
	Seriini
	Tyrosiini

* Arginiini on välttämätön aminohappo nuorilla kasvuikäisllä, mutta ei aikuisilla.

Elävä organismi on riippuvainen proteiineista, joilla on lukuisia eri tehtäviä elimistössä: entsymaattisia, rakenteellisia ja säätelytehtäviä. Proteiinit voivat toimia muun muassa kuljetustehtävissä, varastoinnissa, immuunipuolustuksessa ja hormoneina. (Mooren & Völker 2005, 55.) Aminohapot ovat myös mukana useissa tärkeissä aineenvaihdunnan tehtävissä proteiinisynteesin ja proteiinien hajoamisen lisäksi. Ne toimivat rakennusaineina monille muille biologisille yhdisteille kuten hermosolujen välittäjäaineille sekä fosfolipideille. (Pitkänen 2002.)

3.1.2 Pilkkominen ja imeytyminen

Ravinnosta saatujen proteiinien pilkkominen alkaa mahalaukussa pepsiinin vaikutuksesta. Pepsiini hydrolysoi tiettyjen aminohappojen välisiä sidoksia, minkä seurauksena saadaan monen mittaisia peptidiketjuja. Happamassa ympäristössä (optimi pH noin 1,6–3,2) toimivan pepsiinin vaikutus lakkaa, kun haimanesteet sekoittuvat mahalaukun sisältöön ohutsuolen duodenumissa (pohjukaissuolessa) ja pH nousee. Ohutsuolessa haimanesteen proteolyyttiset eli proteiineja hajottavat peptidaasientsyymit jatkavat edelleen peptidien pilkkomista. Lopputuotteina saadut di-, ja tripeptidit sekä vapaat aminohapot imeytyvät ohutsuolen limakalvon epiteelisoluihin eli enterosyytteihin. Imeytyminen on aktiivista eli energiaa vaativaa ja siitä vastaa ainakin seitsemän erilaista kuljetussysteemiä. Suurisivuketjuiset aminohapot, kuten haaraketjuiset aminohapot (BCAA), imeytyvät pienisivuketjuisia aminohappoja nopeammin ja vastaavasti välttämättömät aminohapot nopeammin kuin ei-välttämättömät aminohapot. Lisäksi neutraalien aminohappojen imeytyminen on

nopeampaa kuin varautuneiden aminohapojen (happamien tai emäksisten). Di- ja tripeptideille on oma kuljetussysteeminsä. (Ganong 1999, 451; Groff & Gropper 2000, 173–177.)

Enterosyyteistä verenkiertoon kuljetetaan di-, ja tripeptidejä sekä vapaita aminohappoja. Tästä kuljetuksesta vastaa ainakin viisi eri mekanismia (Ganong 1999, 451.) Aminohappojen konsentraatio veressä nousee välittömästi aterian jälkeen, mutta nousu on yleensä vain muutama mg/dl. Hidas nousu johtuu ensinnäkin siitä, että proteiinien pilkkominen ja imeytyminen kestää yleensä 2–3 tuntia, jolloin vain pieni määrä aminohappoja voi imeytyä kerrallaan. Toiseksi verenkiertoon kulkeutuneet ylimääräiset aminohapot imeytyvät 5–10 minuutin kuluessa soluihin ympäri kehoa, erityisesti maksasoluihin. Tämän vuoksi suuria määriä aminohappoja ei miltei koskaan keräänny vereen tai kudosnesteisiin. Silti aminohappojen vaihtuvuus on niin nopeaa, että useita grammoja proteiineja voidaan kuljettaa kehon toisesta osasta toiseen aminohappojen välityksellä joka tunti. (Guyton & Hall 2000, 791–792.)

3.1.3 Aminohappojen sisäänotto luurankolihaksiin

Aminohappomolekyylit ovat liian suurikokoisia kulkeutumaan suoraan solujen sisään solukalvon läpäisevien kanavien kautta. Tämän vuoksi ne kulkeutuvat soluihin fasilitoidun tai aktiivisen kuljetusmekanismin avulla. Aminohappojen kulkeutumista soluun stimuloivat insuliini sekä kasvuhormoni. (Guyton & Hall 2000, 792–795.) Glutamaatti ja haaraketjuiset aminohapot (branched chain amino acids, BCAA), eli leusiini, isoleusiini ja valiini, käsittävät yhdessä yli 90 % luurankolihakseen otetuista aminohapoista. Lihaksessa niiden hiilirunkoja käytetään glutamiinin *de novo* -synteesiin. Lihaksen proteiineista 19 % on BCAA:ta ja 7 % glutamiinia. (Wagenmakers 2001, 123–124.)

Proteiinin määrä 70 kg painavalla miehellä on noin 12 kg ja vapaiden aminohappojen määrä (vapaa aminohappoallas) noin 200–220 g. Proteiinien ja vapaiden aminohappojen määrät ovat jatkuvan muutoksen kohteina, sillä proteiinien synteesiä ja hajoamista tapahtuu koko ajan. Luurankolihaksen kokonaismassasta noin 40–45 % on proteiinia, mikä 70-kiloisella miehellä vastaa noin 7 kg:aa. Pääasiassa nämä proteiinit ovat

myofibrillaarisia eli lihassupistukseen osallistuvia proteiineja. Noin 120 g vapaista aminohapoista on solunsisäisesti luurankolihaksessa, kun vain noin 5 g on verenkierrossa. (Wagenmakers 2001, 119.)

3.2 Proteiinin tarve ja suositukset fyysisen harjoittelun yhteydessä

Valtion ravitsemusneuvottelukunnan suositusten (2005) mukaan tavallisen ihmisen tulisi saada proteiineja päivän kokonaisenergiasta 10–20 % väestötason tavoitteen ollessa 15 %. Jos energiansaanti on hyvin vähäistä (< 6,5 MJ/vrk), suositellaan päivittäiseksi proteiinin saanniksi 15–20 %. Yleensä proteiinin tarvetta tai suosituksia arvioidessa on kuitenkin järkevämpää suhteuttaa proteiinin saanti kehon massaan eikä kokonaisenergiansaantiin. Yhdysvalloissa Institute of Medicinen suositusten mukaan päivittäinen proteiinin tarve normaaliväestölle on 0,8 g/kg (Food and Nutrition Board 2004). Nämä suositukset on kuitenkin tehty nimenomaan normaaliväestölle, eivätkä ne välttämättä sovi urheilijalle (Manninen 2002, 35).

Lihasten maksimaalinen hypertrofia on alle 0,5 kg viikossa. Oletuksena on, että 20 % tästä painon muutoksesta on proteiinia, jolloin kehon lihasten maksimaalinen proteiinin lisääntyminen on alle 15 g päivässä. Tämä viittaa siihen, että lisäproteiinin tarve lihashypertrofiaan on minimaalinen. (Layman 2000.) Kuitenkin päivittäinen kehon proteiinien vaihtuvuus 70 kg:n painoisella miehellä on tutkimusten mukaan keskimäärin noin 300 grammaa vuorokaudessa, mikä maksimoi kehon potentiaalin uusiutua ja korjata rakennettaan (Wagenmakers 1999). Proteiinien päivittäinen varastoituminen lihasproteiiniksi on siis pientä, mutta toisaalta proteiinien vaihtuvuus on suurta, mikä tekee vaikeaksi arvioida optimaalista proteiinien saantia (Layman 2002). Kuitenkin näyttää siltä, että alle 10 grammaa aminohappoja on jo riittävä määrä stimuloimaan proteiinisynteesiä sekä levossa että harjoituksen yhteydessä (Rennie ym. 2004).

Koko kehon typpitasapainon tarkasteleminen on ollut tyypillinen tapa tutkia proteiinimetabolian muutoksia. Koko kehon proteiinimetabolian mittaaminen ei kuitenkaan anna niin yksityiskohtaista tietoa kuin yksittäisten proteiinien mittaaminen. Koko kehon proteiinimetaboliassa heijastuu kaikkien elinten ja kudosten keskiarvo ja

eri elimillä ja kudoksilla on hyvinkin yksilöllinen proteiiniaineenvaihdunta. Nykyään tutkimus on painottunut entistä tarkempien menetelmien ansiosta yksittäisten proteiinien tarkasteluun. (Short & Nair 2000.) Yleisesti käytetään mittausta, jossa lihasbiopsian, laskimo-valtimo -katetroinnin sekä merkatun aminohapon infuusion avulla saadaan selvitetyksi juuri tietyn lihaksen proteiinimetabolia (Nair ym. 1988).

Proteiinin tarpeeseen vaikuttavat kokonaisenergiansaanti, liikunnan intensiteetti, kesto ja muoto, ravinnon proteiinin laatu, harjoittelutausta, sukupuoli, ikä ja ruokailun ajoitus (Lemon 2000). Liikuntasuorituksen aikaisesta energiantuotosta keskimäärin 3–6 % saadaan proteiineista (Maughan & Burke 2002, 28). Yleisesti ottaen lisääntynyt liikunnan intensiteetti ja kesto lisäävät myös proteiinin käyttöä energiaksi (Hargreaves & Snow 2001; Lemon 2000). Miehillä tehtyjen typpitasapainoon perustuvien tutkimusten perusteella on arvioitu, että voimaharjoittelijoilla proteiinin tarve on noin 100 % suurempaa ja kestävyysliikuntaa harrastavilla noin 50–75 % suurempaa verrattuna normaaliväestöön. RDA-arvoina ilmaistuna kyseiset suositukset voimaharjoittelijoille ovat siis 1,6–1,4 g/kg ja kestävyysurheilijoille 1,2–1,4 g/kg. (Lemon 2000.) Voimaharjoittelijoilla lisäys perustuu lisääntyneeseen proteiinisynteesiin ja suuren lihasmassan ylläpitoon, kun puolestaan kestävyysurheilijoilla lisäys perustuu osin lisääntyneeseen proteiinin käyttöön energiaksi ja osin lihaskudoksen ylläpitoon (Tarnopolsky ym. 1992).

Eläinkokeiden perusteella liian alhainen sekä selvästi liian suuri proteiininsaanti heikentää immuunitoimintaa (Venkatraman & Pendegrast 2002). Suuri proteiinin saanti myös lisää kehon happamuutta ja siten voi heikentää akuutisti suorituskykyä, jos hyvin proteiinipitoista ravintoa nautitaan harjoitusta edeltävinä päivinä ja erityisesti jos samaan aikaan hiilihydraattien saanti on vähäistä (Maughan ym. 1997). Tutkimuksissa on lisäksi havaittu, että proteiinin saanti korreloi negatiivisesti veren testosteronipitoisuuksien kanssa, mikä osaltaan viittaa siihen, etteivät suuret määrät proteiinia ole suositeltavia urheilijoille. Tosin negatiivinen korrelaatio saattaa myös viitata testosteronin reseptorisitoutumisen lisääntymiseen. (Sallinen ym. 2004; Volek ym. 1997.) Toisaalta kuitenkin proteiinin aiheuttama kylläisyyden tunne on suuri (Hall ym. 2003) ja proteiinilla tiedetään olevan suuri terminen vaikutus (Lambert ym. 2004). Laihdutuksen aikana runsas proteiinin saanti näyttääkin olevan hyödyksi vähentämällä kehon rasvan määrää ja ylläpitämällä rasvatonta kehon painoa verrattuna normaaliin

proteiinin saantiin (Piatti ym. 1994). Lisäksi runsas proteiinin saanti näyttää edesauttavan painonhallintaa laihdutuksen jälkeen (Westerterp-Plantenga ym. 2004).

3.3 Proteiinivalmisteet - hera

3.3.1 Proteiinivalmisteet yleisesti

Proteiinivalmisteita löytyy pääsääntöisesti kolmessa muodossa: 1) kokonaiset proteiinit, joihin lukeutuvat esimerkiksi maidon kaseiini ja polypeptidiketjut yleisesti, 2) proteiinihydrolysaatit, jotka koostuvat di- ja tripeptideistä sekä vapaista aminohapoista sekä 3) vapaat aminohapot (Colgan 1993, 159). Tässäkin tutkimuksessa käytetty heraproteiini kuuluu maitoproteiineihin, jotka voidaan kokonaisuudessaan jaotella 1) kokomaitoproteiineihin, 2) heraproteiineihin, 3) kaseiineihin tai kaseinaatteihin ja 4) ternimaitovalmisteisiin (Hoffman & Falvo 2004). Markkinoilla olevia proteiineja on saatavilla proteiinijauheina (proteiinia 30–100 %), patukoina (noin 25 g proteiinia/patukka), valmiina juomina, tabletteina ja kapseleina (Manninen 2002, 67).

Urheilijoiden keskuudessa yleisesti käytössä olevia proteiinivalmisteita ovat muun muassa hera, kaseiini (kaseinaatti), ternimaitovalmisteet, soija ja yksittäiset aminohapot sekä niiden yhdistelmät. Lisäksi valmisteiden välillä on eroa valmistustavan suhteen. Erilaiset valmistustekniikat vaikuttavat muun muassa tuotteen sisältämän proteiinin määrään, kuinka hyvin kokonaiset proteiinit ovat säilyneet ja kuinka paljon tuote sisältää suojaravintoaineita, rasvaa, laktoosia ja tuhkaa. Markkinoilla on saatavissa sekä proteiinikonsentraatteja, -hydrolysaatteja että isolaatteja. (Hoffman & Falvo 2004.)

3.3.2 Heraproteiinit

Hera on sekoitus useita eri proteiineja ja peptidejä, joita ovat muun muassa α-laktalbumiini, β-laktoglobuliini, immunoglobuliinit, lysotsyymi, laktoferriini, laktoperoksidaasientsyymi, glykomakropeptidit, laktoosi ja mineraalit. Nimitys heraproteiini tai hera tarkoittaa siis yleensä useita eri heraproteiineja. (Marshall 2004.) Maidon proteiineista noin 20 % on heraa ja 80 % kaseiinia (Hoffman & Falvo 2004).

Heran proteiineilla ja peptideillä on monia terveydelle edullisia vaikutuksia mm. immuniteetin, painonhallinnan sekä oksidatiivisten vaurioiden ehkäisyn suhteen (Ha & Zemel 2003).

Heran välttämättömien aminohappojen pitoisuus on suuri (Walzem ym. 2002) ja lisäksi heran aminohapot imeytyvät ja hyödynnetään tehokkaasti verrattuna esimerkiksi kaseiiniin tai kaseiinin sisältöa vastaavaan vapaita aminohappoja sisältävään liuokseen (Daenzer ym. 2001). Verrattuna muihin proteiinilähteisiin herassa on myös suuri pitoisuus haaraketjuisia aminohappoja eli leusiinia, isoleusiinia ja valiinia, jotka ovat eriyisen tärkeitä tekijöitä kudoksen kasvussa ja korjauksessa (Marshall 2004). Leusiini erityisesti on keskeinen tekijä proteiinisynteesin translaation initiaatiossa (Anthony ym. 2001). Heraa pidetäänkin yleisesti parhaimpana proteiinilähteenä sen aminohappokoostumuksen, sekoituksen helppouden, pysyvyyden nesteenä, maun, ja nopean imeytymisen vuoksi (Manninen 2002, 70).

4 SOLUJEN VIESTINVÄLITYS JA SOLUSYKLI

Monisoluisen eliön kehitys yksisoluisesta nykypäivän bakteeria muistuttavasta organismista kesti fossiilitutkimusten perusteella noin 2,5 miljardia vuotta. Yhdeksi syyksi tähän hitaaseen kehitykseen arvellaan tarkkojen solujen välisten kommunikointimekanismien kehittämisen vaikeutta. Nämä mekanismit ovat pitkälti riippuvaisia ekstrasellulaarisista (solun ulkopuolisista) signaalimolekyyleistä, joita solut tuottavat välittääkseen viestiä naapurisoluille tai kauempana sijaitseville soluille. Solujen välinen kommunikointi on siis seurausta pitkällisestä kehityksestä ja sisältää yleensä seuraavat vaiheet: signalointimolekyylin (1) synteesi ja (2) eritys viestiä välittävästä solusta; (3) signaalin kuljetus kohdesoluun; (4) signalointimolekyylin sitoutuminen spesifiin reseptoriproteiiniin, joka aktivoituu; (5) aktivoidun reseptorin aiheuttama yhden tai useamman signaali-transduktioreitin (signaalin etenemisreitin) käynnistys; (6) spesifit muutokset solun toiminnassa, metaboliassa ja kehityksessä; ja (7) signaalin poistaminen, joka usein lopettaa soluvasteen. (Alberts ym. 2002, 831; Lodish ym. 2004, 534.)

Tässä kappaleessa käsitellään tämän työn kannalta keskeisiä solujen toimintaan liittyviä tapahtumia ja tekijöitä yleisellä tasolla. Ensiksi tarkastellaan solujen välistä signalointia, minkä jälkeen siirrytään solujen sisäisiin signalointimekanismeihin ja lopuksi käydään solusyklin perusperiaatteet läpi.

4.1 Solujen välinen signalointi

4.1.1 Solusignaloinnin mekanismit

Ihmisellä solujen, kudosten ja elinten välistä tiedonsiirtoa koordinoivat säätelyjärjestelmät voidaan jakaa endokriiniseen, parakriiniseen ja autokriiniseen säätelyyn. *Endokriininen järjestelmä* tuottaa umpirauhasissa hormoneita eli biokemiallisia viestiaineita verenkiertoon, jonka välityksellä ne vaikuttavat hyvin etäälläkin sijaitseviin kohdesoluihinsa. *Parakriinisessa* erityksessä viestiaine säätelee

viereisten solujen toimintaa, kun puolestaan *autokriinisessa* erityksessä solu säätelee solukalvon reseptorien kautta omaa toimintaansa. Kehon toimintaa sääteleviin järjestelmiin kuuluvat myös neuraalinen (spesifi muoto parakriinisesta säätelystä) ja neuroendokriininen (spesifi muoto endokriinisesta säätelystä) säätely. *Neuraalisessa* säätelyssä hermosolu erittää paikallisesti hermoston välittäjäaineita, kun puolestaan *neuroendokriinisessa* säätelyssä hermosolu erittää viestiaineita verenkiertoon. Solujen välinen viestintä voi tapahtua myös suoran fyysisen kontaktin avulla ja solujen välille voi muodostua liitoksia solukalvot läpäisevän kanavan kautta. (Guyton & Hall 2000, 836; Heino & Vuento 2004, 223.)

Endokriininen järjestelmä ja hermosto koordinoivat solujen käyttäytymistä, ja koska endokriininen järjestelmä on riippuvainen diffuusiosta ja veren virtauksesta, on säätely suhteellisen hidasta. Yleensäkin ekstrasellulaaristen signaalien aiheuttamien vasteiden nopeus riippuu mekanismista, jolla signaalia välitetään sekä siitä, minkä tyyppisestä vasteesta on kyse. Jos kyse on pelkästään jo solussa sijaitsevien proteiinien muuntelusta, voi vaste tapahtua sekunneissa tai jopa millisekunneissa. Jos kyse on geenien ilmentymisen muutoksista ja uusien proteiinien valmistuksesta, kestää vasteen havaitsemisessa yleensä vähintään tunteja riippumatta signaalin välittymistavasta. (Alberts ym 2002, 835.)

4.1.2 Signaalimolekyylit – hormonit ja kasvutekijät

Solujen erittämät signaalimolekyylit voivat olla rakenteeltaan muun muassa proteiineja, pieniä peptidejä, aminohappoja, nukleotidejä, steroideja, rasvahapon johdannaisia tai liuenneita kaasuja kuten typpioksidi. Tarkalleen ottaen nimityksellä *hormoni* tarkoitettiin ennen pelkästään endokriinisesti vaikuttavaa viestiainetta, mutta nykyään merkitys on laajentunut käsittämään myös muilla tavoin (parakriinisesti, autokriinisesti ja solun sisäisesti) vaikuttavia viestiaineita. Kuitenkin paikallisesti vaikuttavista välittäjäaineista käytetään solubiologiassa yleisesti termiä *kasvutekijä* (growth factor) ja kyseistä ilmaisua käytetään myös tässä työssä. Lähinnä immunologisessa tutkimustyössä löytyneitä välittäjäaineita kutsutaan *sytokiineiksi*. Kasvutekijän ja sytokiinin välinen ero kertookin enemmän välittäjäaineen löytöhistoriasta kuin toimintatavasta tai muista ominaisuuksista. On silti huomattava, että raja endokriinisesti ja parakriinisesti vaikuttavien tekijöiden välillä ei ole jyrkkä ja eräillä kasvutekijöillä on

myös endokriinisiä vaikutustapoja. (Alberts ym. 2002, 832; Borer 2003, 1; Heino & Vuento 2004, 223–224.)

Hormonit

Elimistön useilla hormonisysteemeillä on hyvin merkityksellinen rooli monien elintoimintojen säätelyssä mukaan lukien aineenvaihdunta, kasvu ja kehitys, vesi- ja elektrolyyttitasapaino, lisääntyminen ja käyttäytyminen. Kemiallisen luonteensa perusteella hormonit voidaan jaotella kolmeen pääryhmään: (1) proteiinit ja polypeptidit, joita eritetään aivolisäkkeen etu- ja takalohkosta, haimasta, lisäkilpirauhasesta sekä useista muista paikoista ja joihin lukeutuvat insuliini ja glukagoni; (2) steroidit, joita eritetään lisämunuaisten kuorikerroksessa, munasarjoissa, kiveksissä sekä kohdussa ja joihin lukeutuvat testosteroni ja kortisoli; ja (3) aminohappo tyrosiinin johdannaiset, joita eritetään kilpirauhasesta sekä lisämunuaisen ydinkerroksesta ja joihin lukeutuvat tyroksiini ja trijodityroniini. (Guyton & Hall, 836.)

Suurin osa kehon hormoneista on polypeptidejä ja proteiineja. Ne syntetisoidaan solulimakalvostossa yleensä ensin suurempina proteiineina, jotka eivät ole biologisesti aktiivisia (*preprohormoneina*), minkä jälkeen ne pilkotaan pienemmiksi *prohormoneiksi*. Nämä puolestaan kuljetetaan Golgin laitteeseen, jossa ne varastoidaan eritysvesikkeleihin ja pilkotaan aktiivisiksi hormoneiksi. Vesikkelit varastoidaan syto-plasmassa ja usein ne ovat kiinnittyneenä solukalvoon, kunnes niiden eritystä tarvitaan. Steroidihormonit syntetisoidaan umpierityssoluissa yleensä kolesterolista, eikä niitä säilötä. Koska ne ovat hyvin rasvaliukoisia, ne läpäisevät valmistumisensa jälkeen solukalvon ja päätyvät verenkiertoon. Tosin hyvin pieniä määriä steroidihormonia saatetaan varastoida, mutta sitä erittävässä solussa on puolestaan suuret varastot kolesterolia, joka voidaan mobilisoida nopeasti steroidisynteesiin stimulaation seurauksena. Hormonien eritykseen johtava stimulaatio voi olla hormonaalinen, neuraalinen tai metabolinen. (Guyton & Hall, 837.)

Endokriiniselle järjestelmälle on tyypillistä palautesäätely. Vaikka hormoneiden pitoisuudet plasmassa saattavat vaihdella paljonkin päivän mittaan, niiden eritys on silti tarkkaan säädeltyä. Useimmiten pitoisuutta säädellään negatiivisen palautteen kautta, jossa lisääntynyt hormonin pitoisuus inhiboi sen jatkoeritystä. Joissain tapauksissa hormonien pitoisuutta säädellään positiivisen palautteen kautta, jolloin puolestaan

hormonin biologinen aktiivisuus lisää hormonin erittymistä. (Guyton & Hall 2000, 839.) Hormonien synteesiä ja eritystä säätelee paljon myös muut hormonit. Lisäksi hormonin määrää säädellään translaation jälkeisellä hormonin modifioinnilla, jossa eritetty inaktiivinen hormoni muutetaan aktiiviseen muotoon. Toisaalta biologisesti aktiivinen hormoni voidaan myös muuttaa joissain kudoksissa muiksi viestimolekyyleiksi, kuten testosteroni estrogeeniksi. (Borer 2003, 9–12.)

Hormoneiden pitoisuudet veressä ovat hyvin pieniä, yleensä noin 10^{-9}–10^{-12} mol/l. Hormoneita eritetään yleensä jaksottaisesti, ja hormonin biologinen vaikutus voi olla jopa päinvastainen, kun sitä eritetään jatkuvasti. Useimmat proteiini-, peptidi- ja amiinihormonit ovat veteen liukenevia ja ne kiertävät veressä liuenneena plasmaan. Kasvuhormoni, steroidihormonit ja kilpirauhashormoni kiertävät veressä pääasiassa sitoutuneena kuljetusproteiineihin (yleensä yli 90 prosenttisesti), ja pieni osa (yleensä alle 10 prosenttia) niistä puolestaan kiertää vapaana ja biologisesti aktiivisena. Yleisimmin kuljetusproteiineina toimivat erilaiset globuliinit ja albumiini. Hormonien kuljetus sitoutuneessa muodossa pidentää niiden vaikutusaikaa, mutta toisaalta myös jotkut sitojaproteiinit saattavat helpottaa proteiinin sitoutumista reseptoriinsa. (Borer 2003, 12–13; Guyton & Hall 2000, 839–840.)

Kasvutekijät

Kasvutekijät vaikuttavat nimensä mukaisesti solun kasvuun sekä jakautumiseen (proliferaatioon) ja erilaistumiseen. Rakenteeltaan ne ovat proteiineja ja syntetisoinnin, erityksen sekä veressä kuljetuksen suhteen niihin pätevät pääosin samat tekijät kuin proteiini- ja peptidihormoneille on edellä kuvattu. Jotkut kasvutekijät vaikuttavat tiettyihin soluihin stimuloimalla niiden jakautumista, kun taas toisiin soluihin ne vaikuttavat inhiboiden (estäen) jakautumista. Puolestaan jotkut kasvutekijät voivat stimuloida jakautumista tietyssä konsentraatiossa ja inhiboida toisessa. Useilla kasvutekijöillä vaikutustapa riippuu siis olosuhteista ja solutyypistä. (Alberts ym. 2002, 1015.)

Kasvutekijät säätelevät toistensa ilmentymistä ja toistensa reseptorien ilmentymistä ja siten vaikuttavat muiden kasvutekijöiden vaikutusmahdollisuuksiin. Tietyt hormonit voivat myös toimia kasvutekijöiden säätelyssä (mm. Yang ym. 2007; Liu ym. 2003) ja tätä aihealuetta koskeva tutkimus tuokin kokoajan lisää tietoa. Yksittäisten

kasvutekijöiden vaikutusta voi olla vaikea eritellä yhteisvaikutuksesta ja usein puhutaankin kasvutekijäverkostosta. Toisaalta poistogeenisten hiirien tutkimus on osoittanut, että useilla kasvutekijöillä on tarkasti rajoitettuja vaikutuksia, joissa ne eivät ole korvattavissa muilla kasvutekijöillä. Kasvutekijöiden pitoisuus paikallisina välittäjäaineina on tyypillisesti 10^{-9}–10^{-11} mol/l. Kasvutekijöiden aiheuttamat vasteet tapahtuvat yleensä tuntien kuluessa ja usein tarvitaan monien solunsisäisten signalointireittien aktivoitumista, mikä lopulta johtaa muutokseen geenien ilmentymisessä. (Heino & Vuento 2004, 227–228; Alberts ym. 2002, 871.)

4.2 Solujen sisäiset signalointireitit

Signaalimolekyylin sitoutuminen reseptoriinsa aktivoi solunsisäiset viestinvälitysmekanismit. Tiedonsiirron tarkoituksena on vaikuttaa solun toimintaan, ja usein se edellyttää geenien ilmentymisen uudelleensäätelyä. Reseptorien aktivoituminen aiheuttaa siis solun tumassa geenien transkriptiota säätelevien proteiinien aktivoitumisen. (Heino & Vuento 2004, 224.) Useimmissa tapauksissa reseptori sijaitsee solukalvolla, mutta se voi myös sijaita solun sisällä sytoplasmassa tai tumassa. Jos reseptori sijaitsee solun sisällä, täytyy signaalimolekyylin olla riittävän pieni tai hydrofobinen (vettä hylkivä) läpäistäkseen solukalvon. Proteiinien ja polypeptidien reseptorit sijaitsevat yleensä solukalvolla, kun puolestaan steroidien reseptorit sijaitsevat solun sisällä sytoplasmassa tai tumassa. (Alberts ym 2002, 833; Guyton & Hall 2000, 840.) Reseptorisitoutumisen aiheuttamat solunsisäiset signaalit välittyvät erilaisilla nopeuksilla. Välittömiä tai nopeita vasteita ovat esimerkiksi ionikanavien avautuminen tai fosfaattiryhmien siirtäminen. Hitaammat tai viiveellä tapahtuvat vasteet liittyvät yleensä transkriptioon, josta on esimerkkinä reseptorien ekspression lisääminen. (Mooren & Völker 2005, 130.) Tähtäimenä on solutoimintojen tai fenotyypin (ilmiasun) pitkäaikainen adaptaatio (Berridge 1997).

Solunsisäiset signaalikaskadit eli vesiputousmaisesti etenevät signaalinsiirtoreitit koostuvat useista proteiineista, jotka toimivat pääperiaatteiltaan kahdella tavalla: (1) entsyymeinä tuottaen solunsisäisiä toisiolähettejä tai (2) aktivoivien fosfaattiryhmien luovuttajina tai vastaanottajina. Proteiinien reversiibeli fosforyloiminen edustaa

merkittävää toimintamekanismia, jolla välittäjäaineen sitoutuminen reseptoriin muutetaan soluvasteeksi. Solunsisäinen signalointi mahdollistaa saapuvan signaalin muuntelun vahvistuksen, herkkyyden ja hajaantumisen osalta. Ligandin sitoutuminen reseptoriin aiheuttaa solussa yleensä useiden signalointireittien aktivoitumisen, jotka voivat olla vuorovaikutuksessa keskenään. Tästä käytetään termiä ”cross-talk”. (Mooren & Völker 2005, 130.)

4.2.1 Solunsisäiset toisiolähetit

Solunsisäinen tiedonsiirto tapahtuu usein proteiinien välityksellä, mutta viestin eteenpäin viemiseen osallistuvat myös eräät pienet toisioläheteiksi kutsutut molekyylit. Ne muodostuvat tai aktivoituvat ligandin sitoutuessa reseptoriinsa ja toimivat signaalin vahvistajina. Yleisimpiin toisiolähetteihin kuuluvat: syklinen adenosiinimonofosfaatti (cAMP), syklinen guanosiinmonofosfaatti (cGMP), diasyyliglyseroli (DAG), inositolitrifosfaatti (IP_3) ja kalsiumioni (Heino & Vuento 2004, 224; Mooren & Völker 2005, 130.)

Esimerkiksi IP_3 säätelee solunsisäisen kalsiumin vapauttamista. Sen muodostuessa vapautuu solun sisällä toinen toisiolähetti, diasyyliglyseroli (DAG), joka aktivoi suoraan proteiinikinaasi C:tä (PKC). IP_3-signalointi on osallisena useiden hormonien, kasvutekijöiden ja hermoston välittäjäaineiden aiheuttamissa vasteissa. Kalsiumin rooli solunsisäisenä toisiolähettinä perustuu sen säätelyyn nanomolaarisella tasolla. Muutokset solunsisäisessä kalsiumkonsentraatiossa voivat aiheuttaa monenlaisia soluvasteita mukaan lukien solunjakautuminen, liikkuvuus, sytokiinien erittyminen ja muutokset geenien ilmentymisessä. Kalsiumin aiheuttamat muutokset vaikuttavat myös apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman säätelyyn. (Mooren & Völker, 134.) Ca^{2+}:n signalointireiteissä tärkeitä tekijöitä ovat kalsiumia sitova proteiini kalmoduliini ja seriini/treoniini-kinaasi kalsineuriini, jotka puolestaan aktivoivat transkriptiotekijä NFAT:ia (nuclear factor of activated T-cells). (Mooren & Völker 2005, 131–134.) Aihetta käsitellään lisää vielä kappaleessa 5.3.2.

4.2.2 Fosfaattiryhmien siirto

Aminohappojen sivuketjujen fosforyloiminen kinaasien avulla on pääasiallisin entsyymiaktiivisuuksia ja solunsisäisiä signaalinetenemisreittejä säätelevä mekanismi. Fosforylaatio on dynaaminen ja reversiibeli tasapainoprosessi, jonka tasoa tasapainottavat tietyt fosfataasit, jotka ovat vastuussa joko seriini/treoniini- tai tyrosiinitähteiden defosforylaatiosta. Signaalin etenemisen tehokkuuden kannalta on tärkeää, että kinaasien ja fosfataasien toiminta on hyvin integroitu ja koordinoitu. Yleisiä kinaaseja ja fosfataaseja ovat proteiinikinaasi C, proteiini seriini/treoniini fosfataasi, proteiini tyrosiinikinaasi, proteiini tyrosiinifosfataasi, pienet GTPaasit / Ras-proteiinit sekä MAP-kinaasit (Mooren & Völker 2005, 134)

Esimerkkinä mainittakoon MAP-kinaasit (mitogen-activated protein kinases). Ne ovat hyvin tärkeitä geenien transkription ja aineenvaihdunnan säätelijöitä, jotka aktivoituvat luurankolihakseen kohdistuvan oksidatiivisen, energeettisen tai mekaanisen stressin seurauksena (Kramer & Goodyear 2007). Yleisesti ottaen niiden toiminta voidaan yhdistää kasvuun ja erilaistumiseen (Roux & Blenis 2004). Erilaisia MAP-kinaaseja on löydetty yli 20 ja ne muodostavat superperheen, jonka jäsenet voidaan luokitella neljään eri ryhmään: (1) ERK 1 ja 2 (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2), (2) p38 MAPK (3) JNK (c-Jun NH2-terminal kinases) ja (4) ERK5 tai BMK (big MAP kinase). (Kramer & Goodyear 2007; Mooren & Völker 2005.)

4.3 Solusykli

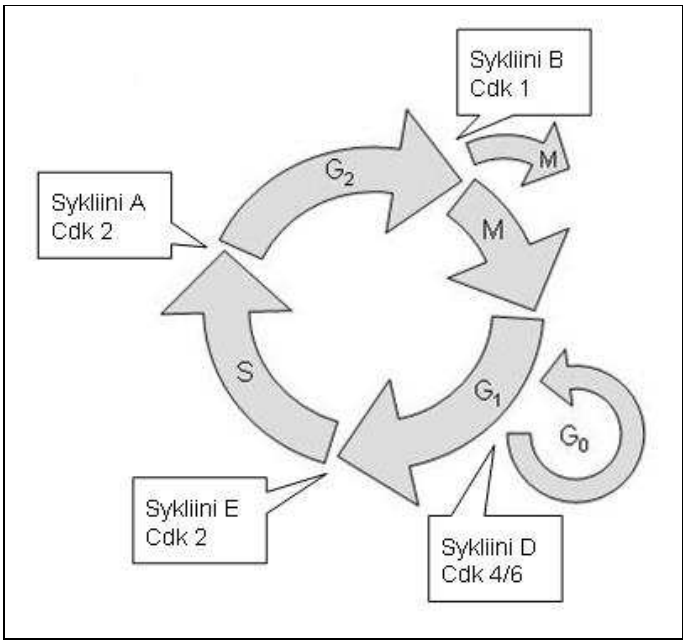
Solusyklillä tarkoitetaan intervallia kahden onnistuneen solunjakautumisen (mitoosin) välillä, minkä seurauksena saadaan kaksi tytärsolua. Solusyklin perustehtävä onkin kahdentaa (replikoida) solun kromosomien DNA ja erottaa kopiot kahdeksi tarkalleen samanlaiseksi tytärsoluksi. DNA:n kahdentuminen tapahtuu S-vaiheessa (S sanasta *s*ynteesi), jota seuraa kromosomien erottelu ja solunjakautuminen eli M-vaihe (M sanasta *m*itoosi). Useimmat solut, kuten ihmisenkin solut, tarvitsevat kuitenkin paljon enemmän aikaa kasvaa ja kaksinkertaistaa niiden proteiinien ja soluorganellien massa kuin mitä DNA:n kahdentuminen ja solunjakautuminen vaativat. Osittain tästä syystä

solunjakautumiseen kuuluu ylimääräiset välivaiheet: G_1-vaihe (G sanasta *g*ap) M-vaiheen ja S-vaiheen välissä sekä G_2-vaihe S-vaiheen ja M-vaiheen välissä. (Alberts ym. 2002, 985.)

