

Luustolihasen hienorakenteen erot LCR ja HCR rotilla ja niiden
yhteys tyypin 2 diabetekseen
Morfometrinen tutkimus

Tatja Purhonen
Pro gradu- tutkielma
Jyväskylän Yliopisto
Bio- ja Ympäristötieteiden laitos
Solubiologia

Alkusanat

Tämä pro gradu- työ tehtiin yhteistyössä Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen ja liikuntafysiologian laitosten kanssa kevään 2006 ja 2008 välisenä aikana. Näytteiden valmistus ja elektronimikroskooppikuvien ottaminen tapahtui bio- ja ympäristötieteiden laitoksella ja kuvien analysoiminen puolestaan liikuntafysiologian laitoksella.

Haluan kiittää graduohjaajiani Hilkka Reunasta ja Heikki Kainulaisesta kärsivällisyydestä, sekä tuesta ja ohjauksesta tämän pitkään vieneen prosessin aikana. Kiitän heitä myös siitä ajasta, jonka he kaiken kiireen keskellä käyttivät tämän työn oikolukemiseen. Suuri kiitos kuuluu myös Raija Vassiselle sekä Paavo Niutaselle, jotka osallistuivat suuren näytemäärän valmistamiseen ja käsittelyyn elektronimikroskopointia ja analysointia varten. Kiitos myös Heikki Kainulaisen tutkimusryhmän jäsenille Maarit Lehdelle, Rita Rinnankoskelle, Mika Silvennoiselle ja Riikka Kivelälle avusta ja hauska seurasta projektin kaikissa vaiheissa. Lappeenrannan sairaalan kirjaston henkilökunnalle kiitos julkaisujen ja tietokantojen käytöstä, sekä avusta tietojen etsinnässä.

Erityiskiitos myös perheeni jäsenille sekä ystäväilleni kannustuksesta, kärsivällisyydestä ja huolenpidosta koko opiskelujeni aikana.

Jyväskylässä 30.5.2008

Tatja Purhonen

Tekijä:	Tatja Purhonen
Tutkielman nimi:	Luustolihasen hienorakenteen erot LCR ja HCR rotilla ja niiden yhteys tyyppin 2 diabetekseen. Morfometrinen tutkimus
English title:	Differences of muscle tissue morphology of LCR and HCR rats and relationship to type 2 diabetes. Morphometric study
Päivämäärä:	30.5.2008 Sivumäärä: 58
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solubiologia
Tutkielman ohjaajat:	Heikki Kainulainen (prof.) ja Hilikka Reunanen (FT)

Tiivistelmä:

Luustolihas kudoksessa esiintyy kaksi eri mitokondriopopulaatiota; solunsisäinen ja sarkolemmakalvon alainen populaatio. Nämä kaksi populaatiota välittävät kestävyysharjoittelun seurauksena tapahtuvan suorituskyvyn kohoamista adaptoitumalla vastaamaan kudoksen kasvaneeseen energiantarpeeseen. Kestävyysharjoittelun seurauksena luustolihasen mitokondrioiden lukumäärä, koko ja entsyymiaktiivisuus kasvavat, jolloin koko lihaksen metabolia paranee. Populaatioiden välisessä adaptaatiokapasiteetissa ja -vaikutuksissa on kuitenkin havaittu eroja. Kestävyysharjoittelun ja sitä kautta paranevan aerobisen kapasiteetin on todettu lisäävän insuliiniherkkyyttä, joka on tunnetusti heikentynyt tyyppin 2 diabeteksessä.

Korkean kapasiteetin (HCR)- ja matalan kapasiteetin (LCR) rotat edustavat kahta suorituskyvyltään eroavaa valinnan avulla lisättyä rottalinjaa. Näillä rotilla kullekin linjalle tyypilliseen suorituskykyyn vaikuttavat synnynnäiset ominaisuudet ovat periytyneet sukupolvelta toiselle, ja valinnan seurauksena ominaisuuksiin vaikuttavat alleelit ovat fiksoituneet omiin lokuksiinsa lisäten homotsygotiaa. Suorituskykyyn vaikuttavat geenit voidaan jakaa synnynnäisiin ja adaptoituihin geeneihin. Lisäksi suorituskykyyn vaikuttaa myös ympäristö. HCR- ja LCR- rotat toimivat eräänlaisina geneettisinä malleina, sillä niiden geneettinen yhdenmukaisuus luo mahdollisuuden tarkastella samaa geneettistä ainesta toistamiseen kun ympäristön ja adaptoituvien geenien vaikutus on minimoitu. LCR- ja HCR- rotat ovatkin hyödyllisiä tutkittaessa metabolisia sairauksia, kuten tyyppin 2 diabetestä.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia HCR- ja LCR- rottalinjojen eroja luustolihasen mitokondriojakauman ja solunsisäisen rasvan suhteen, sekä näiden erojen yhteyttä tyyppin 2 diabetekseen. Tutkimusta varten rotilta otettiin näytteet luustolihasista (*soleus* ja *extensor digitorum longus*), joista valmistettiin näyteblokit pitkittäis- ja poikittaisleikkeitä varten. Puolioiden toluidinisinellä värjättyjen leikkeiden perusteella valittiin parhaat blokit ohutleikkeitä varten. Ohutleikkeet kaksoisvärjättiin uranyyliasetatilla ja lyijysitraatilla ja kuvattiin elektronimikroskoopilla. Kuvien morfometriset analyysit suoritettiin tietokoneohjelmalla.

Suurimmat erot rottalinjojen välillä tulivat odotetusti esiin sarkolemmakalvon alaisen population kohdalla. Erot kahden rottalinjan välillä olivat mitokondriopopulaation suhteellisen pinta-alan osalta tilastollisesti merkitseviä. Solunsisäisten mitokondrioiden määrän välillä ei havaittu merkitsevää eroa rottalinjojen kesken. Solunsisäisen rasvan määrästä ei tässä tutkimuksessa saatu tilastollista tietoa. Tämän tutkimuksen tulokset tukevat aikaisempaa käsitystä, jossa kestävyysharjoittelun tuloksena tapahtuva mitokondrioiden määrän kasvu on suurinta juuri sarkolemmakalvon alla. Tämän populaation suuremman adaptaatiokyvyn yhteys tyyppin 2 diabetekseen on oletettavasti tulosta koko lihaksen oksidatiivisen metabolian paranemisesta, johon vaikuttaa myös solunsisäisen populaation adaptaatio. Solunsisäisten mitokondrioiden osuutta suorituskykyyn ja tyyppin 2 diabetekseen täytyy vielä selvittää. Mielenkiintoinen paradoksi on myös solunsisäisen rasvan määrä, jonka tiedetään korreloivan insuliiniresistenssin kanssa. Kestävyysharjoittelu parantaa insuliiniherkkyyttä, mutta lisää myös solunsisäisen rasvan määrää.

Avainsanat: Morfologia, tyyppin 2 diabetes, sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio, solunsisäinen mitokondriopopulaatio.

Author: Tatja Purhonen
Title of thesis: Differences of muscle tissue morphology of LCR and HCR rats and relationship to type 2 diabetes. Morphometric study
Finnish title: Luustolihaksen hienorakenteen erot LCR ja HCR rotilla ja niiden yhteys tyypin 2 diabetekseen. Morfometrinen tutkimus
Date: 30.5.2008 **Pages:** 58
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Heikki Kainulainen (prof.) and Hilkka Reunanen (FT)

Abstract:

Two populations of skeletal muscle mitochondria have been described, intermyofibrillar and subsarcolemmal. These two populations mediate increased aerobic capacity caused by endurance training by adapting to response increased energy need of the tissue. As a consequence of endurance training, whole muscle metabolism improves because of increase in mitochondria number, size and enzyme activity. However, differences in adaptive capacity and -effects have been discovered between two mitochondrial populations. Improved aerobic capacity caused by endurance training has been found to increase insulinsensitivity, which is known to be impaired in type 2 diabetes.

HCR(high capacity rat)- and LCR(low capacity rat)- rats represent two distinct lines artificially selected and bred for endurance capacity. In these rats, intrinsic features typical for both lines have been passed down over following generations. As a consequence of selective breeding, alleles responsible of aerobic endurance capacity become fixed at loci increasing homozygosity. Genes effecting on endurance capacity can be divided to intrinsic and adaptive ones. Environment has also effect on endurance capacity. The integrity of the genotype and minimized effect of environment and adaptive genes creates a possibility to value the same genetic material repeatedly. That is why LCR and HCR- rats as ideal genetic models are useful in resolving metabolic diseases, like type 2 diabetes.

The aim of this study was to examine differences of muscle tissue mitochondrial populations and intracellular fat in HCR- and LCR- lines, and relationship to type 2 diabetes. Samples were taken from two skeletal muscle (*soleus* and *extensor digitorum longus*) and they were prepared for crosswise and longitudinal ultramicrotome sectioning. Semi- thin sections were stained with toluidine blue and best examples, based on examination of semi- thin sections, were selected for further sectioning to ultra- thin sections. Ultra- thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with an electron microscope. Morphometric analyses were analyzed with computer software.

The biggest differences between two ratlines were found in subsarcolemmal mitochondria, as were expected. Differences in relative area of subsarcolemmal mitochondria populations were statistically significant. Differences between intermyofibrillar populations of the ratlines were not statistically significant. The amount of intracellular fat remained involved in this examination. The results of this examination are consistent with previous ones, where have been found the largest mitochondrial increase, as a consequence of endurance training, takes place under sarcolemmamembrane. The relationship of adaptive capacity of this population to type 2 diabetes probably results of improved oxidative capacity of the muscle tissue, in which also the adaptation of intermyocellular population has an influence. The effect of intermyocellular population on aerobic endurance and type 2 diabetes has still to be examined. An interesting paradox also exists between exercise and intracellular fat. Intracellular fat content is known to correlate with insulin resistance. Endurance training increases intracellular fat content but improves time insulinsensitivity at the same time.

Keywords: Morphology, type 2 diabetes, subsarcolemmal mitochondria, intermyofibrillar mitochondria

Sisällys

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällys

Lyhenteet

1. Johdanto.....	8
1.1 Luustolihaskudos.....	8
1.1.1 Luustolihassolutyypit.....	10
1.1.2 Luustolihassolutyypit ja liikunta.....	10
1.1.3 Luustolihaksen adaptaatio kestävyysharjoitteluun.....	11
1.2 Luustolihaksen mitokondriot.....	13
1.2.1 Mitokondrioiden biogeneesi.....	14
1.3 Luustolihaskudoksen rasva.....	15
1.4 Mitokondrioiden rakenne ja toiminta.....	15
1.4.1 Rasva- aineiden metabolia.....	16
1.4.2 Rasva- aineiden metabolian häiriöt.....	17
1.5 Rotta tutkimuseläimenä.....	18
1.5.1 Valinnalla luotu geneettinen malli.....	18
1.5.2 LCR - ja HCR – rotat.....	20
1.6 Tyypin 2 diabetes.....	23
1.6.1 Insuliini ja glukagoni.....	24
1.6.2 Insuliinisignalointi.....	25
1.6.3 Insuliinin erityksen säätely.....	26
1.6.4 Rasva- happojen vaikutus insuliinin eritykseen.....	26
1.6.5 Insuliiniresistenssi.....	27
1.6.6 Tyypin 2 diabetes ja perinnöllisyys.....	28
1.6.7 Tyypin 2 diabetes ja mitokondriot.....	29
1.6.8 Tyypin 2 diabetes ja rasva.....	30

1.6.9	Tyypin 2 diabetes ja lihaskudos.....	31
2.	Tutkimuksen tarkoitus.....	32
3.	Materiaalit ja menetelmät.....	32
3.1	Koeasetelma.....	32
3.2	Näytteiden valmistus.....	33
3.3	Näytteiden mikroskopointi ja kuvaaminen.....	34
4.	Tulokset.....	34
4.1	Ohutleikkeiden tarkastelu.....	36
4.1.1	Pitkittäisleikkeet.....	36
4.1.2	Poikittäisleikkeet.....	36
4.2	Morfometrinen analysointi.....	36
4.2.1	Solunsisäiset mitokondriot.....	36
4.2.2	Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot.....	40
4.2.3	Solunsisäinen rasva.....	43
5.	Tulosten tarkastelu.....	44
5.1	Solunsisäiset mitokondriot.....	44
5.2	Solunsisäinen rasva.....	45
5.3	Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot.....	46
5.4	Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot ja tyypin 2 diabetes.....	47
5.5	Yhteenveto.....	48
Lähteet.....		52

Lyhenteet

Akt	Proteiinikinaasi B
DAG	Diasyyliglyseroli
EMCL	Lihassolun ulkopuolinen rasva
FABPpm	Solukalvon rasvahappoa sitova proteiini, plasmamembran FA binding protein
FFAs	Vapaat rasvahapot
GLUT	Glukoositransportteri
HCR	High capacity rat
IMCL	Intramyocellular lipid, lihassolun sisäinen rasva
LCR	Matala kapasiteettinen rotta, low capacity rat
MHC	Myosiinin raskas ketju
MLC	Myosiinin kevyt ketju
mtDNA	Mitokondrionaalinen DNA
PCG- 1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α
PDK	Phosphoinosidi dependent proteinkinase 1
PI- 3K	Phosphotidylinositol –3 kinase
PIP3	PI - 3,4,5-fosfaatti
PKB	Proteiinikinaasi B
PKC	Proteiinikinaasi C
TAG	Triasyyliglyseroli

1. Johdanto

1.1 Luustolihas kudokset

Luustolihas kudokset koostuu pitkistä supistumiskykyisistä lihassoluista eli myofiibereistä. Yksittäisen lihaksen rakenne on hyvin järjestelmällinen koostuen asteittain pienenevistä sidekudoksen ympäröimistä osista. Kokonaista lihasta ympäröi tiivis sidekudos *epimysium*. Useitten yksittäisten lihassolujen muodostamaa lihaskudoskimppua eli fasikkelia ympäröi *epimysiumista* peräisin oleva *perimysium*. Jokaista fasikkelin sisältämää lihassolua ympäröi retikulaarisäikeistä koostuva *endomysium*, jonka alla sijaitsee solun plasmamembraani, jota lihassolussa kutsutaan sarkolemmakalvoksi.