Välivaiheiden merkitys solulle ei ole pelkästään lisäajan antaminen kasvuun. Ne antavat solulle myös lisää aikaa tarkkailla sen sisäistä ja ulkoista ympäristöä ja varmistua, että olosuhteet ovat sopivat sekä tarvittavat valmistelut on saatettu loppuun ennen kuin solu siirtyy peruuttamattomasti S- tai M-vaiheeseen. G_1-vaihe on tässä mielessä erityisen tärkeä. Sen pituus voi vaihdella suuresti riippuen ympäristön olosuhteista sekä muista soluista saapuvista signaaleista. Jos solun ulkopuoliset olosuhteet ovat epäsuotuisat, solut viivyttävät siirtymistä G_1-vaiheesta eteenpäin, ja ne voivat myös asettua ikään kuin solusyklin ulkopuolelle, eli ne siirtyvät lepotilaan, jossa ne eivät valmistaudu seuraavaan solunjakautumiseen. Tätä tilaa kutsutaan G_0-vaiheeksi. (Alberts ym. 2002, 985–986.)

Sykliinit säätelevät solusyklin vaiheita

Sykliinit ovat proteiineja, joilla on keskeinen asema solusyklin läpiviemisessä. Eri sykliinit ilmentyvät vain tietyssä vaiheessa solusykliä. Tällöin ne aikaansaavat muutoksen juuri halutussa solusyklin vaiheessa. Samalla ne aktivoivat seuraavassa vaiheessa tarvittavat proteiinit ja myös oman tuhoutumisensa. Sykliinit säätelevät solun toimintaa sitoutumalla Cdk-proteiineihin (cyclin-dependent kinase), joiden aktiivisuus nousee ja laskee solusyklin edetessä. Sykliset muutokset sykliinitasoissa aiheuttavat kullekin vaiheelle tyypillisten sykliini/Cdk-yhdistymien muodostumisen, mikä puolestaan toimii sykäyksenä solusyklin etenemiselle. Solusyklin säätely tapahtuu pääperiaatteiltaan siis fosforyloimalla solun proteiineja ja siten ohjaamalla niiden toimintaa. Kuviossa 2 (seuraavalla sivulla) on esitetty solusykli sekä siihen vaikuttavia sykliinejä ja Cdk-proteiineja. (Alberts ym. 2002, 993; Heino & Vuento 2004, 251.)



KUVIO 2. Yksinkertaistettu esitys solusyklistä sekä siihen vaikuttavista sykliineistä ja Cdk-proteiineista (mukaeltu Mooren & Völker 2005).

Tutkimukset ovat osoittaneet, että sykliinin sitoutuminen Cdk-proteiiniin paljastaa Cdk:n aktiivisen kohdan, mikä osittain aktivoi Cdk:n. Kuitenkin täysi aktivaatio tapahtuu vasta, kun sykliini/Cdk-yhdistymä aktivoidaan erillisellä CAK-kinaasilla (Cdk-activating kinase). Yhdistymän toimintaa puolestaan estävät solysyklin inhibiittoriproteiinit, CIK:t (Cdk inhibitos). Niitä ovat muun muassa p16, p21 ja p27, jotka toimivat G_1- ja S-vaiheissa. Ne ovat solusyklin keskeisiä säätelytekijöitä, jotka välittävät solunjakautumista estäviä viestejä ja muun muassa TGF-β:n vaikutusta solusykliin. Lisäksi muun muassa p21 edistää solujen erilaistumisen aloitusta. Solusyklin säätelyssä hyvin merkityksellisiä ovat myös entsyymikompleksit SCF ja APC, jotka aiheuttavat spesifisten solusyklin säätelytekijöiden proteolyysin (hajoamisen) ubikitiinin välityksellä, mikä puolestaan panee alulle useita kriittisiä tapahtumia solusyklissä. (Alberts ym. 2002, 994–995; Heino & Vuento 2004, 251; Malumbres ym. 2000.)

5 LUURANKOLIHASTEN MASSAAN VAIKUTTAVAT SOLU- JA MOLEKYYLIBIOLOGISET TEKIJÄT

In vitro ja *in vivo* -tutkimukset viittaavat siihen, että nisäkkäiden luurankolihasten kasvuun eli hypertrofiaan vaikuttaa merkityksellisimmin kaksi erillistä säätelyprosessia. Ensimmäinen on anaboliset prosessit, jotka ovat välttämättömiä lihassolujen (myofiber) kasvuun vaadittavien proteiinien muodostumiseen. Toinen puolestaan käsittää satelliittisolujen proliferaation, mikä näyttää olevan välttämätöntä kasvavien lihassolujen tumien lukumäärän lisäämiseen. (Allen ym., 1995; Rosenblatt ym. 1994; Salleo ym. 1983; Schiaffino ym. 1972; Schiaffino ym. 1976; Snow 1990.) Lurankolihasten massa määräytyy lopulta anabolisten (hypertrofiaan vaikuttavien) ja katabolisten (atrofiaan vaikuttavien) prosessien yhteisvaikutuksesta. Näiden prosessien osalta tämä kappale käsittelee olennaisimpien solu- ja molekyylibiologisten tekijöiden mekanismit ja vaikutukset. Ravinnon ja voimaharjoituksen vaikutuksia anabolisiin ja katabolisiin prosesseihin proteiinien synteesin ja hajoamisen osalta käsitellään vielä kappaleessa 6.

Yleisesti ottaen luurankolihaksen massaan vaikuttavat tekijät käsittää suuren määrän erilaisia säätelytekijöitä, jotka toimivat vuorovaikutuksessa keskenään. Iso osa kyseisistä säätelytekijöistä on varmasti vielä selvittämättäkin. Viimeaikainen kehitys solu- ja molekyylibiologisissa menetelmissä on kuitenkin vauhdittanut luurankolihaksen massan säätelyn ymmärtämistä.

5.1 Luurankolihasten rakenteelliset tekijät

5.1.1 Luurankolihas ja sen rakenne yleisesti

Luurankolihas on hyvin muuntautumiskykyistä kudosta. Se pystyy muuttamaan sen toiminnallisia, rakenteellisia ja metabolisia ominaisuuksia vasteena neuromuskulaarisen aktiivisuuden määrän ja toimintatavan muutoksiin eli vasteena aktivaatiolle ja/tai kuormitukselle (Roy ym. 1991). Kaikkiaan luurankolihakseen kohdistuviin muutoksiin

vaikuttavat mekaaniset, hormonaaliset ja ravitsemukselliset tekijät (Harridge 2007) ja näistä muutoksista käytetään yleisesti termiä *adaptoituminen*, eli lihas sopeutuu suoriutumaan sen tyyppisestä fyysisestä aktiivisuudesta, jota siltä vaaditaan (Goldspink & Harridge 2003). Esimerkiksi voimaharjoittelun seurauksena tapahtuu normaalisti lihassolujen hypertrofiaa sekä voiman kasvua, kun taas kestävyysharjoittelu tyypillisesti lisää mitokondrioiden ja kapillaarien tiheyttä lihaksessa vaikuttaen joko vähän tai ei ollenkaan lihaksen kokoon (MacDougall 2003). Puolestaan jos lihasta ei kuormiteta normaalisti esimerkiksi pitkittyneen vuodelevon tai immobilisaation takia, tapahtuu lihaksen atrofiaa (lihaksen poikkipinta-ala pienenee) ja muun muassa sitä kautta myös heikkenemistä. Kuormituksen tai käyttämättömyyden vaikutukset kohdistuvat spesifisesti niihin lihaksiin, joita muutos koskee. (Harridge 2007.)

Valmis luurankolihas koostuu lihasfiibereistä eli lihassoluista tai -syistä, jotka ovat hyvin isoja ja monitumaisia soluja. Halkaisijaltaan ne ovat noin 20–100 μm ja pituudeltaan ulottuvat usein koko lihaksen päästä päähän. Lihassolut koostuvat sauvamaisista supistuvista komponenteista, myofibrilleistä, jotka ovat halkaisijaltaan noin 1–2 μm, ja joita ympäröi sarkoplasminen kalvosto. Myofibrillit koostuvat proteiinifilamenteista, jotka ovat järjestäytyneet sarkomeereiksi kutsuttuihin yksikköihin. Sarkomeerit puolestaan muodostuvat useista proteiineista, jotka ovat mukana joko suoraan lihassupistukessa tai sitten rakenteellisina proteiineina. Kaksi merkittävintä lihassupistukseen osallistuvaa proteiinia ovat aktiini ja myosiini. Lihassupistuksen aikana aktiini- ja myosiinifilamenttien välille muodostuu poikittaissiltoja ja filamentit liukuvat lomittain, mikä vaatii energiaksi ATP:tä. (Goldspink & Harridge 2003; Nelson & Cox 2000, 235.)

Myosiinin raskasketjut, MyHC

Kuten jo todettiin, myosiini on lihaksen supistuvan komponentin keskeinen rakenneproteiini, joka toimii myös entsyyminä vapauttamalla ATP:stä energiaa lihassupistusta varten. Lihassolujen nopeus ja hitaus perustuvat myosiinin kapasiteettiin pilkkoa ATP:tä. Myosiinin ominaisuuksiin vaikuttavat sen kuusi alayksikköä, joista kaksi on niin kutsuttuja raskasketjuja (MyHC). (Nelson & Cox 2000, 233–238.) Aikuisen ihmisen luurankolihaksessa ilmentyy kolmea erilaista MyHC:tä: MyHC-I, MyHC-IIa ja MyHC-IIx. Lihassolut, joissa ilmentyy MyHC-I:tä, ovat hitaimpia. MyHC-IIa solut voivat olla kolmekin kertaa nopeampia kuin MyHC-I:tä ilmentävät

solut, ja puolestaan MyHC-IIx solut ovat näistä kaikkein nopeimpia. Lisäksi eläimillä ilmentyy IIb-tyypin MyHC:tä, joka vastaa ihmisen IIx-tyyppiä, mutta on vielä nopeampi. (Goldspink & Harridge 2003.) Osa ihmisen lihassoluista ilmentää useampaa kuin yhtä MyHC:n muotoa eli on niin sanotusti hybridisoituja (Putman ym. 2004). Lihassolujen MyHC-koostumus on kuitenkin tärkein lihassolun supistuksen ominaisuuksiin vaikuttava tekijä (Talmadge 2000).

5.1.2 Satelliittisolut

Satelliittisolut ovat lihaksen kantasoluja, jotka ovat osittain vastuussa syntymän jälkeisestä lihasten kasvusta, vaurioiden korjauksesta ja lihaskudoksen ylläpidosta. Ne vastaavat lihassolujen tumien lukumäärän lisäämisestä lihaskasvun yhteydessä sekä lihassolujen uusiutumisesta vaurioiden korjauksen yhteydessä. Satelliittisolut sijaitsevat lihassolujen ulkopinnalla tyvikalvon ja sarkolemman välissä. Normaalisti satelliittisolut ovat lepotilassa, eivätkä tällöin ole mitoottisesti aktiivisia. Kuormituksen tai lihasvaurion yhteydessä ne aktivoituvat ja siirtyvät solusykliin eli läpikäyvät useita solunjakautumisia. Näitä solunjakautumisen seurauksena syntyneitä tytärsoluja kutsutaan myogeenisiksi prekursorisoluiksi tai myoblasteiksi, jotka puolestaan läpikäyvät solunjakautumisia, minkä jälkeen ne voivat sulautua lihassoluihin. Satelliittisolut myös uusivat itseään, ja aktivoidun satelliittisolun erilaistumista ja sijoittumista säätelevätkin useat tekijät. (Seale & Rudnicki 2000; O'Connor & Pavlath 2007.)

Myogeeniset säätelytekijät

Myogeeniset säätelytekijät (myogenic regulatory factors, MRFs) ovat MyoD-perheeseen kuuluvia bHLH transkriptiotekijöitä, jotka ohjaavat satelliittisolujen aktivointia ja erilaistumista. Primaariset MRF:t MyoD ja Myf5 vastaavat myoblastien erilaistumisvaiheeseen siirtymisestä ja lihassoluihin liittymisestä, kun taas sekundääriset MRF:t myogeniini ja MRF4 vastaavat myoblastien lopullisesta erilaistumisesta. Lepotilassa olevissa satelliittisoluissa ei ole havaittu MRF:ien ekspressiota. Lihasvaurion yhteydessä MyoD:n ekspressio satelliittisoluissa lisääntyy nopeasti (12 tunnin kuluessa) ja myogeniinin ekspression lisääntyminen tapahtuu puolestaan viimeisenä. (Seale & Rudnicki 2000; Raue ym. 2006.) MyoD:tä ja myogeniiniä on

myös paikallistettu jo olemassa olevien lihassolujen tumista, joissa ne oletettavasti edesauttavat hypertrofisia vasteita (Ishido ym. 2004).

5.1.3 Lihasvoimaan ja tehoon liittyvät tekijät

Lihasvoiman määrityksenä voidaan pitää maksimivoimaa, jonka lihas pystyy tuottamaan yksittäisen isometrisen tai dynaamisen lihassupistuksen aikana. Lihasvoima on läheisessä yhteydessä siihen, kuinka paljon poikittaissiltoja pystyy työskentelemään yhtäaikaisesti, joten maksimivoima voidaan kohtuullisen hyvin ennustaa lihaksen poikkipinta-alan perusteella. Lihasteho puolestaan on riippuvainen nopeudesta, eli teho määräytyy voiman ja nopeuden vuorovaikutuksen perusteella. Lihaksen poikkipinta-alan kasvaminen on siis myös merkittävä adaptaatio lihastehon lisääntymiselle. (Goldspink & Harridge 2003.)

Voimaharjoittelu kasvattaa kaikkien lihassolutyyppien poikkipinta-alaa luurankolihaksessa, mutta useimmat tutkimukset viittaavat kuitenkin siihen, että tyypin II lihassoluissa tapahtuu suhteellisesti eniten hypertrofiaa (MacDougall 2003.) Poikkipinta-alan kasvu on seurausta 1) aktiini- ja myosiinifilamenttien lukumäärän lisäyksestä sekä 2) sarkomeerien lukumäärän lisäyksestä (Goldspink & Harridge 2003; MacDougall ym. 1979). Luurankolihasten hypertrofian määrityksenä onkin lihassolujen poikkipinta-alan ja massan kasvaminen sekä myofibrillaaristen proteiinien määrän lisääntyminen (O'Connor & Pavlath 2007). Paljon on käyty keskustelua, onko lihaksen kasvu seurausta lihassolujen hypertrofian lisäksi myös lihassolujen lukumäärän lisääntymisestä eli hyperplasiasta. Ihmisillä hyperplasiaa ei ole pystytty todistamaan menetelmällisten vaikeuksien vuoksi, mutta joissain eläintutkimuksissa harjoittelun seurauksena tapahtuneesta hyperplasiasta on näyttöä (Fleck & Kraemer 2004, 83).

5.2 Kasvutekijät ja hormonit

5.2.1 Myostatiini

Myostatiini, toiselta nimeltään GDF-8 (growth and differentiation factor 8), on TGF-β (transforming growth factor-β) superperheen jäsen, joka löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1997. Tässä hiirillä tehdyssä tutkimuksessa myostatiinigeenin tuhoamisen seurauksena aikuisilla yksilöillä havaittiin olevan huomattavasti enemmän lihasmassaa kuin normaalin myostatiinigeenin omaavilla lajitovereillaan ja ne painoivat 2–3 kertaa enemmän. Tämä antoi vahvoja viitteitä siitä, että myostatiini toimii luurankolihaksen kasvun negatiivisena säätelijänä. (McPherron ym. 1997.) Viallisesti toimivan myostatiinin ja lihasmassan kasvun välinen yhteys on tullut esiin myös muilla lajeilla ja erityisen selvästi tietyillä nautakarjalajikkeilla, kuten Belgian Blue ja Piedmontese, joilla on havaittu poikkeuksellisen suuret lihakset (double-muscled) yhdistettynä mutaatioon myostatiinigeenissä (Kambadur ym. 1997; McPherron & Lee 1997). Myös ihmislapsella on raportoitu olevan poikkeuksellisen suuri lihasmassa yhdistettynä myostatiinigeenin mutaatioon (Schuelke ym. 2004).

Toisin kuin useimmat TGF-β/GDF -perheen jäsenet, joiden ekspressiota tapahtuu yhtäläisesti useissa eri kudostyypeissä, myostatiinia ekspressoituu erityisesti kehitysvaiheessa olevissa luurankolihassoluissa alkion- ja sikiönkehityksen aikana sekä luurankolihassoluissa syntymän jälkeen (McPherron ym. 1997; Gonzalez-Cadavid ym. 1998). Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa nopeissa IIb-tyypin lihassoluissa on havaittu enemmän myostatiinin ekspressiota kuin hitaissa lihassoluissa, mikä viittaa siihen, että myostatiinia muodostuu spesifisesti nopeissa lihassoluissa (Carlson ym. 1999). Myostatiinin ekspressiota on havaittu alhaisia määriä myös sydänlihaksessa, maitorauhasissa sekä rasvakudoksessa ja myostatiinin biologinen toiminta saattaakin ulottua laajemmalle kuin tähän mennessä on saatu selville (Morissette ym. 2006; Sharma ym. 1999; Ji ym. 1998). Myostatiinin ekspressio ja aktiivisuus saattavat olla osallisina myös metabolisten häiriöiden, kuten tyypin II diabeteksen, lihavuuden ja lihasdystrofian, kehittymisessä (Gonzalez-Cadavid & Bashin 2004).

Rakenne, eritys ja sitojaproteiinit

Myostatiinin rakenteessa on löydettävissä kaikki TGF-β superperheen tunnusmerkit. Näitä ovat signaalisekvenssi eritykselle, proteolyyttinen prosessointikohta ja karboksi-terminaalinen (C-terminaalinen) alue, joka sisältää yhdeksän kysteiinitähdettä. Tämä kysteiinisolmu onkin olennainen osa TGF-β perheeseen kuuluvan molekyylin toimintaa. Myostatiini syntetisoidaan 376 aminohapon prekursoriproteiinina (käytetään myös nimitystä pro-myostatiini), joka sisältää signaalisekvenssin, N-terminaalisen propeptidiosan ja C-terminaalisen osan, joka on molekyylin aktiivinen osa. (McPherron ym. 1997.) Jotta syntetisoitu myostatiini saadaan biologisesti aktiiviseen muotoonsa, se käy läpi proteolyyttisen prosessoinnin. Siitä oletettavasti vastaa pro-proteiinikonvertaaseihin (PC) kuuluva seriiniproteaasi nimeltään furiini (Lee & McPherron 2001). Signaalisekvenssin poistamisen ja entsymaattisen pilkkomisen seurauksena saadaan N-terminaalinen propeptidi (latenssipeptidi, LAP) sekä C-terminaalinen valmis myostatiini (mature myostatin). Eläinkokeiden perusteella valmis myostatiini esiintyy dimeerinä, jossa disulfidisilta yhdistää kahta myostatiinin C-terminaalista osaa. Tämä prosessoitu myostatiinidimeeri on proteiinin ainut biologisesti aktiivinen muoto. (Thomas ym. 2000.)

Myostatiini eritetään verenkiertoon inaktiivisena latenttina kompleksina eli valmis myostatiini on sitoutuneena myostatiinin propeptidiin (Lee & McPherron 2001). Seerumissa suurin osa myostatiinista (yli 70 %) onkin ilmeisesti tässä sitoutuneessa muodossa (Hill ym. 2002). Myös muutamat muut proteiinit seerumissa pystyvät sitoutumaan myostatiiniin ja estämään sen välittämät vaikutukset. Näitä ovat ainakin follistatiini (Zimmers ym. 2002; Amthor ym. 2004), FLRG (follistatin-related gene) (Hill ym. 2002) sekä GASP-1 (growth and differentiation factor associated protein-1) (Hill ym. 2003). Solun sisällä myostatiiniin sitoutuvia proteiineja ovat puolestaan titiini (titin cap) ja hSGT (human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) (Nicholas ym. 2002; Wang ym. 2003). Ekstrasellulaarisessa matriksissa myostatiinin on havaittu sitoutuvan dekoriini-nimiseen (decorin) proteoglykaaniin, joka siten ilmeisestikin osallistuu myostatiinin aktiivisuuden säätelyyn (Miura ym. 2006). Hiljattain julkaistun tutkimuksen mukaan myostatiini esiintyy ekstrasellulaarisessa matriksissa pro-myostatiinimuodossa (pilkkomattomassa muodossa), ja näyttääkin siltä, että se muodostaa suurimman osan lihaksen myostatiinista. Kyseisen myostatiinialtaan

aktivoiminen furiinilla näyttää siis olevan merkittävä säätelykohde luurankolihaksen myostatiinin aktivoimiselle. (Anderson ym. 2008.)

Myostatiiniin sitoutuvista proteiineista follistatiinin yliekspression on todettu lisäävän hyvin merkittävästi lihasmassaa transgeenisillä hiirillä (Lee & McPherron 2001). Aivan hiljattain julkaistussa tutkimuksessa (Lee 2007) selvitettiin, onko tämä follistatiinin hypertrofinen vaikutus seurausta yksinomaan myostatiiniaktiivisuuden inhiboimisesta. Selvisi, että hiirillä, jotka olivat homotsygootteja myostatiinimutaation suhteen ($Mstn^{-/-}$) ja joilla oli myös follistatiinin siirtogeeni, oli jopa neljä kertaa suurempi lihasmassa kuin villityypeillä lajitovereillaan. Tärkeää löydöksessä oli se, että kyseisten hiirien lihasmassa oli vielä huomattavasti suurempi kuin $Mstn^{-/-}$ hiirien, joilla ei ollut follistatiinin siirtogeeniä. Tämä viittaa vahvasti siihen, että on olemassa myös muita myostatiinin kaltaisia lihasmassan säätelijöitä. Toinen merkittävä löydös tutkimuksessa oli, että suurin lihasmassan kasvu tapahtui jälkeläisillä, joiden äiti oli homotsygoottinen myostatiinin mutaation suhteen, eli homotsygootin äidin jälkeläisillä oli suurempi lihasmassa kuin heterotsygootin äidin jälkeläisillä. Tämä puolestaan viittaa siihen, että joko myostatiini itsessään tai jokin sen alavirranpuoleinen säätelytekijä saattaa normaalisti siirtyä äidistä sikiöön verenkierron tai äidinmaidon välityksellä. (Lee 2007.)

Ilmentymisen säätely

Myostatiinin ilmentymiseen vaikuttavia tarkkoja mekanismeja ymmärretään vielä aika heikosti, mutta yhä enemmän tutkimuksissa on saatu näyttöä mahdollisista vaikutusmekanismeista. Myostatiiniekspression säätely näyttää riippuvan merkittävistä kasvuun vaikuttavista tekijöistä, sillä myostatiinigeenin promoottorista on löydetty potentiaalisia sitoutumiskohtia glukokortikoideille, androgeeneille, kilpirauhashormoni-reseptoreille, MyoD1:lle (MyoD:lle), MEF2:lle, PPARγ:lle ja NF-κB:lle. (Ma ym. 2001) Tutkimuksissa glukokortikoidien onkin todettu lisäävän myostatiinin ekspressiota (Ma ym. 2003) ja puolestaan androgeenien vaikuttavan negatiivisesti myostatiinin mRNA- ja proteiinitasoon lihaksessa (Mendler ym. 2007; Kwalda ym. 2006). Lisäksi myostatiinin on todettu olevan kalsineuriinisignaloinnin alavirranpuoleinen säätelykohde (Michel ym. 2004).

Vaikka Mendler ym. (2007) sekä Kwalda ym. (2006) havaitsivat androgeenien ja myostatiinin välisen yhteyden, ovat tutkimustulokset olleet ristiriitaisia. Marcellin ym.

(2001) vanhoja miehiä koskevassa tutkimuksessa myostatiinin ja androgeenireseptorin mRNA:iden välillä ei ollut korrelaatiota, kuten ei myöskään verenkierron testosteronin ja myostatiinin mRNA:n välillä. Myöskään lampailla tehdyssä tutkimuksessa androgeenireseptorien ja myostatiinin mRNA:iden välillä ei ollut yhteyttä (Mateescu & Thonney 2002). Silti uroshiirien lihaksien prosessoidun myostatiiniproteiinin pitoisuuden on todettu olevan pienempi kuin naarashiirien, mikä tukee androgeenien negatiivista vaikutusta myostatiiniin (McMahon ym. 2003). Androgeeneilla saattaa myös olla joitain muitakin vaikutuksia myostatiinin signalointiin, sillä kudoskohtainen myostatiinin yliekspressio on aiheuttanut atrofiaa miespuolisilla, mutta ei naispuolisilla yksilöillä (Reisz-Porszasz ym. 2003)

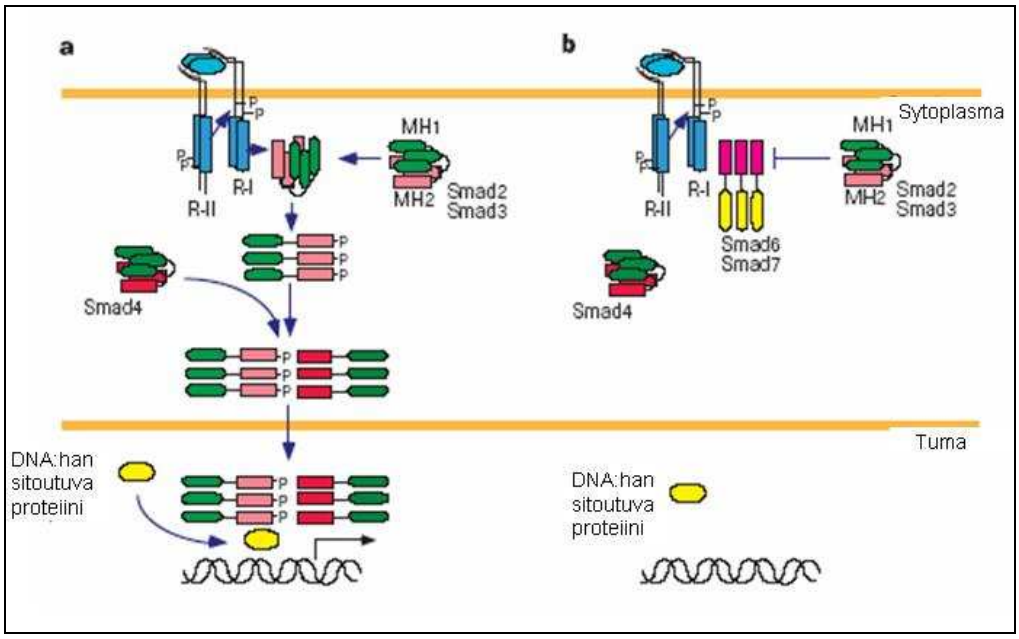
Hiljattain julkaistussa tutkimuksessa (Yang ym. 2007) on saatu näyttöä siitä, että myostatiini toimisi vuorovaikutuksessa IGF-1:n kanssa. C2C12-solujen käsittely IGF-1:llä vähensi myostatiinin ehkäisevää vaikutuksia solunjakautumiseen, ja lisäksi kun IGF-1:n signalointia vähennettiin ja soluja käsiteltiin myostatiinilla, kävivät solut läpi pikemminkin apoptoosin eli solukuoleman kuin solusyklin pysähdyksen. Tämä antaa ehdottaa IGF-1:llä olevan suojeleva vaikutus myostatiinille altistuneille soluille. (Yang ym. 2007.) IGF-1:n tiedetään toimivan kasvutekijänä edesauttaen luurankolihaksen kehitystä. Kuitenkin, koska elinten kokoa säädellään tarkasti, on oletuksena, että solunsisäisiä eri solutyypeille spesifisiä mitoosin inhibiittoreita, joita on kutsuttu chaloneiksi, on olemassa. Yangin ym. (2007) tutkimustulokset viittaavatkin siihen, että myostatiini saattaa olla erilaisten kasvua edistävien tekijöiden, kuten IGF-I:n, stimuloimana toimiva chaloni, jota tuotetaan paikallisesti luurankolihassoluissa ja joka rajoittaa luurankolihaksen kasvua negatiivisen palautesäätelyn kaltaisesti. Kuitenkin koska myostatiinin ja glukokortikoidien välillä näyttää myös olevan yhteys (Ma ym. 2003), olisi parempi puhua pikemminkin myostatiinin ja kasvuun vaikuttavien tekijöiden yhteydestä.

Liun ym. (2003) tutkimustulokset antavat viitteitä siitä, että myostatiini on merkittävä kohde kasvuhormonin aiheuttamille anabolisille vaikutuksille luurankolihaksessa (Liu ym. 2003), mikä myös tukee IGF-1:n ja myostatiinin välistä yhteyttä. Tosin eräässä toisessa tutkimuksessa (Brill ym. 2002) kasvuhormonin antaminen terveille ikääntyneille miehille ei aiheuttanut muutoksia myostatiinin mRNA-pitoisuudessa. Myostatiinin roolia kasvuhormonin vaikutusten välittäjänä tukee silti tutkimus, jossa

kasvuhormonireseptorin mRNA-pitoisuus korreloi negatiivisesti myostatiinin mRNA-pitoisuuden kanssa terveillä iäkkäillä miehillä (Marcell ym. 2001).

Signalointireitit

Veressä kiertävä sitoutunut myostatiini aktivoidaan BMP-1/tolloid -perheen metalloproteinaasien toimesta, jolloin valmis myostatiini vapautuu (Wolfman ym. 2003). Biologisen toimintansa myostatiini välittää sitoutumalla aktiviini II -tyypin seriini-/treoniinikinaasireseptoreihin. Pääasiallisesti sitoutuminen tapahtuu aktiviini IIB:n välityksellä, mutta myostatiini pystyy myös sitoutumaan aktiviini IIA -reseptoriin (Lee & McPherron 2001; Rebbapragada ym. 2003; Lee ym. 2005; Yang 2007). Sitoutuminen aiheuttaa samankaltaisen signaalinsiirtymisreaktiosarjan kuin TGF-β perheen jäsenille on yleisesti kuvattu (Shi & Massagué 2003). Tämä Smad-proteiinien välityksellä tapahtuva signalointi on esitetty kuviossa 3.



KUVIO 3. (mukaeltu Heldin ym. 1997). Agonistiset ja antagonistiset SMAD-proteiinit TGF-β signaloinnissa. **a.** Oletettu signaalin etenemisreitti TGF-β:lle. TGF-β:n sitoutuminen johtaa heterotetramerisen reseptorikompleksin muodostumiseen, jossa tyypin II reseptori fosforyloi ja aktivoi tyypin I reseptorin. Reittirajoitteiset SMAD:it (Smad2 ja Smad3), jotka voivat olla ankkuroituneena sytoplasmassa homotrimeerisessä muodossa, fosforyloidaan. Tämä johtaa heteromerisaatioon Smad4:n (common mediator SMAD:in) kanssa. Kyseinen hetero-oligometrinen kompleksi siirtyy tumaan, jossa se sitoutuu suoraan tai kompleksina muiden säätelytekijöiden kanssa DNA:han ja vaikuttaa tiettyjen geenien transkriptioon. **b.** Inhibitoriset SMAD:it (Smad6 ja Smad7) sitoutuvat reseptoreihin ja estävät reittirajoitteisten Smad:ien fosforylaation ja signalointiaktiivisuuden. (Heldin ym. 1997.)

On myös ehdotettu, että Smad-proteiineista nykytietämyksen mukaan pääasiallisesti riippumattomat p38 MAPK- ja PI3K/Akt/GSK-3β-reitit ovat osallisina myostatiinin signaalinsiirtymisreiteissä (Philip ym. 2005 ; Morissette ym. 2006; Yang 2007). Lisäksi Erk1/2 MAPK-reitin ja hiljattain julkaistun tutkimuksen mukaan c-Jun N-terminaalisen kinaasin (JNK) signalointireitin on havaittu osallistuvan myostatiinin aiheuttamaan luurankolihaksen kasvun ja erilaistumisen säätelyyn (Yang ym. 2006; Huang ym. 2007). Vaikuttaa siis enenevässä määrin siltä, kuten myostatiinin ilmentymiseen vaikuttavien tekijöiden määrästäkin voi päätellä, että myostatiini säätelee solujen proliferaatiota ja erilaistumista useiden eri signalointireittien välityksellä. Kunkin reitin spesifisyys ja reittien välinen vuorovaikutus normaalin kehityksen tai sairauksien edetessä on vielä kuitenkin selvittämättä (Yang ym. 2007).

Signaloinnin solu- ja kudosvasteet

Myostatiinigeenin mutaation aiheuttaman lihaksen kasvun on todettu olevan seurausta sekä lihassolujen lukumäärän kasvusta (hyperplasia) että lihassolujen koon kasvusta (hypertrofia) (McPherron ym. 1997). Myostatiinilla voidaan siis katsoa olevan kaksi erillistä säätelytehtävää: 1) säädellä lihassolujen lopullista lukumäärää alkionkehityksen aikana ja 2) säädellä lihassolujen kokoa syntymän jälkeen (Lee 2004). Useissa eri tutkimuksissa on selvitetty tätä myostatiinin kaksijakoista tehtävää (mm. Lee & McPherron 2001; Nishi ym. 2002; Zhu ym. 2000), ja tulosten perusteella voidaankin todeta, että hypertrofian ja hyperplasian kehittyminen riippuu tavasta ja sitä kautta myös ajoituksesta, miten myostatiinin aktiivisuutta on estetty.

Myostatiinin kyky säädellä lihassolun kokoa perustuu osittain satelliittisolujen toiminnan estämiseen. Myostatiini inhiboi satelliittisolujen akivaatiota, proliferaatiota, erilaistumista ja uusiutumista sekä siten tumien lisäystä lihaskudokseen. Sen on todettu myös vähentävän proteiinisynteesiä lihassoluissa. (Taylor ym. 2001; McCroskery ym. 2003; Welle ym. 2006; Yang ym. 2007; McFarlane ym. 2007.) Satelliittisolujen sekä myoblastien toiminnan estäminen tapahtuu ilmeisestikin säätelemällä solusykliä säätelevien proteiinien sekä myogeenisten säätelytekijöitten toimintaa. Solujen proliferaatioon myostatiini vaikuttaa estämällä solusyklin etenemisen G_1-vaiheesta S-vaiheeseen, mikä tapahtuu nostamalla p21-tasoja ja laskemalla Cdk2-tasoja ja aktiivisuutta sekä laskemalla Retinoblastin (Rb:n) fosforylaatiota (Thomas ym. 2000; Ríos ym. 2001; McCroskery ym. 2003). Lisäksi hiljattain julkaistun tutkimuksen

mukaan myostatiini lisää sykliini D1:n hajoamista, mikä puolestaan vähentää Cdk4:n aktiivisuutta (Yang ym. 2007). Solujen erilaistumiseen myostatiini vaikuttaa estämällä myogeenisten säätelytekijöiden MyoD:n, myogeniinin ja Myf-5:n ilmentymistä (Langley ym. 2002; Ríos ym. 2002; Joulia ym. 2003). Satelliittisolujen uusiutumiseen myostatiini vaikuttaa ilmeisetikin estämällä Pax7:n vaikutusta satellittisoluihin (McFarlane ym. 2007).

Myostatiinin terapeuttiset sovellutukset

Myostatiinin vastavaikuttajien tutkiminen ja kehittäminen sekä ihmisten terapeuttisiin tarkoituksiin että karjatalouden piiriin on ymmärrettävästi saanut paljon huomioita. Myostatiinin vaikutusten iniboiminen on ollut tehokas keino useissa tutkimuksissa lisätä lihasmassaa hiirillä (Bogdanovich ym. 2002; Whittemore ym. 2003; Bogdanovich ym. 2005; Lee ym. 2005 & Wolfman ym. 2003). Esimerkiksi Whittemoren ym. hiirillä tehdyssä tutkimuksessa (2003) myostatiinin vaikutukset estävän vasta-aineen viikottainen injektio 15 viikon ajan aiheutti 13–30 % lihasmassan kasvun, joka oli havaittavissa sekä nais- että miespuolisilla yksilöillä sekä 24 kuukauden ikäisillä ja aikuisilla hiirillä. Lukuun ottamatta vaikutuksia luurankolihakseen mitään vasta-aineen aiheuttamia sivuvaikutuksia elinten kokoon, histologiaan tai seerumin muuttujiin ei tutkimuksessa havaittu.

5.2.2 IGF-I / MGF

Insuliininkaltaisia kasvutekijöitä on kahta eri päätyyppiä: IGF-I ja IGF-II (Solomon & Bouloux 2006). Näistä tunnetumpi on IGF-I, toiselta nimeltään somatomediini C. Se on 70 aminohapon peptidi, jota eritetään pääasiassa maksassa kasvuhormonin (GH:n) säätelemänä, mutta myös paikallisesti muissa kudoksissa kuten lihaskudoksessa (Harridge 2007). IGF-I on pääasiallisin GH:n vaikutusten välittäjä (Butler & LeRoith 2001; Yarasheski 1994) ja akselilla GH/IGF-I onkin tärkeä rooli lihasmassan säätelijänä (Goldspink & Harridge 2004). Rotilla tehdyssä tutkimuksessa IGF-I:n infuusio lihakseen on aiheuttanut merkittävää hypertrofiaa (Adams & McCue 1998) ja IGF-I:n anaboliset vaikutukset on osoitettu selvästi myös useissa soluviljelytutkimuksissa. Niistä iso osa on tehty hiirten/rottien solulinjoilla ja näissä tutkimuksissa IGF-I:n on todettu lisäävän lihassolujen poikkipinta-alaa, vähentävän proteiinien hajoamista,

lisäävän aminohappojen sisäänottoa luurankolihakseen sekä stimuloivan proteiinisynteesiä. (Florini ym. 1996; Rommel ym. 2001; Bodine ym. 2001.) Myös ihmisen luurankolihaksen soluja tutkittaessa (mm. Jacquemin ym. 2004) IGF-I:n on todettu lisäävän lihassolujen poikkipinta-alaa, tumien lukumäärää sekä MHC:n määrää lihaksessa.

IGF-I:tä erittyy luurankolihaksissa fyysisen harjoituksen ja/tai lihasvaurion ja hormonien stimuloimana. Ihmisen lihassolut tuottavat vaihtoehtoisen IGF-I:n esi-mRNA:n silmukoinnin (pilkkomisen) seurauksena kolmea eri IGF-I:tä: IGF-IEa:ta, IGF-IEb:tä sekä MGF:ää (IGF-Ic:tä). Nimitys MGF (mechano growth factor) tulee siitä, että kyseinen kasvutekijä ilmentyy nimenomaan mekaanisen ärsytyksen seurauksena. IGF-IEa puolestaan on samankaltainen maksan tuottaman IGF-I:n kanssa ja se on tärkeässä asemassa proteiinisynteesin lisäämisessä. IGF-Ib:n merkitystä ihmisillä ei vielä tiedetä, mutta eläimillä tehdyssä tutkimuksessa se toimii kuten MGF (Hameed ym. 2003; Goldspink & Harridge 2004; Harridge 2007.) MGF:n injektoiminen lihakseen yhdessä IGF-IEa:n kanssa on aiheuttanut keskimäärin 25 %:n kasvun lihassolujen koossa kolmen viikon kuluessa ja voiman kasvu on myös tapahtunut samassa suhteessa (Goldspink & Harridge 2004). Kun samantyyppinen tutkimus on tehty injektoimalla maksan tuottamaa IGF-I-tyyppiä lihakseen, on siitä seurannut 15 % lihasmassan kasvu, mutta kasvun kehittymisessä on kestänyt neljä kuukautta (Barton-Davis ym. 1998). Syy, miksi MGF on niin tehokas lihaksen hypertrofian välittäjänä verrattuna IGF-IEa:han, on todennäköisesti se, että MGF on vastuussa satelliittisolujen aktivaation alulle panemisesta, mikä toimii sykäyksenä hypertofia-/korjausprosesseissa (Adams & McCue 1998; Goldspink & Harridge 2004).

IGF-I:n aktivoimiin signalointireitteihin kuuluu Akt/PKB-mTOR-reitti (mm. Rommel ym. 2001), minkä välityksellä proteiinisynteesin lisääminen tapahtuu. Myös mTOR:ista alavirranpuoleinen $p70^{S6K}$ on tärkeä IGF-I:n signalointiin liittyvä säätelytekijä (Baar & Esser 1999).

5.2.3 Insuliini

Insuliini on haiman Langerhansin saarekkeiden β-soluista eritettävä anabolinen peptidihormoni, jonka eritys voidaan yhdistää riittoisaan energiatilanteeseen. Etenkin, kun ruoka sisältää suuria määriä hiilihydraatteja ja proteiineja, insuliinia erittyy runsaasti. Insuliinilla on siis tärkeä tehtävä varastoida ylimääräistä energiaa. Tärkein insuliinin eritystä stimuloiva tekijä on plasman glukooosi. Insuliinin lukuisten vaikutusten rasva- ja hiilihydraattiaineenvaihduntaan ohella sillä on proteiineihin suora vaikutus lisäämällä aminohappojen siirtymistä soluihin ja lisäämällä proteiinisynteesiä. Lisäksi insuliini vähentää solussa jo olevien proteiinien hajoamista. (Guyton & Hall 2000, 884.) Insuliinin vaikutus soluihin välittyy sen sitoutuessa tyrosiinikinaasireseptoriin, joka aktivoi Ras-MAP kinaasireitin, IP_3/DAG reitin ja PI-3 kinaasireitin (Ganong 1999, 320-330; Guyton & Hall 2000, 885; Lodish ym. 2004, 572.)

Insuliinin on siis todettu lisäävän proteiinisynteesiä, mutta vain jos aminohappoja on riittävästi saatavilla. Insuliinin annos-vaste suhde luurankolihaksen proteiinisynteesiin on silti vielä epäselvä. Insuliinin merkittävimmät vaikutukset proteiinien hajoamisen vähentymiseen näyttävät välittyvän ubikitiinista riippuvaisen proteolyyttisen systeemin välityksellä, joka on vastuussa myofibrillaaristen proteiinin hajotuksesta nisäkkäillä. Aterian ja todennäköisesti harjoituksenkin jälkeen insuliinin välityksellä tapahtuva lasku proteiinien hajotuksessa näyttää silti olevan vähemmän tärkeä anabolian kannalta kuin proteiinisynteesin lisääminen. (Rennie ym. 2004.)

5.2.4 Kasvuhormoni

Kasvuhormonia (GH), toiselta nimeltään somatotropiinia, eritetään aivolisäkkeen etulohkosta. GH:a on verenkierrossa useita muotoja ja voidaankin puhua GH superperheestä. Tutkituin ja yleisin muoto verenkierrossa (noin 75 %) on 191 aminohapon polypeptidi, jonka molekyylipaino on 22 kDa. Toiseksi yleisin muoto veressä (noin 10 %) on 20 kDa GH. Kuten jo kappaleessa 5.2.2 todettiin, akselilla GH/IGF-I on keskeinen rooli lihasmassan kasvun säätelyssä, mutta myös kasvun ja kehityksen säätelyssä yleisesti. GH:n lukuisten vaikutuskohteiden ja -reittien vuoksi on mahdollista, että GH:n jotkut vaikutukset rasva-, hiilihydraatti- ja

proteiiniaineenvaihduntaan, luun kasvuun ja luurankolihaksen proteiinitasapainoon välittyvät eri isoformien kautta. (Ganong 1999, 381; Guyton & Hall 2000, 849; Fleck & Kraemer 2004, 104; Harridge 2007.)

Kasvuhormonia eritetään sykäyksittäin ja vaikuttaa siltä, että kyseinen eritystapa on tärkeä anabolian kannalta (Godfrey ym. 2003.). Erityksen säätelyn tarkkaa mekanismia ei vielä täysin ymmärretä, mutta usean ravitsemukseen ja stressiin liittyvän tekijän tiedetään stimuloivan eritystä. Näitä ovat nälkiintyneisyys etenkin yhdistettynä vaikeaan proteiinin puutokseen, hypoglykemia tai veren alhainen rasvahappojen konsentraatio, fyysinen harjoittelu, jännitystila sekä psyykkinen ja fyysinen stressi. Lisäksi kasvuhormonin pitoisuus kasvaa tyypillisesti syvän unen kahden ensimmäisen tunnin aikana. (Guyton & Hall 2000, 851; Ganong 1999, 382.)

Sitoutuessaan reseptoriinsa kasvuhormoni aktivoi useita eri solunsisäisiä signalointireittejä. Merkityksellisimpiin reitteihin kuuluu JAK2-Stat, jonka kautta välittyy myös useiden kasvutekijöiden vaikutukset. (Ganong 1999, 383.) Kasvuhormonin vaikutus ulottuu miltei kaikkiin kudoksiin ja sen merkitys kasvuun on hyvin suuri etenkin kasvuikäisillä. Lihaksen hypertrofian kannalta merkittävimpiin kasvuhormonin vaikutuksiin kuuluu proteiinisynteesin lisääntyminen useimmissa elimistön soluissa. (Guyton & Hall 2000, 849.) Nykytietämyksen mukaan näyttää kuitenkin siltä, että eksogeenisella kasvuhormonilla ei ole merkittävää suoraa anabolista vaikutusta luurankolihasten kasvuun normaaleilla aikuisilla mukaan lukien ikääntyneet, vaan että sen hypertrofiset vaikutukset lihakseen välittyvät pääosin IGF-1:n kautta. (Rennie 2003.) Viimeaikaiset tutkimukset viittaavat enenevässä määrin siihen, että SOCS-2 (suppressor of cytokine signalling-2) toimii avainasemassa kasvuhormonin lihasmassan säätelyssä (Leroith & Nissey 2005) ja on myös merkittävä tekijä kasvussa ja lihaksen kasvussa yleisesti (Greenhalgh ym. 2005).

5.2.5 Androgeenit - testosteroni

Androgeenit eli miessukupuolihormonit ovat anabolisia steroidihormoneja. Ne ovat välttämättömiä miesten sukuelinten muodostumiselle sekä ylläpidolle ja lisäksi niillä on anabolisia vaikutuksia muihin kudoksiin mukaan lukien lihakset ja luusto. (Yin ym. 2003.) Veressä kiertävistä androgeeneista merkittävin on testosteroni. Sitä

muodostetaan kolesterolista ja eritetään kivesten Leydigin soluista lutenisoivan hormonin (LH) stimulaatiosta sekä vähäisiä määriä lisämunuaisten kuorikerroksesta ja naisilla munasarjoista. Muita Leydigin soluista eritettäviä androgeeneja ovat mm. dihydrotestosteroni (DHT) ja androsteenidioni. (Guyton & Hall 2000, 922.) Testosteroni sekä muut androgeenit välittävät vaikutuksensa sitoutumalla androgeenireseptoriin (AR). Sitoutumisen seurauksena muodostuu komplekseja, jotka sitoutuvat kohdegeenien promoottoriin tai luentaa lisääviin kohtiin ja säätelevät siten kyseisten geenien transkriptiota. Näitä androgeenien kohdegeenien sitoutumispaikkoja kutsutaan ARE:iksi (androgen response elements). (Freedman 1992.)

Androgeenien anabolisiin vaikutuksiin on uskottu pitkään ja niistä on myös saatu paljon näyttöä. Kliinisissä tutkimuksissa androgeenien on todettu parantavan lihasvoimaa ja lisäävän lihaksen kokoa (Brodsky ym. 1996; Bhasin ym. 1997; Bhasin ym. 2001; Mauras ym. 1998; Sinha-Hikim ym. 2002). Eläintutkimuksissa on myös saatu näyttöä androgeenien anabolisista vaikutuksista lihaksen kokoon ja voimaan (Antonio ym. 1999; Nnodim ym. 1999).

AR ekspressoituu useassa eri solutyypissä, mutta satelliittisolut ja lihassolujen tumat näyttävät olevan androgeenien vaikutusten merkittävimmät kohteet (Sinha-Hikim ym. 2004; Doumit ym. 1996). On ehdotettu, että androgeenit säätelevät luurankolihasten hypertrofiaa vaikuttamalla useaan kohteeseen lihaksessa usean eri mekanismin välityksellä mukaan lukien satelliittisolujen aktivointi ja erilaistuminen sekä luurankolihaksen proteiinisynteesin säätely (Sinha-Hikim 2004). Kuitenkaan tarkat mekanismit, joilla androgeenit vaikutuksensa välittävät, eivät ole selvillä (Chen ym. 2005).

5.2.6 Kortisoli

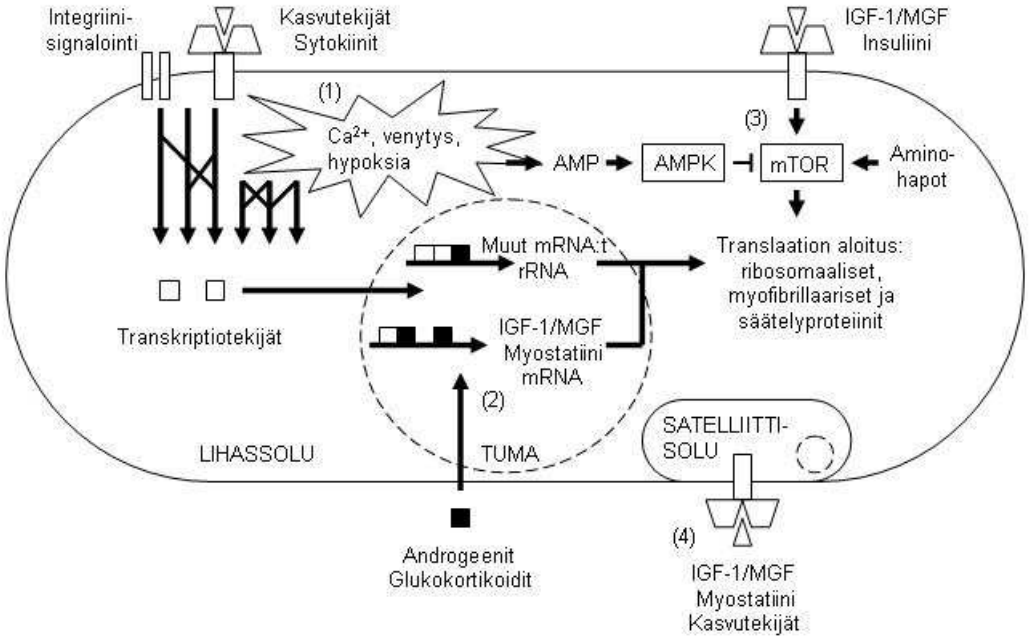
Kortisoli on katabolinen steroidihormoni, jota eritetään lisämunuaisten kuorikerroksesta. Se kuuluu glukokortikoideihin ja onkin niistä merkittävin vastaten noin 95 % glukokortikoidiaktiivisuudesta. Korkeimmillaan kortisolin pitoisuus on aamulla ja alimmillaan illalla (Scheen ym. 1998; Häkkinen & Pakarinen 1993; Brandenberger ym. 1982). Kortisolilla on lukuisia vaikutuksia rasva-, hiilihydraatti- ja proteiinimetaboliaan ja erityisesti fyysinen ja psyykkinen stressi stimuloivat sen eritystä (Guyton & Hall

2000, 875–880). Kuitenkin tärkein kortisolin erityksen stimuloija on hypoglykemia (mm. Davis ym. 2000). Liikunnan yhteydessä kortisolin eritys vaihtelee huomattavasti riippuen muun muassa liikunnan tyypistä, kestosta, intensiteetistä ja mahdollisesta liikuntaa edeltävästä tai sen aikaisesta ravinnosta ja lämpötilasta (Viru & Viru 2001, 81–84). Lihaksen koon kannalta merkittävimmät kortisolin vaikutukset ovat proteiinisynteesin vähentäminen, proteiinien hajoamisen lisääminen sekä aminohappojen kuljetus lihaksista maksaan (Guyton & Hall 2000, 875–876). Kortisoli kiihdyttää lihaskudoksen hajotusta erityisesti tyypin II lihassoluissa (Kraemer & Ratamess 2003). Kortisolin liikaeritys johtaakin lihasten atrofiaan (Guyton & Hall 2000, 876).

5.3 Kasvustimuluksen havaitsemiseen liittyvät signalointireitit

5.3.1 Yhteenveto signalointireiteistä

Voimakas, kasvua aiheuttava lihasaktiivisuus voidaan yhdistää muutokseen yhdessä tai useammassa muuttujassa, joita ovat muun muassa: passiivinen tai supistuksen aiheuttama venytys (strain), sarkoplasminen kalsiumkonsentraatio, energiantarve, lihaksen sisäinen happikonsentraatio, hormoneiden saatavuus, kasvutekijät ja sytokiinit, lämpötila ja soluvaurio. Riittävä muutos missä tahansa näistä muuttujista aiheuttaa aktiivisuuden muutoksen signalointireiteissä, jotka säätelevät lihaksen kasvuun vaikuttavien geenien ilmenemistä. Kuviossa 4 (seuraavalla sivulla) on esitettynä yhteenveto lihaksen hypertrofiaan vaikuttavista signalointireiteistä. (Rennie ym. 2004).



KUVIO 4. Yleiskuva luurankolihaksen hypertrofiaan vaikuttavista signaalinsiirtoreiteistä ja geenien säätelyn tapahtumista. (1) Kasvutekijät ja sytokiinit havaitaan reseptorisitoutumisen ja solusignaalien välityksellä. Tämä sekä mekaanista ärsytystä havaitsevat integriinit vuorovaikutuksessa ekstrasellulaarisen matriksin proteiinien kanssa aktivoivat signaali-transduktio reittien verkoston, minkä seurauksena (2) transkriptiotekijät siirtyvät tumaan tai aktivoituvat. Nämä aktiiviset, tumassa sijaitsevat transkriptiotekijät (yhdessä androgeenien ja glukokortikoidien välittämien transkriptiotekijöiden kanssa) muuttavat pääasiallisten lihasten kasvun säätelijöitten IGF-1:n/MGF:n, myostatiinin tai muiden luurankolihasgeenien ilmentymistä mukaan lukien ribosomaalinen RNA (rRNA). Reitit, jotka säätelevät translaatiota tai satelliittisolujen toimintaa, voivat myös aktivoitua muiden kuin IGF-1:n/MGF:n tai myostatiinin välityksellä tapahtuvien mekanismien kautta (eivät näy kuvassa). (3) IGF-1/MGF ja insuliini aktivoivat PI3K-PKB/AKT-mTOR reitin, mikä edistää proteiinisynteesiä kohonneen translaation aloituksen ja ribosomaalisten proteiinien synteesin välityksellä. Välttämättömien aminohappojen saatavuus aktivoi mTOR-signaloinnin, kun puolestaan AMPK:n havaitsema kohonnut energiantarve inhiboi mTOR-signalointia. (4) IGF-1/MGF, myostatiini ja useat muut tekijät säätelevät satelliittisolujen lisääntynyttä proliferaatiota ja erilaistumista. (Mukaeltu Rennie ym. 2004; Mooren & Völker 2005, 13.)

Erilaisten lihassupistusten yhteydessä aktivoituviin signaalin etenemisreitteihin kuuluvat muun muassa AMPK, kalsineuriini, ERK1/2 ja p38, JNK, NF-κB, PI3K-PKB/AKT-mTOR ja PKC. Näiden reittien lisäksi useat myogeneesiin liittyvät transkriptiotekijät pysyvät aktivoituneina adaptiivisissa ja regeneratiivisissa prosesseissa

aikuisen lihaksessa. Näin ollen voimakas, kasvua aiheuttava lihasaktiivisuus ja muut kasvustimulukset aktivoivat pikemminkin signaalin etenemisverkoston kuin pelkästään yhden tai kaksi signaalin etenemisreittiä. (Rennie ym. 2004.)

5.3.2 Kalsineuriini-signalointi

Ca^{2+} toimii säätelytekijänä luurankolihaksen hypertrofiassa (Dunn ym. 1999). Se on ollut erityisen mielenkiinnon kohteena, sillä lihassupistuksen aikana tapahtuu suuri yhtäkkinen muutos sytoplasman Ca^{2+}-konsentraatiossa. Kalsineuriini on Ca^{2+}-kalmoduliini -reitin kautta aktivoitava proteiinifosfataasi, joka defosforyloi transkriptiotekijänä toimivaa NFAT:ia, joka siten pystyy sitoutumaan DNA:han. (Rennie ym. 2004.)

Siirtogeenisillä hiirillä tehdyissä tutkimuksissa (Dunn ym. 2000; Naya ym. 2000) kalsineuriinin yliekspressio ei aiheuttanut luurankolihasten hypertrofiaa. Tämä voi viitata siihen, että luurankolihaksessa on jo riittävästi lihaksen kasvuun vaadittavaa kalsineuriini-aktiivisuutta, eikä ylimääräisestä kalsineuriinista ole siten apua (Mitchell ym. 2002). Nykytietämyksen mukaan kalsineuriinin hyperaktivaatio yksin ei ole riittävä aiheuttamaan luurankolihasten hypertrofiaa, mutta erilaisten ylävirran ja alavirran puoleisten säätelytekijöiden aktivoinnilla yhdessä kalsineuriinin aktivoinnin kanssa saattaa olla merkityksellinen rooli lihaksen hypertrofiassa (Dunn ym. 2000). Myös myostatiinin on havaittu olevan kalsineuriinisäätelyn kohde. Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa viiden päivän mittainen toiminnallinen plantaris-lihaksen ylikuormitus laski myostatiinin mRNA-tasoa. (Michel ym. 2004.)

5.3.3 Mekaanis-kemiallinen signaalinsiirto

Mekaanista venytystä rekisteröivillä erilaisilla sensoreilla näyttää olevan kyky muuttaa venytys kemiallisiksi signaaleiksi, jotka aiheuttavat luurankolihaksen α-aktiini promoottorin aktivoitumisen (Carson & Wei 2000). Mekaanisen signaalinsiirron olemassaoloa luurankolihaksessa vahvistaa myös ”tensegrity”-hypoteesi (Ingber 2003.), jonka mukaan solun sisäinen proteiiniverkosto ylläpitää solun arkkitehtuuria kokonaisuudessaan. Vasteena mekaanisille voimille solun rakenteelliset verkostot ovat

vuorovaikutuksessa geenien ja proteiinien signalointiverkostojen kanssa, mikä sallii luurankolihaksen proteiinien uudelleen järjestäytymisen ja uusiutumisen. Tämä puolestaan sallii solun vastustaa muodonmuutosta. Mekaanisen venytyksen havaitsevina sensoreina toimivat oletettavasti integriinit, joiden välityksellä muun muassa sarkolemmassa sijaitseva proteiini nimeltään FAK (focal adhesion kinase) aktivoituu. (Fluck ym. 1999; Carson ym. 1996; Mooren & Völker 2005, 13; Cohen & Guan 2005.)

5.4 Ikääntymiseen liittyvät tekijät - sarkopenia

Ihmisen maksimivoima saavuttaa huippunsa 20–30 ikävuoden välillä, minkä jälkeen se pysyy muuttumattomana tai laskee hieman yli 20 vuotta. Kuitenkin iän lisääntyessä, erityisesti 50 ikävuoden jälkeen, alkaa maksimivoiman jyrkempi lasku (Häkkinen 2003, 409). Tästä ikääntymisen myötä tapahtuvasta maksimivoiman ja lihasmassan määrän laskusta käytetään nimitystä sarkopenia, joka tulee kreikan kielen sanoista ”lihan puute” (mm. Solomon & Bouloux 2006). Sarkopenialla on merkittäviä haittavaikutuksia terveyteen sekä toimintakykyyn ja yhteiskunnalle siitä aiheutuu mittavia kustannuksia (Greenlund & Nair 2003).

Sarkopenian kehittymisen mekanismia ei täysin ymmärretä ja monet tekijät ovatkin potentiaalisia vaikuttajia sarkopenian kehittymiselle. Proteiinisynteesin nopeuden erityisesti translaation osalta on raportoitu hidastuvan ikääntymisen myötä (Schulte & Yarasheski 2001; Haddad & Adams 2006) ja erityisesti myofibrillaaristen proteiinien synteesin on havaittu olevan hitaampaa ikääntyneillä koehenkilöillä verrattuna nuoriin (Welle ym. 1993; Welle ym. 1995). Ikääntyessä myös tyypin IIa ja IIx lihassolujen määrät vähenevät (Greenlund & Nair 2003). Lisäksi harjoituksesta tai lihasvauriosta palautuminen kestää kauemmin vanhalla kuin nuorella (Brooks & Faulkner 1990), mihin saattaa vaikuttaa ikääntyneiden heikentynyt satelliittisolujen rekrytointi voimaharjoituksen jälkeen (Dreyer 2006). Nopea palautuminen harjoituksen aiheuttamasta myofibrillien hajoamisesta (Gibala ym. 1995) olisi tärkeää etenkin ikääntyneillä. Myostatiini, myogeeniset säätelytekijät sekä siten satelliittisolut ovatkin todennäköisesti tärkeitä tekijöitä lihaksen palautumisessa akuutista mikro- tai makrovauriosta (Wagner ym. 2005). Kuitenkin raskaita voimaharjoituksia sisältävä

harjoittelu olisi tärkeää iäkkäillä, sillä se toimii sarkopeniaan liittyvien prosessien vastavaikuttajana (mm. Häkkinen ym. 1998).

Haddadin ja Adamsin rotilla tehdyssä tutkimuksessa (2006) saatiin viitteitä siitä, että useat solunsisäiset lihaksen hypertrofiaan liittyvät signalointireitit ovat sensitiivisiä iän suhteen. Muun muassa myostatiinin, myogeniinin, SOC2:n ja STAT3/SOC3:n reaktiot sekä Akt:n fosforyloiminen voimaharjoituksen yhteydessä poikkesivat vanhoilla verrattuna nuoriin. Myös IGF-I systeemi näyttää reagoivan voimaharjoitukseen eri tavoin vanhalla kuin nuorella. (Haddad & Adams 2006.) Insuliinin aiheuttama proteiinisynteesin lisääntyminen on ollut vähäisempää ikääntyneillä rotilla verrattuna nuorempiin (Fluckey ym. 1996). Myös ribosomaalisen $p70^{S6}$ kinaasin aktiivisuuden on raportoitu olevan matalampaa ikääntyneillä verrattuna nuoriin (Morris ym. 2004), mikä hyvin saattaa rajoittaa anabolisia prosesseja. Tutkimuksissa, joissa on mitattu myostatiinitasoja ikääntymisen aikana (Kwalda ym. 2001: Baumann ym. 2003), on saatu ristiriitaisia tuloksia koskien myostatiinin roolia sarkopenian kehittymisessä. Siriettin ym. (2006b) tutkimuksen perusteella näyttää kuitenkin siltä, että myostatiinin puute vähentää serkopenian oireita.

6 VOIMAHARJOITUKSEN JA RAVINNON VAIKUTUS LUURANKOLIHASTEN PROTEIINIEN SYNTEESIIN JA HAJOAMISEEN

Jotta luurankolihasten hypertrofiaa pystyy tapahtumaan, täytyy proteiinitasapainon olla positiivinen, eli joko proteiinisynteesin täytyy lisääntyä, proteiinien hajoamisen vähentyä tai molempia (Rennie ym. 2004). Yksittäinen voimaharjoitus stimuloi proteiinisynteesiä luurankolihaksessa, mutta jos riittävästä ravinnonsaannista ei huolehdita, jää proteiinitasapaino negatiiviseksi voimaharjoituksen jälkeen (Tipton & Wolfe 2001). Tämä kappale käsittelee ensin ravinnon vaikutuksia proteiinien synteesiin ja hajoamiseen, minkä jälkeen tarkastellaan voimaharjoituksen vaikutuksia kyseisiin muuttujiin. Lopuksi selvitetään ravinnon ja voimaharjoituksen yhteisvaikutuksia proteiinien synteesiin ja hajoamiseen. Yleisellä tasolla proteiinien synteesiä ja hajoamista on käsitelty kappaleessa 2 ja ikääntymisen vaikutusta niihin kappaleessa 5.4.

6.1 Ravinnon vaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen

Ravinnon vaikutukset proteiinimetaboliaan voidaan jaotella kahteen osaan: 1) lisääntyneen aminohappojen saatavuuden aiheuttamat muutokset ja 2) ruoansulatustoimintojen aiheuttamat hormonien ja kasvutekijöiden (pääasiassa insuliini ja kasvuhormoni/IGF-1) pitoisuuksien kasvun aikaansaamat muutokset. (Rennie ym. 2004.) Kohdan 2) muuttujia on jo käsitelty kappaleessa 5, joten tässä yhteydessä keskitytään aminohappojen aiheuttamiin vaikutuksiin ja tarkalleen ottaen proteiinisynteesin muutoksiin. Lisääntynyt aminohappojen saatavuus on eläintutkimuksissa pystytty yhdistämään myös proteiinien hajoamisen vähentymiseen (Kadowaki & Kanazawa 2003), mutta ihmisillä kyseisiä vaikutuksia ei ole pystytty havaitsemaan tai ainakaan ne eivät ole lähellekään yhtä ilmeisiä kuin vaikutukset proteiinisynteesiin (Bennet ym. 1990; Nygren & Nair 2003).

Aminohappojen vaikutukset proteiinisynteesiin

Lisääntynyt aminohappojen pitoisuus lihaksessa stimuloi proteiinisynteesiä, mikä on todettu useissa in vitro ja in vivo -tutkimuksissa (Kimball ym. 2002). Tämä vaikutus on havaittavissa riippumatta hormoneista, tosin insuliini voi vielä tehostaa sitä. Ihmisillä aminohappojen infuusio on kaksinkertaistanut merkattujen aminohappojen käytön lihaksessa ilman lisääntynyttä insuliinin saatavuutta (Bennet ym. 1989). Tärkeä lihaksen proteiinisynteesiä lisäävä tekijä on välttämättömien aminohappojen lisääntyminen erityisesti veressä (ekstrasellulaaritilassa) (Bohé ym. 2003). Erityisesti haaraketjuisten aminohappojen – leusiinin ilmeisesti merkittävimpänä niistä – on todettu stimuloivan proteiinisynteesiä (Rennie ym. 2004). Ihmisillä yläraja aminohappokonsentraatiolle, jossa lihasten proteiinisynteesi vaikuttaa olevan tyydyttynyt, on noin 50 % suurempi kuin normaalisti saavutettu aterian jälkeinen aminohappojen pitoisuus veressä (Rennie ym. 2002). Tämä sekä useat muut tulokset viittavat siihen, että riittävä määrä aminohappoja stimuloimaan proteiinisynteesiä levossa (ja harjoituksenkin jälkeen) on pieni, alle 10g, verrattuna päivittäiseen proteiinintarpeeseen (Rennie ym. 2004).

Näyttää siltä, että aminohappojen proteiinisynteesiä stimuloivien vaikutusten havaitsemiseen kuluu aikaa noin 30 minuuttia. Tämän jälkeen proteiinisynteesi kiihtyy nopeasti huippunopeuden sijoittuessa noin 60–90 minuutin kohdalle, minkä jälkeen proteiinisynteesin määrä laskee normaalitasolle huolimatta aminohappojen jatkuneesta saatavuudesta. Tämä antaa ehdottaa, että systeemi on tyydyttynyt proteiinista, eikä enää reagoi ravitsemukselliseen stimulaatioon. (Rennie ym. 2002; Rennie ym. 2004.) Aminohappojen vaikutukset proteiinisynteesiin välittyvät välttämättömien aminohappojen kautta, jotka stimuloivat proteiinisynteesiä ravinnolle herkän Raptor-mTOR -kompleksin välityksellä. Kompleksi muodostuu kahdesta proteiinista, Raptorista ja mTOR:ista, joita ilmentyy luurankolihaksissa enemmän kuin muissa kudoksissa. (Kim ym. 2002; Kim ym. 2003.) Tarkalleen ottaen kompleksista aktivoituu mTOR, jonka alavirranpuoleisia säätelykohteita ovat muun muassa translaatiota säätelevät $p70^{S6K}$, 4E-BP ja eIF2 (Proud 2002).

6.2 Voimaharjoituksen vaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen

Yksittäinen voimaharjoitus stimuloi ihmisen proteiinisynteesiä neljän tunnin kuluessa ja tämä vaikutus kestää aina 48 tuntiin saakka. Voimaharjoituksen seurauksena myös proteiinien hajoaminen lisääntyy aluksi ja tämä vaikutus säilyy, jos ravintoa ei saada. (Chesley ym. 1992; MacDougall ym. 1995; Phillips ym. 1997.) Kuitenkin palautuksen aikana ja ravinnon saannin jälkeen lihaksen proteiinisynteesi lisääntyy (Tipton ym. 1999). Silti jos voimaharjoituksen intensiteetti ei ole riittävä, ei proteiinisynteesi lisäänny (Roy ym. 1997; Tipton ym. 1996).

Itse voimaharjoituksen aikaisesta proteiinien synteesin ja hajoamisen nopeudesta ihmisillä ei ole tietoa. Tämä johtuu käytössä olevien menetelmien heikosta ajoituksen määrityksestä. Kävelyä ja pyöräilyä koskevien tutkimusten perusteella todennäköistä kuitenkin on, että proteiinisynteesi joko pysyy muuttumattomana tai laskee liikunnan aikana, mutta ei nouse. (Carraro ym. 1990; Rennie ym. 1981; Millward ym. 1994.) Poteiinisynteesin nopeuden laskua voimaharjoituksen aikana tukee myös Bylund-Felleniuksen ym. (1984) rotilla tehty tutkimus, jossa lisäksi havaittiin proteiinien hajoamisen vähentymistä sähköstimulaation avulla aiheutetun voimaharjoituksen aikana.

6.3 Voimaharjoituksen ja ravinnon yhteisvaikutus proteiinien synteesiin ja hajoamiseen

Tutkimuksissa on selkeästi osoitettu, että aminohappojen nauttiminen voimaharjoituksen yhteydessä joko vapaassa muodossa (Børsheim ym. 2002; Miller ym. 2003; Tipton ym. 2003; Tipton ym. 1999) tai kokonaisina proteiineina (Tipton ym. 2004) lisää proteiinisynteesiä ja aiheuttaa positiivisen proteiinitasapainon (synteesiä tapahtuu enemmän kuin hajoamista). Erityisesti hera-/maitoproteiinien nauttiminen voimaharjoituksen jälkeen on osoittautunut kannattavaksi keinoksi lisätä lihaksen kasvua (Andersen ym. 2005; Burke ym. 2001) ja parantaa proteiinitasapainoa (Tipton ym. 2007). Proteiinin nauttiminen saattaa nopeuttaa palautumista voimaharjoituksesta vähentämällä lihasvaurion määrää (Nosaka ym. 2006) sekä mahdollisesti vähentämällä harjoituksen aikana tapahtuvaa proteiinien hajoamista (Tipton & Wolfe 2001). Näyttää

kuitenkin siltä, että parhaiten lihasten proteiinitasapaino voidaan kääntää positiiviseksi voimaharjoituksen jälkeen nauttimalla hyvänlaatuisen proteiinin lisäksi hiilihydraatteja (Børsheim ym. 2004; Miller ym. 2003).

Ravinnon ajoitus

Viimeaikoina ravinnon nauttimisen ajankohta voimaharjoituksen yhteydessä on herättänyt kiinnostusta. Näyttää siltä, että ravinnon nauttiminen välittömästi ennen voimaharjoitusta ja/tai välittömästi sen jälkeen on hyödyllisempää lihasten anabolisten prosessien kannalta kuin ravinnon nauttiminen muina aikoina (Esmarck ym. 2001; Cribb & Hayes 2006).