Sarkolemmaa ympäröi tyvikalvo ja satelliittisolut, jotka pystyvät erikoistumaan uusiksi lihassoluiksi. Luustolihas solun useat tumat sijaitsevat välittömästi sarkolemmakalvon alla, josta on lyhyt etäisyys lihasta ravitseviin kapillaareihin. Sarkolemmakalvosta työntyy solun sytoplasmaan nk. T-putkia, jotka ovat yhteydessä sytoplasman sarkoplasmiseen kalvoon, kalvorakenteiseen Ca^{2+} -molekyylejä varastoivaan soluelimeen. T-putki on osana triadia, joka koostuu kahdesta lateraalista terminaalista sarkoplasmisen retikulumin kisternasta ja niiden keskellä olevasta T-putkesta. Triadin tehtävänä on välittää aksonin depolarisaatiosignaali solun sisään. Lihassolulla on useita tumia, jotka kaikki sijaitsevat perifeerisesti sarkolemmakalvon alla. Sarkolemmakalvolle ulottuvat myös lihassolua hermottavien aksonien terminaalit, jotka muodostavat primaarisen synapsiraon yhdessä sisäänpainuneen solukalvon kanssa. Välittäjäaineena luustolihas solujen aksoneissa toimii asetyylikoliini, joka vapautuu synapsirakoon vasteena aktiopotentialille. Molekyylit sitoutuu reseptoriinsa sarkolemmakalvolla ja depolarisaatiosignaali välittyy triadin kautta syvälle lihassoluun, saaden aikaan Ca^{2+} -molekyylin vapautumisen sarkoplasmisesta retikulumista (Lodish ym. 2003).

Lihaksen supistuva yksikkö sarkomeeri koostuu paksuista myosiini- ja ohuista aktiini filamentteista. Sarkomeeri voidaan jakaa eri vyöhykkeisiin rakenteensa perusteella. Sarkomeeria reunustaa molemmista päistään Z-levyt, joihin sarkomeerin aktiini filamentit

ovat kiinnittyneet. Ohuet filamentit koostuvat pääosin F- aktiinista, sekä troponiinista, tropomyosiinista ja nebuliinista muodostaen nk. I- juovan. Aktiinifilamentti koostuu globulaarisesta monomeerisesta G- aktiinista, joka järjestyy kierteiseksi kaksijuosteiseksi rakenteeksi. Tropomyosiini ja troponiini osallistuvat myosiinifilamentin sitoutumisen säätelyyn ja nebuliini toimii templaattina aktiinifilamentin pituuden säätelyssä. Paksut filamentit puolestaan koostuvat myosiinista ja titiinista muodostaen A- juovan. Lihaksessa supistumiseen osallistuva myosiinimolekyyli II koostuu kahdesta identtisestä raskaasta (MHC, myosin heavy chain) ketjusta ja neljästä kevyestä (MLC, myosin light chain) ketjusta. Kevyisiin ketjuihin kuuluvat kaksi fosforyloituvaa säätelevää kevyttä ketjua (regulatory light chain), sekä kaksi varsinaista emäksistä kevyttä ketjua (alkali/essential light chain). Raskaan ketjun kaksi globulaarista domeenia ovat ATPaaseja, jotka aktiinin aktivoimana hajottavat ATP:n ADP:ksi ja fosfaatiksi. Globulaarisella päällä on kolme eri toiminnallista aluetta; aktiinifilamenttiin kiinnittyvä alue, ATP: ta sitova alue ja kevyttä ketjua sitova alue. Globulaariden domeenin vieressä sijaitsee alue, jonka ympärille kietoutuneet kevyet ketjut säätelevät globulaaristen domeenien aktiivisuutta, sekä välittävät head domeenin pienet liikkeet koko molekyylin liikkeeksi. A - juova jaetaan keskeltä alueeseen H- juovaksi, joka koostuu pääasiassa kreatiinikinaasientsyymistä, joka katalysoi ADP:sta ja fosfokreatiinista ATP: ta. Keskellä H- juovaa voidaan vielä erottaa M- linja (Lodish ym. 2003).

Kun lihas supistuu, sen pituus lyhenee noin kolmanneksella. Supistuksen aikana sarkomeerin sisältämät filamentit liukuvat toistensa väliin, kun myosiinimolekyylin globulaarinen pää tarttuu aktiinifilamenttiin. Filamenttien pituus ei siis muutu, vaan sarkomeerin pituus lyhenee. Supistuksen laukaisee neuromuskulaariliitoksen kautta saapuva depolarisaatiosignaali, joka etenee lihasoluun T- putkien kautta tridiin A-I junktioon kohdalla. Depolarisaatio saavuttaa sarkoplasmisen kalvoston ja vapauttaa Ca^{2+} molekyylit solulimaan. F- aktiinifilamentin uurteissa oleva tropomyosiini sitoo troponiini-kompleksia, joka säätelää myosiinin sitoutumista aktiiniin. Levossa tropomyosiini-kompleksi peittää myosiinin sitoutumiskohdan aktiinifilamentissa. Kun kalsium vapautuu depolarisaatiosignaalin vaikutuksesta, sitoutuu se troponiiniin ja aikaansaa tropomyosiini- troponiini kompleksin muuttamaan konformaatiotaan, jolloin

myosiinin sitoutumispaikka paljastuu. Myosiinifilamentti sitoutuu korkeaenergisessä konfiguraatiossaan (hydrolysoitunut ATP) aktiiniin. Kun filamentti palaa matalaenergiseseen muotoonsa (vapauttaa sitoutuneen ADP:n ja epäorgaanisen fosfaatin) liukuu siihen kiinnittynyt aktiinifilamentti kohti sarkomeerin keskustaa. Myosiinin pää irtaana kun domeeniin kiinnittyy uusi ATP- molekyyli (Lehninger ym. 2002).

1.1.1 Luustolihaslutyypit

Luustolihaslujen ominaisuudet eroavat toisistaan useiden ominaisuuksien osalta. Lihasludet eli myofiiberit voidaan jakaa karkeasti kahteen eri tyyppiin; hitaisiin tyyppiin I sekä nopeisiin tyyppiin II fiibereihin. Tyyppiin II ludet voidaan vielä edelleen jakaa oksidatiivisiin tyyppiin IIa sekä glykolyyttisiin tyyppiin IIb lihaslueihin. Lähes kaikki ihmisen luustolihas on ns. sekatyyppiä koostuen näistä ludetyypeistä. Oksidatiiviset tyyppiin I lihasludet sisältävät suuria määriä myoglobiinia, mitokondrioita ja kapillaareja. Soluilla on korkea kapasiteetti generoida ATP:tä oksidatiivisellä metabolialla, jolloin ludet pystyvät työskentelemään pitkään mutta supistumisnopeus on hidas, sillä ATP:n hajoamisnopeus on pieni. Tyyppiin IIa fiibereillä on myöskin suuri määrä myoglobiinia, mitokondrioita ja kapillaareja. Myös näillä soluilla on korkea kapasiteetti generoida ATP:tä oksidatiivisesti, mutta ATP:n hajoaminen on nopeampaa kuten myös supistumisnopeus. Tyyppiin IIb fiiberit ovat glykolyyttisiä. Soluilla on suhteellisen vähän mitokondrioita sekä kapillaareja ja niiden myoglobiinisältö on pieni. Glykogeeniä sen sijaan on runsaasti. Ludet generoivat ATP:tä anaerobisella metabolialla, jolloin ne eivät kykene tuottamaan energiaa pitkäkestoiseen supistumiseen, vaan ludet toimivat lyhyissä anaerobisissa suorituksissa. ATP hajotetaan soluissa nopeasti jolloin myös lihaksen supistumisnopeus on suuri (Oberbach ym. 2006; Dugaard ja Richter, 2001).

1.1.2 Luustolihaslutyypit ja liikunta

Luustolihas adaptoituu säännöllisesti suoritettuun harjoitteluun sekä rakenteellisesti että toiminnallisesti. Nämä muutokset käsittävät mekaanisia, metabolisia ja hermostollisia muutoksia, joiden avulla lihas pyrkii täyttämään muuttuneiden olosuhteiden vaatimukset,

kuten mm. kasvaneen energian tarpeen. Näitä muutoksia toteutetaan proteiiniexpressio-
modifikaatioilla, jolloin geenien tuotteet johtavat muuttuneeseen lihasfenotyyppiin.
Geeniexpressio pysyvillä muutoksilla on perinnöllistä merkitystä, kun adaptoidutaan
muuttuneisiin olosuhteisiin. Lihaksistossa tapahtuvat muutokset riippuvat suoritetusta
harjoitustyypistä, esim. voimaharjoittelu tuottaa yksilölle erilaisia ominaisuuksia kuin
kestävyys- ja keuhko- ja sydänharjoittelu. Kukin harjoitteluperiodi kehittää vain juuri kyseistä harjoitettavaa
ominaisuutta.

Lihassolutyyppien suhteellinen jakautuminen kuhunkin lihakseen riippuu lihaksen
pääasiallisesta tehtävästä. Lihassolujakaumaan vaikuttaa myös fyysinen aktiivisuus, sillä
oikealla harjoittelulla voidaan jakaamaa muuttaa tietyn verran haluttuun suuntaan.
Aerobisen harjoittelun määrän lasku vähentää tyyppin I ja kasvattaa tyyppin II
lihassoluosuutta. Aerobinen harjoittelu puolestaan kasvattaa tyyppin I lihassolujen määrää
(Daugaard ja Richter, 2001). Vaikka suurelta osin lihassolutyyppien jakautuminen on
ihmisillä pääosin heterogeenistä, lihassolujen suhteellisilla osuuksilla on myös yksilöllisiä
eroja, joihin vaikuttavat perimä sekä ympäristö. Näiden tekijöiden osuuksiksi
lihassolujakaumassa on arvioitu olevan perimän osalta 45% ja ympäristön osalta 40%
(Simoneau ja Bouchard, 1995)

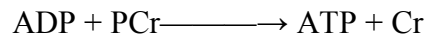
1.1.3 Luustolihasen adaptaatio kestävyys- ja keuhko- ja sydänharjoitteluun

Kestävyys- eli aerobisen harjoittelun vaikutus on kumulatiivinen ja sen seurauksena
tapahtuu lihassolun adaptaatiota. Vaikutuksista tunnetuimpia ovat oksidatiivisen
kapasiteetin kasvu, rasvahappojen lisääntynyt käyttö ATP:n tuotannossa sekä
oksidatiivisen tyyppin I lihassoluosuuden kasvu. Lihassolujen muutoksia tapahtuu
harjoittelun vaikutuksena systemisesti, ei lokaalisesti, ts. vain supistuva lihas adaptoituu.
Suorituskyvyn paraneminen kestävyys- ja keuhko- ja sydänharjoittelun tuloksena johtuu siis pääosin lihaksen
metabolian muutoksista. Kroonisella fyysisellä harjoittelulla voidaan muokata mm.
mitokondrioiden proteiinisäilytystä, jolla on suora vaikutus mitokondrioiden ja siten
metabolian toimintaan (Henriksson ym., 1986).

Vasteena kasvaneelle energiankulutukselle solut kasvattavat mitokondrioiden tilavuus osuutta (= volume density eli mitokondrioiden lukumäärä ja koko), entsyymipitoisuutta ja oksidatiivista kapasiteettia, johtuen mitokondrioiden biogeneesin tehostumisesta (Holloszy ja Coyle, 1984). Lihaksen kahdesta erillisestä mitokondriopopulaatiosta sarkolemmakalvon alla sijaitseva populaatio (SSM) kasvattaa harjoittelun vaikutuksena oksidatiivista kapasiteettiaan enemmän kuin intermyofibrillaarinen populaatio (IFM). Mitä suurempi lihaksen mitokondriosäilytys on, sitä pienempi respiraation taso vaaditaan kultakin mitokondriolta lihaksen työskennellessä. Kun säännöllinen harjoittelu päättyy, SSM populaatio menettää oksidatiivista kapasiteettiaan enemmän kuin IMF populaatio, jonka ominaisuudet pysyvät suhteellisen muuttumattomana. Aerobinen harjoittelu siis vaikuttaa enemmän juuri SSM- populaatioon (Krieger ym., 1980).

Kestävyysharjoittelu tehostaa rasvahappojen käyttöä, joka on seurausta hiilihydraattien pienentyneestä käytöstä energiantuotannossa, kun lihasten glykogenolyysin taso vähenee. Tämä johtaa suurempaan rasvahappojen kulutukseen, joka johtuu harjoitettujen lihasten tehostuneesta kyvystä ottaa rasvahappoja veren plasmasta. Samoin lihasten kapillaaritiheys kasvaa harjoittelun tuloksena, joka lisää aineenvaihtopinta- alaa ja vähentää diffuusioetäisyyttä tehostaen lihasten rasvahappojen saantia ja käyttöä (Kiens ym., 1993) Sarkolemmakalvolla sijaitsevat rasvahappo- transportterit (FA- transportterit) vastaavat suurelta osin rasvahappojen liikenteestä solun sisään. Toistaiseksi sarkolemmakalvolta on identifioitu kaksi FA- transportteriproteiinia, plasma membrane FA- binding protein (FABPpm) ja FA- translocase protein FAT/CD36. Tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että näitä transporttereita voidaan säädellä sekä akuutisti että kroonisesti, jolloin solun metabolian kasvanut FA- tarve voidaan täyttää (Jeukendrup, 2002).

Ensimmäisten kymmenien sekuntien aikana kestävyysharjoittelun alkaessa lihaksen energiansaanti turvataan aluksi muulla kuin oksidatiivisella fosforylaatiolla. Kun lihas supistuu, vapaan ADP:n (fADP) osuus nousee ja johtaa ATP:n ja kreatiinin (Cr) muodostumiseen kreatiini fosfokinaasin (CPK) katalysoimana fADP:stä ja fosfokreatiinista (PCr).



PCr:n määrä luustolihaksissa on n. kymmenen kertaa ATP:n konsentraation määrä, eli n. 30 mM. CPK toimii akuutissa energiantarpeessa tuottaen lihaksen käyttöön energiaa nopeammin kuin sitä muodostuu katabolisella reaktiolla. fADP on myös glykolyysin substraatti ja allosterinen aktivaattori, sekä säätelee mitokondrioiden aktiivista hengitystä. Harjoittelun seurauksena kasvanut mitokondriosältö lisää lihasten mitokondrioiden 3. vaiheen (= ATP:n tuottoon kytketty hengitys) hengityksen herkkyyttä fADP:lle vähentäen glykolyysin ja tuotetun laktaatin määrää, jolloin suurempi osa työhön tarvitusta energiasta saadaan aerobisen metabolian kautta (Hood, 2001). Oksidatiivisella fosforylaatiolla tuotetun energian määrän kasvuun liittyy myös irtikytkijäproteiini UCP3- proteiinin vähentynyt ekspressio. UCP3 on proteiini, joka kytkee irti oksidatiivisen fosforylaation, jolloin energia haihtuu lämpönä eikä sitoudu ATP:nä (Rolfe ja Brand, 1996). Oksidatiiviset lihassolutyypit ekspressoivat UCP3- proteiinia vähemmän kuin glykolyyttiset lihassolut. Koska kestävyys harjoittelu lisää oksidatiivisten lihassolujen määrää, vähenee samalla UCP3:n ekspressio ja lihaksen oksidatiivinen fosforylaatio tehostuu, jolloin tämäntyyppisellä harjoittelulla on suotuisa vaikutus lihasten metaboliaan (Hesselink ym., 2001; Fernström 2004). Metaboliset muutokset luustolihaksissa johtuvat lihassolutyypikoostumuksen sekä solutyypille ominaisen metabolian muutoksista. Tyypin 2 diabetes potilailla on lihasten glykolyyttinen entsyymiaktiivisuus energiantuotannossa kasvanut ja oksidatiivinen entsyymiaktiivisuus vähentynyt. Selitys tähän tilanteeseen on lihasten vähentynyt tyypin I lihassoluosuus ja lisääntynyt tyypin IIb lihassoluosuus. (He ym., 2001).

1.2 Luustolihaksen mitokondriot

Luustolihas on vahvasti riippuvainen oksidatiivisesta hapetusprosessista, joka tuottaa energiaa ATP:nä lihassolujen käyttöön. ATP tuotetaan lihassolujen mitokondrioissa oksidatiivisten entsyymien muodostaman ketjun katalysoimassa reaktiossa (Krebsin sykli eli sitruunahappokierto) hapettamalla ravinnosta saatavia yhdisteitä, pääasiassa rasvoja ja glukoosia. Täydellinen aerobinen glukoosimolekyylin hajotus CO₂:ksi ja H₂O:ksi tuottaa

yhteensä 30 molekyyliä ATP:tä. Luustolihas pystyy tuottamaan energiaa myös anaerobisesti hajottamalla glukoosimolekyylin laktaatiksi eli maitohapoksi. Tämä metabolia tosin tuottaa vain 2 molekyyliä ATP:tä per glukoosimolekyyli, joten luustolihas ei voi toimia anaerobisesti kovin pitkään. Myöhemmin hapen ollessa saatavilla hapetetaan laktaatti pyryvaatiksi ja ohjataan hajotettavaksi mitokondrioiden Krebsin sykliin.

Lihaksen supistumiseen tarvittava energia tuotetaan pääasiassa mitokondrioissa, jotka sijaitsevat lihassolujen väleissä (solunsisäiset eli intermyofibrillaariset mitokondriot) lähellä Z- levyjä. Välittömästi sarkolemmakalvon alla sijaitsevat mitokondriot tuottavat energiaa mm. ionin vaihtoon, substraatin kuljetukseen, signalointiin ja proteiinisynteesiin (Gogswell ym., 1993).

1.2.1 Mitokondrioiden biogeneesi

Mitokondrioiden määrää luustolihaksessa voidaan pitää eräänlaisena fyysisen kunnon määreenä, sillä säännöllisesti toistuva aerobinen kestävyystyyppinen rasitus (lihassupistus) ylläpitää ja lisää mitokondrioiden biogeneesiä. Vaikutus näkyy lisääntyneenä mitokondriomassana ja oksidatiivisen fosforylaation kapasiteetin lisääntymisenä, joka johtuu muuttuneesta nukleaarisen ja mitokondrionaalisen DNA:n geeniekspressiosta. Voimatyypinen nopeita lihassoluja aktivoiva harjoittelu puolestaan ei vaikuta mitokondrioiden adaptaatioon, jos tavoitteena on parempi fyysinen kestävyys ja suurempi hapenottokyky. Mitokondrioiden proteiineja koodaa sekä nukleaarinen DNA että mtDNA, joista jälkimmäisen osuus proteiinisällön tuottamisesta on huomattavasti pienempi. Biogeneesiä ohjaa näiden kahden genomien koodaamat transkriptiotekijät, jotka välittävät mitokondrioiden metabolisia ja fysiologisia muutoksia vaikuttaen biogeneesiin osallistuvien proteiinien geeniekspression. Näitä transkriptiotekijöitä ovat mm. NRF-1, NRF-2 (NRF = nuclear respiratory factor), sekä PPAR- α ja PPAR- γ (PPAR = peroksisome proliferator activated reseptors) (Hood 2001; Kiens 1993).

1.3 Luustolihaskudoksen rasva

Lihaskudoksessa rasva varastoidaan joko extrasellulaarisena metabolisesti inerttinä rasvana adiposyytteihin (EMCL, extramyocellular lipid) tai solunsisäisinä metabolisesti käytettävänä rasvapisaroina sytoplasmaan mitokondrioiden läheisyyteen (IMCL, intramyocellular lipid). Pääasialliset IMCL- tasoon vaikuttavat tekijät ovat sukupuoli, perimä, liikunta ja ruokavalio (Chalkey ym., 1998; Krssak ym., 2000). Aerobinen harjoittelu lisää lihasten IMCL- pitoisuutta, mikä on paradoksaalista, sillä insuliiniresistenssi on liitetty korkeaan IMCL- sisältöön. (Goodpaster ym., 2001). Ruokavalion tyydyttyneet rasvat akkumuloituvat lihaskudokseen rasvojen metaboliitteina DAG (diasylglyserol): na ja seramidina, kun taas tyydyttymättömät rasvahapot akkumuloituvat joko IMTG: na tai vapaina rasvahappoina (FFA). (Montell ym., 1997). Leptiinihormoni toimii ei- rasvakudoksissa vähentäen solujen FFA- pitoisuutta ja estämällä triglyseridien akkumulaatiota lisäämällä FFA:n β - oksidaatiota ja lisäämällä lipogeneesiä suojaen näin soluja lipotoksisuudelta. Kun solun leptiinireseptorien ekspresio tai toiminta heikkenee, johtaa se triglyseridien kerääntymiseen solun sisään. (Unger ym., 1999). Ruokavalion rasvoilla voidaan siis olettaa olevan yhteys insuliiniresistenssin syntymiseen, sillä tyydyttyneet rasvat lisäävät DAG: n akkumulaatiota lihaksiin ja TAG- poolin saturaatiota, jolloin syntyy lisää insuliinisignaalintia häiritseviä metaboliitteja.

1.4 Mitokondrioiden rakenne ja toiminta

Mitokondrio on sytoplasmassa sijaitseva kaksoiskalvon ympäröivä organeli, joka vastaa ATP:n tuotannosta aerobisessa metaboliassa. Mitokondriota ympäröivät kaksi membraania eroavat toisistaan sekä rakenteeltaan että koostumukseltaan. Ulompi sytoplasmaa reunustava kalvo koostuu proteiineista (n. 50 %) ja lipideistä (n. 50 %). Membraanin läpäisevien porien kautta suuret molekyylit, kuten ionit ja metaboliitit, pääsevät sytoplasmasta kalvojen väliseen intermembraanitilaan. Sisempi kalvo koostuu sekin proteiineista (n. 80 %) ja lipideistä (n. 20%), mutta on paljon läpäisemättömämpi kuin ulkokalvo. Sisäkalvo on lisäksi poimuttunut kohti mitokondrion sisäosaa eli matriksia muodostaen kristoja, jotka lisäävät sisäkalvon pinta-alaa.

Mitokondrion matriksissa tapahtuu soluliman glykolyysissa syntyneen pyruvaatin sekä rasva- ja aminohappojen hajotus hiilidioksidiksi Krebsin syklissä. Ennen sykliin liittymistä pyruvaatti ja rasvahapot muutetaan asetyyli CoA: ksi entsyymikatalysoidussa reaktiossa mitokondrion sisäkalvolla. Krebsin syklin entsyymit katalysoivat reaktiota, jossa elektronit siirtyvät sykliin liittyneeltä asetyyli CoA: lta elektroninsiirtäjä NAD^+ :lle ja FAD : lle pelkistäen ne NADH :ksi ja FADH_2 :ksi. Sisäkalvolla ja kristoissa sijaitsee elektroninsiirtoketju, joka koostuu useista eri molekyyleistä, pääasiassa proteiineista. Nämä molekyylit ovat ryhmittyneet neljäksi eri kompleksiksi. Kalvon poimuttuminen mahdollistaa elektroninsiirtoketjun esiintymisen mitokondrioissa useina kopioina. Ketjun molekyyliin kiinnittyneet prosteettiset ryhmät vuorottelevat hapetus- ja pelkistystilojen välillä sitä mukaa kun ne vastaanottavat ja luovuttavat elektroneja. Ketju vastaanottaa elektroninsa Krebsin syklissä pelkistyneiltä elektroninsiirtäjiltä (NADH ja FADH_2) ja siirtää elektronit lopulta ketjun viimeisenä olevalle happimolekyyylille (Lehninger ym. 2002).

Elektroninsiirtoketjun tehtävänä on ylläpitää H^+ gradienttia intermembraanitilan ja matriksin välillä. Ketjun kolme kompleksia pumppaavat protoneja matriksista intermembraanitilaan, jolloin luodaan ATP- syntaasin toiminnan mahdollistava protonigradietti. Sisäkalvolla sijaitseva ATP- syntaasi syntetisoi ADP : sta ATP :ta kun protonit virtaavat sen läpi konsentraatiogradienttinsa mukaisesti (Lehninger ym. 2002).

1.4.1 Rasva-aine metabolia

Ihmisellä rasvojen hapettaminen eli β - oksidaatio on energianlähteenä tärkeämpää kuin glukoosin hapetus, sillä rasvasta saatavan ATP : n määrä on kuusi kertaa suurempi kuin vastaavasta määrästä glukoosia saatavan energian määrä. Rasvojen hapettaminen tapahtuu mitokondrioissa neljässä katalysoidussa reaktiossa. Energian tuotantoa säädellään tarkasti vastaamaan solun ja koko organismin sen hetkisiä tarpeita sekä entsyymaattisesti että hormonaalisesti. Korkea hiilihydraattien saanti ravinnosta supressoi rasvojen metaboliaa mitokondrioissa ja edistää rasvahappojen biosynteesiä. Entsyymaattinen säätely toimii

solutasolla säädellen glykolyysin tasoa solulimassa allosteristen entsyymeiden, kuten esim. heksokinaasin, pyryvaattikinaasin ja fosfofruktokinaasin avulla. Hormonaalinen säätely huolehtii koko organismin metabolisesta tasosta hormonien, kuten insuliinin sekä glukagonin avulla. Siruunahappokiertoon osallistuvat entsyymit sekä niiden aktiivisuus ovat tärkeässä osassa rasvojen metaboliassa. Sitruunahappokierron entsyymit sijaitsevat liukoisessa muodossa mitokondrion matriksissa sekä integraalisina proteiineina mitokondrion sisäkalvolla. Kestävyysharjoittelun seurauksena geeniekspression muutokset lisäävät näiden entsyymeiden pitoisuutta ja entsyymejä koodaavien geenituotteiden kuljetus mitokondrioihin lisääntyy (Adhihetty ym. 2003).

1.4.2 Rasva-aine metabolian häiriöt

Rasvojen häiriintynyt metabolia ilmenee epänormaalina rasvojen oksidaation säätelynä sekä triglyseridien ja muiden rasvahappojohdannaisten akkumulaationa. (Simoneau ja Kelley 1997; Blaak ym., 2000) Esimerkiksi tyypin 2 diabeteksessa luustoli hasten metabolinen kapasiteetti on painottunut enemmän rasvahappojen esterifikaatioon kuin hapettamiseen. Esterifikaatio on reversiibeli reaktio jossa rasvahapot voidaan liittää kovalenttisellä sidoksella toiseen molekyyliin. Tapahtuma on dehydraatioreaktio, sillä rasvahapon karboksyyli ryhmästä häviää OH- ryhmä ja reaktion toiselta osapuolelta poistuu puolestaan hydroksyyli ryhmä. Esterifikaatioprosessiin tuotteena syntyy mm. fosfolipidejä, kolesteroliestereitä, diasyyli glyseroleja (DAG) ja triasyyli glyserideja (TAG). Esterifikaation osuuden kasvuun on syynä kohonnut glukoositaso joka inhiboi rasvahappojen, jotka ovat siis pääasiallisin energian lähde, oksidaatiota sekä stimuloi rasvojen esterifikaatioprosesseja haiman saarekkeissa (Simoneau ym., 1999; Roduit ym., 2004)

Mitokondrioiden heikentynyt toiminnallinen kapasiteetti on yksi mahdollinen syy rasvojen sekä myös hiilihydraattien metabolian häiriöihin. Metabolisen kapasiteetin häiriöihin on yhdistetty lihassolujen mitokondrioiden epänormaali morfologia, niiden lukumäärän väheneminen ja oksidatiiviseen metaboliaan kuuluvien entsyymien aktiivisuuden ja määrän väheneminen. Myös tyypin 2 diabeteksessä insuliiniresistenssin taso on korreloi

oksidatiivisten entsyymeiden vähentyneeseen aktiivisuuden kanssa (Simoneau ym., 1997; Simoneau ym., 1999).

Triglyseridien akkumulaatio luustolihaan korreloi oksidatiivisten entsyymeiden vähentyneen aktivaation kanssa (He ym., 2001). Lihasbiopsioiden biokemialliset analyysit ovat osoittaneet, että lipidien kertymiseen liittyy mitokondrioiden epänormaali morfologia, mitokondrioiden oksidatiivisten entsyymien ja siitä johtuva oksidatiivisen kapasiteetin väheneminen (Simoneau ym., 1999).

1.5 Rotta tutkimuseläimenä

Laboratoriorotta *Rattus norvegicus* oli ensimmäinen tutkimuskäyttöön kasvatettu nisäkäslaji. Rottien tutkimuskäytön historia on pitkä ja pitää sisällään useita eri menetelmiä ja tutkimuskohteita. Useita eri rottakantoja on käytetty luomaan tautimalleja lisäämällä eläimiä valinnan avulla, jolloin tautia aiheuttavat alleelit fiksoituvat lokuksiinsa. Sisäsiitoksella luotuja rottalinjoja on käytetty tutkittaessa mm. metabolisia häiriöitä, sydän- ja verisuonisairauksia, rintasyöpää, munuaistauteja ja ikääntymistä (James ja Lindpaintner, 1997).