7 VOIMAHARJOITTELUN VAIKUTUKSET MYOSTATIININ ILMENTYMISEEN

Vaikka tämä työ käsittelee yksittäisen voimaharjoituksen aiheuttamia akuutteja vasteita, on myostatiini siinä hyvin keskeisessä asemassa ja sen vuoksi tarkastellaan myostatiinin ilmentymistä myös voimaharjoittelun yhteydessä. Yhdeksän viikkoa kestäneen konsentrisen voimaharjoittelun on todettu vähentävän myostatiinin mRNA:n tasoa luurankolihaksessa 37 %:a tutkimuksessa, jossa koehenkilöinä oli sekä nuoria että ikääntyneitä miehiä ja naisia. Voimaharjoittelun jälkeiset biopsiat otettiin kuitenkin 48–72 tuntia viimeisen harjoituksen jälkeen, eli tulos saattoi johtua edellisen harjoituksen aiheuttamista akuuteista vasteista. (Roth ym. 2003.) Verenkierron myostatiinipitoisuudessa on havaittu keskimäärin 20 %:n laskua 18–45-vuotiailla miehillä kymmenen viikon hypertrofisen eksentris-konsentrisen voimaharjoittelujakson jälkeen. Osalla koehenkilöistä (n = 11) harjoittelu kohdistui koko kehoon ja osalla (n = 6) pelkästään hauislihakseen, mutta harjoittelun vaikutukset myostatiiniin olivat molemmilla ryhmillä hyvin samankaltaisia. (Walker ym. 2004.) Myös Heinemeierin ym. (2007) rotilla tehdyssä lyhytkestoisessa tutkimuksessa neljän päivän sekä konsentrinen, eksentrinen että isometrinen hermostimulaation avulla aiheutettu voimaharjoittelu vähensi myostatiinin mRNA-tasoa merkitsevästi (2–8-kertaisesti), kun harjoittelun jälkeinen biopsia otettiin 24 tuntiä viimeisen voimaharjoituksen jälkeen. Lisäksi Kimin ym. tutkimuksessa (2007) 16 viikkoa kestävä voimaharjoittelu vähensi myostatiinin mRNA-tasoa 52 %, kun jälkimmäinen biopsia otettiin 24 tuntia viimeisen harjoituksen jälkeen. Lasku oli havaittavissa sekä heikosti, keskivertaisesti että erittäin hyvin harjoitteluun lihasten hypertrofialla reagoivilla henkilöillä. Mukana tutkimuksessa oli nuoria sekä vanhoja, naisia ja miehiä. Tutkimuksen perusteella seerumissa olevan myostatiinin proteiinitason ja lihaksessa olevan myostatiinin proteiini- ja mRNA-tason perusteella ei juuri pysty ennustamaan, miten voimaharjoittelu tulee vaikuttamaan lihasten kasvuun.

Voimaharjoittelun seurauksena on siis useammassakin tutkimuksessa havaittu myostatiinitasojen laskua. Tulosten tulkitsemista vaikeuttaa kuitenkin jälkimmäisen biopsian aikainen ajankohta viimeiseen voimaharjoitukseen nähden (24–72 tuntia sen

jälkeen), minkä seurauksena moniin tuloksiin vaikuttaa myös yksittäisen voimaharjoituksen aiheuttamat akuutit vasteet. Sen sijaan Willoughbyn (2004a ja 2004b) tutkimuksissa on saatu päinvastaisia tuloksia myostatiinin ilmentymisen ja voimaharjoittelun suhteen. Näissä tutkimuksissa kuusi sekä 12 viikkoa kestävä kovaintensiteettinen lihasten kokoa ja voimaa kasvattanut eksentris-konsentrinen voimaharjoittelu lisäsi luurankolihaksen myostatiinin mRNA:n ja proteiinin sekä seerumin myostatiinin määriä. Kyseisissä tutkimuksissa havaittiin myös myostaiinin sitojaproteiinin FLRG:n määrän lisääntymistä (Willoughby 2004a ja 2004b). Myös Hulmin ym. (2007) julkaisemissa tuloksissa, jotka ovat osa samaa projektia kuin tämäkin tutkimus, myostatiinin mRNA-taso nousi 21 viikkoa kestäneen voimaharjoittelun seurauksena.

Vaikka myostatiinin puute aiheuttaa lihaksen kasvua, on silti epäselvää, lisääkö se voimantuottoa. Wagnerin ym. (2002) ja Whittemoren ym. (2003) tutkimuksissa myostatiinin puutteesta aiheutunut lihasmassan kasvu ei aiheuttanut suhteessa kasvuun samansuuruista voiman lisäystä. Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa jopa havaittiin, että myostatiinin puute heikentää voimantuottoa (Amthor ym. 2006). Lisäksi hiljattain julkaistun tutkimuksen mukaan toimimattoman myostatiinigeenin omaavien hiirien ($Mstn^{-/-}$) jänteet ovat pienempiä ja hauraampia kuin normaalin myostatiinigeenin omaavien hiirien ($Mstn^{+/+}$) jänteet (Mendias ym. 2008). Kuitenkin myostatiinin mutaatiolla on ollut parantava vaikutus urheilusuoritukseen vinttikoirilla tehdyssä tutkimuksessa (Mosher ym. 2007), jossa jo yhden toimivan myostatiinialleelin menetys paransi merkitsevästi sprinttisuoritusta. Selkeästi aihe vaatii vielä lisätutkimusta.

8 VOIMAHARJOITUKSEN AKUUTIT VAIKUTUKSET MYOSTATIININ JA SOLUSYKLIN SÄÄTELYTEKIJÖIDEN ILMENTYMISEEN

Yksittäinen raskas voimaharjoitus stimuloi merkittävästi luurankolihaksia ja täydellinen palautuminen siitä kestää yleensä vähintään 2–4 päivää. Raskaan voimaharjoituksen on todettu vaikuttavan myös myostatiinin ja myogeenisten säätelytekijöiden ilmentymiseen sekä satelliittisolujen proliferaatioon. (mm. Hulmi 2007; Kim ym. 2005; Raue ym. 2006; Dreyer 2006.) Voimaharjoittelun aiheuttamat muutokset säätelytekijöihin voidaan jaotella kolmeen osaan: 1) akuutit muutokset yksittäisen voimaharjoituksen aikana ja jälkeen, 2) krooniset muutokset lepopitoisuuksissa ja 3) krooniset muutokset voimaharjoituksen aiheuttamissa akuuteissa vasteissa (Kraemer & Ratamess 2003; Yang ym. 2005). Tämä kappale käsittelee kohtaa 1) eli yksittäisen voimaharjoituksen aiheuttamia akuutteja vaikutuksia.

Useat tekijät voivat vaikuttaa yksittäisen voimaharjoituksen aiheuttamiin akuutteihin vasteisiin hormonipitoisuuksissa (Kraemer & Ratamess 2003) sekä muiden säätelytekijöiden pitoisuuksissa. Näitä ovat (Kraemer & Ratamess 2003):

- Harjoitusohjelma
- Kuormitusmalli ja liikkeiden suoritusjärjestys
- Lihaksen supistumistapa
- Intensiteetti
- Volyymi (harjoitusten, sarjojen ja toistojen kokonaismäärä)
- Toistojen suoritusnopeus
- Palautukset sarjojen ja harjoitteiden välillä
- Harjoittelufrekvenssi (kuinka usein harjoitellaan)
- Harjoitettavat lihasryhmät
- Ravitsemustila
- Harjoittelutausta
- Lihasmassan suuruus
- Sukupuoli
- Ikä

On ehdotettu, että harjoittelun aiheuttamat adaptaatiot solutasolla ovat seurausta jokaisen harjoituksen jälkeisistä hetkellisistä muutoksista geenien transkriptiossa ja

niiden aiheuttamasta kumulatiivisesta vaikutuksesta (Fluck & Hoppeler 2003; Neufer & Dohm 1993).

8.1 Voimaharjoituksen vaikutukset myostatiiniin

Kimin ym. tutkimuksessa (2005) myostatiinin mRNA:n määrä väheni merkitsevästi 24 tuntia yksittäisen voimaharjoituksen jälkeen nuorilla miehillä (-56 %) ja naisilla (-48 %) sekä ikääntyneillä miehillä (-40 %). Ikääntyneillä naisilla merkitsevää muutosta myostatiinin mRNA-tasoissa ei havaittu, mutta heilläkin taso laski hieman. Yllättävää tutkimuksen tuloksissa oli, että myostatiinin mRNA-taso levossa korreloi posiiivisesti ($p<0,01$) reiden lihasmassan kanssa, eli mitä enemmän oli lihasta, sitä korkeampi myostatiinin lepotaso oli. Voimaharjoituksen aiheuttama lasku myostatiinitasoissa puolestaan korreloi negatiivisesti ($p<0,01$) reiden lihasmassan kanssa, eli mitä korkeampi lihasmassa oli, sitä suuremman laskun voimaharjoitus aiheutti myostatiinin mRNA-tasoissa. (Kim ym. 2005.) Kimin ym. toisessa tutkimuksessa (2007) voimaharjoitus laski myostatiinin mRNA-tasoa 24 tuntia harjoituksen pättymisen jälkeen mitattuna sekä harjoitelleilla että harjoittelemattomilla henkilöillä (lasku 44 %). Tämä myostatiinin alentunut ekspressio ei kuitenkaan ennustustanut henkilön lihaksiston kykyä reagoida pitkäaikaiseen voimaharjoitteluun.

Myostatiinitason akuuttia laskua voimaharjoituksen yhteydessä tukee myös Rauen ym. tutkimus (2006), jossa myostatiinin mRNA-taso laski neljä tuntia voimaharjoituksen jälkeen mitattuna sekä nuorilla ($n = 8$) että vanhoilla ($n = 6$) naisilla. Lasku oli samansuuruista molemmilla ryhmillä (noin 2,2-kertainen lasku lähtöasoon verrattuna). Huomionarvoista kuitenkin oli, että iäkkäiden naisten myostatiinin lepotasot olivat merkitsevästi korkeammat kuin nuorilla naisilla. (Raue ym. 2006.) Myös Kvorningin ym. (2007) tutkimuksessa myostatiinitaso laski merkitsevästi kahdeksan viikkoa voimaharjoittelua tehneillä henkilöillä voimaharjoituksen yhteydessä, kun mittaus tehtiin neljä tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen. Myös 24 tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen myostatiinin mRNA-taso oli alhaisempi kuin ennen harjoitusta, mutta muutos ei saavuttanut tilastollista merkitsevyyttä. Samaisessa tutkimuksessa selvitettiin myös alhaisen veren testosteronipitoisuuden vaikutuksia myostatiinin

muutoksiin voimaharjoituksen yhteydessä ja kyseisellä ryhmällä muutokset eivät eronneet edellä mainitusta normaalin testosteronipitoisuuden veressä omaavasta ryhmästä. Alhaisen testosteronipitoisuuden ryhmän lasku myostatiinin mRNA-tasossa oli kuitenkin merkitsevä sekä neljä että 24 tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen (Kvorning ym. 2007.)

Coffeyn ym. (2005) tutkimuksessa puolestaan yksittäinen voimaharjoitus laski myostatiinin mRNA-tasoa kestävyysharjoittelijoilla noin 0,6-kertaisesti kolme tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen mitattuna, mutta voimaharjoittelijoilla ei merkitseävää muutosta myostatiinin mRNA-tasossa havaittu. Myöskään Jenskyn ym. (2007) tutkimuksessa eksentrinen voimaharjoitus ei aiheuttanut muutosta myostatiinin mRNA-tasoissa nuorilla tai ikääntyneillä miehillä 24 tuntia voimaharjoituksen päättymisen jälkeen. Sama ilmiö oli havaittavissa Haddadin & Adamsin (2006) tutkimuksessa. Siinä suoritettiin kaksi isometrista voimaharjoitusta 24 tunnin välein, eivätkä harjoitukset aiheuttaneet merkitsevää muutosta kuuden eikä 30 kuukauden ikäisten rottien myostatiinin mRNA-tasoissa 24 tuntia tai 48 tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen mitattuna. Sen sijaan vanhojen rottien mRNA:n lepotasot olivat matalammat kuin nuorilla rotilla, mikä oli yllättävä tulos (Haddad & Adams 2006).

8.2 Voimaharjoituksen vaikutukset solusyklin säätelytekijöihin

8.2.1 Myogeeniset säätelytekijät

Bickelin ym. (2005) rotilla tehdyssä tutkimuksessa sähköstimulaation avulla aiheutettu voimaharjoitus lisäsi MyD:n mRNA-tasoa noin 83 % ja myogeniinin mRNA-tason noin kolminkertaiseksi lepotasosta. Myös Haddadin ja Adamsin tutkimuksessa (2002) myogeniinin mRNA-taso oli koholla tai säilyi koholla 24 tuntia sähköstimulaatiolla aiheutetun voimaharjoituksen jälkeen.

Yangin ym. (2005) tutkimuksessa seurattiin myogeenisten säätelytekijöiden ilmentymisen muutoksia voimaharjoituksen jälkeen ja erityisesti haluttiin selvittää, millä aikavälillä muutokset tapahtuvat. Kuudelta voimaharjoittelutaustan omaavalta

koehenkilöltä otettiin lihasbiopsianäytteet ennen, välittömästi jälkeen sekä 1, 2, 4, 8, 12 ja 24 tuntia jälkeen voimaharjoituksen. Voimaharjoituksen seurauksena MRF4:n mRNA-taso nousi 3,7-kertaisesta 4,5-kertaiseksi 2-4 h harjoituksen jälkeen. MyoD:n mRNA-taso nousi 5,8-kertaiseksi 8 h harjoituksen päättymisen jälkeen ja myogeniinin mRNA-taso 2,6-kertaisesta 3,5-kertaiseksi 8–12 h harjoituksen jälkeen. Myf5:n mRNA-tasossa ei havaittu muutoksia. Tutkimuksen yksi päätulos olikin, että vaikka voimaharjoituksen aiheuttamissa geenieksprессion muutoksissa oli vaihtelua, oli geenien ilmentyminen huipussaan yleensä 4–8 h harjoituksen päättymisen jälkeen. (Yang ym. 2005).

8.2.2 Sykliinit, Cdk-proteiinit sekä sykliini-inhibiittorit

Kuten jo solusykliä käsittelevässä kappaleessa 4.3 käytiin läpi, sykliinit sitoutuvat Cdk-proteiineihin säädelläkseen niiden aktiivisuutta. Sykliini D -perhe on ensimmäinen, joka ekspressoituu, kun lepotilassa olevia soluja stimuloidaan. Solusyklin G1-vaiheen läpivieminen vaatiikin vähintään yhden D-sykliinin läsnäolon, mistä syystä luurankolihaksen proliferatiivista aktiivisuutta tutkittaessa selvitetään usein sykliini D1:n mRNA-tasojen muutoksia. (Obaya & Sedivy 2002; Adams ym. 2007.) Bickelin ym. (2005) tutkimuksessa voimaharjoitus aiheutti 50 % nousun sykliini D1:n mRNA-tasossa. Myös Kimin ym. (2005) tutkimuksessa sykliini D1:n mRNA taso nousi 34 % 24 tuntia voimaharjoituksen jälkeen.

Sykliini-inhibiittoreista p21:n mRNA-tasojen on todettu nousevan ihmisillä 24 tuntia kahden sähköstimulaatiolla aiheutetun voimaharjoituksen jälkeen mitattuna (Bickel ym. 2003). Myös rotilla tehdyssä tutkimuksessa p21:n tasot ovat nousseet ylikuormituksen aiheuttaman hypertrofian yhteydessä (Adams ym. 1999). p27:n mRNA-tasojen puolestaan on todettu laskevan 24 tuntia voimaharjoituksen jälkeen mitattuna (Kim ym. 2005).

9 RAVINNON VAIKUTUKSET MYOSTATIINIIN JA SOLUSYKLIN SÄÄTELYTEKIJÖIHIN LEPOTILASSA TAI VOIMAHARJOITUKSEN YHTEYDESSÄ

9.1 Ravinnon vaikutukset myostatiiniin lepotilassa

Ravinnon vaikutuksista ihmisen myostatiinin ilmentymiseen lepotasossa ei ole julkaistu tutkimuksia lukuun ottamatta myostatiinia sitovaa reagenssia sisältävän supplementaation (päivittäisannos 1200 mg) vaikutuksista seerumin myostatiinitasoihin (Willoughby ym. 2004b). Eläimillä tehdyissä tutkimuksissa ravinnolla on ollut vaikutuksia myostatiinin ilmentymiseen joissain (mm. Guernec ym. 2004; Jeanplong ym. 2003; Nakazato ym. 2006; Terova ym. 2006), mutta ei kaikissa tutkimuksissa (mm. Chauvigne ym. 2003; Ji ym. 1998).

Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että myostatiinin mRNA- ja proteiinitasot ovat nousseet luurankolihaksessa erilaisten tilojen yhteydessä, jotka voidaan yhdistää lihasmassan vähenemiseen. Näitä ovat olleet muun muassa AIDS (Gonzalez-Cadavid ym. 1998), lihasten käyttämättömyydestä seurannut atrofia (Reardon ym. 2001) sekä rotilla takajalkojen kuormittamattomuus (Carlson ym. 1999). Samoilla linjoilla ovat myös Jeanplongin ym. (2003) tutkimus, jossa lampaiden krooninen aliruokinta nosti myostatiinitasoja, sekä Terovan ym. (2006) meriahvenilla tehty tutkimus, jossa paastoamien lisäsi myostatiinin ilmentymistä ja palautuminen paastosta vähensi sitä. Puolestaan Guernecin ym. (2004) tutkimuksessa 48 tunnin paastoaminen laski myostatiinin mRNA-tasoa neljän viikon ikäisillä kanoilla, kun taas 48 tunnin syöminen paaston jälkeen nosti myostatiinitasot takaisin normaaleiksi. Tutkijat olettivat myostatiinin laskun paaston aikana toimivan suojamekanismina liiallista lihasten heikkenemistä vastaan. Jin ym. (1998) tekemässä tutkimuksessa kolmen päivän paasto taasen ei aiheuttanut muutoksia myostatiinin mRNA-tasoissa neljän eikä seitsemän kuukauden ikäisillä sioilla. Näyttää siis siltä, että ravitsemustila säätelee myostatiinin ekspressiota, mutta ravinnon rajoittamisen vaikutukset näyttävät vaihtelevan rajoitusjakson biologisen mallin sekä keston mukaan (Guernec ym. 2004).

Nakazaton ym. (2006) tutkimuksessa selvitettiin proteiiniravinnon vaikutusta myostatiiniin rotilla. Perusolettamuksena oli, että päivittäin yli 15 % proteiinia sisältävä ravinto ei suoraan aiheuta hypertrofiaa normaalissa luurankolihaksessa, ja koska anaboliset olosuhteet ovat kuitenkin suotuisat korkeaproteiinisen ravinnon yhteydessä, toimii tällöin oletettavasti jokin luurankolihaksen kasvuun inhiboivasti vaikuttava tekijä. Oletuksena oli, että kysessä on myostatiini. Tutkimuksessa selvisikin, että 35 % proteiinia päivittäisannoksena saaneilla rotilla sekä myostatiinin proteiinitaso että mRNA-taso lihaksessa olivat merkitsevästi korkeammat kuin 15 % proteiinia saavilla. Myös 25 % päivittäin proteiinia saavien rottien lihaksen myostatiinin proteiini- ja mRNA-tasot olivat selvästi korkeampia 15 % proteiiniryhmään verrattuna, mutta muutokset eivät saavuttaneet tilastollista merkitsevyyttä. Tulokset viittaavat siihen, että myostatiini saattaa rajoittaa lihaksen mahdollisesti liiallista kasvua korkeaproteiinipitoisen ravinnon yhteydessä.

Jotkut yksittäiset aminohapot, kuten glutamiini ja glutamaatti, joiden pitoisuus on korkea herassa (yhteensä 22 % heran kaikista aminohapoista), saattavat välittää proteiiniravinnon vaikutuksia myostatiinin ekspressioon. Salehianin ym. (2006) tutkimuksessa rottien ruokkiminen glutamiinilla tai glutaamiinin lisääminen C2C12-myoblastisoluihin lisäsi myostatiinin proteiinitasoja, tosin ei-merkitsevästi. Yksittäisten aminohappojen vaikutukset tai yleensäkin proteiiniravinnon aiheuttamat signalointireitit ja niiden vaikutukset myostatiinin ekspressioon on vielä selvittämättä.

9.2 Ravinnon vaikutukset solusykliä säätteleviin tekijöihin lepotilassa

Kappaleessa 9.1 käsitellyssä Nakazaton ym. (2006) tutkimuksessa selvitettiin proteiinipitoisen ravinnon vaikutusta myös MyoD:n ja myogeniinin ilmentymiseen. Niiden tasoissa ei kuitenkaan havaittu merkitseviä muutoksia, eikä yhteyttä myostatiinitasoihin. Yhteyden puutetta ei silti pidetty yllättävänä, sillä ryhmien lihasmassoissa ja lihaksen poikkipinta-aloissa ei ollut eroja. Thalacker-Mercerin ym. (2007) hiljattain julkaistussa tutkimuksessa puolestaan viikon kestävä alhainen proteiininsaanti (0,5 g/kg/päivä) vähensi solujen proliferaatioon positiivisesti vaikuttavien tekijöiden transkriptiota ja lisäsi negatiivisesti vaikuttavien tekijöiden

transkriptiota. Koehenkilöinä tutkimuksessa oli keski-ikäisiä/ikääntyneitä (55–80-vuotiaita) miehiä ja naisia

9.3 Ravinnon vaikutukset myostatiiniin ja solusykliä säätteleviin tekijöihin voimaharjoituksen yhteydessä

Ravinnon vaikutuksista myostatiiniin voimaharjoituksen yhteydessä on hyvin niukalti tietoa saatavissa. Julkaistuna on tiettävästi vain yksi abstrakti (Pilegaard ym. 2006). Tässä Pilegaardin ym. (2006) tutkimuksessa koehenkilöinä oli kahdeksan nuorta miestä, jotka suorittivat reiden lihaksiin kohdistuvan voimaharjoituksen sekä 15 % proteiinia sisältävää ravintoa nauttineena (ilman ylimääräistä proteiinia voimaharjoituksen yhteydessä; kontrolliryhmä) että 29 % proteiinia sisältävää ravintoa nauttineena (ylimääräinen proteiinisupplementaatio harjoituksen jälkeen). Biopsiat otettiin vastus lateralis -lihaksesta ennen voimaharjoitusta sekä 6, 24 ja 48 tuntia sen jälkeen. Myostatiinin mRNA laski 24 tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen molemmissa tilanteissa noin 50 % lähtötasoa alemmalle tasolle. Kontrollitilanteessa lasku oli merkitsevä ($p < 0,05$) ja proteiinisupplementaation yhteydessä laskulle oli trendi ($p < 0,1$). Verrattaessa käsittelyjä 48 tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen myostatiinitaso oli alhaisempi proteiinikäsittelyssä kuin kontrollikäsittelyssä ($p < 0,05$).

Ravinnon vaikutuksista voimaharjoituksen yhteydessä solusykliä säätteleviin tekijöihin sekä satelliittisoluihin on saatu jonkin verran tutkimustuloksia. Erityisesti kreatiinisupplementaation mutta mahdollisesti jossain määrin myös proteiinisupplementaation on todettu lisäävän voimaharjoituksen seurauksena tapahtuvaa satelliittisolujen sekä luurankolihaksen tumien lukumäärän lisääntymistä (Olsen ym. 2006). Tämä viittaa siihen, että vaikutus on kohdistunut myös solusykliä sääteleviin tekijöihin. Edellä mainitussa Pilegaardin ym. (2006) tutkimuksessa MyoD:n ja MRF4:n mRNA-tasot nousivat kaksinkertaisiksi kuusi tuntia harjoituksen päättymisen jälkeen ($p < 0,05$), eikä käsittelyjen välillä ollut eroa. Myogeniinin taso oli lähtötasoon nähden koholla ($p < 0,05$) molemmilla käsittelyillä kaikissa aikapisteissä, eikä käsittelyjen välillä ollut eroa.

10 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT

Tutkimusongelmat:

1. Miten voimaharjoitus vaikuttaa myostatiinin, myostatiiniin sitoutuvan proteiinin FLRG:n ja myostatiinin reseptoriproteiinin aktiviini IIb:n sekä solusykliä säätelevien tekijöiden (MyoD:n, myogeniinin, Cdk2:n, p21:n ja p27:n) mRNA-tasoihin?

2. Mitä muutoksia välittömästi ennen voimaharjoitusta ja välittömästi voimaharjoituksen jälkeen nautittu heraproteiini aiheuttaa myostatiinin, FLRG:n, AcvrIIb:n sekä solusykliä säätelevien tekijöiden mRNA-tasoissa tunnin ja 48 tunnin aikana voimaharjoituksen päättymisen jälkeen?

3. Onko myostatiinin, FLRG:n, AcvrIIb:n ja solusyklin säätelytekijöiden mRNA:iden ja seerumin testosteronipitoisuuden tai androgeenireseptorien (AR) proteiinitasojen välillä korrelaatioita voimaharjoituksen yhteydessä ja vaikuttaako heraproteiinin nauttiminen niihin?

Hypoteesit:

1. Voimaharjoitus laskee myostatiinin mRNA-tasoa.

- Vaikka tutkimustulokset ovat olleet osittain ristiriitaisia voimaharjoituksen akuuteista vaikutuksista myostatiinin ilmentymiseen, on enemmistössä tutkimuksista osoitettu myostatiinin mRNA-tasoissa tapahtuvan laskua (mm. Kim ym. 2005; Kim ym. 2007; Raue ym. 2006; Kvorning ym. 2007).
- Myostatiiniin sitoutuvan proteiinin FLRG:n ilmentymistä ei ole tutkittu yksittäisen voimaharjoituksen yhteydessä, joten hypoteesia kyseisen muuttujan osalta ei voi tehdä.

2. Voimaharjoitus nostaa myogeniinin, MyoD:n, p21:n ja Cdk2:n mRNA-tasoja ja laskee p27:n mRNA-tasoa. AcvrIIb:n mRNA-taso pysyy muuttumattomana.

- Vaikka tutkimustuloksissa on ollut osittain eriäviäkin tuloksia, on myogeniinin, MyoD:n ja p21:n mRNA-tasot ovat nousseet akuutisti voimaharjoituksen jälkeen (Bickel ym. 2005; Bickel ym. 2003; Haddad & Adams ym. 2002; Adams ym. 1999; Yang ym. 2005), kun taas p27:n mRNA taso on laskenut (Kim ym. 2005).
- Cdk2:n ilmentymistä ei ole tutkittu yksittäisen voimaharjoituksen yhteydessä, mutta koska sykliini D1:n mRNA-tasot ovat akuutisti nousseet voimaharjoituksen jälkeen (Bickel ym. 2005; Kim ym. 2005) ja sykliinit yleisesti aktivoivat seuraavassa solusyklin vaiheessa tarvittavat proteiinit, voidaan myös Cdk2:n mRNA-tasojen olettaa nousevan voimaharjoituksen jälkeen.
- Myostatiinin reseptoriproteiinin AcvrIIb:n mRNA-tasossa ei ole tapahtunut muutosta voimaharjoituksen seurauksena (Kim ym. 2007).

3. Voimaharjoituksen yhteydessä nautittu heraproteiini ei aiheuta lisämuutosta myostatiinin, myogeniinin tai MyoD:n mRNA-tasoissa.

- Tiettävästi proteiinin akuuteista vaikutuksista voimaharjoituksen yhteydessä tätä tutkimusta koskeviin mRNA-tasoihin ei ole tehty kuin yksi julkaisu ja sekin on pelkästään abstrakti (Pilegaard ym. 2006). Sen perusteella voidaan kuitenkin olettaa, että myostatiinin, myogeniinin ja MyoD mRNA-tasot eivät poikkea voimaharjoituksen jälkeen proteiini- ja plaseboryhmän välillä.
- Proteiinin akuuteista vaikutuksista voimaharjoituksen yhteydessä ei ole tehty tarkkoja tutkimuksia koskien FLRG:tä, Acvr IIb:tä, Cdk2:ta, p21:tä tai p27:ää, joten näiden muuttujien osalta ei voida tehdä hypoteesia.

4. *Seerumin testosteronipitoisuus ja lihaksen AR-proteiinitaso korreloivat negatiivisesti myostatiinin mRNA-tasojen kanssa.*

    - Vaikka myostatiinin ja androgeenien (testosteronin) välistä yhteyttä koskevat tutkimustulokset ovat olleet ristiriitaisia, on androgeenien todettu vaikuttavan negatiivisesti myostatiinin mRNA-tasoon (Mendler ym. 2007). Tietäen, että myostatiinigeenin promoottorissa on mahdollinen sitoutumiskohta androgeenireseptorille (ARE; Ma ym. 2001), sekä tietäen androgeenien anaboliset vaikutukset ja myostatiinin lihasmassan kasvua estävät vaikutukset, voisi negatiivisen korrelaation olettaa pitävän paikkansa.

11 MENETELMÄT

11.1 Koehenkilöt

Tutkimuksen koehenkilöinä oli 18 keski-ikäistä/ikääntynyttä miestä (ikä 57–72 vuotta). He kaikki olivat osallistuneet 21 viikkoa kestäneeseen ohjattuun, 2 kertaa viikossa tapahtuvaan voimaharjoitteluun, joka kohdistui koko kehoon. Koehenkilöiden harjoittelustausta tutkimusta edeltävien noin viiden kuukauden aikana oli erittäin hyvin vakioitu. Tarkempi kuvaus harjoittelusta on kerrottu Hulmin ym. 2007 artikkelissa. Kaksi viikkoa harjoittelun päättymisen jälkeen tutkimusryhmästä valikoitui edellä mainittu 18 miehen joukko, joka oli halukas osallistumaan kyseiseen tutkimukseen. Koehenkilöt sovitettiin pareittain iän, kehonpainon ja jalkaprässin 1RM-tuloksen perusteella ja jaettiin satunnaisesti joko heraproteiiniryhmään (n = 9) tai plasebo-ryhmään (n = 9). Lisäksi tutkimukseen osallistui kuusi kontrollihenkilöä, jotka eivät olleet osallistuneet edeltävään 21 viikon voimaharjoitteluun, mutta olivat olleet siinäkin kontrollihenkilöinä. Taulukossa 2 on esitetty koehenkilöiden taustatiedot ryhmittäin.

TAULUKKO 2. Koehenkilöiden taustatiedot ryhmittäin (keskiarvo ± keskihajonta SD).

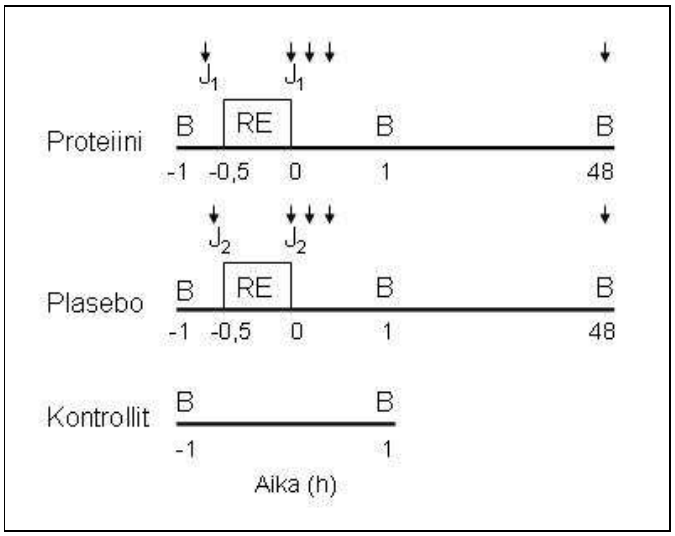
Muuttuja	Proteiiniryhmä	Plaseboryhmä	Kontrolliryhmä
n	9	9	6
Ikä (vuotta)	61,4 ± 4,3	62,1 ± 4,2	66,5 ± 7,1
Paino (kg)	85,8 kg ± 9,4	79,6 ± 3,2	72,1 ± 9,8
Pituus (cm)	176,1 ± 5,7	176,7 ± 3,2	170,0 ± 6,8
Maksimikuorma bilateraalisessa jalkaprässissä suhteutettuna omaan kehonpainoon (kg/kg)	2,4 ± 0,6	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,3

Ennen 21 viikkoa kestävää voimaharjoittelututkimusta kaikki koehenkilöt kävivät lääkärintarkastuksessa, eikä kellään heistä ollut vasta-aiheita suorittaa raskasta voimaharjoittelua. Kaikki koehenkilöt olivat myös fyysisesti suhteellisen aktiivisia. Kriteerejä poissulkemiselle oli 1) alle 50 vuoden ikä, 2) osallistuminen raskaaseen voimaharjoitteluun edeltävän viiden kuukauden aikana, 3) kasvissyöjät, 4) ne, jotka käyttivät säännöllisesti ravintolisiä tai farmakologisia aineita, jotka saattaisivat vaikuttaa voimaharjoittelun/-harjoituksen aiheuttamiin vasteisiin, 5) huipputason veteraani-

urheilijat, 6) merkittävä ylipaino (BMI > 30) ja 7) neuromuskulaariset tai kardiovaskulaariset sairaudet. Koehenkilöitä informoitiin tarkasti tutkimuksen sisällöstä mukaan lukien sen aiheuttamat mahdolliset riskit ja epämukavuudet. Kaikki koehenkilöt allekirjoittivat ennen tutkimukseen osallistumisesta kirjallisen suostumuslomakkeen, jonka Jyväskylän yliopiston eettinen toimikunta oli hyväksynyt. Tutkimus suoritettiin Helsingin julistusta (Declaration of Helsinki) noudattaen.

11.2 Koeasetelma

Tutkimuksen koeasetelma on esitetty kuviossa 5. Tutkimus tehtiin Jyväskylässä syksyllä 2005 Vivecassa. Koehenkilöitä oli neuvottu välttämään raskasta liikuntaa kolme päivää ennen mittausta. Ennen ensimmäistä biopsiaa koehenkilöt paastosivat kolme tuntia. Hyvin proteiinipitoisten ruokien (mm. lihan tai maitotuotteiden) nauttiminen ei ollut sallittua biopsiaa edeltävän viiden tunnin aikana.



KUVIO 5. Koeasetelma. Koehenkilöt suorittivat raskaan voima-harjoituksen (RE), joka sisälsi 5 x 10 toiston jalkaprässisarjan. Lihasbiopsia (B) otettiin Vastus Lateralis -lihaksesta 0,5 h ennen RE:n alkua (pre) sekä 1 (post 1h) ja 48 h (post 48h) sen jälkeen. Kontrollihenkilöt osallistuivat vain B:ihin, jotka otettiin kahden tunnin välein. Nuolet osoittavat verinäytteiden ottamisajankohdat: ennen ja välittömästi (0), 15 ja 30 min sekä 48 h jälkeen RE:n. Ennen RE:tä ja välittömästi sen jälkeen proteiiniryhmä nautti heraproteiini-isolaattijuomaa (J_1) ja plaseboryhmä kaloritonta plasebojuomaa (J_2).

Välittömästi ennen RE:tä ja välittömästi sen jälkeen nautittiin joko 250 ml heraproteiini-isolaattia tai 250 ml plasebojuomaa (kuvio 5). Juomat annettiin koehenkilöille kaksoissokkomenetelmää mukaillen. Plasebossa ei ollut ollenkaan kaloreita. Se sisälsi kuitenkin eksoottista hedelmää (exotic fruit), asesulfaami-K:ta, xantiinikumia ja betakaroteenia maun, viskositeetin ja värin vuoksi. Proteiinijuoma (250 ml) sisälsi 15 g heraproteiini-isolaattia, joka sisälsi vain mitättömän vähän rasvaa ja laktoosia (Protarmor 907 LSI, Armor Proteins, Brittany, France). Aromina, makeutena, viskositeetin säätäjänä sekä värinä käytettiin trinatriumsitraattia, eksoottista hedelmää, asesulfaami-K:ta, xantiinikumia sekä betakaroteenia. Käytetty proteiinimäärä vastasi määrää, jota voimaharjoittelijat käyttävät yleisesti (Tipton ym. 2007). Proteiini- ja plasebojuomat (Härmä Food) näyttivät ja maistuivat samankaltaiselta ja niiden viskositeetit vastasivat myös toisiaan.

11.3 Aineiston keräys ja analysointi

Raskaan voimaharjoituksen (RE) protokolla

Raskas voimaharjoitus (RE) suoritettiin bilateraalisessa jalkaprässilaitteessa (David 210, David Fitness and Medical: Hulmi ym. 2007; Häkkinen ym. 1998). Ennen jalkaprässiprotokollaa suoritettiin kaksi minuuttia kestävä lämmittely kuntopyörällä. Jalkaprässissä suoritettiin 5 x 10 toiston maksimisuoritus palautusten ollessa kaksi minuuttia sarjojen välillä. Kuormat sovitettiin harjoituksen aikana siten, että kukin koehenkilö pystyi suorittamaan 10 toistoa jokaisessa sarjassa. Jos kuorma oli liian raskas, koehenkilöä avustettiin kevyesti sarjan viimeisillä toistoilla. Avustetuilla toistoilla avustaja pyrki pitämään saman liikenopeuden kuin sarjan aiemmissa toistoissa oli ollut. Avustaja oli sama jokaisen koehenkilön kohdalla. Maksimaalinen isometrinen voima mitattiin ennen harjoitusta ja jokaisen sarjan jälkeen bilateraalisesti elektromekaanisella dynamometrilla kuten seuraavassa kappaleessa (Maksimivoiman testaus) on kuvattu (Hulmi ym. 2007; Häkkinen ym. 1998). RE:n jälkeen koehenkilöiltä kysyttiin rasitustuntemus Borgin subjetiivisella astikolla (6-20).

Maksimivoiman testaus

Voimasignaali nauhoitettiin ja analysoitiin Signal software -ohjelman versiolla 2.15 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Maksimaalinen isometrinen jalkojen ojentajalihasten bilateraalinen voima mitattiin elektromekaanisella dynamometrilla lantiokulman ollessa 110° ja polvikulman 107° (Hulmi ym. 2007; Häkkinen ym. 1998).

Lihasbiopsiat

Koehenkilöiltä otettiin lihasbiopsiat 0,5 tuntia ennen (pre) sekä 1 ja 48 tuntia RE:n jälkeen (post 1h ja post 48h). Biopsiat otettiin vastus lateralis -lihaksesta patellajänteen ja isomman trochanterin puolestavälistä alueelta, jossa lihas on paksuimmillaan ja jossa ei sijaitse suuria verisuonia tai hermoja. Lääkäri otti biopsianäytteet (näyte noin 50–100 mg) steriilisti paikallispuudutuksessa (2 ml Lidocainea, 1 %) käyttäen Bergströmin neulaa. Näytteenotossa käytettiin hyväksi imua, joka saatiin aikaiseksi letkun välityksellä neulaan yhdistetyllä ruiskulla. Ennen RE:tä sekä 48 tuntia sen jälkeen otettu biopsia otettiin vasemmasta jalasta. Ensimmäisen biopsian jäännösvaikutusten välttämiseksi tunti RE:n jälkeen otettu biopsia otettiin oikeasta jalasta ja 48 tuntia RE:n jälkeen otettu biopsia 2 cm edellisen näytteenottokohdan yläpuolelta. Biopsia-ajat yhtenäistettiin proteiini- ja plaseboryhmissä. Koska kaksi ensimmäistä biopsiaa otettiin eri jaloista, oli tutkimuksessa mukana myös kuusi kontrollihenkilöä, jotta eri jalasta otetun näytteen vaikutus pystyttiin selvittämän. Kontrollihenkilöiltä otettiin kaksi näytettä, joiden välissä oli kaksi tuntia lepoa. Näytteenottoajankohdat yhtenivät siis RE-ryhmien kanssa. Kaikki näytteet puhdistettiin näkyvästä rasva- ja sidekudoksesta sekä verestä. Tämän jälkeen näytteet jäädytettiin välittömästi nopeasti nestemäisessä typessä (-160 °C), minkä jälkeen ne säilöttiin -80 °C:ssa tulevaa mRNA-analyysiä varten.

Ravinnonsaannin seuraaminen

Koehenkilöiden ravinnonsaantia seurattiin ruokapäiväkirjojen avulla ensimmäistä biopsiaa edeltävän kolmen päivän ajalta, ensimmäiseltä mittauspäivältä sekä sitä seuraavalta päivältä. Ruokapäiväkirjat analysiotiin Micro Nutrica ravintoaineanalyysiohjelman versiolla 3.11. (The Social Insurance Institution of Finland).

Totaali-RNA:n eristys, käänteinen transkriptio ja cDNA:n synteesi

Lihasnäytteiden homogenisointi suoritettiin FastPrep (Bio101 Systems, USA) putkissa, jotka sisälsivät Lysing Matrix D:tä (Q-Biogene, USA). Totaali-RNA eristettiin ~50 mg lihaskudoksesta käyttäen Trizol-reagenssia (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. OD_{260}/OD_{280} -suhde oli noin 2,0 ja geelielektroforeesin perusteella eristys tuotti vapaata DNA:ta sekä ei-hajonnutta RNA:ta. Viisi mikrogrammaa totaali-RNA:ta käänteistranskriptoitiin, jolloin saatiin syntetisoitua komplementaarinen DNA (cDNA). Käänteistranskriptio suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti 50 µg:n totaalitilavuudesta käyttäen High Capacity cDNA Archive kittiä (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Real-time RT-PCR

mRNA:n ekspressiotasot määritettiin real-time reverse transcriptase-PCR:n (RT-PCR) avulla, joka perustuu Taq-polymeraasin 5´ nukleaasiaktiivisuuteen käyttäen Abi Prism 7700 Sequence Detector Systemiä (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Käytetyt alukkeet (primer) ja koettimet (probe) olivat ennalta suunniteltuja transkripteja (niin kutsuttuja ”inventoried assayta”), jotka Applied Biosystems bioinformatics design pipelines oli validoinut. Geenipankin hankintanumerot ja Applied Biosystems assayn ID:t olivat seuraavat: NM 005259 ja Hs00193363_m1 (myostatiini), NM 004064 ja Hs00153277_m1 (p27), NM 001106 ja Hs00609603_m1 (AcvrIIb), NM 005860 ja Hs00610505_m1 (FLRG), NM 002478 ja Hs00159528_m1 (MyoD), NM 002479 ja Hs00231167_m1 (myogeniini), NM_078467.1 ja Hs00355782_m1 (p21), NM_052827.1 ja Hs00608082_m1 (Cdk2), NM002046 and Hs99999905_m1 (GAPDH) sekä X03205.1 ja Hs99999901_s1 (18sRNA). Jokainen näyte analysoitiin triplikaattina. Kaikille näytteille käytettiin identtisiä PCR-syklin muuttujia: 2 min 50 °C:ssa, 10 min 95 C °:ssa ja 40 sykliä ensin 15 s 95 C°:ssä, jonka jälkeen 1 min 60°:ssa. Applied Biosystems oli validoinut kyseisen menetelmän. GAPDH:n mRNA:ta käytettiin housekeeping geeninä eli sisäisenä kontrollina, koska verrattuna 18sRNA:han sillä oli matalampi CV% (4,4 % verrattuna 5,9 %:iin) ja sen ekspressio oli stabiilimpi eri ajankohtien välillä sekä se käyttäytyi tasaisemmin verratessa proteiinikäsittelyä plaseboon. GAPDH/18sRNA oli myös stabiili verrattaessa pre-näytettä post 1h näytteeseen sekä pre-näytettä post 48h näytteeseen ($P>0,25$). Jokaisen koehenkilön näytteet ajettiin samassa ajossa, jotta näytteet olisivat täysin vertailukelpoisia. Ekspressiotasojen laskennallistamiseen ja normalisointiin käytettiin amplifikaation

tehokkuuteen perustuvaa menetelmää (Liu & Saint 2002). Geenitranskriptin tulokset laskettiin Liun ja Saintin (2002) matemaattisen mallin mukaan, joka on osittautunut hyvin validiksi tutkittaessa transkriptoidun geenin (mRNA:n) alkuperäistä määrää (Liu & Saint 2002). Liun ja Saintin (2002) menetelmässä käytettiin käyrän sovitukseen SigmaPlot-ohjelmaa (versio 9.1, Systat Software, Richmond, CA, USA).

Lihaksen androgeenireseptoriproteiinin (AR) määritys

Lihaksen AR-proteiinimääritys tehtiin Western Blot immunoblottausmenetelmällä käyttäen Santa Cruz Biotechnologyn (Santa Cruz, CA, USA) primäärivasta-ainetta N-20 valmistajan ohjeiden mukaisesti. Tämä vaihe on selitetty tarkemmin Tiina Salon Cum laude -tutkielmassa (2007). Kahden PROT-ryhmän koehenkilön kohdalla näytteet eivät olleet tarpeeksi korkealaatuisia, joten AR-proteiinitasot oli saatavissa yhteensä 16 koehenkilöltä.

Seerumin testosteroni

Koehenkilöiltä otettiin verinäyte kyynärlaskimosta levossa ennen RE:tä sekä välittömästi, 15 min, 30 min ja 48 h RE:n jälkeen. Näytteet säilöttiin -80 °C:ssa, kunnes ne analysointiin. Seerumin testosteronin määritys tehtiin immunometrisella kemilumenesenssimenetelmällä käyttäen Immulite® 1000 -laitetta (DPC, Los Angeles, CA, USA).

Testosteronin molaarinen pitoisuus verenkierrossa lisääntyy veriplasman vähentyessä (Pullinen 2001, 36), joten RE:n aiheuttamia muutoksia plasmatilavuudessa arvioitiin Dill & Costillin (1974) kaavan avulla. Käytetyt testosteronin arvot on siis korjattu plasmatilavuuden muutoksilla.

Seerumin vapaa testosteroni

Seerumin vapaan testosteronin määritys tehtiin Vermeulenin ym. (1999) esittämän menetelmän mukaan, jossa pitoisuus lasketaan mitattujen seerumin testosteronin ja SHBG:n sekä arvioidun albumiinipitoisuuden mukaan. Menetelmä on osoittautunut reliaabeliksi arvioitaessa biologisesti aktiivisen (sitoutumattoman) testosteronin pitoisuutta plasmassa (Vermeulen ym. 1999).

Seerumin SHBG

Vapaan testosteronin pitoisuuden arviointiin käytetyt SHBG-pitoisuudet määritettiin immunometrisella kemilumenesenssimenetelmällä käyttäen Immulite® 1000 -laitetta (DPC, Los Angeles, CA, USA). Anlayysit tehtin verinäytteistä, jotka otettiin levossa ennen RE:tä sekä välittömästi, 15 min, 30 min ja 48 h RE:n jälkeen.

11.4 Tilastolliset menetelmät

Keskiarvojen, keskihajontojen (SD) ja keskivirheiden (SE) lakemiseen käytettiin perinteisiä tilastollisia menetelmiä. Korrelaatioanalyysiin käytettiin Pearsonin korrelaatiota. RE:stä saatu data analysoitiin kahden tekijän repeated measures general linear model -menetelmän avulla. Koska otoksessa oli kolme aikapistettä (pre, post 1h ja post 48h), tarkistettiin ja kontrolloitiin tulosjakauman sfäärisyys Atkinsonin (2001) esittämien menetelmien mukaisesti. Holm-Bonferronin post hoc -testiä käytettiin vaikutusten paikallistamiseen kuten Atkinson (2002) on ehdottanut. Analyysit suoritettiin SPSS-ohjelmalla (versio 13.0). Merkitsevyyden rajaksi asetettiin $p \leq 0,05$.

12 TULOKSET

12.1 Voima- ja ravintomuuttujat

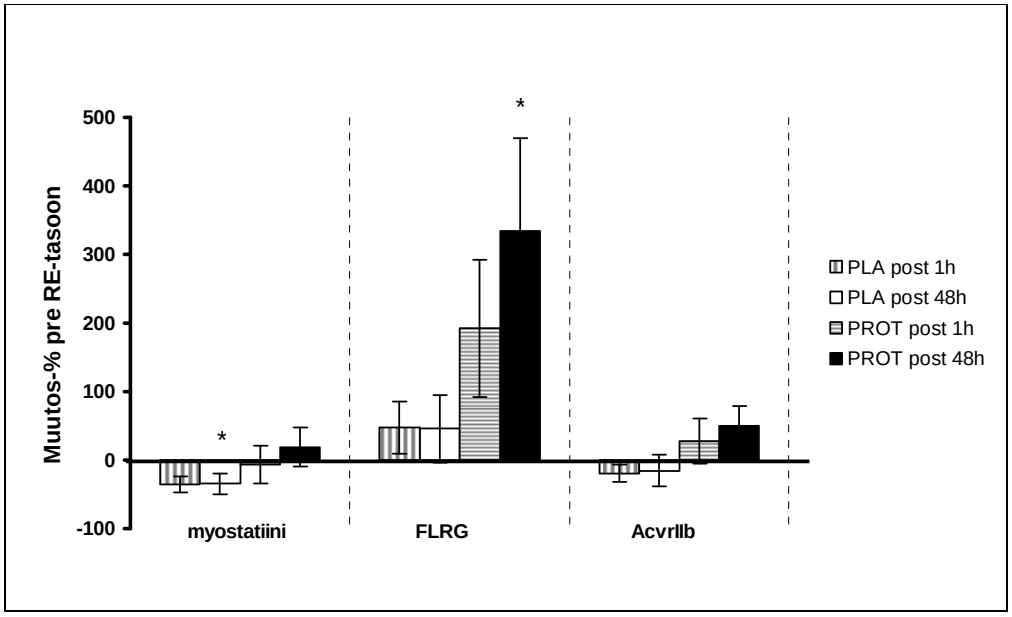
RE:n aikana tehty kokonaiskuorma (kuormat x sarjat x toistot, keskiarvo ± SD) oli plaseboryhmällä (PLA) 7,572 ± 1,105 kg ja proteiiniryhmällä (PROT) 8,094 ± 1,378 kg. Ryhmien tulokset eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi tosistaan ($p = 0,26$). Borgin asteikolla mitatut rasitustuntemukset RE:n jälkeen olivat PLA:lla 17,0 ± 0,6 ja PROT:lla 16,9 ± 0,5 ($p = 0,88$). Jalkojen ojentajien maksimaalinen isometrinen voima laski merkitsevästi ($p < 0,01$) RE:n jälkeen. Ryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa ($p = 0,15$). PLA:lla voima laski 2,874 ± 352 N:sta 2,058 ± 168 N:iin ja PROT:lla 3,270 ± 850 N:sta 2,134 ± 184 N:iin.

Ruokapäiväkirjojen analyysin perusteella ryhmien välillä ei ollut merkitsevää eroa kokonaisenergiankulutuksessa tai yksittäisten energiaravintoaineitten (proteiinien, hiilihydraattien tai rasvojen) saannissa absoluuttisina arvoina laskettuna eikä myöskään kehon painoon suhteutettuna ($p > 0,23$). Kehonpainoon suhteutettu proteiinin keskimääräinen saanti kolmelta päivältä ennen RE:tä oli PROT:lla 1,2 ± 0,4 g/kg ja PLA:lla 1,2 ± 0,3 g/kg. RE-päivänä ja sen jälkeisenä päivänä proteiinin keskimääräinen saanti lukuun ottamatta PROT:n RE:n yhteydessä saatuja kahta 15 g:n annosta oli PROT:lla 0,9 ± 0,3 g/kg ja PLA:lla 1,0 ± 0,3 g/kg.

12.2 Lihaksen mRNA-tasot

Raskas RE laski myostatiinin mRNA-tasoa PLA:lla ($p = 0,03$), mutta ei PROT:lla ($p = 0,94$; kuvio 6). PLA:lle tehty Post hoc analyysi paljasti, että myostatiinin post 48h mRNA-tasot olivat merkitsevästi matalammat verrattuna pre RE-tasoihin ($p = 0,03$) ja post 1h:n kohdalla oli myös trendi myostatiinin mRNA:n laskulle ($p = 0,06$). Taulukossa 3 (seuraavalla sivulla) on esitetty myostatiinin PLA:n ja PROT:n yksittäiset muutokset sekä ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat ajanhetkillä post 1h ja post 48h.

Liitteessä 1 on esitettynä muiden mitattujen mRNA-tasojen muutokset post 1h ja post 48h.

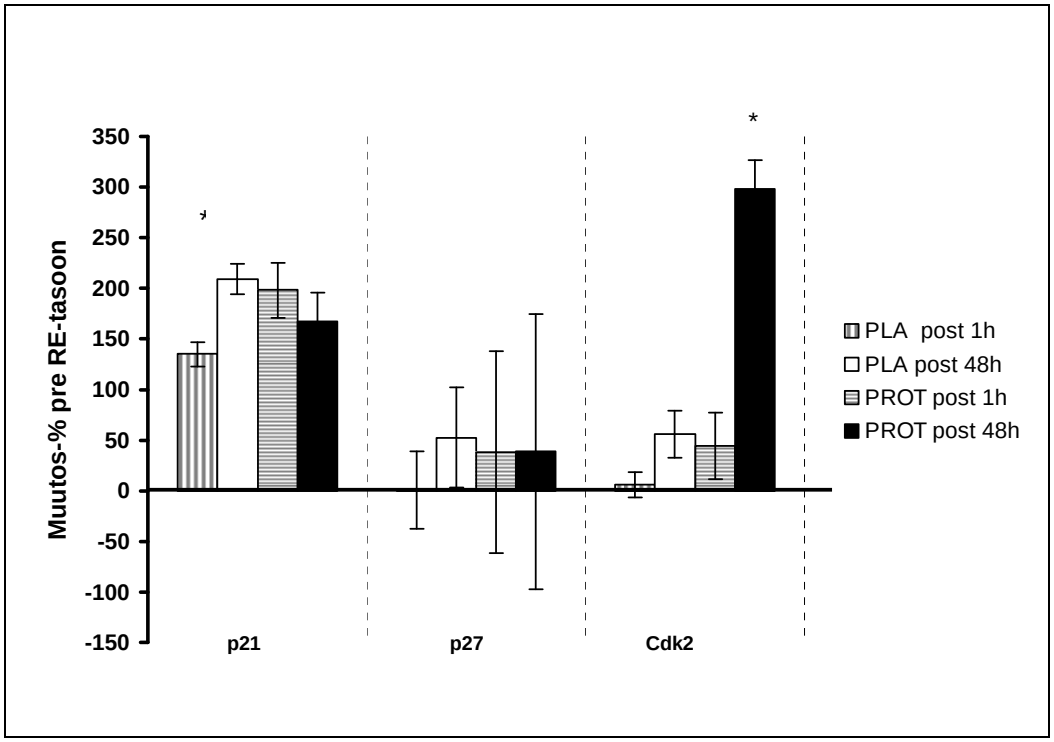


KUVIO 6. Real-time RT-PCR tulokset myostatiinin, FLRG:n ja aktiviinireseptori IIb:n (AcvrIIb) mRNA-ekspressioiden muutoksille RE:n jälkeen PROT- ja PLA-tilanteissa. Tulokset on normalisoitu GAPDH:n mRNA:n suhteen ja muutokset on esitetty suhteessa pre RE-arvoihin. Arvot on laskettu Liun ja Saintin (2000) matemaattisen mallin mukaan. Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SE (keskivirhe). Tähti merkitsee Holm-Bonferronilla korjattua tilastollisesti merkitsevää eroa $p < 0,05$ verrattuna pre-arvoon joko PROT- tai PLA-tilanteessa.

TAULUKKO 3. PLA- ja PROT-ryhmien yksittäiset mRNA-tasojen muutosprosentit post 1h ja post 48h verrattuna pre RE:hen. Keskiarvot (Ka) ja keskihajonnat (SD) näkyvät alhaalla. Tähti merkitsee Holm-Bonferronilla korjattua tilastollisesti merkitsevää eroa $p < 0,05$ verrattuna pre-arvoon PLA-tilanteessa.

	Myostatiinin mRNA-tason muutos-%			
	Pre - post 1h		Pre - post 48h	
	Plasebo	Proteiini	Plasebo	Proteiini
	23,0	-27,4	-57,9	225,7
	-60,5	46,2	-51,6	16,6
	-32,7	-22,8	-71,6	6,6
	-9,9	-33,8	-71,2	-39,5
	-50,4	-71,5	-14,0	65,6
	-14,0	-70,4	-12,3	-26,3
	-77,6	190,7	71,3	-25,5
	-9,8	-35,5	-57,6	-41,4
	-87,9	-36,3	-45,3	-14,9
Ka	**-35,5**	**-6,8**	**-34,5***	**18,6**
SD	**36,4**	**81,5**	**45,2**	**84,6**

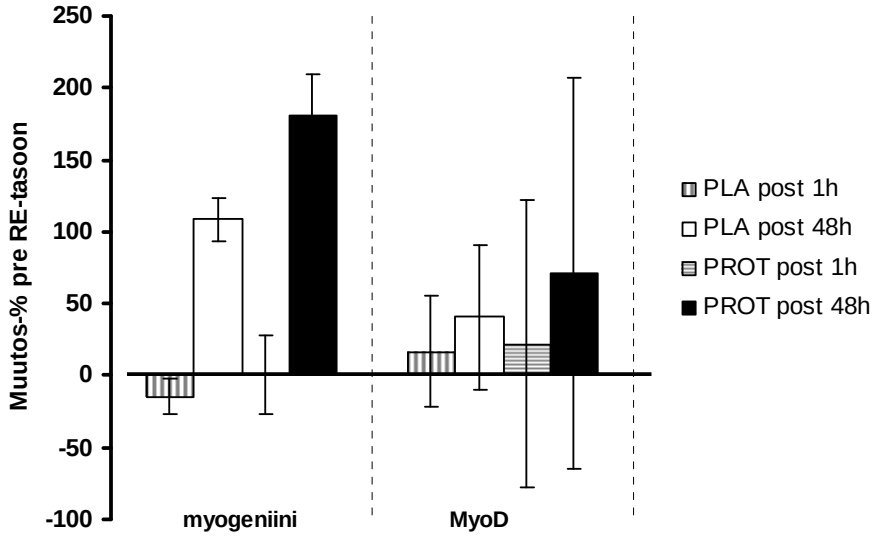
FLRG:n mRNA-taso nousi puolestaan vain PROT:lla (p = 0,03), kun PLA:lla ei ollut muutosta havaittavissa (p > 0,99; kuvio 6). Myös Cdk2:n mRNA-taso nousi merkitsevästi vain PROT:lla (p = 0,009), kun PLA:lla oli havaittavissa vain trendi nousulle (p = 0,075; kuvio 7). FLRG:n ja Cdk2:n merkitsevä nousu PROT:lla ajoittui post 48h kohdalle (0,02). p21:n mRNA-taso post 1h:n kohdalla oli merkitsevästi noussut PLA:lla lähtötasoon verrattuna (p = 0,03), kun PROT:lla noususta oli havaittavissa vain trendi (p = 0,08; kuvio 7).



KUVIO 7. Real-time RT-PCR tulokset p21:n, p27:n ja Cdk2:n mRNA-tasojen muutoksille RE:n yhteydessä. Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SE. Tähti merkitsee Holm-Bonferronilla korjattua tilastollisesti merkitsevää eroa p < 0,05 verrattuna pre-arvoon joko PROT- tai PLA-tilanteessa.

RE:llä ei ollut vaikutusta AcvrIIb:n, p27:n, myogeniinin tai MyoD:n mRNA-tasoihin PLA:lla tai PROT:lla (p > 0,14; kuviot 6, 7, ja 8). Kontrollihenkilöiden 2 tunnin lepo ei muuttanut myostatiinin, AcvrIIb:n, FLRG:n, p27:n, myogeniinin, MyoD:n (raportoitu Hulmi ym. 2007), p21:n (p = 0,38) tai Cdk2:n (p = 0,82) mRNA-tasoja. Jotta pystyttiin näkemään RE:n aiheuttama keskimääräinen kuormitusvaikutus kaikilta (n = 18) koehenkilöiltä, heidän tuloksensa myös yhdistettiin (pooled data). Ainut merkitsevä tulos löytyi myogeniinin kohdalta post 48h (p = 0,05). Lisäksi yhdistetty data osoitti

nousevaa trendiä p21:lle (p = 0,090) ja MyoD:lle (p = 0,096). Post hoc analyysi paikallisti p21:n vasteen erityisesti post 1h:n kohdalla (p = 0,01), mutta trendi oli havaittavissa myös post 48h (p = 0,07).



KUVIO 8. Real-time RT-PCR tulokset myogeniinin ja MyoD:n mRNA-tasojen muutoksille RE:n yhteydessä. Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SE.

12.3 Korrelaatiokertoimet tutkittujen mRNA-tasojen välillä

Tutkittujen mRNA-tasojen välistä korrelaatioanalyysiä varten ryhmiä käsiteltiin yhdessä. Korrelaatiot analysoitiin pre ja post 1h sekä pre ja post 48h mittausten välissä tapahtuneille muutoksille. Yhdistetyn aineiston (n = 18) perusteella löytyi useita merkitseviä korrelaatioita ($p \leq 0,05$). Esimerkiksi myostatiinin post 48h muutos korreloi sen reseptoriproteiinin AcvrIIb:n post 1h muutoksen kanssa (r = 0,48; p = 0,04) sekä sen sitojaproteiinin FLRG:n post 1h muutoksen (r = 0,78; p < 0,001) ja post 48 h muutoksen (r = 0,53; p = 0,002) kanssa. Myostatiinin post 1h muutos korreloi myös p27:n post 1h:n muutoksen (r = 0,821; p < 0,001) ja post 48h muutoksen kanssa (r = 0,573; p = 0,013).

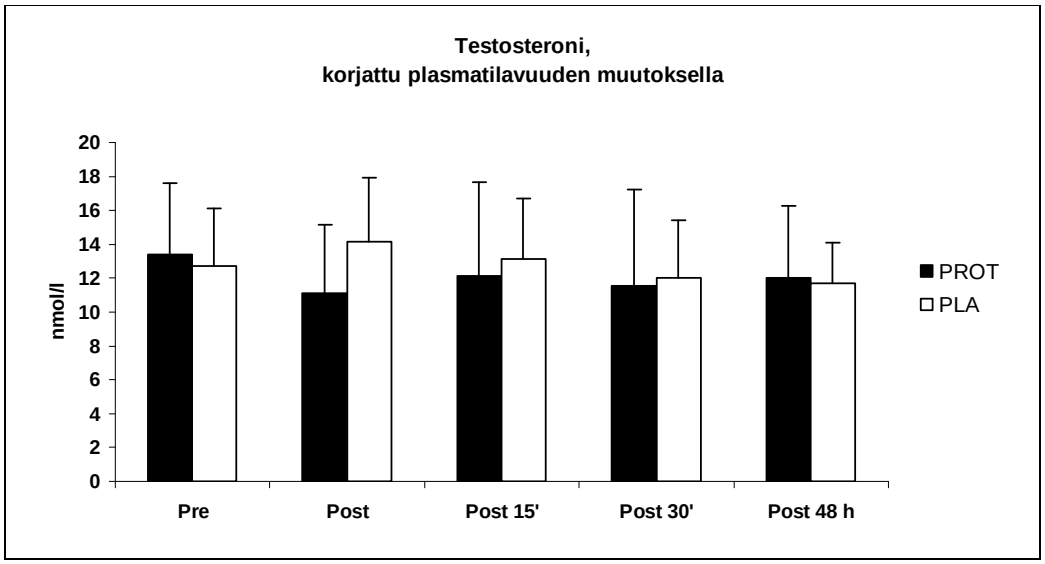
Cdk2:n post 1h muutos (r = 0,67; p = 0,002) ja post 48h muutos (r = 0,75: p < 0,001) korreloivat AcvrIIb:n vastaavien muutosten kanssa. Myogeniinin post 1h muutos

puolestaan korreloi merkitsevästi vastaavien MyoD:n ($r = 0,49$; $p = 0,04$), p21:n ($r = 0,46$; $p = 0,05$) ja Cdk2:n ($r = 0,76$, $p = 0,001$) muutosten kanssa, kun taas myogeniinin post 48h muutos korreloi vastaavien Cdk2:n ($r = 0,79$; $p < 0,001$) ja AcvrIIb:n ($r = 0,55$; $p = 0,02$) muutosten kanssa. Huomionarvoista oli, että kaikki merkitsevät ($p \leq 0,05$) ja melkein merkitsevät ($p < 0,20$) muutokset sekä post 1h:n ja post 48h:n kohdalla olivat positiivisia.

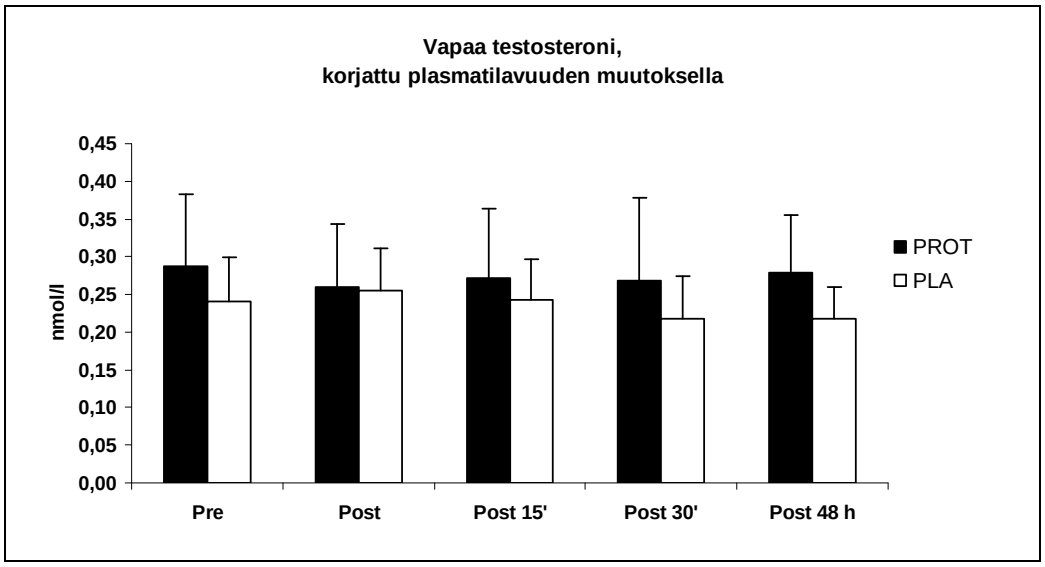
12.4 Testosteronin ja AR-proteiinin muutokset ja korrelaatiokertoimet

Seerumin testosteronimuutosten ja lihaksen AR-proteiinimuutosten merkitsevyydet on käsitelty Salon kandidaattitutkielmassa (2007). Päätuloksina saatiin, että PLA:n kokonaistestosteronin ja vapaan testosteronin pitoisuus seerumissa nousi välittömästi RE:n jälkeen ($p < 0,01$), kun taas PROT:lla ei ollut merkitsevää muutosta havaittavissa. AR-proteiinin osalta PLA:lla oli trendi nousulle ($p = 0,08$) post 1h, kun taas PROT:lla ei havaittu muutosta.

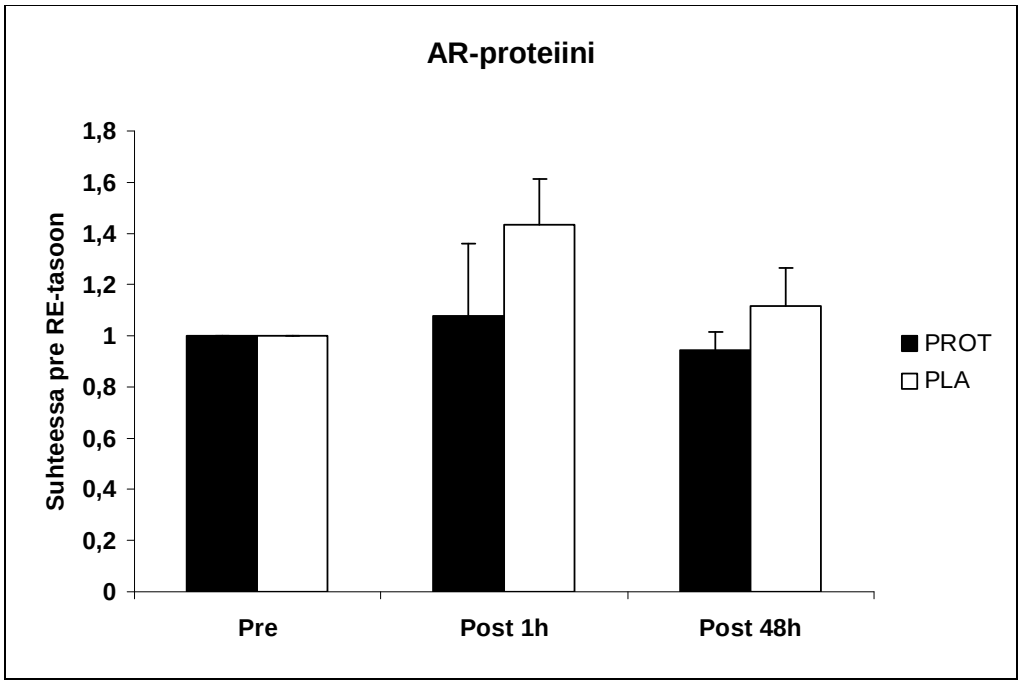
Tämän työn yhteydessä oltiin kiinnostuneita testosteronin (kokonaismäärän ja vapaan määrän) ja AR-proteiinin mahdollisista yhteyksistä mitattujen mRNA ekspressioiden tasoihin ja muutoksiin ja lihaksessa (kappaleet 12.5 ja 12.6). Kuviossa 9 (seuraavalla sivulla) on esitetty seerumin kokonaistestosteronin (korjattu plasmatilavuuden muutoksella) pitoisuudet mitatuilta ajankohdilta. Kuviossa 10 (seuraavalla sivulla) on esitettynä seerumin vapaan, biologisesti aktiivisen, testosteronin pitoisuudet (korjattu plasmatilavuuden muutoksella) ja kuviossa 11 (sivulla 77) AR-proteiinin pitoisuudet suhteutettuna lähtötasoon (pre).



KUVIO 9. Seerumin testosteronipitoisuudet mitatuilta ajankohdilta: levossa ennen RE:tä, välittömästi RE:n jälkeen sekä 15 min, 30 min ja 48 h RE:n jälkeen. Tulokset on korjattu plasmatilavuuden muutoksilla. Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SD.



KUVIO 10. Seerumin vapaan testosteronin pitoisuudet mitatuilta ajankohdilta: levossa ennen RE:tä, välittömästi RE:n jälkeen sekä 15 min, 30 min ja 48 h RE:n jälkeen. Tulokset on korjattu plasmatilavuuden muutoksilla. Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SD.

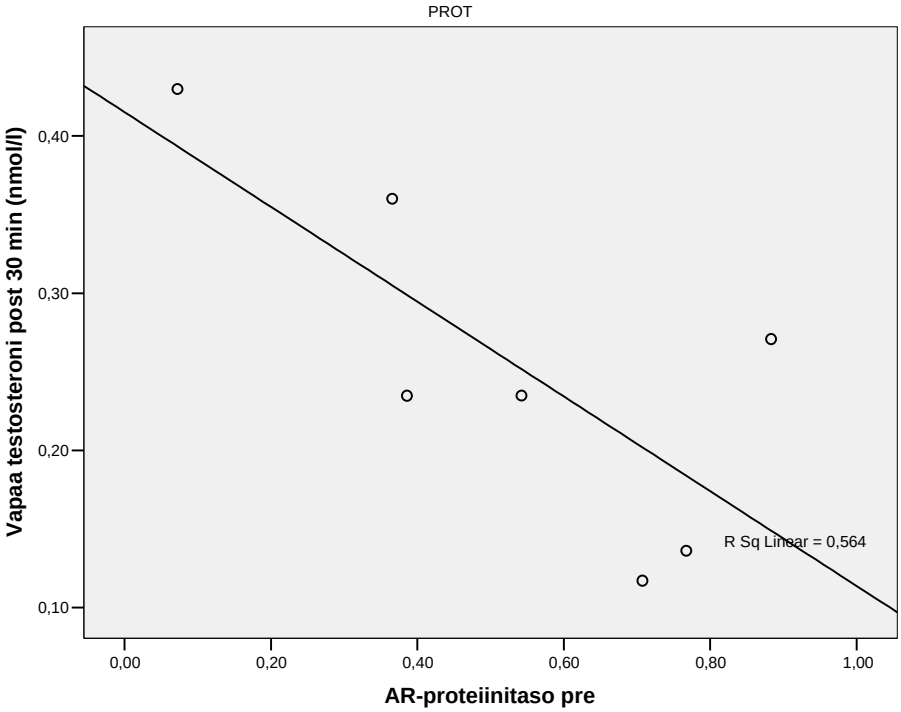


KUVIO 11. AR-proteiinin mitatut tasot suhteutettuna lähtotasoon (pre). Kaikki arvot ovat muotoa keskiarvo ± SE.

Tulosten pohdinnan yhteydessä tuli tarpeelliseksi tarkistaa myös absoluuttisten testosteronitasojen ja AR-proteiinitasojen välinen mahdollinen korrelaatio. PLA:lla ei ollut merkitseviä tai suuntaa antavia korrelaatioita havaittavissa, mutta PROT:lla ja ryhmillä yhdessä havaittiin yksi merkitsevä korrelaatio (vapaan testosteronin post 30 min ja AR-proteiinin pre 1h välinen; $r = -0{,}534$ ja $p = 0{,}033$) sekä useampi suuntaa antava korrelaatio (taulukko 4 seuraavalla sivulla), jotka kaikki olivat negatiivisia. PROT:n vapaan testosteronin post 30 min ja AR-proteiinin pre välisen korrelaation kuvaaja on esitettynä kuviossa 12.

TAULUKKO 4. Kokonaistestosteronin (testo; nmol/l) ja vapaan testosteronin (vapaa T; nmol/l) sekä AR-proteiinin absoluuttisten tasojen välinen korrelaatio PROT:lla ja ryhmillä yhdessä.