1.5.1 Valinnalla luotu geneettinen malli

Valinnan avulla suoritettu lisääminen tuottaa käyttökelpoisen eläinlinjan halutun ominaisuuden tutkimista varten, jos ominaisuuden määrää tai muuta funktiota voidaan toistettavasti mitata ja jos ominaisuuden variaatio perustajapopulaatiossa on tarpeeksi suuri (Koch ym. 1998).

Geneettinen komponentti kattaa arviolta 2/3 polygeenisen aerobisen suorituskyvyn variaatioista. Harjoittelemattomalla yksilöllä aerobiseen suorituskyvyn variaatioihin vaikuttaa useita yksilölle ominaisia synnynnäisiä geenejä (Klissouras 1971). Lisäksi suorituskykyyn vaikuttavat ne geenit, jotka vastaavat harjoittelun seurauksena tapahtuvasta adaptaatiosta (Bouchard ym., 1999). Aerobinen kapasiteetti voidaan siis käsittää luontaisten (perittyjen) ja adaptoituvien geenien ekspressioiden summana kun ne

vuorovaikuttavat ympäristötekijöiden kuten elämäntapojen ja liikunnan kanssa. Näiden tekijöiden yksittäistä vaikutusta suorituskykyyn on siksi vaikea arvioida. Mallit, joilla suorituskykyyn vaikuttavat yksittäiset tekijät ovat kontrolloituja, ovat käyttökelpoisia määritettäessä geneejiä, jotka vaikuttavat yksilön suorituskyvyn variaatioihin (Britton ja Koch, 2001).

Valinnan avulla voidaan monimutkaisen geneettisen variaation omaavasta ominaisuudesta, kuten aerobisesta kapasiteetista, luoda ominaisuuden suhteen ääripäitä edustavia geneettisiä malleja (high & low lines). Tämä kaksisuuntainen eli divergentti valintamenetelmä sopii tutkimustarkoitukseen kolmesta eri syystä:

- 1) Saman ominaisuuden suhteen ääripäitä edustavista kahdesta linjasta saadaan enemmän tutkimusmateriaalia.
- 2) Kun valinnan avulla valmistetun eläinlinjan sisäsiitoskerroin pidetään alhaisena, ominaisuuden aiheuttavat vastakkaiset alleelit konsentroituvat näihin kahteen eri linjaan.
- 3) Useiden sukupolvien yli tapahtuva valinta minimoi ominaisuuteen kohdistuvat ympäristön vaikutukset.

Valinnan tarkoituksena on siis konsentroida geneettistä komponenttia ja minimoida ympäristön vaikutusta ylläpitämällä standardisoitua ympäristöä. Tämä geneettinen yhdenmukaisuus luo mahdollisuuden arvioida samaa geneettistä ainesta toistamiseen, kun ominaisuuteen vaikuttavat vastakkaiset alleelit fiksoituvat lokukseen lisäksi homotsygotiaa ja ympäristön ja geneettisen variaation vaikutus on mahdollisimman minimoitu (Troxell ym., 1996; Troxell ym.; 2003). Valinnan seurauksena tapahtuva vaste, eli halutun ominaisuuden jakautuminen kahteen eri linjaan muodostuu neljästä lähteestä:

- 1) valinnan perusteena olevien fenotyypin muutoksesta vastaavien geenien lisääntynyt esiintymistiheys
- 2) odottamattomat pienet muutokset ympäristössä, joiden vaihtelussa divergentti valinta toimii kontrollina
- 3) tilastolliset virheet mittausmenetelmissä

4) satunnaiset muutokset geenifrekvenssissä (geneettinen virta)

Tilastollista virheistä ja geneettisestä virrasta johtuvaa variaatiota voidaan vähentää lisäämällä sukupolvien perheiden määrää, joista siis valitaan yksi pari seuraavien sukupolvien vanhemmiksi ja lisäämällä perustajapopulaation eläinten määrää. Valinnalla saavutetaan ennen pitkää se raja- arvo sukupolvien määrässä, jolloin vastetta ei enää saada. Tätä rajaa on kuitenkin vaikea määrittää, sillä vasteeseen vaikuttaa yksittäisten geenien vaikutusten hajautuminen perustajapopulaatiossa, sekä mutaatioiden tuottama jatkuva alleelien variaatio (Koch ja Britton 2001).

1.5.2 LCR - ja HCR - rotat

Steven L. Brittonin tutkimusryhmä (Medical College of Ohio) valmisti valinnalla kaksi rottalinjaa käyttäen perustajapopulaationa geneettisesti heterogeenistä N:NIH kantaa ($n = 168$). Jokainen eläin perustajapopulaatiossa edusti eri sukua, jotta vältettäisiin sisarusten välistä valintaa. Näin geneettinen varianssi (= heterogeenisyys) oli mahdollisimman suuri. Rottalinjat valmistettiin perinnöllisen aerobisen suorituskyvyn ja siihen liittyvien sairauksien tutkimista varten käyttäen valintakriteerinä juoksupyörämittausta. Testissä mitattiin eläinten uupumukseen asti juoksemaa metrimäärää jonka perusteella arvioitiin aerobista kapasiteettia ja siitosarvoa. Koska rotat eivät saaneet minkäänlaista harjoitusta ennen mittauksia, testillä saatiin selville yksilöiden luontainen juoksukapasiteetti. Koska ympäristökijöillä, kuten eläinten ylläpidolla ja käsittelyllä on joko positiivista tai negatiivista vaikutusta suorituskykyyn, pyrittiin olosuhteet pitämään vakioina kaikille eläimille. Ympäristön vaikutuksen minimoimiseksi myös eläimen saama tulos oli paras viidestä eri päivinä suoritetuista mittauksista. Keskimäärin perustajapopulaation jäsenet juoksivat 355 ± 11 m, joista naaraiden suoritukset (380 ± 15 m) olivat huomattavasti paremmat kuin urosten (327 ± 16 m). Perustajapopulaatiosta valittiin mittausten perusteella 13 parhaiten ja 13 heikoiten menestynyttä rottaa molemmista sukupuolista ja näiden annettiin pariutua satunnaisesti keskenään. Näin syntyi ensimmäinen sukupolvi HCR (high capacity rat)- ja LCR (low capacity rat) linjoista. Uudelle sukupolvelle suoritettiin samat mittaukset joiden perusteella jokaisesta perheestä valittiin yksi uros ja yksi naaras

seuraavan sukupolven vanhemmiksi (within-family selection), joka säilyttää geneettistä heterogeenisyyttä ja lisää yleistä vastetta suoritettuun valintaan. Sisäsiittoisuuden kerroin (DF) linjan jokaisessa sukupolvessa oli $\sim 0,96$ %. $DF = [1/4N]$, $N =$ linjan vanhempien lkm. $13 \times 2 = 26$.

Kuuden sukupolven valinnan seurauksena HCR linjan naaraat paransivat juoksukapasiteettiaan 140 % perustajapopulaatioon verrattuna. LCR linjan naaraiden kapasiteetti puolestaan väheni 18 % perustajapopulaatioon verrattuna. HCR linjan urokset paransivat kapasiteettiaan 131 % ja LCR linjan uroksien kapasiteetti heikkeni kuudessa sukupolvessa 11 %. Kuudennen sukupolven rottalinjojen juoksukapasiteetit erosivat toisistaan 171 %, suurimman muutoksen tapahtuessa HCR linjassa (LCR 310 ± 8 m, HCR 839 ± 21 m), joka reagoi valintaan voimakkaammin ja jolla oli myös kapasiteetin suhteen suurempi variaatio kuin LCR linjalla. Valinnan seurauksena myös rottalinjojen keskimääräiset painot korreloivat juoksukapasiteetin kanssa. LCR linjan eläinten painot nousivat ja HCR linjan laskivat molemmilla sukupuolilla aerobisen kapasiteetin valinnan funktiona kuudessa sukupolvessa. Näiden tulosten lineaarinen malli arvioi, että painolla on tilastollinen merkittävyys molempien rottalinjojen aerobisen kapasiteetin variaatioihin (Koch ja Britton 2001).

Gonzales ym. (2005) tutkivat seitsemännän sukupolven LCR ja HCR rottien systeemisen hapenkuljetuksen, maksimalisen hapenottokyvyn (VO_{2max}) ja lihasten metabolisen kapasiteetin eroja. Maksimaalista hapenottokykyä on yleisesti käytetty organismin aerobisen kapasiteetin indeksinä ja se koostuu yhteistyöstä keuhkojen hapensiirron ja kapillaareista soluun diffuusion välillä (Basset ja Howley 2000). Maksimaaliseen hapenottoon vaikuttaa useita tekijöitä, joista osaan voidaan vaikuttaa harjoittelulla ja osa on yksilölle ominaisien geenien ekspressioiden tulosta (Buick ym., 1980).

VO_{2max} mitattiin juoksupyörässä tehdyssä testissä, jonka nopeutta nostettiin asteittain testin kuluessa. VO_{2max} oli merkittävästi korkeampi HCR linjan rotilla [normoksinen (12 %) ja hypoksinen mittausta (22 %)]. Suurin tekijä HCR rottien paremmalle VO_{2max} -arvolle on tehostunut hapen johtuminen luustolihaksissa, joka oli 30 % parempi kuin LCR linjan rotilla. *Gastrocnemius*-lihaksista tutkittiin kapillaaritiheyttä tarkoituksena selvittää

johtuvatko hapen johtumisen erot lihasten rakenteellisista muutoksista. Tutkimuksessa selvisi ettei kapillaari- lihasfiiberi suhteessa ollut eroja rottalinjojen kesken. Erot tulivat esiin kapillaaritiheydessä (kapillaarien lukumäärä / lihaksen pinta-ala), joka oli korkeampi HCR linjalla. Kapillaaritiheys kasvaa kun lihasfiiberin pinta- ala pienenee, kapillaarien lukumäärä kasvaa tai näiden tekijöiden kombinaation seurauksena. HCR rotilla tämä adaptaatio on seurausta kapillaaritiheyden kasvusta ja vähentyneestä lihasfiiberien pinta-alasta. Tämä tarkoittaa suurempaa lihassolujen ja kapillaarien aineenvaihtopinta- alaa, joka vaikuttaa hapenkuljetukseen kapillaareista soluihin ja on siten myös yhteydessä suurempaan oksidatiiviseen kapasiteettiin (Hepple 2000).

Howlett ym. (2003) käyttivät HCR ja LCR rottia tutkiakseen luontaisen kestävyysominaisuuden erojen yhteyttä lihassolukoostumukseen, kapillaaritiheyteen, maksimaaliseen hapenottoon ja entsyymiaktiivisuuteen. *Gastrocnemius*- lihaksen morfometriset analyysit osoittivat, että HCR rottien kapillaaritiheys oli 32 % suurempi kuin LCR rottien, vaikka kapillaarien lukumäärässä ei havaittu eroja. Eroja ei myöskään havaittu lihassolujen lukumäärän kesken, vaikka keskimääräinen solujen pinta- ala oli 25 % suurempi LCR rotilla. Solujen pienentynyt pinta-ala yhdistetään ihmisellä kestävyysharjoittelun tuloksena tapahtuvaan lihassolutyypin muutokseen I tyypistä tyypin II lihassoluksi. Lihassolutyypin I:n suhteen ei kuitenkaan havaittu eroja rottalinjojen välillä. Syynä tähän epäillään olevan lihassolutyypin heterogeenisuuden lajin sisällä. Koko lihaksen oksidatiivisten entsyymien aktiivisuudet (CS, sitraattisyntaasi ja β -HAD, β -hydroksisyyli CoA dehydrogenaasi) olivat merkittävästi korkeammat kuin LCR rotilla. Glykolyysistä entsymeistä fosfofruktokinaasin (PFK) aktiivisuus oli korkeampi LCR rotilla kun taas heksokinaasin (HK) suhteen ei esiintynyt tilastollisesti merkittävää eroa.

Näiden tutkimusten perustella todetut erot HCR- ja LCR rottalinjojen välillä:

- 1) HCR linjan rottien hapen käyttö on tehokkaampaa kuin LCR- linjan
- 2) Systeemisessä hapenkuljetuksessa ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa linjojen välillä

- 3) Suurimmat tehokkaampaan hapen käyttöön johtavat erot olivat HCR- linjan eläinten lihasten kyvyssä poistaa happea verenkierrosta, johon vaikuttaa hapen parempi johtuminen
- 4) Kapillaari-lihasfiiberi suhteessa ei eroja *gastrocnemius*- lihaksessa
- 5) Keskimääräinen lihassolujen pinta- ala on suurempi *gastrocnemius*- lihaksessa LCR- linjalla
- 6) Kapillaaritiheys (kapillaarien lukumäärä/pinta-ala) on suurempi HCR- linjalla
- 7) Oksidatiivisten entsyymien aktiivisuus ja siten myös metabolinen kapasiteetti ovat tehokkaampia HCR- linjalla
- 8) HCR linjan keskimääräisen lihassolun pinta- ala oli pienempi kuin LCR linjalla, ei havaittu lihassolutyypin I:n kasvanutta osuutta
- 9) Perifeeriset lihasten adaptaatiot tapahtuvat lihasten morfometrian ja entsyymimuutosten kautta

Näitä tuloksia tarkastellessa on kuitenkin otettava huomioon, että lihasnäytteet ovat peräisin vain yhdestä lihaksesta ja että mitatut veriarvot edustavat kaikkia työskenteleviä lihaksia.