Pearsonin korrelaatio			**Testo post 30'**	**Vapaa T post 30'**	**Testo post 0-30' ka**	**Vapaa T post 0-30' ka**
PROT	**AR**	**r**	**-0,737**	**-0,751**	-0,602	-0,642
	pre	**p**	**0,059**	**0,052**	0,153	0,120
		n	**7**	**7**	7	7
	AR	**r**	**-0,692**	**-0,686**	-0,554	-0,563
	post 1h	**p**	**0,085**	**0,089**	0,197	0,188
		n	**7**	**7**	7	7
	AR	**r**	-0,525	-0,624	-0,376	-0,525
	post 48h	**p**	0,226	0,134	0,406	0,226
		n	7	7	7	7
Yhdessä	**AR**	**r**	-0,412	**-0,534**	-0,284	**-0,431**
	pre	**p**	0,113	**0,033**	0,286	**0,096**
		n	16	**16**	16	**16**
	AR	**r**	-0,182	-0,283	-0,098	-0,170
	post 1h	**p**	0,501	0,289	0,717	0,529
		n	16	16	16	16
	AR	**r**	-0,271	-0,424	-0,165	-0,333
	post 48h	**p**	0,310	0,101	0,541	0,207
		n	16	16	16	16



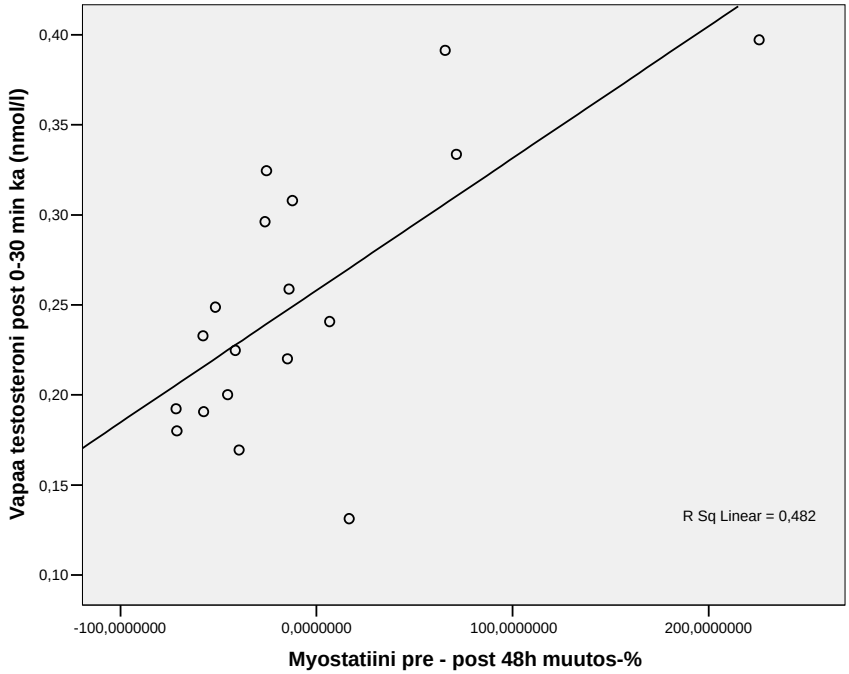
KUVIO 12. Vapaan testosteronin post 30 min pitoisuuden (nmol/l) ja absoluuttisen AR-proteiinitason välinen negatiivinen korrelaatio PROT:lla (r = -0,751; p = 0,052).

12.5 Testosteronin ja AR-proteiinin korrelaatiokertoimet myostatiinin kanssa

Yllättäen testosteronin pitoisuus alussa ja välittömästi RE:n jälkeen korreloi positiivisesti myostatiinin post 48h muutoksen kanssa (taulukko 5; kuvio 13). Ilmiö oli havaittavissa molemmilla ryhmillä erikseen ja yhdessä useimmissa aikapisteissä sekä kokonais- että vapaan testosteronin osalta.

TAULUKKO 5. Myostatiinin mRNA:n pre - post 48h muutosprosentin korrelaatiot kokonais testosteronin (testo) ja vapaan testosteronin (vapaa T) absoluuttisiin pitoisuksiin (nmol/l).

Pearsonin korrelaatio			Testo Pre	Testo Post 0'	Testo Post 0-30' ka	Vapaa T Pre	Vapaa T Post 0'	Vapaa T Post 0-30' ka
PLA	Myostatiinin	r	0,875	0,857	0,848	0,843	0,895	0,882
	muutos-%	p	0,002	0,003	0,004	0,004	0,001	0,002
	pre - post 48h	n	9	9	9	9	9	9
PROT	Myostatiinin	r	0,556	0,825	0,884	0,140	0,481	0,624
	muutos-%	p	0,120	0,006	0,002	0,719	0,190	0,072
	pre - post 48h	n	9	9	9	9	9	9
Yhdessä	Myostatiinin	r	0,695	0,802	0,874	0,390	0,556	0,694
	muutos-%	p	0,001	0,000	0,000	0,110	0,017	0,001
	pre - post 48h	n	18	18	18	18	18	18

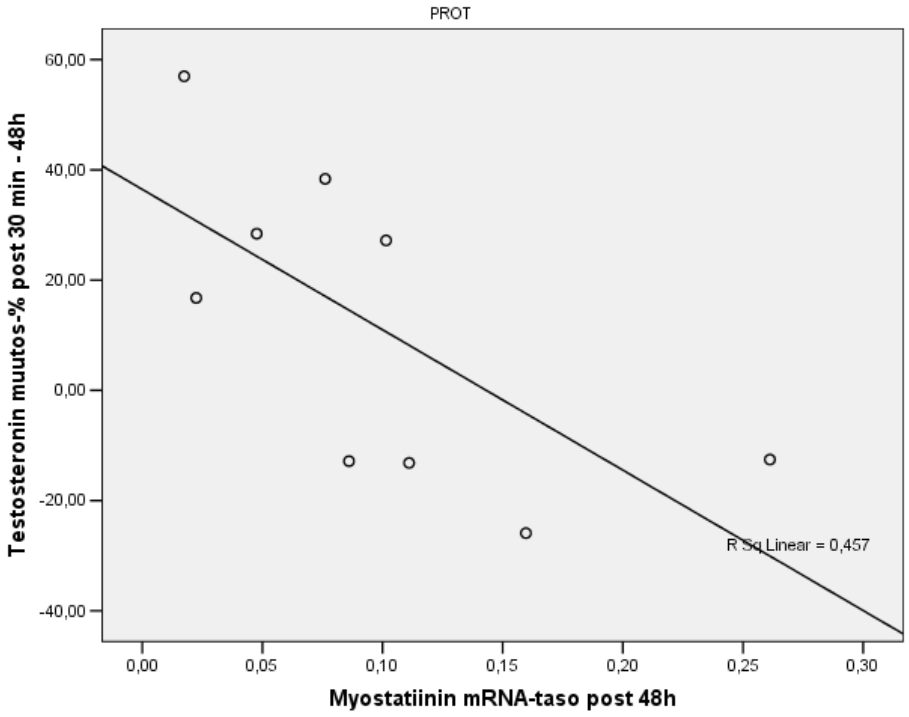


KUVIO 13. Myostatiinin pre - post 48h muutosprosentin korrelaatio vapaan testosteronin post 0 min - post 30 min keskiarvopitoisuuden (nmol/l) kanssa yhdistetyllä ryhmällä (r = 0,694; p = 0,001).

Puolestaan myostatiinin mRNA:n absoluuttinen taso post 48h:n kohdalla korreloi negatiivisesti testosteronin (kokonaismäärän ja vapaan määrän) post 30 minuutin ja post 48h välillä tapahtuneen muutoksen kanssa (taulukko 6; kuvio 14). Korrelaatio oli merkitsevä vain PROT:lla, mutta myös kun ryhmiä katsottiin yhdistettynä (taulukko 6).

TAULUKKO 6. Myostatiinin absoluuttisen m-RNA-tason korrelaatio kokonaistestosteronin (testo) ja vapaan testosteronin (vapaa T) muutos-prosentin post 30 min - 48h kanssa.

Pearsonin korrelaatio			Testo muutos-% Post 30min - 48h	Vapaa T muutos-% Post 30min - 48h
PLA	**Myostatiinin**	**r**	-0,421	-0,438
	mRNA-taso	**p**	0,259	0,238
	post 48h	**n**	9	9
PROT	**Myostatiinin**	**r**	-0,676	-0,724
	mRNA-taso	**p**	0,046	0,027
	post 48h	**n**	9	9
Yhdessä	**Myostatiinin**	**r**	-0,425	-0,489
	mRNA-taso	**p**	0,079	0,039
	post 48h	**n**	18	18

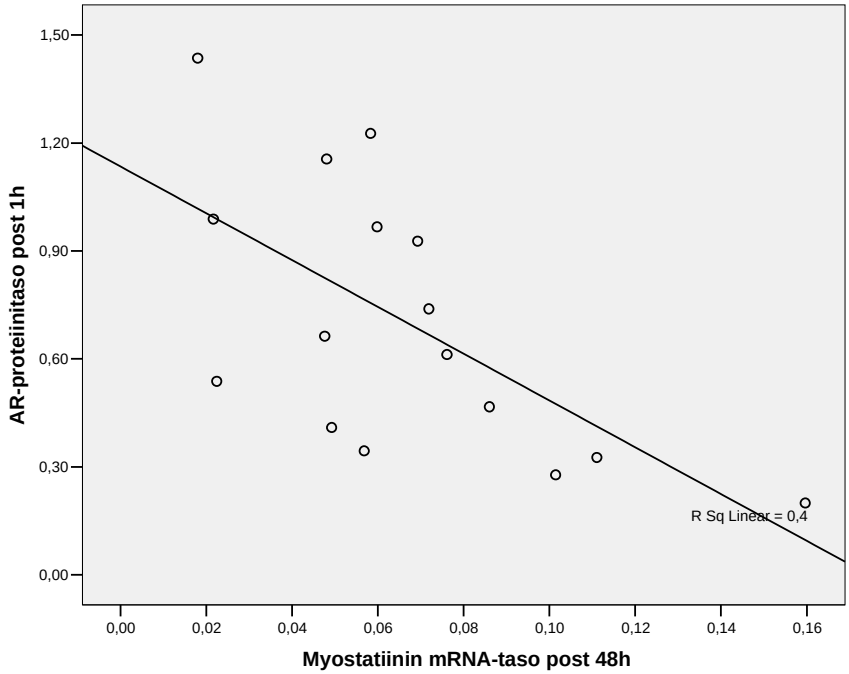


KUVIO 14. Myostatiinin mRNA-tason post 48h ja testosteronin muutosprosentin post 30 min - 48h välinen negatiivinen korrelaatio PROT:lla (r = -0,676; p = 0,046).

Myös AR-proteiinin absoluuttisen tason (pre, post 1h ja post 48h) ja myostatiinin absoluuttisen mRNA-tason post 48h välillä oli merkitseviä negatiivisia korrelaatioita PROT:lla ja ryhmillä yhdessä (taulukko 7; kuvio 15).

TAULUKKO 7. Myostatiinin absoluuttisen mRNA-tason ja AR-proteiinitason välinen korrelaatio.

Pearsonin korrelaatio			AR pre	AR post 1h	AR post 48h
PROT	**Myostatiinin**	**r**	-0,899	-0,839	-0,847
	mRNA-taso	**p**	0,006	0,018	0,016
	post 48h	**n**	7	7	7
PLA	**Myostatiinin**	**r**	-0,113	-0,422	-0,533
	mRNA-taso	**p**	0,771	0,258	0,140
	post 48h	**n**	9	9	9
Yhdessä	**Myostatiinin**	**r**	-0,665	-0,633	-0,630
	mRNA-taso	**p**	0,005	0,009	0,009
	post 48h	**n**	16	16	16



KUVIO 15. Myostatiinin mRNA-tason post 48h ja AR-proteiinitason post 1h välinen korrelaatio ryhmillä yhdessä (r = -0,633; p = 0,009).

12.6 Testosteronin ja AR-proteiinin korrelaatiokertoimet solusyklin säätelytekijöiden, FLRG:n ja AcvrIIb:n kanssa

Testosteronin ja AR-proteiinin sekä solusyklin säätelytekijöitten, AcvrIIb:n ja FLRG:n välillä oli havaittavissa useita yksittäisiä positiivisia ja negatiivisia korrelaatioita. Esimerkiksi AcvrIIb:n post 48h muutoksen ja vapaan testosteronin alkupitoisuuden (r = -0,90; p = 0,001) sekä post 0–30 min keskiarvopitoisuuden (r = -0,69; p = 0,04) välillä oli merkitsevä negatiivinen korrelaatio PROT:lla, mutta ei PLA:lla tai ryhmillä yhdessä. Systemaattiset sekä ryhmät yhdessä ja PROT:lla ja/tai PLA:lla havaitut korrelaatiot olivat kuitenkin vähissä. Yksi systemaattinen havainto oli, että sekä kokonaistestosteronin että vapaan testosteronin muutoksien ja MyoD:n post 48h muutoksen välillä oli merkitseviä ja melkein merkitseviä positiivisia korrelaatioita PLA:lla ja ryhmillä yhdessä (taulukko 8).

TAULUKKO 8. MyoD:n mRNA:n pre - post 48h muutosprosentin korrelaatio kokonaistestosteronin (testo) ja vapaan testosteronin (vapaa T) muutosprosentin post 0–30 min keskiarvopitoisuuden - post 48h kanssa.

Pearsonin korrelaatio			**Testo muutos-%** **post 0–30 min ka - 48h**	**Vapaa T muutos-%** **post 0–30 min ka - 48h**
PROT	**MyoD**	**r**	0,479	0,417
	muutos-%	**p**	0,192	0,265
	pre - post 48h	**n**	9	9
PLA	**MyoD**	**r**	0,728	0,657
	muutos-%	**p**	0,026	0,055
	pre - post 48h	**n**	9	9
Yhdessä	**MyoD**	**r**	0,663	0,603
	muutos-%	**p**	0,003	0,008
	pre - post 48h	**n**	18	18

AR-proteiinin absoluuttinen pitoisuus PROT:lla kaikissa mitatuissa aikapisteissa (pre r = -0,80 ja p = 0,03; post 1h r = -0,86 ja p = 0,01; post 48h r = -0,85 ja p = 0,01) korreloi puolestaan negatiivisesti MyoD:n mRNA-tason post 1h muutoksen kanssa. AR-proteiinin absoluuttinen pitoisuus korreloi negatiivisesti myös p21:n post 1h muutoksen kanssa PROT:lla (pre r = -0,94 ja p = 0,002; post 1h r = -0,90 ja p = 0,006; post 48h r = -0,89 ja p = 0,008) sekä ryhmillä yhdessä post 1h (r = -0,71 ja p = 0,002).

13 POHDINTA

Tämä oli tiettävästi ensimmäinen ihmisillä tehty tutkimus, joka osoitti, että proteiinin nauttiminen vaikuttaa myostatiinin ja solusykliä säätelevien geenien ekspressioon. Tutkimus osoitti, että proteiinin nauttiminen näyttää estävän voimaharjoituksen yhteydessä tapahtuvan myostatiinin mRNA:n ekspression laskun 57–72-vuotiailla ikääntyneillä miehillä ja vaikutus on nähtävissä etenkin 48 tuntia raskaan voimaharjoituksen (RE:n) jälkeen. Lisäksi proteiinin nauttiminen lisäsi myostatiinin sitojaproteiinin FLRG:n ja solusyklin säätelyyn osallistuvan Cdk2:n ekspressiota RE:n jälkeen. Myostatiinin ekspressio voimaharjoituksen yhteydessä näyttää myös mahdollisesti olevan yhteydessä seerumin testosteronipitoisuuteen ja lihaksen AR-proteiinitasoon.

Voimaharjoituksen ja heraproteiinin vaikutus myostatiinin mRNA-tasoon

Vaikka tutkimustulokset ovat olleet osittain ristiriitaisia voimaharjoituksen aiheuttamista akuuteista vaikutuksista myostatiinin ekspressioon, enemmistö tutkimuksista on osoittanut myostatiinin mRNA-tasossa tapahtuvan laskun (mm. Kim ym. 2005; Kim ym. 2007; Raue ym. 2006; Kvorning ym. 2007) ja laskua tukee myös tämän tutkimuksen tulokset PLA:lla. Tutkimus osoitti, että heraproteiinin nauttiminen välittömästi ennen ja jälkeen RE:n ehkäisee myostatiinin mRNA-tasossa tapahtuvaa laskua. Heran imeytymisnopeus on noin 8–10 g/h (Bilsborough & Mann 2006) ja aminohappojen proteiinisynteesiä stimuloivien vaikutusten havaitsemiseen kuluu aikaa oletettavasti noin 30 minuuttia proteiinisyneesin huippunopeuden ajoittuessa noin 60–90 minuutin kohdalle (Rennie ym. 2002). Etenkin ennen RE:tä nautitulla proteiinilla olisi siis jo voinut olla vaikutusta tutkittujen geenien transkriptioon tunti RE:n jälkeen mitattuna. Kuitenkin RE:ssä olleista 18 koehenkilöstä 15:llä myostatiinin mRNA-taso lihaksessa laski tunti harjoituksen päättymisen jälkeen mitattuna. Lukuun ottamatta koehenkilöiden positiivisia muutoksia lasku plaseboryhmällä (8 koehenkilöllä) oli 43 % ja proteiiniryhmällä (7 koehenkilöllä) myös 43 %. Mukaan mahtui kuitenkin 3 tulosta, joissa myostatiinin taso oli noussut (PLA:n +23 % sekä PROT:n +46 % ja +190 %). Toki ei pidä unohtaa, että tilastollinen koko ryhmän keskiarvo PROT:n ja PLA:n välillä poikkesi tunti RE:n jälkeen mitattuna ja PLA:n kohdalla muutos melkein saavutti

merkitsevyyden (p = 0,06; muutos -35,5 %), kun puolestaan PROT:lla ei (p = 0,94; muutos -6,8 %). Silti katsottaessa ryhmien yksittäisiä muutosprosentteja näyttää, että ryhmien reaktiot myostatiinin suhteen tunti RE:n päättymisen jälkeen ovat hyvin samankaltaiset, eikä proteiinin nauttiminen siihen juuri vaikuta.

Verrattaessa PLA:n ja PROT:n välisiä muutoksia myostatiinitasoissa 48 tuntia RE:n päättymisen jälkeen on ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevä ero (p = 0,03). Myös yksittäisten muutosten profiili ryhmien välillä poikkesi enemmän kuin tunti harjoituksen jälkeen mitattuna (post 48h: PLA:lla 1 ja PROT:lla 4 positiivista muutosta). PLA:lla myostatiinin mRNA-taso oli 34,5 % alhaisemmalla tasolla lähtötasoon nähden, kun puolestaan PROT:lla se oli 18,6 % korkeammalla tasolla. Tämä ryhmien välillä havaittu merkitsevä ero oli hypoteesin vastainen. Tosin vertailukohtana on vain Pilegaardin ym. (2006) tutkimuksen abstrakti, ja siinä käsiteltyjä tuloksia on osittain hankala verrata tähän tutkimukseen, sillä menetelmien yksityiskohtia ei ole tiedossa. Esimerkiksi ryhmien ravinnon ajoituksesta ei ollut yksityiskohtaista tietoa. Myös se, että Pilegaardin ym. (2006) tutkimuksessa koehenkilöt olivat nuoria ja tämän tutkimuksen koehenkilöt ikääntyneitä, saattaa vaikuttaa vasteisiin.

Voi olla, että ravinnon vaikutukset myostatiiniin välittyvät juuri proteiinin kautta, sillä Nakazaton ym. (2006) tutkimuksessa (käsitelty kappaleessa 9.1) korkeaproteiinipitoinen ravinto lisäsi myostatiinin sekä mRNA-tasoa että aktiivisen proteiinin tasoa. Mahdollisesti nyt havaittu myostatiinin mRNA-tason lasku 48h RE:n jälkeen PLA:lla tai paasto/alhainen proteiininsaanti aiemmissa tutkimuksissa (Guernec ym. 2004; Nakazato ym. 2006) toimivat suojamekanismina lihasten heikkenemistä vastaan (Guernec ym. 2004). Tätä mahdollista mekanismia ei ehkä tarvita nautittaessa proteiinia, koska proteiini, tässä tapauksessa hera, parantaa proteiinitasapainoa lihaksessa lisääntyneen proteiinisynteesin kautta (Tipton ym. 2007) vaikuttamalla translaation aloitukseen (Koopman ym. 2007). Nautittaessa siis proteiinia kuormituksen yhteydessä lihaksen anabolinen ympäristö paranee, jolloin toisaalta mahdollisesti liiallista lihaksen kasvua rajoitetaan myostatiinitasojen nostamisella. Nakazaton ym. (2006) tutkimuksessa hyvin korkeaproteiinipitoista ravintoa (35 %) syöneiden rottien lihasten poikkipinta-ala oli hieman suurempi kuin 15 % ja 25 % proteiinia ravinnosta saavilla rotilla, tosin tulos ei ollut merkitsevä. Kirjoittajat kuitenkin pohtivat, että vaikka runsas

aminohappojen saatavuus lihaksessa stimuloi proteiinisynteesiä, myostatiini minimoi lihassolujen kasvun estämällä satelliittisolujen aktivoitumista ja erilaistumista.

Tarkat ylävirranpuoleiset mekanismit, joiden avulla proteiinin vaikutukset myostatiiniin välittyvät, eivät ole selvillä. Mahdollista on, että vaikutusten välittäjinä toimivat tietyt yksittäiset aminohapot kuten glutamiini tai glutamaatti (Salehian ym. 2006). Toisaalta proteiinin nauttiminen mahdollisesti vähentää voimaharjoituksen aikana tapahtuvaa proteiinien hajoamista (Tipton & Wolfe 2001) ja saattaa nopeuttaa palautumista siitä vähentämällä lihasvaurion määrää (Nosaka ym. 2006). Voi siis olla, että RE:n yhteydessä nautittu proteiini toimii suojelevana tekijänä luurankolihassoluille aiheuttamalla vähäisemmän kudosvaurion ja tulehdusreaktion (käsitellään tarkemmin seuraavassa kappaleessa) verrattuna PLA:han, minkä seurauksena PROT:n myostatiinin mRNA-tasot ovat korkeammalla 48 tuntia RE:n jälkeen verrattuna PLA:han.

Yksittäinen raskas voimaharjoitus aiheuttaa lihakseen kudosvaurion (degeneraatio), jonka alkuvaiheessa lihaskudosta tuhoutuu ja tulehdusreaktiot aktivoituvat (Chargé & Rudnicki 2004). Neutrofiiliset granulosyytit (jyvässolut) saapuvat tulehduspaikalle jo tunnin päästä lisääntyneen lihaskuormituksen alkamisesta, ja niiden konsentraatio saattaa olla koholla vielä viiden päivän päästä (Tidball 2005). Noin 48 tunnin kuluttua vauriosta makrofagit saapuvat paikalle ja edustavat valtaosaa immunipuolustuksen soluista. Lihasvaurion yhteydessä erittyy vaurioalueella useita biologisesti aktiivisia molekyylejä, joihin kuuluu muun muassa erilaisia kasvutekijöitä ja sytokiinejä (Chargé & Rudnicki 2004). On siis hyvin mahdollista, että RE:n aiheuttama akuutti lasku myostatiinin mRNA-tasossa liittyy läheisesti lihaksen degeneraatio- ja korjausprosesseihin. RE:n aiheuttama akuutti vaste myostatiinin ekspressioon saattaa myös liittyä kalsineuriinisignalointiin. Michelin ym. (2004) tutkimustulosten mukaan kalsineuriini vähentää myostatiinin ekspressiota ylikuormituksen yhteydessä. Tosin siirtogeenisillä hiirillä tehdyissä tutkimuksissa kalsineuriinin yliekspressio ei ole aiheuttanut luurankolihasten hypertrofiaa (Dunn ym. 2000; Naya ym. 2000) ja tuskin siis kalsineuriinin signalointireitit yksin ovat vastuussa RE:n yhteydessä tapahtuvasta myostatiinin mRNA-tason laskusta. Myös paikallinen muutos verenvirtauksessa saattaa vaikuttaa myostatiinitasoihin, sillä verenkierron rajoittaminen takaraajoissa on laskenut myostatiinin proteiinitasoja ja aiheuttanut hypertrofiaa luurankolihaksessa (Kwalda & Ishii 2005).

Vaikka transkription muutos ei aina aiheuta muutosta proteiinitasossa, on esimerkiksi shRNA-tekniikalla saatu tulos näyttänyt, että pienikin lasku myostatiinin mRNA-tasossa on aiheuttanut kasvua rottien satelliittisolujen lukumäärässä ja lihaksen koossa (Magee ym. 2006). Tosin myostatiinin sitojaproteiinien (myostatiinin propeptidin, follistatiinin, FLRG:n ja GASP-1:n) tarkat toimintamekanismit ovat vielä selvittämättä, ja osittain siitä syystä myostatiinin mRNA- ja proteiinipitoisuudet erilaisissa fysiologisissa ympäristöissä tai vasteena erilaisille ärsykkeille eivät välttämättä kerro myostatiinin todellisesta signaloinnin tasosta. (Lee 2004.) Tämän tutkimuksen ulkopuolelle jäävistä tekijöistä myös dekoriini (Miura ym. 2006; Kishioka ym. 2008) ja furiini (Anderson ym. 2008) ovat keskeisessä asemassa myostatiinin vaikutusten välittäjinä.

Tutkimuksessa havaittujen myostatiinin mRNA-tasojen muutokset vaihtelivat yksilökohtaisesti ja myös PLA:lla tapahtui muutama positiivinen muutos. Myostatiinin mRNA- ja proteiinitasojen on todettu nousseen luurankolihaksessa erilaisten tilojen yhteydessä, jotka voidaan yhdistää lihasmassan vähenemiseen (Gonzalez-Cadavid ym. 1998; Reardon ym. 2001; Carlson ym. 1999). Mahdollisesti kun lihaskuormitus tehdään anabolian kannalta epäsuotuisassa tilassa tai paastotilassa, voi myostatiinin mRNA- ja proteiinitaso olla yksilökohtaisesti taipuvainen nousemaan akuutisti lihaksessa. Toisaalta kun proteiinitasapaino on negatiivinen, saattaa myostatiinin vaikutusten lisääntyminen välittyä muutoin kuin transkription tai translaation välityksellä, eli myostatiinin vaikutuksia edistävät muut säätelymekanismit aktivoituvat. Yksittäiset myostatiinin mRNA-tasojen muutokset vaihtelivat suuresti PROT:lla etenkin 48 tuntia harjoituksen jälkeen mitattuna. Ehkä vaihtelevat reaktiot RE:n aiheuttamissa myostatiinivasteissa osittain johtuvat myös siitä, minkälainen proteiinimäärä kullekin henkilölle on sopiva/optimaalinen anabolian kannalta. Suuren lihasmassan omaavan henkilön voi olettaa reagoivan myostatiinin suhteen eri tavoin tiettyyn proteiinimäärään kuin pienen lihasmassan omaavan henkilön.

Voimaharjoituksen ja heraproteiinin vaikutus FLRG:hen, AcvrIIb:hen sekä solunjakautumisen ja erilaistumisen säätelytekijöihin

Myostatiinin sitojaproteiinin FLRG:n on todettu estävän myostatiiniaktiivisuutta konsentraatiosta riippuvaisesti (Hill ym. 2002). Tämä oli ensimmäinen tutkimus, jossa selvitettiin FLRG:n mahdollista ekspressiota lihaksessa. FLRG:n mRNA nousi RE:n seurauksena PROT:lla, kun puolestaan PLA:lla ei ollut merkitsevää muutosta

havaittavissa. Näyttääkin siltä, että proteiinin nauttiminen saattaa lisätä FLRG:n ekspressiota. Jos vaste on havaittavissa myös proteiinitasolla, saattaa se vähentää myostatiiniaktiivisuutta (Hill ym. 2002) ja siten kompensoida PROT:n kohonnutta myostatiinin mRNA-tasoa verrattuna PLA:han. RE:n vaikutus myostatiinin reseptoriproteiinin AcvrIIb:n mRNA-tasoihin ei poikennut PROT:n ja PLA:n välillä. Näyttää siis siltä, ettei proteiinin nauttimisella ole vaikutusta AcvrIIb:n tasoihin. AcvrIIb:n mRNA-tasoissa ei havaittu merkitsevää muutosta myöskään yhdistetyllä ryhmällä, mikä oli hypoteesin mukaista ja tukee sitä, ettei voimaharjoitus aiheuta merkitsevää muutosta AcvrIIb:n mRNA-tasoissa (Kim ym. 2007). Sen sijaan myostatiinin post 1h muutos korreloi positiivisesti AcvrIIb:n post 48h muutoksen kanssa ($r = 0,48$; $p = 0,04$), mikä antaa viitteitä siitä, että myostatiini saattaa säädellä reseptorinsa ekspressiota RE:n seurauksena.

Cdk2:n mRNA-tasojen nousu oli hypoteesin mukainen. Nousu oli PROT:lla vielä merkitsevästi suurempi kuin PLA:lla. Koska Cdk2 ekspressoituu, kun satelliittisoluja aktivoidaan siirtymään solusykliin (Malumbres ym. 2000; McCorskery ym. 2003), voidaan ehdottaa, että proteiinin nauttiminen ennen ja jälkeen RE:n saattaa lisätä satelliittisolujen aktivaatiota ja siten proliferaatiota. Myös Olsenin ym. (2006) ja Thalacker-Mercerin ym. (2007) tutkimustulokset viittaavat siihen, että proteiinin nauttiminen lisää satelliittisolujen aktivaatiota. Tosin myös muut proliferoituvat solut saattavat vaikuttaa tutkittujen mRNA-muuttujien tasoon. Satelliittisolujen ja myoblastien lisäksi muun muassa fibroblastit, aktivoituneet immunipuolustuksen solut tai verisuonten epiteelisolut saattavat ekspressoida tässä tutkimuksessa tutkittuja mRNA-muuttujia ja siten vaikuttaa niiden tasoon. Lisätutkimukset ovat siis tarpeen, jotta voidaan varmistua, mistä soluista on kyse.

PROT:n suurempi Cdk2:n nousu sekä samankaltaiset muutokset p21:n, myogeniinin ja MyoD:n mRNA-tasoissa RE:n jälkeen verrattuna PLA:han viittaavat siihen, ettei proteiinin nauttiminen todennäköisesti aiheuttanut muutosta myostatiinin signaloinnissa, sillä kyseiset proteiinit ovat myostatiinin alavirranpuoleisia säätelytekijöitä (McCroskery ym. 2003). Toisaalta myogeenisten säätelytekijöiden ekspression on todettu olevan huipussaan 4–8 tuntia voimaharjoituksen jälkeen (Yang ym. 2005) ja kyseinen ajoitus olisikin saattanut selventää tuloksia tässä tutkimuksessa. Kuitenkin jos myostatiinin signalointi olisi lisääntynyt PROT:lla, olisi se aiheuttanut pikemminkin

alhaisemman Cdk2:n mRNA-tason verrattuna PLA:han kuin korkeamman (McCroskery ym. 2003). Toisaalta koska proteiinin nauttiminen näytti nostavan Cdk-tasoja, niin vaikka myostatiinin signalointi olisikin hieman lisääntynyt, olisi vaikutus saattanut peittyä proteiinin aiheuttaman nousun alle. Valitettavasti tutkimuksen lihasnäytteet eivät olleet tarpeeksi korkealaatuisia, jotta niistä olisi pystytty analysoimaan myostatiinin proteiinitasot.

Cdk2-inhibiittorin sekä solun erilaistumista edistävän p21:n (Malumbres ym. 2000) mRNA-tasot nousivat RE:n jälkeen, mikä oli hypoteesin mukaista ja linjassa aiempien tutkimustulosten kanssa (Bickel ym. 2003; Adams ym. 1999). Nousu saattaa viitata lisääntyneeseen satelliittisolujen proliferaatioon, mitä siis myös Cdk2-tasojen nousu tukee. p21:n ja myogeniinin välinen positiivinen korrelaatio viittaa taasen siihen, että RE:n aiheuttamat vasteet olisivat peräisin myogeenisistä soluista, kuten satelliittisoluista, eikä joistain muista soluista. Koska p21 on myös anti-apoptoottinen (Wang & Walsh 1996), saattaa RE ehkäistä satelliittisolujen apoptoosia lisäämällä p21:n ekspressiota. Suuntaus myogeniinin kohonneelle mRNA-tasolle post 48h:n kohdalla ($p = 0,07$) antaa viitteitä siitä, että satelliittisolujen erilaistuminen on vielä koholla RE:n seurauksena (Ríos ym. 2002). Samanaikaisesti koholla oleva Cdk2:n mRNA-taso viittaa puolestaan siihen, että post 48h:n kohdalla satelliittisolujen proliferaatio on koholla (McCroskery ym. 2003) ainakin PROT:lla.

Suurin osa tutkittujen muuttujien mRNA-ekspressioista nousi RE:n seurauksena. Havaittavissa oli yli 20 merkitsevää korrelaatiota eri muuttujien RE:n aiheuttamien muutosten välillä. Mielenkiintoinen havainto oli, että kaikki pre - post 1h ja pre - post 48h välillä saadut merkitsevät ($p \leq 0,05$) tai melkein merkitsevät ($p < 0,20$) korrelaatiot olivat positiivisia. Näyttääkin siltä, että RE toimii ärsykkeenä, joka vaikuttaa akuutisti tutkittujen geenien mRNA-tasoihin. Nämä kaikki geenit (myostatiini, FLRG, AcvrIIb, Cdk2, p21, p27, MyoD ja myogeniini) liittyvät lihasmassan säätelyyn ja toisiinsa useiden in vivo ja in vitro -tutkimusten perusteella (Bickel ym. 2003; Joulia ym. 2003; Kim ym. 2005; Langley ym. 2002; McCroskery ym. 2003; Ríos ym. 2002; Taylor ym. 2001; Yang ym. 2007). Solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen vaikuttavien mRNA-tasojen positiivista korrelaatiota selittää todennäköisesti suurelta osin RE:n aiheuttama kudosvaurio, jota käsiteltiin jo aiemminkin. Kudosvauriota ja tulehdusreaktiota seuraa korjausprosessi eli regeneraatio, jossa myogeenisten solujen jakautuminen ja

erilaistuminen aktivoituu, ja lihaskudos pystyy uusiutumaan (Chargé & Rudnicki 2004). Tidball (2005) muun muassa pohtii review-artikkelissaan, että neutrofiiliset granulosyytit saattavat erittää tunnistamattomia tekijöitä, jotka edistävät satelliittisolujen jakautumista ja erilaistumista, mikä taas saattaisi olla yhteydessä myös myostatiiniin. Voisi siis olettaa, että mitä enemmän kudosvauriota on tapahtunut, sitä enemmän tarvitaan myogeenisten solujen solunjakautumista ja erilaistumista. Myostatiinin, FLRG:n ja AcvrIIb:n muutosten positiivinen korrelaatio solujen proliferaatiota ja erilaistumista säätelevien tekijöiden kanssa saattaa puolestaan liittyä johonkin tiettyyn transkriptiotekijään tai myös mRNA:n puoliintumisaikaan.

Testosteronin ja AR-proteiinin yhteys myostatiiniin sekä muihin tutkittuihin mRNA-muuttujiin

Tulokset myostatiinin ja testosteronin välisestä yhteydestä olivat ristiriitaisia. Myostatiinin mRNA-tason post 48 h ja testosteronin (etenkin vapaan) post 30 min - post 48 h muutosprosentin välinen merkitsevä negatiivinen korrelaatio PROT:lla ja ryhmillä yhdessä oli hypoteesin mukainen (PLA:llakin r = -0,42 koskien testosteronia ja r = -0,44 koskien vapaata testosteronia). Myös absoluuttisen AR-proteiinitason merkitsevä negatiivinen korrelaatio myostatiinin post 48h absoluuttisen mRNA-tason kanssa PROT:lla ja ryhmillä yhdessä tukee androgeenien negatiivista vaikutusta myostatiiniin. Puolestaan myostatiinin muutosprosentin post 48 h ja testosteronipitoisuuden (post 0–30 min keskiarvo) merkitsevä positiivinen korrelaatio oli yllättävä ja sellaisenaan esitettynä ristiriidassa edellä mainittujen tulosten kanssa. Myostatiinin ja testosteronin mahdolliseen postiviiviseen yhteyteen tulee suhtautuakin hyvin varauksellisesti. Mahdotonta ei silti ole, että testosteroni lisäisi myostatiinin ilmentymistä voimaharjoituksen yhteydessä negatiivisen palautesäätelyn kautta. Tulos antaa pohtimisen aihetta sille, että myostatiinin geenin promoottorista löydetty sitoutumiskohta androgeeneille (ARE; Ma ym. 2001) toimisikin RE:n yhteydessä myostatiinin ekspressiota lisäävänä tekijänä sen sijaan, että se estäisi myostatiinin ekspressiota (Mendler ym. 2007). Tämä tuskin kuitenkaan on tilanne.