1.6 Tyypin 2 diabetes

Tyypin 2 diabeteksen määrä on lisääntynyt merkittävästi ikääntyvien joukossa nyky-yhteiskunnassa, mutta tauti yleistyy myös kaikissa aikuisten ikäryhmissä. Taudin ilmeneminen on siirtynyt enenevässä määrin myös lapsiin ja nuoriin erityisesti niissä etnisissä ryhmissä, joissa taudin esiintyvyys on muutoinkin tavallista yleisempi (Kaufmann 2002). Tyypin 2 diabetes on yksi monista elintapasairauksista, vaikka sairastumisalttiuteen vaikuttaa myös geneettinen perimä. Elämäntapatekijöistä selkeimmin sairastumisen vaaraa lisäävät lihavuus ja liikunnan puute. Ruokavaliotekijöistä erityisesti runsaan tyydyttyneen rasvan saanti lisää sairastumisriskiä. Tyypin 2 diabetes ei puhkea yllättäen, vaan sen kehittymiseen kuuluu useita vaiheita ja tauti kehittyy asteittain alkaen heikentyneellä glukoosin siedolla ja suurentuneella paastoverenglukoosilla päättyen hyperglykemiaan eli kohonneeseen verensokeriin (Uusitupa ym., 2001). Taudin patologiaan kuuluu heikentynyt rasvojen hapetuskyky- ja glukoosin kuljetus, luustolihas-

insuliiniresistenssi ja insuliinisolitoireittii kuuluvi molekyylie heikentynt aktivaatio. Muita taudin etenemiseen kuuluvia muutoksia ovat mm. vähentynyt mitokondrioiden biogeneesi ja glukoostransportteriproteiinien synteesi, glukoostrintoleranssi ja oksidatiivisten lihassolujen korvautuminen glykolyttisillä lihassoluilla. Jatkuvasta diabetestutkimuksesta huolimatta monta yksityiskohtaa on vielä selvittämättä, mm. insuliinisolitoireitin kaikkia mekanismeja ei vielä täysin tunneta.

Yksinkertaistettuna tauti voidaan siis määritellä sokeriaineenvaihdunnan ja rasvojen metabolian häiriönä. Liikunnan on todettu parantavan luustolihasien insuliiniresistenssiä ja tehostavan rasvojen oksidaatiota, kun oksidatiivisten lihassolujen määrä kasvaa ja metaboliaan liittyvien mekanismien toiminta paranee. Siksi liikunta on taudin hoidossa ja ehkäisyssä merkittävässä asemassa yhdessä ruokavalion kanssa (Tuomilehto ym., 2001).

1.6.1 Insuliini ja glukagoni

Keskeisimmät veren glukoostripitoisuutta säätelevät hormonit ovat endokriinisen haiman Lagerhansin saarekkeiden α -soluista erittämä glukagoni ja β -soluista erittyvä insuliini. Tyypin 2 diabeteksessä verensokerin nousu liittyy sekä insuliinin heikentyneeseen vaikutukseen erityisesti luustolihasoluissa (insuliiniresistenssiin), että insuliinin häiriintyneeseen erityykseen haiman β -soluista. Terveellä ihmisellä insuliinin toiminta palauttaa plasman kohonneen glukoostritason normaaliksi n. tunnin kuluessa. Diabeetikolla veren sokeri säilyy korkealla pitempään, koska veren matalampi insuliinitaso hidastaa solujen sokerinottoa. Glukagonia vapautuu vereen plasman glukoostripitoisuuden laskiessa ja se nostaa plasman glukoostripitoisuutta lisäämällä maksan glykogenolyysiä eli varastoituneen glykogeenin pilkkoutumista glukoostriksi. Vastaavasti insuliini stimuloi solujen glukoostrinottoa erityisesti maksassa, luusto- ja sydänlihaksessa, fibroblasteissa ja rasvakudoksessa.

Insuliinilla on myös muita suoria ja epäsuoria vaikutuksia kuten maksa-, sydänlihas- ja luustolihasolujen glykogeenisynteesin stimulointi sekä glukoostrin muuttaminen triglyserideiksi rasvasoluissa. Kun insuliinin tuotanto on heikentynyt, solujen glukoostrinotto vähenee ja plasman glukoostripitoisuus nousee. Samalla myös muut insuliinin

stimuloivat vaikutukset vähenevät. Pysyvästi liian korkea veren sokeritaso voi aiheuttaa vaurioita valtimoihin mutta myös erityisesti pieniin verisuoniin. Silmänpohjien ja munuaisten pienten verisuonien vauriot aiheuttavat näön heikkenemistä ja jopa sokeuden ja munuaisten toiminnan häiriöitä. Korkean veren sokeritason aiheuttamat hermostomuutokset sekä verenkiertohäiriöt puolestaan lisäävät amputaatioiden riskiä.

1.6.2 Insuliinisignalointi

Insuliinihormonin vaikutus luustolihasissa alkaa, kun insuliini sitoutuu lihassolun solukalvon insuliinireseptoriin. Tämä laukaisee signalointikaskadin, joka johtaa glukoositransportteriproteiini GLUT4:n siirtymisen solunsisäisistä vesikkeleistä solukalvolle ja T-tubuluksiin. Insuliinireseptori on tetrameeri, koostuen kahdesta solun ulkopuolisesta α - ja sisäpuolisesta β - yksiköstä. Insuliinihormoni sitoutuu α - osaan ja aikaansaa β - yksikön tyrosiinitähteiden autofosforylaation ja insuliinireseptori tyrosiinikinaasin (IRTK) aktivaation. IRTK fosforyloi adapteriproteiinien tyrosiinitähteet, joihin kuuluvat insuliinireseptorisubstraattiperheen proteiinit IRS 1,2,3 ja 4. IRS proteiinit toimivat ”telakkaproteiineina” (dockingproteins) signalointireitin seuraaville molekyyille, joilla on SH- 2 domeeni, kuten tässä tapauksessa lipaasikinaasi fosfatidylinositoli (PI) -3 kinaasille. PI- 3 kinaasia pidetään merkittävänä tekijänä insuliinivälitteisen GLUT4- proteiinin translokaatiossa sekä glukoosin kuljetuksessa. (ks. yleiskatsaus Kahn 1994; White 1998). IRS-1:n kiinnittyminen PI-3 kinaasin säätelyosaan aktivoi kinaasin ja aikaansaa fosforylaatiokaskadin., jossa PI-3 fosforyloi PI- 4,5-fosfaatin PI - 3,4,5-fosfaatiksi (PIP3), joka puolestaan sitoutuu proteiinikinaasi B:hen (Akt/PKB) ja fosfoinositidistä riippuvaan proteiinikinaasi 1:een (PDK). PDK aktivoi seuraavaksi Akt:n fosforyloimalla yhden sen aminohapoista, treoniini 308: n.

Aktivoitunut Akt säätelee useiden glukoosinkuljetukseen, glykolyysiin, glykokeenin muodostukseen sekä proteiinisynteesiin osallistuvien kinaasien aktiivisuutta. Akt mm. fosforyloi ja siten inaktivoi glykokeenisyntaasi kinaasi- 3:n, saaden näin aikaan glykokeenisyntaasin aktivaation ja lisäten lihasten ja maksan glykokeenin tuotantoa. PDK

voi fosforyloida myös eräitä proteiinkinaasi C:n (PKC) muotoja. Aktivoitunut PKC osallistuu sekä GLUT 4:n toiminnan että proteiinisynteesin säätelyyn (Cross ym., 1995).

Insuliinin vaikutus glykogeenisyntaasiin luustolihasoluissa on heikentynyt tyypin 2 diabetestä sairastavilla potilailla ja kasvattaa siten taudille ominaiseen nonoksidatiivisen metabolian osuutta energiantuotannossa. (Klein ym., 1995; Krook ym., 2000). Korkea vapaitten rasvahappojen (FFA) määrä inhiboi tehokkaasti insuliinisignaalintiekaskadin aktiivisuutta jo IRS-1 fosforylaation ja PI-3 kinaasin aktivaation tasolla. (Dresner ym., 1995; Griffin ym., 1999).

1.6.3 Insuliinin erityksen säätely

Insuliinin erityks haimasta on glukoosistimuloituvaa. Vaikka glukoosi on tärkein insuliinin erittymistä säätelevä tekijä, senkin stimuloivaa vaikutusta voivat muut tekijät muuttaa. Näitä tekijöitä ovat muut ravinnosta saatavat muut molekyylit, hormonit ja neurotransmitterit (Matschinsky 1995). Glukoosi aktivoi useita eri signaalintieiteitä voimistaakseen insuliinin eritystä ja synteesiä haiman β - soluista. Adipokiinit kuten leptiini, adiponektiini, vapaat rasvahapot (FFA) sekä lipidimetabolian tuotteet kuten DAG ja fosfolipidit vaikuttavat insuliinieritykseen säätelemällä glukoosi- ja lipidimetaboliaa ja insuliiniherkkyyttä. (Randle 1998; Katsuma ym., 2005). Kun rasvahappojen määrä veressä on pitkittyneesti korkealla, se inhiboi glukoosin ottoa ja hapetusta, joka taas heikentää glukoosi- stimuloituvaa insuliinin eritystä. Jotkin adipokiinit lisäävät insuliiniherkkyyttä kun taas toiset vähentävät sitä. Insuliiniherkkyys määräytyy näiden kahden tekijän välisestä tasapainosta. Adiponektiini lisää insuliiniherkkyyttä ja sen määrä onkin vähentynyt lihavuudessa. Resistiini, FFA:t ja TNF- α vähentävät insuliiniherkkyyttä ja nämä tekijät ovatkin yliekspressoituneita lihavuudessa ja niiden toiminta johtaa myöhemmin insuliiniherkkyyden vähenemiseen (Kralisch ym., 2005).

1.6.4 Rasva- happojen vaikutus insuliinin eritykseen

Erityisesti rasvahappojen osuutta insuliinierityksessä on tutkittu, mutta vaikuttavat mekanismit ovat toistaiseksi huonosti tunnettuja. Niiden on kuitenkin arveltu vaikuttavat insuliinieritykseen esterifikaatioprosesseissa syntyvien molekyylien kuten C-kinaasia aktivoivan DAG:n kautta. Vapaat rasvahapot (FFA) toimivat haiman saarekkeissa polttoaineena ja osallistuvat GIIS: aan vapaista rasvahapoista syntetisoitujen molekyylien (erityisesti DAG) avulla. Matala FFA- taso vähentää insuliinin vapautumista, kun taas korkea taso kiihdyttää eritystä. Rasvahappojen metabolia onkin tärkeää haiman β - solujen toiminnan kannalta. FFA:n rooli insuliinierityksessä on tärkeä ja sen pitoisuutta säädellään tarkasti mm. rasvasolujen endogeenisellä lipolyysillä. Pelkkä FFA- pitoisuus ei yksin ole β - solujen toimintaan vaikuttava tekijä. Plasman vapaitten rasvahappojen korkea taso yhdessä korkean glukoositason kanssa taas puolestaan heikentää insuliinin eritystä, biosynteesiä sekä aiheuttaa β - solujen lipoapoptoosia, kun triglyseridit kerääntyvät β - soluihin. Kun solujen uusiutuminen ei pysy kiihtyvän apoptoosin tahdissa, seurauksena on diabetes (Stein ym., 1996; McGarry ym., 1999; El-Assaad ym., 2003).

1.6.5 Insuliiniresistenssi

Ihmisillä tavataan erilaisia insuliiniresistenssin muotoja, joka tarkoittaa eroja resistenssin vakavuuden, resistenssin perimmäisen syyn sekä oireiden vakavuuden suhteen. Insuliiniresistenssi kehittyy perinnöllisessä tyyppin 2 diabeteksessä, sekä liittyy lähes aina myös liikalihavuuteen. Usein tyyppin 2 diabetestä sairastavien potilaiden jälkeläisillä on resistenssin oireita, vaikka he eivät tautia sairastakaan. Ikääntyvillä ihmisillä tavataan insuliiniresistenssiä lisääntyneiden mitokondrioiden toimintahäiriöiden vuoksi joka johtuu kasvaneesta mtDNA mutaatiopitoisuudesta (ks. Yleiskatsaus Ritz ja Berrut 2005).

Haiman β - solujen erittämä insuliinihormoni stimuloi luustolihasten glukoosinottoa. Luustolihassolujen glukoosinotosta vastaavat glukoositransportteriproteiinit GLUT1 ja GLUT4. GLUT1 transportteri tukee solun perussokerinottoa kun taas GLUT4 lisää sokerinottoa vasteena insuliinihormonille ja luustolihassolun supistumiselle. (ks.

yleiskatsaus Bell ym., 1990). Insuliinivasteen puuttuminen eli insuliiniresistenssi voi johtua joko insuliinireseptorien puutteesta solukalvolla tai reseptori- ligandi interaktion jälkeisen signaloinnin puutteellisuudesta, joka häiritsee glukoositransportteriproteiinien siirtymistä solukalvolle. Signaloinnin puutteellisuus on yleisempi (n. 80%:ssa insuliiniresistensseissä) ja havaitaan erityisesti aikuistyyppin diabeteksessä. (Bell ym., 1993). Perifeerinen insuliiniherkkyys (IS) tarkoittaa luustolihashsten kykyä käyttää hyväkseen glukoosia. Tämä taas riippuu lihassolujen glukoosin kuljetusaktiivisuudesta solukalvon läpi ja GLUT4 transportteriproteiinin pitoisuudesta solukalvolla. (Cline ym., 1999).

Rasvojen osuutta insuliiniresistenssin synnyssä on tutkittu etenkin vapaitten rasvahappojen (FFA) ja triglyseridien osalta. Yhdessä kohonneen glukoositason kanssa plasman korkean FFA- pitoisuuden on todettu inhiboivan insuliinin eritystä ja biosynteesiä sekä aiheuttavan haiman insuliinia tuottavien β - solujen apoptoosia. (Roden ym., 1996; McGarry 2001; Prentki ym., 2002; El-Assaad ym., 2003; Poitout ym., 2006).

1.6.6 Tyypin 2 diabeteksen perinnöllisyys

Aikuistyyppin diabetes on voimakkaasti perinnöllinen sairaus, sillä potilailla on usein taustalla pitkä sukuhistoria taudin osalta, vaikka tyypin 2 diabeteksen periytyminen ei noudatakaan perinteistä Mendelististä kaavaa (Alcolado ja Alcolado 1991). Tyypin 2 diabeteksen puhkeamiseen vaikuttaa usea osa- tekijä, suurimpina vaikuttajina ympäristötekijät ja perimä, sekä niiden yhteisvaikutus. Vaikuttavista ympäristötekijöistä merkittävimmät ovat lihavuus, elämäntavat, lääkitys, liikunta ja raskausajan olosuhteet (kts. yleiskatsaus Froguel ja Velho 2001).

Tauti näyttäisi olevan polygeeninen, jolloin sen puhkeamiseen tarvitaan usean eri geenin virhe tai usean virheellisen alleelin yhtäaikainen vaikutus yhdessä ympäristön altistavan vaikutuksen kanssa. Tunnistetuilta diabetessuvuilta on onnistuttu löytämään geenilokus, joka on taustalla useiden eri diabetesmuotojen puhkeamisessa (Cook ym, 1994). Useita eri geenejä on tutkittu osallisena taudin syntyyn ja kehitykseen, mutta mitään tiettyä geeniä, geeniryhmää tai biokemiallista tapahtumaa, joka suoraan johtaa taudin puhkeamiseen ei

ole pystytty osoittamaan. Sukututkimusten perusteella on arvioitu, että riski sairastua tyypin 2 diabetekseen kaksinkertaistuu jos toinen vanhemmista sairastaa kyseistä tautia ja nelinkertaistuu jos molemmat vanhemmat ovat diabeetikkoja (Knowler ym., 1981; Klein ym., 1996).

Koska mitokondrionaalinen DNA siirtyy suoraan äidiltä jälkeläiselle, altistavat maternaalisen mtDNA:n mutaatiot mitokondrioiden toiminnan häiriöille. mtDNA koodaa useita mitokondrion hengitysketjun proteiineja sekä mitokondrion sisäisen proteiinisynteesiin osallistuvia RNA- molekyyliä. Yhdessä mitokondriossa on useita tuhansia kopioita DNA:sta, joista osa on mutatoituneita ja osa normaaleja ”villi tyyppiä” edustavia. Tätä tilaa nimitetään heteroplastisuudeksi. Mutatoituneen mtDNA:n osuus vaihtelee eri kudoksissa, ollen korkea postmitoottisissa solukoissa, kuten esimerkiksi luustolihaksissa ja aivoissa (Lynn ym., 1998; Choo- Kang ym., 2002).

Useita diabetekselle altistavia mtDNA:n mutaatioita on löydetty tunnetuilta diabetessuvuilta, yhtenä tunnetuimmista substituutio $A \rightarrow G$ tRNA^{Leu (UUR)} geenin paikassa A3243G, joka heikentää hengitysketjun proteiinien synteesiä (Kadowaki ym., 1994). Tämä mutaatio myös heikentää insuliinin eritystä haiman β - soluista vasteena plasman glukoositason nousulle (Brändle ym., 2001). Kun mutatoituneen DNA:n osuus on suuri, tarkoittaa se myös suurempaa taudin ilmenevyyttä. Mutatoituneen mtDNA:n vaikutus heijastuu siis proteiinisynteesiin ja hengitysketjun proteiinien toimivuuteen, kun kyseisten molekyylien prosessoinnissa ei tuota toimivia muotoja (Majamaa ym., 1998).

1.6.7 Tyypin 2 diabetes ja mitokondriot

Rasvahappojen ja glukoosin metabolia luustolihaksissa on häiriintynyt tyypin 2 diabeteksessä. Nämä puutteet ilmenevät heikentyneenä glykogeenisynteesinä, glukoosin kuljetuksena ja fosforylaationa. Myös mitokondrioiden hengitys on vähentynyt tyypin 2 diabetestä sairastavilla jopa verrattuna lihaviin yksilöihin. Näihin ongelmiin on syynä heikentynyt mitokondrioiden toiminta, joka entisestään lisää taudin progressiivisuutta (Mogenssen ym., 2007). Mitokondrioiden heikentynyt toiminta ilmenee mm. elektroninsiirtoketjun aktiivisuuden sekä samalla ATP:n tuoton vähenemisenä ja

mitokondrioiden proteiinisynteesin tason laskuna. Lisäksi mitokondrioiden määrä on vähentynyt, koko pienentynyt sekä niiden morfologia on epänormaali. Nämä oireet korreloivat myös insuliiniresistenssin kanssa (Kelley ym., 2002).

Sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation määrän on todettu olevan normaalia alaisempi lihavilla yksilöillä ja tyypin 2 diabetestä sairastavilla (Ritov ym. 2002).

Sarkolemmakalvon alaisten mitokondrioiden häiriöt erityisesti elektroninsiirtoketjun toiminnassa ovat merkittävä tekijä insuliiniresistenssin muodostumisessa.

Elektroninsiirtoketjun toiminnan heikkenemiseen epäillään olevan syynä joko mitokondrioiden määrän tai niiden toiminnallisen kapasiteetin lasku (Simoneau ja Kelley 1997).

Mitokondrioiden toimintahäiriöitä tavataan myös tyypin 2 diabetestä sairastavien tautia sairastamattomilla jälkeläisillä. Näitä toimintahäiriöitä ovat mm. oksidatiivisten fosforylaation proteiineja koodaavien nukleaaristen geenien vähentynyt ekspressio. Perimmäistä syytä tähän ei toistaiseksi tunneta, mutta yksi mahdollinen syy voi olla häiriintynyt tasapaino solun lipidisisällön ja substraattioksidaation välillä (Oberbach ym., 2006). Tasapainon häiriintymiseen vaikuttaa triglyseridien akkumulaatio lihassoluihin T2D potilailla, joilla rasva varastoidaan soluihin ylimäärin verrattuna oksidatiivisen metabolian tarpeeseen (He ym., 2001). Mitokondrioilla on siis perinnöllinen osuus tyypin 2 diabeteksessä (Patti ym., 2003). Koska mitokondriot ovat adaptoituvia vastaamaan vallitsevaan energiantarpeeseen ja omaavat äärimmäisen plastisuuden, voi yksilö kompensoida fyysisin harjoittein perinnöllisen komponentin puutteita (Hood 2001). Vastaava mitokondrioiden plastisuus näyttäisi säilyvän myös yksilöillä, joilla insuliiniresistenssi liittyy lihavuuteen tai ikääntymiseen (Toledo ym., 2006).

1.6.8 Tyypin 2 diabetes ja rasvat

Tutkimukset lihassoluilla osoittavat, että ruokavalion tyydyttyneet rasvahapot aiheuttavat insuliiniresistenssiä kun taas tyydyttymättömät rasvahapot suojaavat tai jopa parantavat insuliiniherkkyyttä (Montell ym., 2001; Chavez ja Summers 2003). Tyydyttyneet rasvat

lisäävät DAG: n akkumulaatiota lihaksiin ja solunsisäisen TAG- poolin saturaatiota, jolloin syntyy lisää insuliinisignalointia häiritseviä metaboliitteja (Lee ym., 2006). DAG: n otaksutaan häiritsevän insuliinisignalointia PKC: n aktivaation tasolla (Yu ym., 2002). Kerääntynyt ceramidi puolestaan estää keskeisen glukoosinoton ja anabolisen metabolian säätelijän, Akt/proteiini kinaasi B: n, fosforylaatiota ja siten proteiinin aktivoitumista (Stradford ym., 2004).

Myös lihassoluihin kerääntyvän rasvan osuutta resistenssiin on tutkittu. Korkean IMCL-tason on todettu korreloivan ihmisellä insuliiniresistenssin kanssa, mutta korkea IMTG-pitoisuus itsessään ei suoraan ole syynä insuliiniresistenssiin, vaan pikemminkin siitä lähtöisin olevat metaboliitit, kuten sfingolipidi ceramidi ja diasyyloglyseroli (DAG), jotka kerääntyessään kudoksiin häiritsevät insuliinisignalointia (Kanety ym., 2004).

1.6.9 Tyypin 2 diabetes ja lihaskudos

Luustoli hassolujakaumalla on yhteys insuliiniresistenssiin (Lillioja ym., 1987). T2D potilailla on todettu tyypin I lihassoluosuuden vähenemistä lihaksissa, kun taas tyypin II lihassoluosuuden on todettu kasvavan. Samalla lihasten oksidatiivinen kapasiteetti laskee ja lihaksen käyttö painottuu yhä enemmän glykolyyttisen energian tuotannon puolelle. Nämä metaboliset muutokset luustoli haksissa ovat siis seurausta sekä muuttuneesta lihassolujakaumasta, että lihassolulle ominaisen metabolian muuttumisesta.

Vähentynyt tyypin I lihassoluosuus → vähentynyt oksidatiivinen metabolia
Lisääntynyt tyypin II lihassoluosuus → lisääntynyt glykolyyttinen metabolia
(Oberbach ym., 2006).

Tyypin I lihassoluilla on todettu myös olevan suurempi solukalvon GLUT4 ekspressio kuin tyypin II lihassoluilla, joka on merkinä solutyypin paremmasta insuliiniherkkyydestä. T2D potilailla on todettu vähentynyt tyypin I lihassoluosuus, joka voidaan siis samalla yhdistää vähentyneeseen GLUT4 ekspressioon. Lihassolutyypeillä on myös eroja GLUT4 reseptorin siirtymisen herkkyydessä solukalvolle. Tyypin I ja Iia

lihassolujen herkkyys insuliinille on suurempi, joka johtaa GLUT4 reseptorin siirtymiseen solukalvolle. Tyypin IIb lihassoluilla vastaava reaktio insuliiniin on heikompi, sillä solut reagoivat herkemmin lihaksen supistukseen. Lihassolutyypillä on siis vaikutusta lihassolujen sokerinotolle (Lillioja ym., 1987; Gaster ym., 2001).

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää kahden suorituskyylyltään erilaisen rottalinjan luustolihas kudoksen hienorakenteen eroja, pääasiassa mitokondriojakaumaa- ja sisältöä sekä solunsisäisen rasvan määrää. Tutkimuksesta saatuja tietoja oli tarkoitus käyttää selvittämään mitokondrioiden, solunsisäisen rasvan sekä aerobisen liikunnan vaikutuksia tyypin 2 diabetekseen.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 Koeasetelma

Tutkimukseen käytettiin Steve L. Britton:in tutkimusryhmän (Koch ja Britton 2001) lahjoittamia valinnalla valmistettuja kahden eri rottalinjan naaraita 18:sta sukupolvesta (Jyväskylän yliopiston koe-eläintoimikunta, lupanumero 49/10.10.2005). Nämä kaksi eri eläinlinjaa olivat LCR (low capacity rat) ja HCR (high capacity rat), joista LCR-linjan eläimet olivat suorituskyylyltään heikkoja ja HCR-linjan eläimet huippuja.

Rotat asuivat pareittain eläinlaatikossa (Tecniplast, Eurostandard type IV) ja niille oli tarjolla rajattomasti ruokaa (Lactamin, Labfor R 36) ja vettä. Eläinhuoneen lämpötila oli 21 °C, ilmankosteus 46 % ja ilmanvaihto 15 krt/h. Huoneen valaistus säädettiin siten, että klo 06.00 – 18.00 oli valoisaa ja kello 18.00 – 06.00 pimeää. Kokeen aluksi eläinten luontaista aktiivisuutta mitattiin kolmen viikon ajan juoksupyörillä, joissa oli sekä matka- että nopeusmittari (Heikki Kainulaisen tutkimusryhmä). Mittaukset suoritettiin kolmessa 8 rotan erässä. Tämän jälkeen rotilla ei ollut käytössään juoksupyörää, jotta mahdolliset aktiivisuusmittauksen aikaiset harjoitusvaikutukset eivät vaikuttaisi tuloksiin. Eläimille tehtiin aktiivisuusmittauksen jälkeen vielä glukoositoleranssitesti sekä

hengityskaasuanalyysi. Eläimet lopetettiin 14 viikon kuluttua kokeen aloittamisen jälkeen tainnuttamalla ensin hiilidioksidilla (n. 1 min) ja sen jälkeen dekapitaatiolla. Eläinten iät olivat lopetushetkellä: LCR 39 \pm 4 viikkoa ja HCR \pm 4 viikkoa.

3.2 Näytteiden valmistus

Lihasnäytteet otettiin Jyväskylän yliopiston koe-eläinlaitoksen tiloissa, joissa myös rottien säilytys tapahtui. Eläimiä oli yhteensä 24 kappaletta, joista kustakin preparoitiin näytteitä kahdesta eri lihaksesta, jolloin näytteiden kokonaismääräksi tuli 48. Preparoidut lihakset olivat *soleus* ja *extensor digitorum longus (edl)*. Lihaksesta leikattiin pala, joka siirrettiin välittömästi pieneen petrimaljaan ja kudoksen päälle annosteltiin pisara fiksaatiivaa. Fiksaatiivina käytettiin 3% glutaraldehydiä 0.1 M fosfaattipuskurissa (pH 7,4, + 4°C). Kudospalan pilkkominen tapahtui petrimaljassa n. 1 mm³ kokoisiksi paloiksi partakoneenterällä, jonka jälkeen näytteet fiksoitiin kahden tunnin ajan jääkaapissa. Jälkifiksaatio suoritettiin 1% osmiumtetroksidilla 0,1 M fosfaattipuskurissa (pH 7,4, + 4°C). Seuraavaksi näytteet dehydroitiin nousevalla etanolisarjalla ja värjättiin *en block* uranyyliasetaatilla. Etanoli korvattiin propyleenioksidilla, joka puolestaan korvattiin eponilla, jonka jälkeen näytteet olivat valmiita valettavaksi muotteihin.

Näytteet valettiin käyttäen valuaineena eponia (LX-112, Ladd). Muotin pohjalle pipetoitiin hieman eponia ja kudospala nostettiin eponiin injektioneulalla. Kustakin näytetyypistä valettiin kolme pitkittäis- ja kolme poikittaisnäytettä ja kudospalojen orientaatio varmistettiin valomikroskoopilla. Näytteet polymerisoitiin lämpökaapissa + 60 °C:ssa kaksi vuorokautta.

Leikkeiden valmistamisen suoritti laitoksen erikoislaboratoriomestari Raija Vassinen. Näytteiden leikkaamiseen osallistuivat myös Turun, Kuopion ja Helsingin yliopistojen vastaavat henkilöt Leena Salminen, Virpi Miettinen ja Veijo Kinnunen. Näytteistä leikattiin ensin ultramikrotomilla puoliohuttleikkeet, jotka värjättiin objektilasilla 1 % toluidiinisisinillä. Näiden leikkeiden perusteella valittiin paras näyte ohuttleikkeitä varten.

Kustakin poikittais- ja pitkittäissuuntaisesta kudoksenäytteestä otettiin leikkeitä kolmelle hilalle. Hilat kaksoisvärjättiin uranyyliasetaatilla ja lyijysitraatilla.