Jo edellä mainittu ARE (Ma ym. 2001) sekä myös myostaiinin ja androgeenien vastakkaiset vaikutukset luurankolihaksen massaan viittaavat siihen, että androgeeneilla saattaa olla suora vaikutus myostatiinin ekspressioon. Yllättävää kuitenkin on, että myostatiinin mRNA-tasoja koskevissa tutkimuksissa yhteyttä ei ole havaittu (Marcell

ym. 2001; Mateescu & Thonney 2002; Kvorning ym. 2007) lukuun ottamatta Mendlerin ym. (2007) tutkimusta, jossa aikuisilla rotilla havaittiin testosteronin negatiivinen vaikutus myostatiinin mRNA-tasoon. Nuorilla rotilla yhteyttä ei havaittu, mutta rotat eivät olleet vielä ehtineet sukukypsiksi, mikä saattaa selittää tulosta (Mendler ym. 2007). Sen sijaan myostatiinin proteiinitasoon lihaksessa testosteronin on havaittu vaikuttavan negatiivisesti (Mendler ym. 2007; Kwalda ym. 2006; McMahon ym. 2003). Oletuksena on, että testosteronin sitoutuminen AR:iin vaikuttaa translaatioon vaikuttaviin tekijöihin ja sitä kautta myostatiinin proteiinitasoihin. Toisaalta näyttää myös siltä, että kun testosteronitasoon on aiheutettu huomattava muutos (Mendler ym. 2007; Kwalda ym. 2006) tai ero tasoissa on systemaattinen jo valmiiksi kuten verrattaessa miehiä ja naisia (McMahon ym. 2003), on testosteronin negatiivinen vaikutus myostatiinin proteiini-/mRNA-tasoon pystytty havaitsemaan. Puolestaan tutkimuksissa, joissa on verrattu saman sukupuolen edustajia lepotilassa ilman testosteronitason manipulointia (Marcell ym. 2001; Mateescu & Thonney 2002), ei testosteronitason ja myostatiinin mRNA-tason välillä ole havaittu yhteyttä, kuten ei tässäkään tutkimuksessa havaittu. Tosin Kvorningin ym. (2007) tutkimuksessa, jossa verrattiin nuorten miesten normaalin ja hyvin alhaisen testosteronipitoisuuden vaikutuksia mm. levossa myostatiinin mRNA-tasoon ennen ja jälkeen kahdeksan viikkoa kestäneen voimaharjoittelujakson, ei ryhmien myostatiinitasoissa havaittu eroa.

Myostatiinin ja testosteronin (androgeenien) välisestä yhteydestä voimaharjoitukseen liittyen on niukalti tietoa saatavissa. Kvorningin ym. (2007) tutkimuksessa voimaharjoituksen aiheuttamat akuutit vasteet myostatiinin mRNA-tasossa (tasot laskivat molemmilla) eivät poikenneet normaalin ja hyvin alhaisen testosteroni-pitoisuuden omaavien ryhmien välillä 4 ja 24 tuntia harjoituksen jälkeen mitattuna. Ryhmien välillä ei ollut merkitseviä eroja myöskään MyoD:n, myogeniinin, AR:n, IGF-IEa:n, IGF-IEb:n tai IGF-IEc:n mRNA-tasojen muutoksissa, mikä vittaisi siihen, ettei testosteronin konsentraatio seerumissa tai AR:n mRNA-taso lihaksessa vaikuta kyseisten geenien ekspressioon voimaharjoituksen yhteydessä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan selvitetty muuttujien välisiä korrelaatioita tai ainakaan niitä ei raportoitu. Ryhmien välillä oli silti merkitsevä ero voimaharjoituksen aiheuttamassa akuutissa testosteronin vasteessa. Normaalin testosteronipitoisuuden omaavalla ryhmällä pitoisuus seerumissa nousi, kun puolestaan alhaisen testosteronipitoisuuden omaavalla ryhmällä se laski. Ryhmien vasteet olivat linjassa sen kanssa, että kahdeksan viikkoa kestänyt

voimaharjoittelu lisäsi vähemmän lihasmassaa eikä lainkaan isometrista voimaa alhaisen testosteronitason omaavilla koehenkilöillä verrattuna korkean testosteronitason omaaviin henkilöihin. Tutkijat pohtivatkin, että testosteroni saattaa säädellä solunsisäisiä tekijöitä, jotka ovat myostatiinin, MyoD:n, myogeniinin, IGF-IEa:n, IGF-IEb:n ja IGF-IEc:n alavirranpuoleisia säätelytekijöitä.

Androgeenireseptoritasojen ja myostatiinin mRNA-tasojen välinen negatiivinen korrelaatio RE:n yhteydessä oli hypoteesin mukainen. Negatiivista korrelaatiota tukee myös Marcellin ym. (2001) ikääntyneitä miehiä koskeva tutkimus, jossa AR:n mRNA-tason ja myostatiinin mRNA-tason välillä oli trendi negatiiviselle korrelaatiolle ($r = -0,36$; $p = 0,07$). Lisäksi Siriettin ym. tutkimuksessa (2006a) ehdotetaan, että myostatiinin puutteen seurauksena AR:n koaktivaattorin ARA70:n ekspressio lisääntyy, mikä puolestaan lisää AR:n aktiivisuutta. Saattaa siis olla mahdollista, että RE:n yhteydessä tapahtuva myostatiinin lasku aktivoi AR:ia. AR-proteiinin absoluuttinen taso näyttääkin vaikuttavan merkitsevästi siihen, millä tasolla myostatiinin mRNA-taso on 48h RE:n jälkeen. Miksi myostatiinin post 48h ja AR:n välinen korrelaatio oli merkitsevä ryhmillä yhdessä ja PROT:lla kaikissa aikapisteissä (pre, post 1h ja post 48h), todennäköisesti johtuu siitä, että muutokset AR-tasossa olivat pieniä ja siten jo alussa havaittu yhteys oli merkitsevä vielä lopussa. AR-proteiinin pitoisuus alussa näyttää selittävän merkittävästi myös havaittua myostatiinin post 48h muutoksen ja RE:n jälkeisen testosteronipitoisuuden (post 0–30 min keskiarvo) välistä positiivista korrelaatiota, nimittäin kyseinen testosteronipitoisuus korreloi puolestaan negatiivisesti AR-proteiinin alkupitoisuuden kanssa. Nähtävästi kun testosteronin (kokonaismäärä ja vapaa määrä) taso oli heti RE:n jälkeen korkealla, oli AR-taso puolestaan alhainen, eivätkä testosteronin vaikutukset päässeet välittymään tehokkaasti korkeasta pitoisuudesta huolimatta.

Tutkimustuloksia siitä, mitä testosteronille tarkalleen ottaen tapahtuu itse voima-harjoituksen aikana, ei ole tiettävästi julkaistu. Yleisesti ottaen voimaharjoituksen jälkeistä kohonnutta testosteronitasoa pidetään edistävänä tekijänä anabolian kannalta (mm. Kraemer & Ratamess 2005). Tutkimustulokset koskien voimaharjoituksen yhteydessä havaittavia testosteronivasteita ikääntyneillä ovat olleet osittain ristiriitaisia, mutta ikääntymisen myötä voimaharjoituksen yhteydessä tapahtuvan akuutin nousun on kuitenkin todettu olevan pienempää tai sitä ei ole havaittu lainkaan verrattuna nuoriin

(mm. Baker ym. 2006). Voi siis olla, että tämän tutkimuksen heti RE:n jälkeisen testosteronipitoisuuden (post 0–30 min keskiarvo) ja AR-proteiinin alkupitoisuuden välillä havaittu negatiivinen korrelaatio saattaa liittyä ikääntymisen myötä tapahtuviin muutoksiin lihaksen kasvun säätelyssä. Kyseinen tulos yhdistettynä havaittuihin testosteronin sekä AR-proteiinin ja myostatiinin välisiin korrelaatioihin antaa aihetta miettiä, kuvastaako välittömästi RE:n jälkeen mitattu testosteronipitoisuus ikääntyneillä pikemminkin sitä, miten hyvin testosteroni on harjoituksen aikana sitoutunut reseptoriinsa. Tosin yleisesti ottaen korrelaatioihin perustuviin päätelmiin tulee suhtautua hyvin varovaisesti, etenkin kun tulokset on laskettu vähäisellä koehenkilömäärällä kuten tässä tutkimuksessa. Lisäksi tulosten tulkintaa vaikeuttaa heraproteiinin vaikutus myostatiiniin.

Testosteronin ja AR-proteiinin väliset systemaattiset korrelaatiot muihin tutkittuihin muuttujiin myostatiinin lisäksi jäivät vähiin. Kuitenkin MyoD:n pre - post 48h muutosprosentin ja testosteronin post 0–30 min keskiarvopitoisuuden - post 48h muutosprosentin välinen positiivinen korrelaatio (vapaan testosteronin osalta ryhmät yhdessä $r = 0{,}603$ ja $p = 0{,}008$) antaa viitteitä siitä, että testosteroni lisäsi MyoD:n ekspressiota voimaharjoituksen yhteydessä sekä siten mahdollisesti aktivoituneiden satelliitisolujen eli myoblastien erilaistumista. Satelliittisolujen uskotaan olevan androgeenien suoria vaikutuskohteita, sillä ne ilmentävät AR:ia (Doumit ym. 1996). On kuitenkin epäselvää, lisäävätkö androgeenit satelliittisolujen proliferaatiota, erilaistumista vai molempia, ja mitkä ovat androgeenien tarkat vaikutusmekanismit (Chen ym. 2005). Tutkimustulokset androgeenien ja MyoD:n välisistä yhteyksistä ovat olleet ristiriitaisia. Jo aiemmin käsitellyssä Kvorningin ym. (2007) tutkimuksessa testosteronitasolla ei näyttänyt olevan vaikutusta MyoD:n mRNA-tasoon voimaharjoituksen yhteydessä. Myöskään MyoD:n lepopitoisuuksiin testosteronilla ei ole näyttänyt olevan vaikutusta Kvorningin ym. (2007) eikä Lewisin ym. tutkimuksissa (2007). Silti *in vitro* -tutkimuksissa testosteronin (Singh ym. 2003) ja testosteronin prekursorin Δ-4-androsteeni-3,17-dionin (Jasuja ym. 2005) on todettu lisäävän MyoD:n ekspressiota.

Tutkimustulosten tarkastelua yleisellä tasolla

Yleisesti ottaen myostatiinin ja muiden tutkittujen muuttujien tasoihin vaikuttaa monimuotoiset säätelymekanismit, jotka ovat vuorovaikutuksessa keskenään ja joita

oheisessa kirjallisuuskatsauksessa sekä pohdinnassa on käsitelty. Lisäksi kuitenkin vuorokausirytmillä saattaa olla osuutta tässä tutkimuksessa tarkasteltaviin muuttujiin. Vuorokausirytmiä säädellään hypotalamuksesta ja perifeerisistä kudoksista käsin, ja sen lisäksi, että vuorokausirytmi vaikuttaa hormonien erityksen eli tässä tapauksessa testosteronin erityksen, vaikuttaa se myös geenien ilmentymiseen luurankolihaksessa. Vuorokausirytmiä säätelevät molekyylitason mekansimit muodostavat verkoston, joka koostuu tiettyjen kellogeenien transkriptioon ja translaatioon liittyvistä positiivisista ja negatiivisista palautteista. Kellogeenejä on paikallistettu muun muassa maksasta, munuaisista, sydämestä ja luurankolihaksesta. (mm. McCarthy ym. 2007.) McCarthyn ym. tutkimuksessa (2007) luurankolihaksen geenien ilmentymistä profiloitiin eri vuorokaudenaikoina, jolloin tunnistettin 215 geeniä, jotka transkriptoituvat vuorokausirytmin mukaan. Nämä geenit osallistuivat pääasiassa transkription, proteiinien synteesin ja hajoamisen sekä rasva-aineenvaihdunnan säätelyyn, mutta mukana oli myös solusykliin osallistuvia geenejä. Yksittäisistä geeneistä muun muassa MyoD kuului näihin geeneihin. Zambonin ym. tutkimuksessa (2003) ehdotetaan, että voimaharjoitus muuttaa luurankolihaksessa kellogeenien transkriptiota 6 ja 18 tuntia voimaharjoituksen jälkeen mitattuna ja siten vaikuttaa suoraan lihaksen vuorokausirytmiin. On silti vaikea sanoa, kuinka lihaksen vuorokausirytmi käyttäytyy 48 tuntia RE:n päättymisen jälkeen koskien tätä tutkimusta, ja miten suurta yksilöllinen vaihtelu koehenkilöiden välillä on. Kuitenkin ennen RE:tä otettujen biopsioiden mRNA-tasoihin sekä luonnollisesti seerumin testosteronitasoihin sattaa koehenkilöiden erilaiset vuorokausirytmit vaikuttaa. Toisaalta olennaista on silti se, että mittausten kellonajat olivat ryhmien välillä keskimäärin samanlaisia samoin kuin pre ja post 48 tunnin biopsioiden kellonajat.

Muutamien tutkittujen muuttujien kohdalla joukossa oli yksi tai useampi muutosprosentti, joka oli huomattavasti suurempi kuin muut arvot (LIITE 1). Vieraita havaintoja (outliers) ei kuitenkaan tarkastettu tilastollisesti, sillä vaikka jokin muutosprosentti olisi voitu sulkea pois analyyseistä, kyseessä olisi silti saattanut olla fysiologisesti paikkansapitävä havainto. Esimerkiksi Hulmin ym. nuoria miehiä koskevassa tutkimuksessa (protokolla oli sama kuin tässä tutkimuksessa) mukana oli muutamia yli 1000 %:n muutoksia (Hulmi ym., julkaisemattomia tuloksia) kuten vähäisessä määrin myös tässä tutkimuksessa. Kirjallisuudesta löytyy vielä sen verran niukalti tietoa voimaharjoituksen ja proteiiniravinnon aiheuttamista akuuteista vasteista

tässä tutkimuksessa tarkasteltuihin mRNA-tasoihin, että vielä siinä suuruusluokassa, josta havaituissa muutoksissa on kyse, ei varsinaisesti ole perusteita poissulkea tiettyjä tuloksia. Yleisesti ottaen RE:n ja proteiinin aiheuttamat vaikutukset näyttävät olevan hyvin yksilöllisiä ja suurempi koehenkilöjoukko olisi todennäköisesti selventänyt tuloksia.

Vaihteleviin mRNA-tasoihin saattoi vaikuttaa myös itse lihasbiopsian ottamisen yhteydessä syntynyt kudosvaurio, joka mahdollisesti aktivoi vaurioituneiden lihassyiden yhteydessä sijaitsevia satelliittisoluja siirymään kohti vauriokohtaa (Schultz ym. 1985). Schultzin ym. (1985) tutkimustuloksissa annetun esimerkkitapauksen perusteella satelliittisolujen siirtyminen oli havaittavissa noin yhdeksän mm pitkän lihassyyn proksimaalisesta osasta (kolmannes koko pituudesta) vaurioituneeseen distaaliseen osaan (kolmannekseen). Ajallisesti merkitsevä ero normaaliin oli havaittavissa 15 tuntia vaurion aiheuttamisen jälkeen ($p \leq 0,05$) eron ollessa suurimmillaan 25 tuntia vaurion jälkeen ($p \leq 0,05$; seuraava mittapiste oli vasta seitsemän päivän kohdalla). Tosin tässä tutkimuksessa myös voimaharjoitus aktivoi satelliittisoluja ja lisäksi post 48h biopsia otettiin noin kaksi senttimetriä pre näytteenottokohdan yläpuolelta, eikä siis ole tietoa, aktivoiko pre-näytteen ottamisen yhteydessä syntynyt vaurio satelliittisoluja enää kahden senttimetrin päästä. Kuitenkin tämän tutkimuksen 48 tuntia RE:n jälkeen otetun biopsian satelliittisolujen lukumäärään näytteenottokohdalla saattaa olla vaikutusta riippuen siitä, miten paljon näyttenottoalueella on samoja lihassyitä, joita pre näytteen ottamisen yhteydessä on osittain tuhoutunut ja kuinka kaukana tarkalleen ottaen pre ja post 48h näytteiden ottopaikat ovat.

Tehty tutkimus on pitkälti perustutkimusta ja varsinaiset käytännön sovellutukset siihen liittyen ovat vähissä. Jos kuitenkin PROT:lla havaittu myostatiinin mRNA-tason nouseminen ja merkitsevä ero PLA:han ovat seurausta yli tarpeiden nautitusta proteiinin määrästä, voitaisiin otaksua, että 15g ennen voimaharjoitusta ja 15g sen jälkeen nautittu heraproteiinin määrä on keskimääräisesti turhan paljon ja mahdollisesti pienempikin proteiinimäärä riittäisi stimuloimaan optimaalisesti proteiinisynteesiä koskien ainakin ikääntyneitä miehiä. Onhan jo aiemmissakin tutkimustuloksissa todettu, että alle 10g aminohappoja on jo riittävä määrä stimuloimaan proteiinisynteesiä sekä levossa että harjoituksen yhteydessä (Rennie ym. 2004). Toisaalta koehenkilöiden päivittäisestä ravinnosta saatu proteiinimäärä vaikuttaa myös taustatekijänä, ja edellä mainittuihin

arvioihin proteiinin riittävyydestä tulee jo silläkin perusteella suhtautua varovaisesti. Toisaalta kuitenkin ryhmien päivittäinen proteiininsaanti oli hyvin samankaltaista, eikä ryhmien välillä havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa. Tosin viimeiseltä mittauspäivältä ei enää täytetty ruokapäiväkirjaa.

Loppuyhteenveto

Tehty tutkimus toi uutta tietoa voimaharjoituksen yhteydessä nautitun proteiiniravinnon vaikutuksista lihaksen kasvun säätelyyn osallistuvien geenien ilmentymiseen. Se osoitti, että proteiinin nauttiminen näyttää estävän voimaharjoituksen yhteydessä tapahtuvan myostatiinin mRNA:n ekspression laskun 57–72-vuotiailla miehillä ja vaikutus on nähtävissä etenkin 48 tuntia raskaan voimaharjoituksen jälkeen. Myostatiinin mRNA-tason lasku voimaharjoituksen jälkeen toimii mahdollisesti suojamekanismina lihasten heikkenemistä vastaan (Guernec ym. 2004) ja nautittaessa proteiinia kyseistä mekanismia ei ehkä tarvita, sillä proteiini, tässä tapauksessa hera, parantaa proteiinitasapainoa lihaksessa (Tipton ym. 2007). Toisaalta nautittaessa proteiinia kuormituksen yhteydessä mahdollisesti liiallista lihaksen kasvua rajoitetaan myostatiinitasojen nostamisella (Nakazato ym. 2006). Voi myös olla, että proteiinin nauttimisen seurauksena voimaharjoituksen luurankolihakseen aiheuttama kudosvaurio ja tulehdusreaktio jäävät plasebotilannetta vähäisemmiksi, minkä seurauksena myostatiinin mRNA-tasot ovat korkeammat kuin plaseboryhmällä 48 tuntia voimaharjoituksen jälkeen. Lisäksi proteiinin vaikutusta myostatiinivasteeseen saattaa selittää se, minkälainen proteiinimäärä kullekin henkilölle on sopiva/optimaalinen anabolian kannalta. Voimaharjoituksen aiheuttamat akuutit vaikutukset myostatiiniin saattavat liittyä läheisesti lihakseen aiheutuneeseen kudosvaurioon ja tulehdusreaktioiden aktivoitumiseen tai toisaalta myös kalsineuriinisignalointiin (Michel ym. 2004). Näyttää lisäksi siltä, että testosteronin ja AR-proteiinin tasot vaikuttavat mahdollisesti osaltaan siihen, millä tasolla myostatiinin mRNA-pitoisuus on 48 tuntia voimaharjoituksen jälkeen. Muiden muuttujien osalta tämä tutkimus oli ensimmäinen, jossa selvitettiin voimaharjoituksen vaikutuksia myostatiinin sitojaproteiinin FLRG:n ekspressioon lihaksessa. Plasebotilanteessa merkitsevää muutosta ei havaittu, mutta sen sijaan proteiinin nauttiminen lisäsi FLRG:n sekä myös solusyklin säätelyyn osallistuvan Cdk2:n ekspressiota 48 tuntia voimaharjoituksen jälkeen. Cdk2:n nousu antaa viiteitä siitä, että proteiinin nauttiminen ennen ja jälkeen voimaharjoituksen saattaa lisätä satelliittisolujen aktivaatiota ja siten proliferaatiota.

Kuitenkin myös muut proliferoituvat solut saattavat vaikuttaa Cdk2:n ekspressioon ja lisäksi muiden tutkittujen muuttujien ekspressioon ja jatkotutkimuksissa tulisikin selvittää, mistä soluista tarkalleen on kyse.

Johtopäätöksenä voidaan todeta, että voimaharjoituksella oli vaikutusta myostatiinin ja tiettyjen solusykliä sääntelevien geenien ekspressioon, ja heraproteiinin nauttiminen edelleen vaikutti osaan aiheutuneista vasteista mukaan lukien vaikutukset myostatiinin sitojaproteiiniin FLRG:hen. Tutkittaessa siis harjoituksen vaikutuksia lihasten kasvun säätelyyn osallistuvien geenien ekspressioon on ravinnonsaannin kontrolloiminen tärkeää.

LÄHTEET

Adams, G.R., Haddad, F. & Baldwin, K.M. 1999. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. J Appl Physiol 87, 5, 1705-1712.

Adams, G.R., Haddad, F., Bodell, P.W., Tran, P.D. & Baldwin, K.M. 2007. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. J Appl Physiol 103, 1644-1654.

Adams, G.R. & McCue, S.A. 1998. Localized infusion of IGF-I results in skeletal muscle hypertrophy in rats. J Appl Physiol 84, 1716-1722.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell. 4th edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, U.S.A.

Allen, D.L., Monke, S.R., Talmadge, R.J., Roy, R.R. & Edgerton, V.R. 1995. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. J Appl Physiol 78, 1969-1976.

Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S.C., Otto, A., Voit, T., Muntoni, F., Vrbóva, G., Partridge, T., Zammit, P., Bunger, L. & Patel, K. 2006. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impared force generation. Proc Natl Acad Sci USA 104, 1835-1840.

Amthor, H., Nicholas, G., McKinnel, I., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R. & Patel, K. 2004. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. Dev Biol, 270, 19-30.

Andersen, L.L., Tufekovic, G, Zebis, M.K., Crameri, R.M., Verlaan, G., Kjaer, M., Suetta, C., Magnusson, P. & Aagaard, P. 2005. The effect of resistance training combined with timed ingestion of protein on muscle fiber size and muscle strength. Metabolism 54, 2, 151-156.

Anderson, S.B., Goldberg, A.L. & Whitman, M. 2008. Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M706678200.

Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. 2001. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J Nutr 131, 856S-860S.

Antonio, J., Wilson, J.D. & George, F.W. 1999. Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. Journal of Applied Physiology 87, 2016-2019.

Atkinson, G. 2001. Analysis of repeated measurements in physical therapy research. Phys ther Sport 2, 194-208.

Atkinson, G. 2002. Analysis of repeated measurements in physical therapy researh: multiple comparisons amongst level means and multifactorial design. Phys Ther Sport 3, 191-203.

Baar, K. & Esser, K. 1999. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. Am J Physiol 276, C120-127.

Baker, J.R., Bemben, M.G., Anderson, M.A. & Bemben, D.A. 2006. Effects of age on testosterone responses to resistance exercise and musculoskeletal variables in men. J Strength Cond Res 20, 4, 874-881.

Barton-Davis, E.R., Shoturma, D.I., Musaro, A., Rosenthal, N. & Sweeney, H.L. 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. Proc Natl Acad Sci. USA 95, 15603-15607.

Baumann, A.P., Ibebunjo, C., Grasser, W.A. & Paralkar, V.M. 2003. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. J Musculoskelet Neuronal Interact 3, 1, 8-16.

Bennet, W.M., Connacher, A.A., Scrimgeour, C.M. & Rennie, M.J. 1990. The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[15N]phenylalanine and L-[1-13C]leucine exchange. Eur J Clin Invest 20, 1, 41-50.

Bennet, W.M., Connacher, A.A., Scrimgeour, C.M., Smith, K. & Rennie, M.J. 1989. Increase in anterior tibialis muscle protein synthesis in healthy man during mixed amino acid infusion: studies of incorporation of [$^{1\text{-}13}$C]leucine. Clin Sci 76, 447-454.

Berridge, M.J. 1997. Lymphocyte activation in health and disease. Crit Rev Immunol 17, 17, 2, 155-178.

Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W.P., Bunnel, T.J & Casaburi, R. 1997. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. Journal of Clinical Endocrinology and metabolism 82, 407-413.

Bhasin, S., Woodhouse, L. & Storer, T.W. 2001. Proof of the effect of testosterone on skletal muscle. Journal of Endocrinology 170, 27-38.

Bickel, C.S., Slade, J.M., Haddad, F., Adams, G.R. & Dudley, G.A. 2003. Acute molecular responses of skeletal muscle to resistance exercise in able-bodied and spinal cord-injuried subjects. J Appl Physiol 94, 6, 2255-2262.

Bickel, C.S., Slade, J., Mahoney, E., Haddad, F., Dudley, G.A. & Adams, G.R. 2005. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. J Appl Physiol 98, 482-488.

Bilsborough, S. & Mann, N. 2006. A review of issues of dietary protein intake in humans. Int J Sport Nutr Exerc Metab 16, 129-152.

Bodine, S.C., Stitt, T.N., Conzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J. & Yancopoulos, G.D. 2001. Akt/mTOR pahway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol 3, 1014-1019.

Bogdanovich, S., Kraq, T.O., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittermore, L.A., Ahima, R.S. & Khurana, T.S. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature 420, 6914, 418-21.

Bogdanovich, S., Perkins, K.J., Kraq, T.O., Whittermore, L.A. & Khurana, T.S. 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. FASEB J. 6, 543-549.

Bohé, J., Aili Low, J.F., Wolfe, R.R. & Rennie, M.J. 2003. Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. Journal of Physiology 532.2, 575-579.

Borer, K.T. 2003. Exercise Endocrinology. Human Kinetics, USA.

Børsheim, E., Aarsland, A. & Wolfe, R.R. 2004. Effect of an amino, protein, and carbohydrate mixture on net muscle protein balance after resistance exercise. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. 255-271.

Børsheim, E., Tipton, K.D., Wolf, S.E. & Wolfe, R.R. 2002. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 283, E648-E657.

Brandenberger, G., Follenius, M. & Hietter, B. 1982. Feedback from meal-related peaks determines diurnal changes in cortisol response to exercise. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 54, 3, 592-596.

Brill, K.T., Weltman, A.L., Gentili, A., Patrie, J.T., Fryburg, D.A., Hanks, J.B., Urban, R.J. & Veldhuis, J.D. 2002. Single and combined effects of growth hormone and testosterone administration on measures of body composition, physical performance, mood, sexual function, bone turnover, and muscle gene expression in healthy older men. J Clin Endocrinol Metab 87, 5649-5657.

Brodsky, I.G., Balagopal, P & Nair, K.S. 1996. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men – a clinical research study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81, 3469-3475.

Brooks, S.V. & Faulkner, J.A. 1990. Contraction-induced injury: recovery of skeletal muscles in young and old mice. Am J Physiol 258, C346-442.

Burke, D.G., Chilibeck, P.D., Davidson, K.S., Candow, D.G., Farthing, J. & Smith-Palmer, T. 2001. The effect of whey protein supplementation with and without creatine monohydrate combined with resistance training on lean tissue mass and muscle strength. Int J Sport Nutr Exerc Metab 11, 3, 349-364.

Butler, A.A. & LeRoith, D. 2001. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. Annu Rev Physiol 63, 161-164.

Bylund-Fellenius, A-C., Ojamaa, K.M., Flaim, K.E., Li, J.B., Wassner, S.J. & Jefferson, L.S. 1984. Protein synthesis versus energy state in contracting muscle of perfused rat hindlimb. Am J Physiol Endocrinol Metab 246, E297-E305.

Carlson, C.J., Booth, F.W. & Gordon, S.E. 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. American Journal of Physiology, 277, R601-606.

Carraro, F., Stuart, C.A., Hartl, W.H., Rosenblatt, J. & Wolfe, R.R. 1990. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. Am J Physiol Endocrinol Metab 259, E470-E476.

Carson, J.A., Schwartz, R.J. & Booth, F.W. 1996. SRF TEF-1 control of chicken skeletal α-actin gene during slow-muscle hypertrophy. Am J Physiol Cel Physiol 270, C1624-1633.

Carson, J.A. & Wei, L. 2000. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. J Appl Physiol 88, 1, 337-343.

Chargé, S. & Rudnicki, M.A. 2003. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. Physiol Rev 84, 209-238.

Chauvigne, F., Gabillard, J.C., Weil, C. & Rescan, P.Y. 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. Gen Comp Endocrinol 132, 2, 209-215.

Chen, Y., Jeffrey, D.Z. & MacLean, H.E. 2005. Androgen regulation of satellite cell function. Journal of Endocrionoogy 186, 21-31.

Chesley, A., MacDougall, J., Tarnopolsky, M., Atkinson, S. & Smith, K. 1992. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. J Appl Physiol 73, 1383-1388.

Coffey, V.G., Shield, A., Canny, B.J., Carey, K.A., Cameron-Smith, D. & Hawley, J.A. 2005. Interaction of contractile activity & training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. Articles in PresS. Am J Physiol Endocrinol Metab. doi:10.1152/ajpendo.00299.2005.

Cohen, L.A. & Guan, J.L. 2005. Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. Curr Cancer Drug Targets 5, 8, 629-43.

Colgan, M. 1993. Optimum sports nutrition. Advanced research press, New York.

Cribb, P.J. & Hayes, A. 2006. Effects of supplement timing and resistance exercise on skeletal muscle hypertrophy. Med Sci Sports Exeerc 38,11, 1918-1925.

Daenzer, M., Petzke, K.J., Bequette, B.J., Metges, C.C. 2001. Whole-body nitrogen and splanchnic amino acid metabolism differ in rats fed mixed diets contining casein or its corresponding amino acid mixture. J Nutr 131, 1965-1972.

Davis, S.N., Shavers, C. & Costa F. 2000. Differential gender responses to hypoglycemia are due to alterations in CNS drive and not glycemic thresholds. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 279, E1054-E1063.

Dill, D.B. & Costill, D.L. 1974. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. Journal of Applied Physiology 37, 247-248.

Doumit, M.E:, Cook, D.R: & Merkel, R.A. 1996. Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells *in vitro*. Endocrinology 137, 1385-1394.

Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T. & Wiswell, R.A. 2006. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. Muscle Nerve 33, 242-253.

Dunn, S.E., Burns, J.L. & Michel, R.N. 1999. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. J Biol Chem 274, 21908-21912.

Dunn, S.E., Chin, E.R. & Michel R.N. 2000. Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. J Cell Biol 151, 663-672.

Esmarck, B., Andersen, J.L., Olsen, S., Richter, E.A., Mizuno, M. & Kjaer, M. 2001. Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. J Physiol 535, 301-311.

Fleck, S.J. & Kraemer, W.J. 2004. Designing Resistance Training Programs. 3rd Edition. Human Kinetics.

Florini, J.R., Ewton, D.Z. & Coolican, S.A. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. Endocr Rev 17, 481-517.

Fluck, M., Carson, J.A., Schwartz, R.J. & Booth, F.W. 1999. SRF protein is upregulated during stretch-induced hypertrophy of rooster ALD muscle. J Appl Physiol 86, 1793-1799.

Fluck, M. & Hoppeler, H. 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity–from gene to form and function. Rev Physiol Biochem Pharmacol 146, 159-216.

Fluckey, J.D., Vary, T.C., Jefferson, L.S., Evans, W.J. & Farrell, P.A. 1996. Insulin stimulation of protein synthesis in rat skeletal muscle following resistance exercise maintained with advanced age. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 51, 323-330.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine of the National Academies. 2004. Dietary Reference Intakes Table -- The Complete Set. National Academy of Sciences. Saatavilla pdf-muodossa osoitteessa: <URL:

http://www.iom.edu/Object.File/Master/21/372/DRI%20Tables%20after%20electrolytes%20plus%20micro-macroEAR_2.pdf, viitattu 18.8.2007.

Freedman, L.P. 1992. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. Endocrine Reviews 13,129-145.

Ganong, W.F. 1999. Review of Medical Physiology. Appleton & Lange, USA.

Gibala, M.J., MacDougall, J.D., Tarnopolsky, M.A., Stauber, W.T. & Elorriaga, A. 1995. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. J Appl Physiol 78, 2, 702-708.

Godfrey, R.J., Madgwick, Z. & Whyte, G. 2003. The exercise induced growth hormone response in athletes. Sports Medicine 33, 8, 599-613.

Goldspink, G. & Harridge, S.D. 2003. Cellular and molecular aspects of adaptation in skeletal muscle. Teoksessa Komi, P.V. (Toim.) Strength and Power in Sport. Blackwell Science Ltd, UK, 231-251.

Goldspink, G. & Harridge, S.D. 2004. Growth factors and muscle ageing. Experimental Gerontology 39, 1433-1438.

Gonzalez-Cadavid, N.F. & Bashin, S. 2004. Role of myostatin in metabolism. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 7, 4, 451-457.

Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheki, K., Sinha-Hikim, I., Ma, S., Ezzat, R., Shen, R., Lalani, S. Asa, M., Mamita, G., Nair, S., Arver, S. & Bashin, S. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasing. Proc Natl Acad U.S.A. 95, 14938-14943.

Greenhalgh, C.J., Rico-Bautista, E., Lorentzon, M., Thaus, A.L., Morgan, P.O., Willson, T.A., Zervoudakis, P., Metcalf, D., Street, I., Nicola, N.A., Nash, A.D., Fabri, L.J., Norstedt,G., Ohlsson, C., Flores-Morales, A., Alexander, W.S. & Hilton, D.J. 2005. SOCS2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo. J Clin Invest 115, 397-406.

Greenlund, L.J.S. & Nair, K.S. 2003. Sarcopenia - consequences, mechanisms, and potential therapies. Mechanisms of Ageing and Development 124, 287-299.

Groff, J.L. & Gropper, S.S. 2000. Advanced Nutrition and Human Metabolism. Wadsworth, USA.

Guernec, A., Chevalier, B. & Duclos, M.J. 2004. Nutrient supply enhances both IGF-1 and MSTN mRNA levels in chicken skeletal muscle. Domestic Animal Endocrionology 26, 143-154.

Guyton, A.C. & Hall, J.E. 2000. Textbook of Medical Physiology. W.B. Saunders Company, U.S.A.

Ha, E. & Zemel, M.B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). Journal of Nutritional Biochemistry 14, 251-258.

Haddad, F. & Adams, G.R. 2006. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. J Appl Physiol 100, 1188-1203.

Haddad, F. & Adams, G.R. 2002. Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. J Appl Physiol 93, 394-403.

Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J. & Morgan, L.M. 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. British Journal of Nutrition 89, 239-248.

Hameed, M, Orrell, R.W., Cobbold, M., Goldspink, G & Harridge, S.D.R. 2003. Clarification. J Physiol 549, 3.

Hargreaves, M. & Snow, R. 2001. Amino acids and endurance exercise. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism 11, 133-145.

Harridge, S.D.R. 2007. Translational Review: The plasticity of human skeletal muscle: From gene expression to in vivo function. Expperimental Physiology DOI: 10.1113/expphysiol.2006.036525.

Heinemeier, K.M., Olsen, J.L., Schjerling, P., Haddad, F., Langberg, H, Baldwin, K.M. & Kjaer, M. 2007. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types.

Heino, J. & Vuento, M. 2004. Solubiologia. WSOY, Porvoo.

Heldin, C-H, Miyazono, K & ten Dijke, P. 1997. TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature, Vol 390, 4: 465-471.