3.3 Näytteiden mikroskopointi ja kuvaaminen

Näytteiden tarkasteluun ja kuvaamiseen käytettiin Jyväskylän yliopiston elektronimikroskooppia (Jeol JEM 1200- EX). Kustakin näytteestä oli valittavana kolme hilaa. Aluksi tarkasteltiin kaikkien hilojen laatua ja näistä edustavin valittiin kuvausta varten. Pitkittäissuuntaisia näytteitä kuvattiin 5000 x suurennoksella. Kuva pyrittiin ottamaan keskeltä solua, jolloin saatiin mahdollisimman edustava kuva solunsisäisestä mitokondriopopulaatiosta. Poikittäissuuntaisia näytteitä kuvattiin 1500 x ja 2500 x suurennoksella tarkoituksena saada kuvaan mahdollisimman paljon sarkolemmakalvoa ja välittömästi sen alla sijaitseva mitokondriopopulaatio. Parhaiten tämä onnistui kuvaamalla lihassolujen suippoja päitä, jolloin sarkolemmakalvoa saatiin kuvaan mahdollisimman paljon. Jokaiselta hilalta pyrittiin saamaan kuvia mahdollisimman monesta lihassolusta. Kuvattujen solujen määrä vaihteli yhdeksästä viiteentoista hilaa kohti.

3.4 Kuvien analysointi

Kuvien kehittämisen suoritti laitoksen erikoislaboratoriomestari Paavo Niutanen. Kuvat siirrettiin tietokoneelle digitaaliseen muotoon ja samalla niiden kontrastia parannettiin kuvankäsittelyllä. Digitaalisista kuvista laskettiin pitkittäissuuntaisista leikkeistä solunsisäisten mitokondrioiden lukumäärä ja poikittäissuuntaisista leikkeistä sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation pinta-ala suhteutettuna solukalvon pituuteen. Molemmista näytteistä oli tarkoitus laskea myös solunsisäisen rasvan määrää. Laskennassa käytettiin Jyväskylän yliopiston liikuntabiologian laitoksen analyysiohjelmaa (Olympus: analySIS).

Pitkittäissuuntaisissa leikkeissä rajattiin mahdollisimman suuri suorakaiteen muotoinen alue (μm^2), jonka sisäpuolelta mitokondrioiden kappalemäärä laskettiin. Ensimmäisestä analysoidusta kuvasta mitattiin kuvassa oleva kalibraatiojana ja tämän arvon perusteella ohjelma laski rajatun alueen pinta-alan. Samaa kalibraatiojanan pituusarvoa käytettiin

myös muissa pitkittäissuuntaisten leikkeiden kuvissa, jolloin saadut tulokset olivat vertailukelpoisia. Laskentaan otettiin mukaan vain ne mitokondriot, jotka olivat kokonaan rajatun alueen sisäpuolella. Tulokset ilmoitettiin mitokondrioiden lukumääränä pinta-alaa kohti ($\text{kp}/\mu\text{m}^2$). Pitkittäisleikkeistä analysoituja soluja oli yhteensä 113 kappaletta.

Poikittaissuuntaisten leikkeiden laskennassa meneteltiin samoin kalibraatiojanan suhteen. Tämän perusteella ohjelma laski sarkolemmakalvon pituuden (μm), kun se ensin piirrettiin kuvaan käsin. Seuraavassa vaiheessa laskettiin välittömästi sarkolemmakalvon alla sijaitsevien mitokondrioiden pinta-ala (μm^2) piirtämällä kuvaan niiden muodostama ala. Laskentaan otettiin mukaan vähintään viiden mitokondrion muodostamat ryppäät ja yhtenäinen sarkolemmakalvon alla välittömästi sijaitseva yhtenäinen mitokondrionauha. Yksittäisiä mitokondrioita ei otettu mukaan laskentaan. Lopuksi mitokondrioiden pinta-ala (μm^2) suhteutettiin sarkolemmakalvon pituuteen (μm). Poikittäisleikkeistä analysoituja soluja oli yhteensä 242 kappaletta.

Tulokset käsiteltiin tilastollisesti käyttäen kahden otoksen t- testiä (Microsoft Excel), jossa merkitsevä arvo $P < 0,05$.

4. Tulokset

4.1 Ohutleikkeiden tarkastelu

4.1.1 Pitkittäisleikkeet

Lihasten pitkittäisleikkeistä tarkasteltiin solunsisäisten mitokondrioiden määrää. Suoritettua silmämääräisessä tarkastelussa havaittiin, etteivät solunsisäisten mitokondrioiden määrien erot kahden rottalinjan välillä olleet merkitseviä. Lihasten välisessä tarkastelussa puolestaan havaittiin, että *soleus*- lihasten solunsisäisten mitokondrioiden määrä oli hieman suurempi kuin *edl*- lihasten.

4.1.2 Poikittäisleikkeet

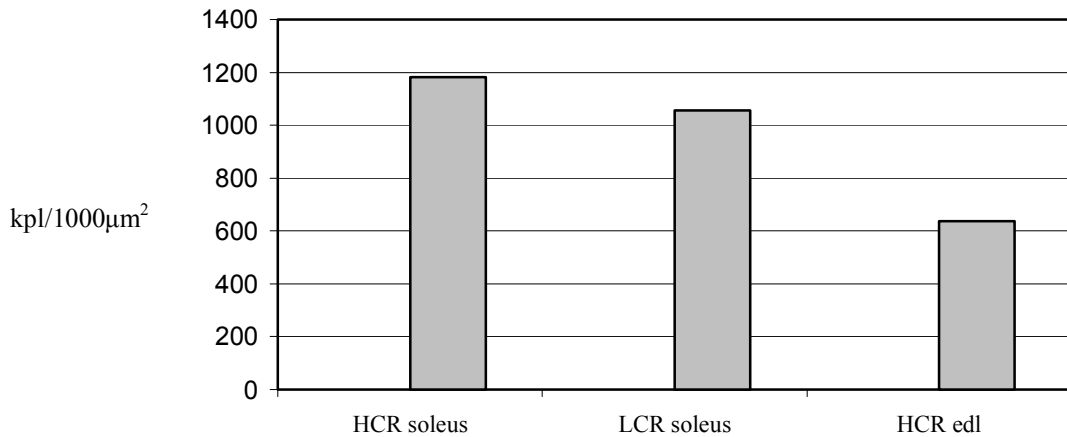
Poikittäisleikkeistä tarkasteltiin sarkolemmakalvon alaisten mitokondrioiden määrää. Linjojen väliset erot tulivat esiin jo silmämääräisessä tarkastelussa, jossa havaittiin HCR-linjan selvästi korkeampi mitokondriopitoisuus. Lihasten välisessä tarkastelussa havaittiin korkeampi mitokondriopitoisuus *soleus*- lihaksessa.

4.2 Morfometrinen analysointi

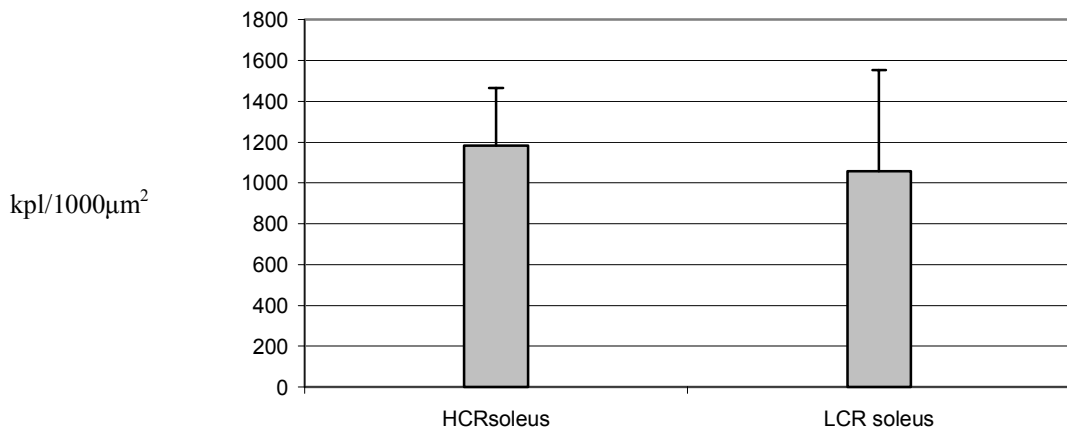
4.2.1 Solunsisäiset mitokondriot

Neljästä LCR- ja HCR- linjan rottien *soleus*- lihaksista ja yhden HCR- linjan rotan *edl*-lihaksesta laskettiin solunsisäisten mitokondrioiden lukumäärä, joka suhteutettiin sytoplasman pinta-alaan ($1000\mu^2$). LCR- linjan rotista analysoitiin 50 *soleus*- solua, HCR-linjan rotista 49 *soleus*- ja 14 *edl*- solua, joiden mitokondriosisällöstä laskettiin suhteelliset keskiarvot (Kuva 1). HCR- ja LCR- linjojen *soleus*- lihasten välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa mitokondrioiden määrän suhteen (Kuva 2).

Silmämääräisesti tehtyjen havaintojen perusteella päätettiin jatkossa keskittyä pelkästään *soleus*- lihasten arviointiin, sillä tämän lihaksen kokonaismitokondriomäärä oli *edl*- lihasta suurempi.

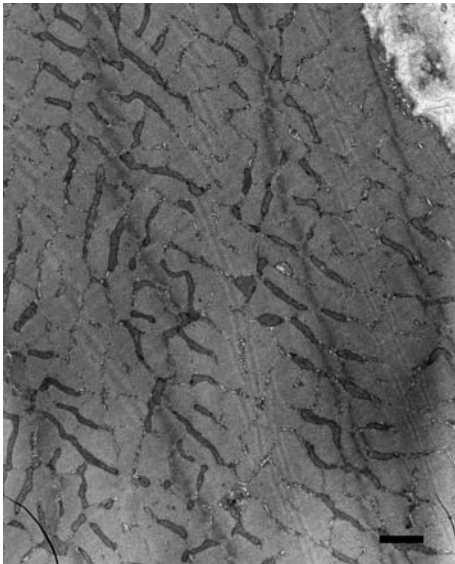


Kuva 1. Solunsisäisten mitokondrioiden keskiarvoinen kappalemäärä sytoplasman pinta-alaa kohti (kpl/1000µm²). Linjakohtaiset keskiarvot lihaksittain on esitetty pylväin. *Edl*- lihaksen analysointi suoritettiin vain yhdestä rotasta. HCR ja LCR- linjojen välillä ei *soleus*- lihaksissa havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa solunsisäisten mitokondrioiden suhteen. *Soleus*- lihaksessa havaittiin silmämääräisesti suurempi mitokondriopitoisuus kuin *edl*- lihaksessa. Vertailun vuoksi analysoitiin yhden rotan *edl*- näytteet (14 solua).



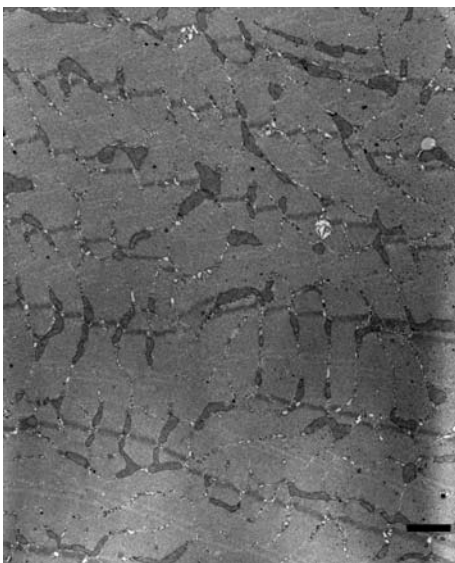
Kuva 2. Solunsisäisten mitokondrioiden keskiarvoinen kappalemäärä sytoplasman pinta-alaa kohti (kpl/1000µm²). Linjakohtaiset keskiarvot *soleus*- lihaksista on esitetty pylväin, janat ilmaisevat linjakohtaiset keskihajonnat. HCR- ja LCR – linjojen välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa *soleus*- lihaksessa.

Lihakselle tyypillinen mitokondrioiden järjestäytyminen lihasfibrillien väliin Z-levyjen tasalle nähdään pitkittäissuuntaisten ohutleikkeiden esimerkkikuvissa. Mitokondrioiden muoto on tilan ahtaudesta johtuen pitkä ja kapea (Kuvat 3-5). HCR- linjan intermyofibrillaarinen mitokondriopopulaatio *soleus*- lihaksessa (Kuva 3) ei eronnut merkittävästi LCR- linjan vastaavasta mitokondriosisällöstä (Kuva 5). HCR- linjan *edl*-lihaksen mitokondrioiden määrä havaittiin silmämääräisessä tarkastelussa *soleus*- lihasta pienemmäksi. Tässä esimerkkikuvassa nähdään myös yksittäinen rasvapisara (Kuva 4).



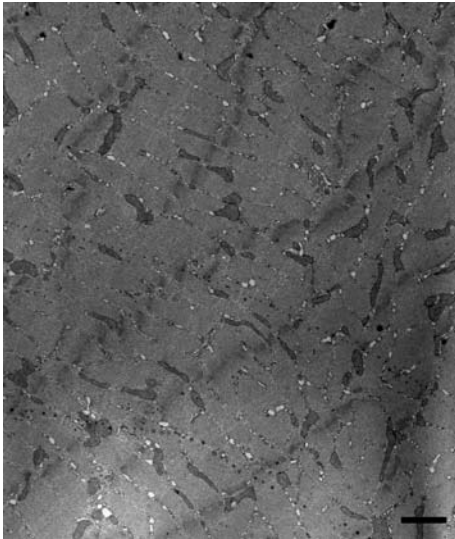
Kuva 3. HCR- rotan solunsisäinen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuva HCR- rotan *soleus*-lihaksesta. Kuvassa nähdään mitokondrioiden tyypillinen sijoittuminen pareittain Z-levyn tasalle. Mitokondrioiden muoto on lihasfibrillien välisen tilan ahtaudesta johtuen pitkä ja kapea. Mittajanan pituus 1 μm .



Kuva 4. HCR- rotan solunsisäinen mitokondriopopulaatio.