Hill, J.J. Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H, Hewick, R.M., Wolfman, N.M. & Qiu, Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. J Biol Chem, 277, 40735-40741.

Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M. & Wolfman, N.M. 2003. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. Mol Endocrinol, 7, 1144-1154.

Hoffman, J.R. & Falvo, M.J. 2004. Protein - which is best? Journal of Sport Science and Medicine 3, 3, 118-130.

Huang, Z., Chen, D., Zhang, K., Yu, B., Chen, X. Meng, J. 2007. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. Cellular Signaling. doi:10.1016/j.cellsig.2007.07.002.

Hulmi, J.J., Ahtiainen, J.P., Kaasalainen, T., Pöllänen, E., Häkkinen, K., Alen, M., Selänne, H., Kovanen, V. & Mero, A.A. 2007. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. Med Sci Sports Exerc 39, 2, 289-297.

Häkkinen, K. 2003. Ageing and neuromuscular adaptation to strength training. Teoksessa Komi, P.V. (toim.) Strength and Power in Sport. Blackwell Science Ltd, UK, 361-386.

Häkkinen, K, Kallinen, M, Izquierdo, M, Jokelainen, K, Lassila, H, Malkia, E, Kraemer W.J., Newton, R.U. & Alen M.1998. Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. J Appl Physiol 84, 4, 1341-9.

Häkkinen, K. & Pakarinen, A. 1993. Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. Journal of Applied Physiology 74, 2, 882-887.

Ingber, D.E. 2003. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. J Cell Sci 116, 1397-1408.

Ishido, M., Kami, K., Masuhara, M. 2004. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscle. Acta Physiol Scand 180, 281-289.

Jacquemin, V., Furling, D., Bigot, A., Butler-Browne, G.S. & Mouly, V. 2004. IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. Exp Cell Res 299, 48-58.

Jasuja, R., Ramaraj, P., Phong Mac, R., Singh, A.B., Storer, T.W., Artaza, J., Miller, A., Singh, R., Taylor, W.E., Lee, M.L., Davidson, T., Sinha-Hikim, I., Gonzalez-Cadavid & Bhasin, S. 2005. Δ-4-Androstene-3,17-dione binds androgen receptor, promotes myogenesis *in vitro*, and increases serum testosterone levels, fat free mass, and muscle strength in hypogonadal men. JCEM 90, 2, 855-863.

Jeanplong, F., Bass, J.J., Smith, H.K., Kirk, S.P., Kambadur, R., Sharma ,M. & Oldham, J.M. 2003. Prolonged underfeeding of sheep increases myostatin and myogenic regulatory factor Myf-5 in skeletal muscle while IGF-I and myogenin are repressed. J Endocrinol 176, 3, 425-437.

Jensky, N.E., Sims, J.K., Rice, J.C., Dreyer, H.C. & Schroeder, E.T. 2007. The influence of eccentric exercise on mRNA expression of skeletal muscle regulators. Eur J Appl Physiol. doi:10.1007/s00421-007-0521-9.

Ji, S., Losisnski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F. & Spurlock, M.E. 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. Am J Physiol 275, R1265-1273.

Joulia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., Cabello, G. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myosblast proliferation end differentiation by myostatin. Exp Cell Res 286, 263-275.

Kadowaki, M. & Kanazawa, T. 2003. Amino acids as regulators of proteolysis. J Nutr 133, 2052S-2056S.

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L. & Bass, J.J. 1997. Mutations in myostatin (GDF-8) in double-muscled Belgian blue and piedmontese cattle. Genome Res, 7, 910-915.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell 110, 163-175.

Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. 2003. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor mTOR. Mol Cell 11, 895-904.

Kim, J-s., Cross, J.M. & Bamman, M.M. 2005. Impact of resistance loading on myostatin expression in young and older men and women. AJP Endocrinol Metab 288, E1110-1119.

Kim, J-s., Petrella, J.K., Cross, J.M. & Bamman, M.M. 2007. Load-mediated downregulation of myostatin mRNA is not sufficient to promote myofiber hypertrophy in humans: a cluster analysis. J Appl Physiol 103, 5, 1488-1495.

Kimball, S.R. & Jefferson, L.S. 2002. Control of protein synthesis by amino acid availability. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5, 63-67.

Kishioka, Y., Thomas, M., Wakamatsu, J.I., Hattori, A., Sharma, M., Kambadur, R. & Nishimura, T. 2008. Decorin enhances the proliferation and differentation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. J Cell Physiol doi:10.1002/jcp.21371.

Koopman, R., Pennings, B., Zorenc, AH & van Loon, LJ. 2007. Protein ingestion further augments S6K1 phosphorylation in skeletal muscle following resistance type exercise in males. J Nutr 137, 8, 1880-1886.

Kraemer, W.J. & Ratamess, N. A. 2003. Endocrine responses and adaptations to strength and power training. Teoksessa Komi, P.V. (toim.) Strength and Power in Sport. Blackwell Science Ltd, UK, 361-386.

.

Kraemer, W.J. & Ratamess, N.A. 2005. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med 35, 4, 339-361.

Kramer, H.F. & Goodyear, L.J. 2007. Exercise, MAPK, and NF-κB signaling in skeletal muscle. Articles in PresS. J Appl Physiol (February 15). Review.

Kvorning, T., Andersen, M., Brixen, K., Schjerling, P, Suetta, C. Madsen, K. 2007. Suppression of testosterone does not blunt mRNA expression of myoD, myogenin, IGF, myostatin or androgen receptor post strength training in humans. J Physiol 578, 579-593.

Kwalda, S. & Ishii, N. 2005. Skeletal muscle hypertrophy after chronic restriction of venous blood flow in rats. Med Sci Sports Exerc 37, 7, 1144-1150.

Kwalda, S., Okuno, M. & Ishii, N. 2006. Testosterone causes decrease in the content of skeletal muscle myostatin. Int J of Sport and Health Sci 4, 44-48.

Kwalda, S., Tachi, C. & Ishii, N. 2001. Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscle during ageing, mechanical unloading and reloading. J Muscle Res Cell Motil 22, 8, 627-633.

Lambert, C.P., Frank, L.L. & Evans, W.J. 2004. Macronutrient considerations for the sport of bodybuilding. Sports Medicine. 34, 5, 317-327.

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S. & Kambadur, R. 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression, J Biol Chem 227, 49831-49840.

Layman, D.K. 2002. Role of leucine in protein metabolism during exercise and recovery. Canadian Journal of Applied Physiology 27, 6, 646-662.

Lee, S-J. 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-β signaling pathways. PLoS ONE 2, 8, e789. doi:10.1371/journal.pone.0000789.

Lee, S-J. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. Annu Rev Cell Dev Biol, 20, 61-86.

Lee, S-J. & McPherron, A.C. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 98, 9306-9311.

Lee, S.J., Reed, L.A., Davies, M.V., Girgenrath, S., Goad, M.E., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Barker, C., Ehrmantraut, G., Holmstrom, J., Trowell, B., Gertz, B., Jiang, M.S., Sebald, S.M., Matzuk, M., Li, E., Liang, L.F., Quattlebaum, E., Stotish, R.L. Wolfman NM. 2005. Regulation of muscle growth by multiple ligands signalling through activin type II receptors. PNAS 102, 50, 18117-18122.

Lemon, P.W.R. 2000. Beyond the zone: protein needs of active individuals. Journal of American College of Nutrition 19, 90005, 513S - 521S.

Leroith, D. & Nissey, P. 2005. Knock your SOCS off! Journal of Clinical Investigation 115, 233-236.

Lewis, M.I., Fournier, M., Storer, T.W., Bhasin, S., Porszasz, J., Ren, S-G., Da, X. & Casaburi, R. 2007. Skeletal muscle adaptations to testosterone and resistance training in men with COPD. J Appl Physiol 103, 1299-1310.

Liu, W. & Saint, D.A. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. Biochem Biophys Res Commun 294, 347-353.

Liu, W., Thomas, S.G., Sylvia, L.A., Gonzalez-Cavidad, N., Bhasin, S. & Ezzat, S. 2003. Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. Journal of Endocrionology & Metabolism 88, 11, 5490-5496.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. & Darnell, J. 2004. Molecular Cell Biology. 5th edition. W.H. Freeman and Company, New York.

Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N. & Bhasin, S. 2001. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone *in vitro*. American Journal of Physiology, Endocrionology and Metabolism 281, E1128-E1136.

Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J. & Salehian, B. 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab 285, E363-E371.

MacDougall, J.D. 2003. Hypertrophy and Hyperplasia. Teoksessa Komi, P.V. (Toim.) Strength and Power in Sport. Blackwell Science Ltd, UK, 252-264.

MacDougall, J.D., Gibala, M.J., Tarnopolsky, M.A., MacDonald, J.R., Interisano, S.A. & Yarasheski, K.E. 1995. The time course for elevated muscle protein synthesis following heavy resistance exercise. Can J Appl Physiol 20, 480-486.

MacDougall, J.D., Sale, D.G., Moroz, J.R., Elder, G.C.B., Sutton, J.R. & Howald, H. 1979. Mitochondrial volume density in human skeletal muscle following heavy resistance training. Medicine and Science in Sports 11,164-166.

Magee, T.R., Artaza, J.N., Ferrini, M.G., Vernet, D., Zuniga, F.I., Cantini, L., Reisz-Porszasz, S., Rajfer, J. & Gonzalez-Cadavid, N.F. 2006. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. J Gene Med 8, 9, 1171-1181.

Malumbres, M., Ortega, S. & Barbacid, M. 2000. Genetic analysis of mammalian cyclin-dependent kinases and their inhibitors. Biol Chem 381, 9, 10, 827-838.

Manninen, A.H. 2002. Protein metabolism in exercising humans with special reference to protein supplementation. Pro Gradu -tutkielma, Kuopion yliopisto, lääketieteellinen tiedekunta.

Marcell, T.J., Harman, S.M., Urban, R.J., Metz, D.D., Rodgers, B.D. & Blackman, M.R. 2001. Comparison of GH, IGF-1, and testosterone with mRNA of receptors and myostatin in skeletal muscle in older men. Am J Phyisol Endocrinol Metab 281, E1159-E1164.

Marshall, N.D. 2004. Therapeutic applications of whey protein. Altern Med Rev 9, 2, 136-156.

Mateescu, R.G. & Thonney, M.L. 2002. Gene expression in sexually dimorphic muscles in sheep. J. Anim. Sci 80, 1879-1887.

Maughan, R.J. & Burke, L.M. 2002. Sports nutrition. Blackwell Science Ltd.

Maughan, R.J., Greenhaff, P.L., Leiper, J.B., Ball, D., Lambert, C.P. & Gleeson, M. 1997. Diet composition and the performance of high- intensity exercise Journal of Sports Sciences, 1997, 15, 265-275.

Mauras, N. Hayes, V. Welch, S., Rini, A., Helgeson, K., Dokler, M., Veldhuis, J.D. & Urban, R.J. 1998. Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83, 1886-1892.

McCarthy, J.J., Andrews, J.L., McDearmon, E.L., Campbell, K.S., Barber, B.K., Miller, B.H., Walker, J.R., Hogenesch, J.B., Takahashi, J.S. & Esser, K.A. 2007. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. Physiol Genomics 31, 86-95.

McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, M., Sharma, M. & Kambadur, R. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. J Cell Biol, 162, 1135-1147.

McFarlane, C., Hennebry, A., Thomas, M., Plummer, E., Ling, N., Sharma, M. & Kambadur, R. 2007. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. Exp. Cell Res. doi:10.1016/j.yexcr.2007.09.012.

McMahon, C.D., Popovic, L., Jeanplong, F., Oldham, J.M., Kirk, S.P., Osepchook, C.C., Wong, K.W., Sharma, M., Kambadur, R. & Bass, J.J. 2003. Sexual dimorphism is associated with decreased expression of processed myostatin in males. Am J Physiol Endocrinol Metab 284, E377-E381.

McPherron, A.C., Lawler, A.M. & Lee, S.-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 1, 387, 83-90.

McPherron, A.C. & Lee, S.-J. 1997. Double muscling in cattle du to mutations in the myostatin gene. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 12457-12461.

Mendias, C.L., Bakhurin, K.I. & Faulkner, J.A. 2008. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. Proc Natl Acad Sci USA 105, 1, 388-393.

Mendler, L., Baka, Z., Kovács-Simon, A. & Dux, L. 2007. Androgens negatively regulate myostatin expression in an androgen-dependent skeletal muscle. Biochemical and Biophysical Research ommnications 361, 237-242.

Michel, R.N., Dunn, S.E. & Chin, E.R. 2004. Calcineurin and skeletal muscle growth. Proc Nutr Soc 63, 2, 341-349.

Miller, S.H., Tipton, K.D., Chienkes, D.L., Wolf, S.E. &Wolfe, R.R. 2003. Independent and combined effects of amino acids and glucose after resistance exercise. Med. Sci. Sports Exerc. 35, 3, 449-455.

Millward, D.J., Bowtell, J.L, Pacy, P. & Rennie, M.J. 1994. Physical activity, protein metabolism and protein requirements. Proc Nutr Soc 53, 223-240.

Mitchell, P.O., Mills, S.T., Pavlath & G.K. 2002. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles. Am J Physiol Cell Physiol 282, C984-992.

Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J-i, Hattori, A., Hennebry, A., Berry, C.J., Sharma, M., Kambadur, R. & Nishimura, T. 2006. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. Biochem Biophys Research Communications 340, 675-680.

Mooradian, A.D., Morley, J.E. & Korenman, S.G. 1987. Biological actions of androgens. Endocrine Reviews 8,1-28.

Mooren, F. & Völker, K. 2005. Molecular and cellular exercise physiology. Human Kinetics, USA.

Morris, R.T., Spangenburg, E.E. & Booth, F.W. 2004. Responsiveness of cell signalling pathways during the failed 15-day regrowth of aged skeletal muscle. J Appl Physiol 96, 398-404.

Morissette, M.R., Cook, S.A., Foo, S., McKoy, G., Ashida, N., Novikov, M., Scherrer-Crosbie, M, Li, L., Matsui, T., Brooks, G. & Rosenzweig, A. 2006. Myostatin regulates cardiomyocyte growth through modulation of Akt signaling. Circ. Res 99, 15-24.

Mosher, D.S., Quignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., Mellersh, C.S., Parker, H.G. & Ostrander, E.A. 2007. A Mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. PLoS Genetics 3, 5, e79.

Nair, K.S., Halliday, D & Griggs, R.C. 1988. Leucine incorporation into mixed skeletal muscle protein in humans. Am J Physiol Endocrionl Metab 254, E208-E213.

Nakazato, K., Hirose, T. & Song, H. 2006. Increased myostatin synthesis in rat gastrocnemius muscles under high-protein diet. Int J Sport Nutr Exerc Metab 16, 2, 153-165.

Naya, F.J., Mercer, B., Shelton, J., Richardson, J.A., Williams, R.S. & Olson E.N. 2000. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. J Biol Chem 275, 4545-4548.

Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2000. Lehininger Principles of Biochemistry. Third Edition. Worth Publishers, New York.

Neufer, P.D. & Dohm, G.L. 1993. Exercise induces a transient increase in transcription of the GLUT-4 gene in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 265, C1597-1603.

Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M. & Kambadur, R., 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. J Cell Physiol, 193, 120-131.

Nishi, M., Yasue, A., Nishimatu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M., Moriyama, K, Ohuchi, H. & Noji, S. 2002. A missense mutant myostatin causes hyprplasia without hypertrophy in the mouse muscle. Biochem Biophys Res Commun 293, 247-251.

Nnodim, J.O. 1999. Effect of aging on myofiber and satellite cell numbers in rat levator ani muscle. FASEB Journal 13, Pt2, suppl, A688.

Nosaka, K., Sacco, P. & Maeatari, K. 2006. Effects of Amino Acid Supplementation on Muscle Soreness and Damage. Int J Sport Nutr Exerc Metab 16, 6, 620-635.

Nygren, J. & Nair, K.S. 2003. Differential regulation of protein dynamics in splanchnic skeletal muscle beds by insulin and amino acids in healthy human subjects. Diabetes 52, 1377-1385.

Obaya, A.J. & Sedivy, J.M. 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. Cell Mol Life Sci 59, 126-142.

O'Connor, R.S. & Pavlath, G.K. 2007. Point: Satellite cell addition is obligatory for skeletal muscle hypertrophy. 2007. Artikkelissa Point: Counterpoint, Satellite cell addition is / is not obligatory for skeletal muscle hypertrophy. J Appl Physiol. Articles in PresS. doi:10.1152/japplphysiol.00101.2007.

Olsen S., Aagaard, P., Kadi, F., Tufekovic, G., Verney, J., Olesen, J.L., Suetta, C. & Kjaer, M. 2006. Creatine supplementation augments the increase in satellite cell and myonuclei number in human skeletal muscle induced by strength training. J Physiol 573, 525-534.

Philip, B., Lu, Z. & Gao, Y. 2005.Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. Cell. Signal. 17, 365-375.

Phillips, S., Tipton, K., Aarsland, A., Wolf, S. & Wolfe, R. 1997. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. Am J Physiol Endocrionol Metab 273, E99-E107.

Piatti, P.M, Monti, F., Fermo, I., Baruffaldi, L., Nasser, R., Santambrogio, G., Librenti, M.C., Galli-Kienle, M., Pontiroli, A.E. & Pozza, G. 1994. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. Metabolism, 43, 12, 1481-1487.

Pilegaard, H., Speerschneider, T., Willumsen, N., Köhnke, R., Møller Kristensen, K., Damsgaard, R. & Saltin, B. 2006. The FASEB Journal 20, A390.

Pitkänen, H. 2002. Amino acid metabolism in athletes and non-athletes. Väitöskirja. Jyväskylän yliopisto.

Proud, C.G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. Eur J Biochem 269, 5338-5349.

Pullinen, T. 2001. Sympathoadrenal response to resistance exercise in men, women and pubescent boys, with special reference to interaction with other hormones and

neuromuscular performance. Jyväskylän yliopisto. Liikuntabiologian laitos. Väitöskirjatyö.

Putman, C.T., Xu, X., Gillies, E., MacLean, I.M. & Bell, G.J. 2004. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. Eur. J. Appl. Physiol. 92, 4-5, 376-384.

Raue, U., Slivka, D., Jemiolo, B., Hollon, C. & Trappe, S. 2006. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. J Appl Physiol 101, 53-59.

Reardon, K.A., Davis, J., Kapsa, R.M., Choong, P. & Byrne, E. 2001. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. Muscle Nerve 24, 7, 893-899.

Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J., Celeste, A.J. & Attisano, L. 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signalling pathway to block adipogenesis. Mol Cell Biol, 23, 7230-7242.

Reisz-Porszasz, S., Bhasin, S., Artaza, J.N., Shen, R., Sinha-Hikim, I, Hogue, A., Fiedler, T.J. & Gonzalez-Cadavid, N.F. 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. Am J Physiol Endocrinol Metab 285, E876-E888.

Rennie, M.J. 2003. Claims for the anabolic effects of growth hormone: a case of the emperor’s new clothes? Br Journal of Sports Medicine 37, 100-105.

Rennie, M.J., Bohe, J. & Wolfe, R.R. 2002. Latency, duration and dose-response relationships of amino acid effects on human muscle protein synthesis. J Nutr 132, 3225S-3227S.

Rennie, M.J., Edwards, R.H., Krywawych, S., Davies, C.T., Halliday, D., Waterlow, J.C. & Millward, D.J. 1981. Effect of exercise on protein turnover in man. Clin Sci 61, 627-639.

Rennie, M.J., Wackerhage, H., Spangenburg, E.E & Booth, F. 2004. Control of the size of the human muscle mass. Annu. Rev. Physiol. 66, 799-828.

Ríos, R, Carneiro, I, Arce, V.M., Devesa, J. 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. Biochem Biophys Res Comm 280, 561-566.

Ríos, R, Carneiro, I, Arce V, M & Devesa, J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. Am J Physiol Cell Physiol 282, C993-C999.

Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. & Glass, D.J. 2001. Mediation of IGF-I induced skeletal muscle hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol 3, 1009-1013.

Rosenblatt, J.D., Young, D. & Parry, D.J. 1994. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat skeletal muscle. Muscle Nerve 17, 608-613.

Roth, S.M., Martel, G.F., Ferrel, R.E., Metter, E.J., Hurley, B.F & Rogers, E.J. 2003. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: A brief communication. Exp Biol Med, 228, 706-709.

Roux, P.P & Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev 68, 320-344.

Roy, B.D., Tarnopolsky, M.A., MacDougall, J.D., Fowles, J. & Yarasheski, K.E. 1997. Effect of glucose supplement timing on protein metabolism after resistance training. Journal of Applied Physiology 82, 1882-1888.

Roy, R.R., Baldwin, K.M. & Edgerton, V.R. 1991. The plasticity of skeletal muscle: effects of neuromuscular activity. Exerc Sports Sci Rev 19, 269-312.

Salehian, B., Mahabadi, V., Bilas, J., Taylor, W.E. & Ma, K. 2006. The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression. Metabolism 55, 9, 1239-1247.

Salleo, A., LaSpada, G., Falzea, G., Denaro, M.G. & Cicciarello, R. 1983. Response of satellite cells and muscle fibers to long-term compensatory hypertrophy. J Submicrosc Cytol Pathol 15, 929-940.

Sallinen, J., Pakarinen, A., Ahtiainen, J., Kraemer, W.J., Volek, J.S. & Häkkinen, K. 2004. Relationship between diet and serum anabolic hormone responses to heavy-resistance exercise in men. International Journal of Sports Medicine 25, 1-7.

Salo, T. 2007. Voimaharjoituksen ja proteiinilisän akuutit testosteroni- ja androgeenireseptorivasteet vanhoilla miehillä. Liikuntafysiologian kandidaatin-tutkielma. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto.

Scheen, A.J., Buxton, O.M., Jison, M., Van Reeth, O., Leproult, R., L`Thermite-Balériaux, M. & Van Cauter, E. 1998. Effects of exercise on neuroendocrine secretions and glucose regulation at different times of day. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 274, 37, E1040-E1049.

Schiaffino, S., Bormioli, S.P. & Aloisi, M. 1972. Cell proliferation in rat skeletal muscle during early stages of compensatory hypertrophy. Virchows Arch B Cell Pathol 11, 268-273.

Schiaffino, S., Bormioli, S.P. & Aloisi, M. 1976. The fate of newly formed satellite cells during compensatory muscle hypertrophy. Virchows Arch B Cell Pathol 21, 113-118.

Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F. & Lee, S-J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. New England Journal of Medicine, 350, 2682-2688.

Schulte, J.N. & Yarasheski, K.E. 2001. Effects of resistance training on the rate of muscle protein synthesis in frail elderly people. Int J Sport Nutr Exerc Metab 11, Suppl, 111-118.

Schultz, E., Jaryszak, D.L. & Valliere, C.R. 1985. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. Muscle Nerve 8, 217-222.

Seale, P. & Rudnicki, M.A. 2000. A New look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. Developmental Biology 218, 115-124.

Sharma, M, Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen J.V., Fowke , P.J. & Bass, J.J. 1999. Myostatin, a transformimg growth factor-β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardimyocytes after infarct. J Cell Physiol 190, 1-9.

Shi, Y. & Massagué, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell 2003, 113, 685-700.

Short, K.R. & Nair, K.S. 2000. The Effect of age on protein metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 3, 1, 39-44.

Singh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F. & Bhasin, S. 2003. Androgens stimulate myogenic differentation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. Endocrinology 144, 11, 5081-5088.

Sinha-Hikim, I., Artaza, J., Woodhouse, L., Gonzalez-Cadavid, N.F., Singh, A.B., Lee, M.I., Storer, T.W., Casaburi, R., Shen, R. & Bhasin, S. 2002. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscl hypertrophy. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism 283, E154-E164.

Sinha-Hikim, I., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F., Zheng, W. & Bhasin, S. 2004. Androgen receptor in human skeletal muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. The Journal o Endocrinology & Metabolism 89, 10, 5245-5255.

Siriett, V., Nicholas, G., Berry, C., Watson, T., Hennebry, A., Thomas, M., Ling, N., Sharma, M. & Kambadur, R. 2006a. Myostatin negatively regulates the expression of the steroid receptor co-factor ARA70. J Cell Physiol 206, 255-263.

Siriett, V., Platt, L., Salerno, M.S., Ling, N., Kambadur, R. & Sharma, M. 2006b. Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. J Cell Physiol 209, 866-873.

Snow, MH. 1990. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergist. Anat Rec 227, 437-446.

Solomon, A.M. & Bouloux, P.M.G. 2006. Modifying muscle mass – the endocrine perspective. Journal of Endocrinology 191, 349-360.

Talmadge, R.J. 2000. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. Muscle & Nerve 23, 5, 661-679.

Tarnopolsky, M.A., Atkinson, S.A., MacDougall, J.D., Chesley, A, Phillips, S. & Schwarcz, H.P. 1992. Evaluation of protein requirements for trained strength athletes. J Appl Physiol 73, 5, 1986-1995.

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M. ym. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 280, E221-E228.

Terova, G., Bernardini, G., Binelli, G., Gornati, R. & Saroglia, M. 2006. cDNA encoding sequences for myostatin and FGF6 in sea bass (Dicentrarchus labrax, L.) and the effect of fasting and refeeding on their abundance levels. Domest Anim Endocrinol 30, 4, 304-319.

Thalacker-Mercer, A.E., Fleet, J.C., Craig, B.A., Carnell, N.S. & Campbell, W.W. 2007. Inadequate protein intake affects skeletal muscle transcript profiles in older humans. Am J Clin Nutr 85, 5, 1344-1352.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., Kambadur, R. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. J Biol Chem, 275, 40235-40243.

Tidball, J.G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288, R345-R353.

Tipton, K.D., Børsheim, E., Wolf, S., Sanford, A.P. & Wolfe, R.R. 2003. Acute response of net muscle protein balance reflects 24-h balance after exercise and amino acid ingestion. Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 284, E76-E89.

Tipton, K.D., Elliott, T.A., Cree, M.G., Aarsland, A.A., Sanford, A.P. & Wolfe, R.R. 2007. Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab 292, E71-E76.

Tipton, K.D., Elliot, T.A., Cree, M.G., Wolf, S.E., Sanford, A.P. & Wolfe, R.R. 2004. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. Med Sci Sports Exerc 36, 2073-2081.

Tipton, K.D., Ferrando, A.A., Phillips, S.M., Doyle, D. JR., & Wolfe, R.R. 1999. Post-exercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism 276, E628-E634.

Tipton, K.D., Ferrando, A.A., Williams, B.D. & Wolfe, R.R. 1996. Muscle protein metabolism in female swimmers after a combination of resistance and endurance exercise. Journal of Applied Physiology 81, 2034-2038.

Tipton, K.D. & Wolfe R.R. 2001. Exercise, protein metabolism, and muscle growth. Int J Sport Nutr Exerc Metab 11, 1, 109-132.

Valtion ravitsemusneuvottelukunta. 2005. Suomalaiset ravitsemussuositukset – ravinto ja liikunta tasapainoon. Edita Prima Oy: Helsinki. Saatavilla pdf-muodossa osoitteessa: <URL: http://wwwb.mmm.fi/ravitsemusneuvottelukunta/FIN11112005.pdf, viitattu 28.7.2007.

Venkatraman, J.T. & Pendergast, D.R. 2002. Effect of dietary intake on immune function in athletes. Sports Medicine 32, 5, 323-337.

Vermeulen, A., Verdonck, L. & Kaufman, J.M. 1999. A critical evaluation of simple method for the estimation of free testosterone in serum. J Clin Endocrinol Metab 84, 10, 3666-3672.

Viru, A. & Viru, M. 2001. Biochemical monitoring of sport training. Human Kinetics, USA.

Volek, J.S., Kraemer, W.J., Bush, J.A., Incledon, T. & Boetes, M. 1997. Testosterone and cortisol in relationship to dietary nutrients and resistance exercise. Journal of Applied Physiology 82, 1, 49-54.

Wagenmakers, A.J.M. 1999. Tracers to investigate protein and amino acid metabolism in human subjects. Proceedings of the Nutrition Society 58, 4, 987-1000.

Wagenmakers, A.J.M. 2001. Amino acid metabolism in exercise. Teoksessa Maughan, R.J. (toim.) Nutrition in Sport: the Encyclopedia of Sports Medicine. Blackwell Sciences Ltd, 119-132.

Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X., Allen, R.E. 2005. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. Proc Natl Acad Sci USA 102, 7, 2519-2524.

Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N. & Lee, S.J. 2002. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. Ann Neurol 52, 6, 832-836.

Walker, K.S., Kambadur, R., Sharma, M. & Smith, H. 2004. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-I in healthy men. Med. Sci. Sports Exerc. 36, 5, 787-793.

Walzem, R.L., Dillard, C.J., Grman, J.B. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. Crit Rev Food Sci Nutr 42, 353-375.

Wang, J. & Walsh, K. 1996. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentation. Science 273, 5273, 359-361.

Wang, H., Zhang, Q. & Zhu, D. 2003. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. Biochem Biophys Res Commun, 311, 877-883.

Welle S, Bhatt K & Pinkert CA. 2006. Myofibrillar protein synthesis in myostatin-deficient mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 290, 3, E409-E415.

Welle, S., Thornton, C., Jozefowicz, R. & Statt, M. 1993. Myofibrillar protein synthesis in young and old men. Am J Physiol Endocrinol Metab 264, E693-E698.

Welle, S., Thornton, C. & Statt, M. 1995. Myofibrillar protein synthesis in young and old human subjects after three months of resistance training. Am J Physiol Endocrinol Metab 268, E422-E427.

Westerterp-Plantenga, M.S., Lejeune, M.P.G.M., Nijs, I., van Ooijen, M & Kovacs, E.M.R. 2004. High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans. International Journal of Obesity 28, 57-64.

Whittemore, L.A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Hill, J.J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., Maylor, R., O'Hara, D., Pearson, A., Quazi, A., Ryerson, S., Tan, X.Y., Tomkinson, K.N., Vldman, G.M., Widom, A., Wright, J.F., Wudyka, S., Zhao, L. & Wolfman, N.M. 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. Biochem, Biophys Res Commun. 300, 965-971.

Willoughby, D.S. 2004a. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. Med. Sci. Sports Exerc. 36, 4, 574-582.

Willoughby, D.S. 2004b. Effects of an alleged myostatin-binding supplement and heavy resistance training on serum myostatin, muscle strength and mass, and body composition. Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab. 14, 4, 461-472.

Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S. & Lee, S.J. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinass. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 100, 15842-15846.

Yang, W., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, N. & Zhu, D. 2006. Extracellular signal-regulatd kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentation repression. Cancer Res 66, 1320-1326.

Yang, W, Zhang, Y, Li, Y, Wu, Z & Zhu D. 2007. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. J Biol Chem 282, 6, 3799-3808.

Yang, Y., Creer, A., Jemiolo, B. & Trappe, S. 2005. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology 98, 1745-1752.

Yarasheski, K.E. 1994. Growth hormone effects on metabolism, body composition, muscle mass, and strength. Exerc Sport Sci Rev 22, 285-312.

Yin, D., Gao, W., Kearbey, J.D., Xu, H., Chung, K., He, Y., Marhefka, C.A., Veverka, K.A., Miller, D.D. & Dalton, J.T. 2003. Pharmacodynamics of selective androgen receptor modulators. Journal of Pharmacology and Experimental Therapetics 304, 1334-1340.

Zambon, A.C., McDearmon, E.L., Salomonis, N., Vranizan, K.M., Johansen, K.L., Adey, D, Takahashi, J.S., Schambelan, M. & Conklin, B.R. 2003 Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. Genome Biology 4, 10, R61.

Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G. & McNally E.M. 2000. Dominant negative myostatin produces hypertophy without hyperplasia in muscle. FEBS Lett. 474, 71-75.

Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., Macpherron, A.C., Wolfman, N.M. & Lee, S.J. 2002. Induction of cachexia in mice by systematically administered myostatin. Science 2002, 296, 1486-1488.

LIITE 1. MITATTUJEN mRNA-TASOJEN MUUTOKSET

LIITETAULUKKO 1. Mitattujen mRNA-tasojen yksittäiset muutosprosentit (Δ%) (lukuunottamatta myostatiinia, taulukko 3) sekä keskiarvot (Ka) ja keskihajonnat (SD).

	p27 (Δ%)				**p21 (Δ%)**				**Cdk2 (Δ%)**			
	Pre - post 1h		Pre - post 48h		Pre - post1h		Pre - post 48h		Pre - post 1h		Pre - post 48h	
	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT
	32,0	50,8	178,6	45,3	29,5	102,4	-68,8	-48,3	-34,6	33,9	66,3	4,3
	76,4	19,1	-28,8	129,5	25,5	170,7	-53,3	-71,2	60,2	314,5	-4,7	1753,7
	4,2	9,3	321,7	11,9	191,0	171,2	144,1	133,3	31,2	50,6	228,9	181,2
	-48,4	-32,6	5,4	-1,0	-23,5	41,0	178,7	160,9	-51,4	27,0	11,8	197,2
	-39,5	-41,9	-11,1	-16,1	140,3	662,5	1153,3	187,6	-37,7	-4,7	-44,7	44,5
	14,5	-8,8	69,1	-77,6	151,6	23,7	190,5	121,8	17,3	-31,4	90,1	47,2
	-52,4	318,7	-57,4	194,2	63,8	232,9	-19,2	328,9	5,2	17,3	-29,2	169,7
	7,6	23,1	-10,0	-1,3	486,7	323,1	327,0	681,3	98,6	-16,3	166,2	251,3
	11,4	6,5	7,4	63,6	148,8	55,1	29,6	11,0	-32,7	8,6	18,7	32,2
Ka	**0,6**	**38,2**	**52,8**	**38,7**	**134,8**	**198,1**	**209,1**	**167,3**	**6,2**	**44,4**	**55,9**	**297,9**
SD	**41,7**	**109**	**122,3**	**81,8**	**150,3**	**200**	**377,7**	**230**	**50,75**	**104,5**	**92,01**	**552,9**

	Myogeniini (Δ%)				**MyoD (Δ%)**			
	Pre - post 1h		Pre - post 48h		Pre - post 1h		Pre - post 48h	
	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT
	-67,1	30,2	18,8	36,0	-21,8	77,0	70,7	9,4
	48,0	115,7	-3,5	828,0	292,4	-9,8	-1,4	-1,5
	-10,6	-45,9	59,0	174,0	15,9	-65,5	200,4	2,3
	-58,0	-25,5	518,6	20,4	-70,9	-48,4	-52,2	-25,2
	-44,3	61,4	168,5	82,2	-42,5	149,9	2,1	28,7
	-35,4	-86,3	136,5	38,6	40,4	-92,6	126,5	-47,0
	0,3	-34,5	-26,0	194,2	-22,4	-13,7	-38,7	101,6
	67,2	-23,1	112,0	119,4	-7,6	152,5	13,6	120,5
	-31,2	16,5	-5,3	133,5	-35,3	44,8	43,0	453,3
Ka	**-14,6**	**0,9**	**108,7**	**180,7**	**16,5**	**21,6**	**40,5**	**71,3**
SD	**46,2**	**61,5**	**168,3**	**250,4**	**108,4**	**90,1**	**81,2**	**153,4**

	FLRG (Δ%)				**AcvrIIb (Δ%)**			
	Pre - post 1h		Pre - post 48h		Pre - post 1h		Pre - post 48h	
	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT	PLA	PROT
	-75,5	816,0	-53,2	107,2	-31,3	27,6	112,0	25,4
	88,3	164,0	5,0	163,0	-53,3	211,1	-80,8	243,3
	256,3	175,0	351,0	166,6	-59,4	130,3	-3,6	45,5
	-89,7	-58,4	-46,2	27,5	-14,1	-38,6	-53,1	45,5
	0,9	507,5	-51,8	83,1	7,0	-32,8	-35,5	-27,6
	-22,0	-99,8	-13,5	134,3	59,1	-96,0	89,5	-61,7
	94,4	25,6	-52,6	995,4	-13,6	25,0	-49,8	40,8
	-1,2	230,8	252,1	1096,4	-11,7	78,4	-43,4	104,1
	173,5	-34,1	18,0	233,8	-55,6	-59,3	-72,4	37,8
Ka	**47,2**	**191,8**	**45,4**	**334,1**	**-19,2**	**27,3**	**-15,2**	**50,4**
SD	**115**	**300**	**149,6**	**408,4**	**37,38**	**98,5**	**69,55**	**86,4**