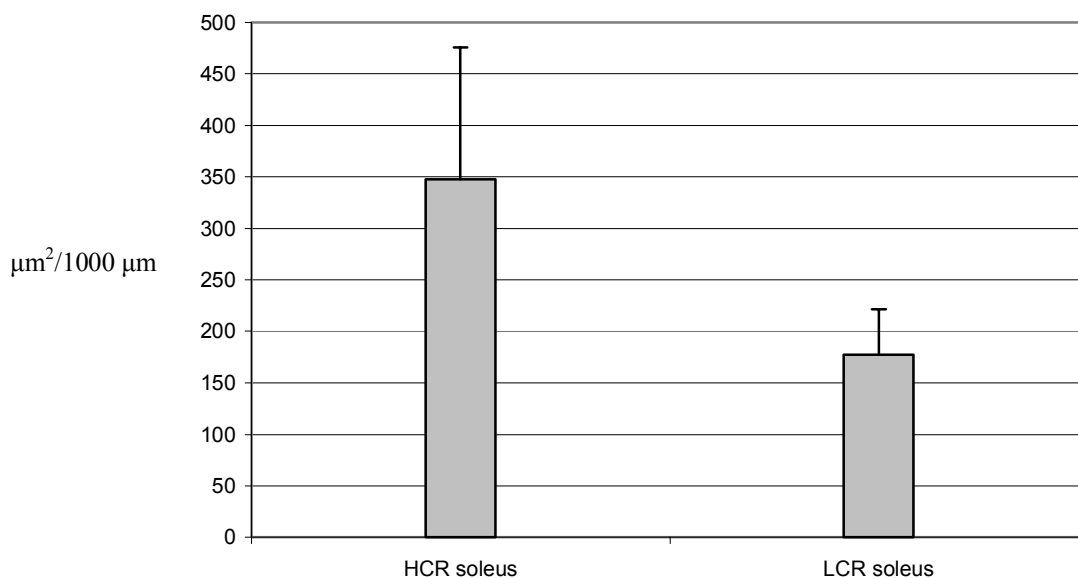
Elektronimikroskooppikuva HCR- rotan *edl*-lihaksesta, jonka mitokondriopopulaation järjestäytyminen on sama kuin *soleus*-lihaksessa. *Edl*-lihaksen mt- pitoisuus oli silmämääräisessä tarkastelussa pienempi kuin *soleus*-lihaksessa. Oikealla ylhäällä nähdään rasvadroletti. Mittajanan pituus 1 μm .



Kuva 5. LCR- linjan solunsisäinen mitokondriopopulaatio. Elektronimikroskooppikuva, nähdään LCR- rotan soleus- lihaksen mitokondriopopulaation tyypillinen järjestäytyminen lihasfibrillien väliin. HCR- ja LCR- linjojen välillä ei havaittu eroa mitokondriopitoisuudessa. Mittajanan pituus 1 μm .

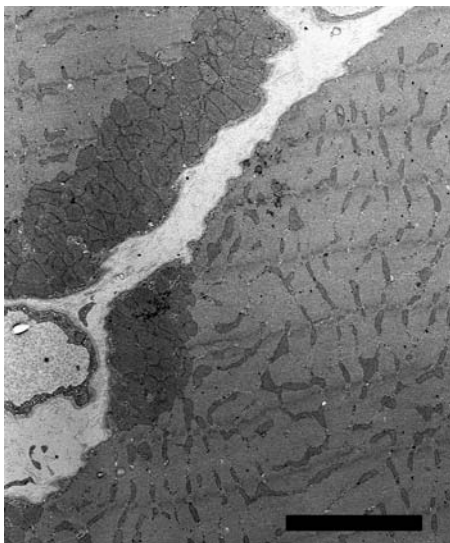
4.2.2 Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot

Soleus- lihaksen sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation määrittelyssä mitattiin mitokondrioiden muodostama pinta- ala (μm^2) ja se suhteutettiin solukalvon pituuteen (μm). *Soleus*- lihaksesta analysoitiin kahdeksalta HCR- linjan rotalta 111 solua ja kymmeneltä LCR- linjan rotalta 131 solua. HCR- linjan mitokondriopopulaation koossa oli merkitsevä ero verrattuna LCR- linjaan ($P= 0,001$). (Kuva 6). LCR- linjan rottien suhteellinen mitokondriopinta- ala oli 51 % HCR- linjan rottien mitokondriopinta-alasta.



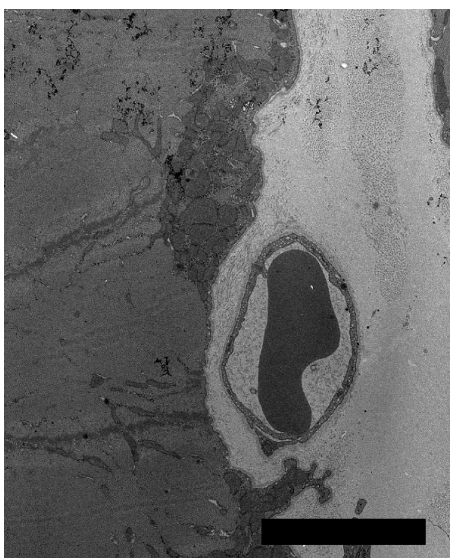
Kuva 6. Sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation pinta- ala suhteessa solukalvon pituuteen $\mu\text{m}^2/1000\mu\text{m}$. Palkit ilmaisevat linjakohtaiset keskiarvot ja janat keskihajonnat. HCL- linjan erot olivat tilastollisesti merkittäviä verrattuna LCR- linjaan ($P= 0,001$).

Poikittaissuuntaisissa ohutleikkeiden esimerkkikuvissa nähdään sarkolemmakalvon alaisten mitokondrioiden erot kahden rottalinjan välillä (Kuvat 7-12). HCR- linjan mitokondriopopulaatio esiintyi paikoitellen huomattavan suurina keräyminä. Keräymät olivat keskittyneenä lihassolua ympäröivien kapillaarien ja perifeeristen tumien läheisyyteen, jolloin kapillaarien kuljettamien molekyylien ja tuman ekspressoimien proteiinien matka mitokondrioihin on mahdollisimman lyhyt (Kuvat 7-9). Tyypillistä HCR- linjalle oli myös LCR- linjaan verrattuna paksumpi ja yhtenäisempi mitokondrioketju suoraan sarkolemmakalvon alla (Kuvat 10-12).



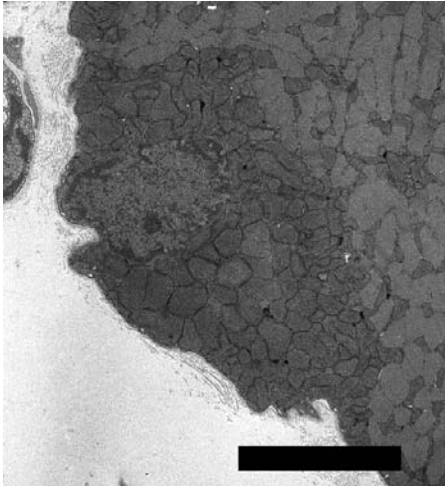
Kuva 7. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa nähdään HCR- rotan *soleus*- lihaksen kahdessa solussa huomattava mitokondriokasauma, joka tyypilliseen tapaan on sijoittunut lähelle kapillaaria. Kuvassa näkyy myös solunsisäisiä mitokondrioita. Mittajanan pituus 5 μm .



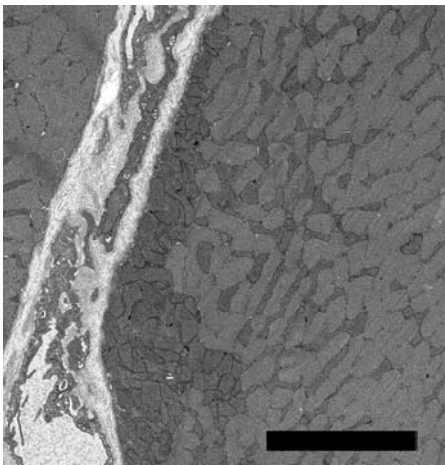
Kuva 8. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa nähdään jälleen huomattava HCR- rotan *soleus*- lihaksen mitokondriokasauma kapillaarin läheisyyteen sijoittuneena. Kapillaarin sisällä nähdään punasolu. Mittajanan pituus 5 μm



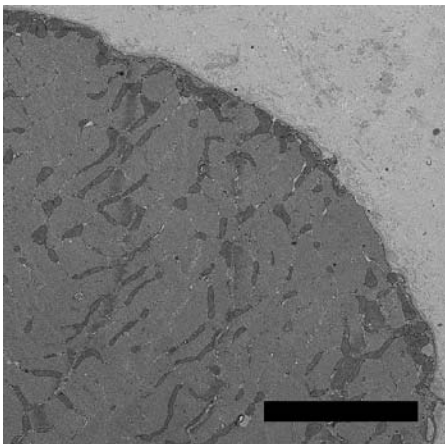
Kuva 9. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa nähdään HCR-linjan rotan soleus- lihaksen mitokondriokasauma perifeerisen tuman ympärillä. Näin tuman ekspressoimien proteiinien kohdentaminen mitokondrioihin on nopeampaa. Mittajanan pituus 5 μm .



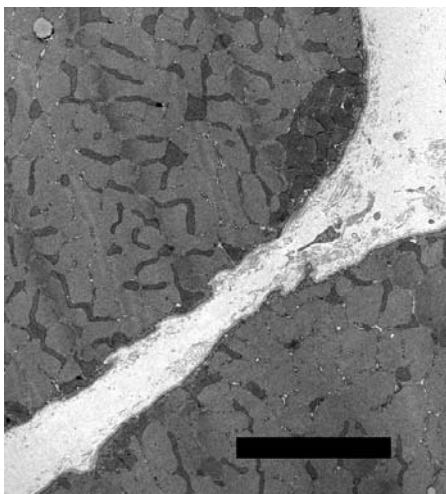
Kuva 10. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa HCR-rotalle tyypillinen paksu ja ehyt mitokondrioketju *soleus*-lihaksessa heti sarkolemmakalvon alla. Mittajanan pituus 5 μm .



Kuva 11. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa LCR-rotan soleus-lihas, jonka mitokondrioketju on epäyhtenäisempi ja ohuempi kuin HCR-linjan rotalla. Mittajanan pituus 5 μm .



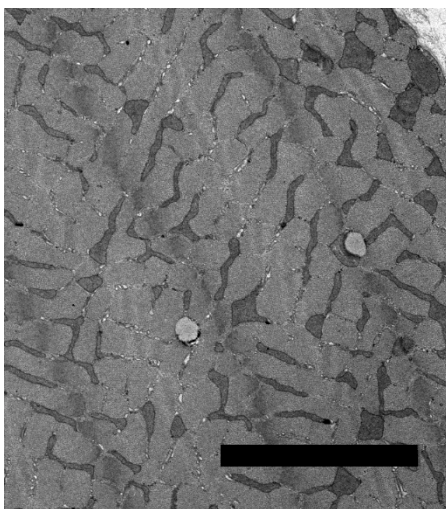
Kuva 12. Sarkolemmakalvon alainen mitokondriopopulaatio.

Elektronimikroskooppikuvassa näkyy LCR-rotan *soleus*-lihaksen tyypillinen mitokondriokasauma, joiden suhteelliset pinta-alat verrattuna HCR-linjan rottiin olivat merkittävästi pienemmät. Ylhäällä vasemmalla nähdään rasvadropletti. Mittajanan pituus 5 μm .

4.2.3 Solunsisäinen rasva

Solunsisäistä rasvaa oli tarkoitus analysoida pitkittäisleikkeistä, mutta jo ohutleikkeiden silmämääräisessä tarkastelussa huomattiin tunnistettavien rasvapisaroiden vähyys.

Yksittäisiä rasvapisaroita (Kuva 13) löytyi kaikista näytetyypeistä, ja niiden jakautuminen oli silmämääräisessä tarkastelussa tasaista kaikkien näytteiden kesken. Rasvapisaroiden varma tunnistaminen osasta leikkeitä oli myös epävarmaa artefaktojen vuoksi. Tästä syystä rasvapisaroiden laskemisesta luovuttiin tässä tutkimuksessa.



Kuva 13. Solunsisäinen rasva.

Elektronimikroskooppikuvassa nähdään kaksi rasvadroplettia HCR-rotan *soleus*-lihaksessa. Silmämääräisessä tarkastelussa ei havaittu eroja rasvan määrässä rottalinjojen tai lihasten välillä. Mittajanan pituus 5 μm .

5. Tulosten tarkastelu

5.1 Solunsisäiset mitokondriot

Mitokondrioiden tehtävänä lihaskudoksessa on tuottaa aerobisella metaboliolla ATP: tä lihassolujen erilaisia tarpeita varten. Vasteena kestävyysharjoittelulle solun mitokondriot adaptoituvat mm. kasvattamalla lukumääräänsä, kokoaan ja sisältämiensä entsyymien määrää, jolloin lihaksen lipidimetabolia ja ATP:n tuotto tehostuu (Holloszy ja Coyle 1984). Rotilla suoritettut tutkimukset ovat osoittaneet, että mitokondrioiden adaptaatiot vaihtelevat riippuen lihaksen mitokondriopopulaatiosta (Koves ym., 2005).

Intermyofibrillaariset eli solunsisäiset mitokondriot ovat lihaskudoksessa sijoittuneet Z-levyjen tasalle myofibrillien väliin. Näiden mitokondrioiden tehtävänä on tuottaa ATP: tä pääasiassa solun supistumiseen. Tässä kokeessa tarkasteltiin kahden eri lihassolutyyppiä edustavan lihaksen solunsisäisten mitokondrioiden määrää. Tutkittavat lihakset edustivat aerobista tyyppiä I (*soleus*) ja glykolyyttistä tyyppiä II lihassolua (*extensor digitorum longus*). Mitokondrioiden määrää mitattiin suhteuttamalla niiden kappaleluku sytoplasman pinta-alaan.

Soleus- lihasten mitokondrioiden määrän väliset erot HCR- ja LCR- linjojen välillä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Vaikka lihassupistuksen on todettu lisäävän mitokondrioiden biogeneesiä, on tutkimuksissa havaittu synnynnäisiä eroja mitokondrioiden vasteessa lihaksen supistumisen muutoksiin kuten kestävyysharjoitteluun. Verrattuna sarkolemmakalvon alaiseen populaatioon, solunsisäisten mitokondrioiden adaptaation kapasiteetti kestävyysharjoitteluun on pienempi (Bizeau YM., 1998). Rotilla suoritetuissa kokeissa havaittiin myös, että populaation reagointi supistumisen vähenemiseen oli suhteellisen muuttumatonta (Krieger Y., 1980). Nämä tutkimukset tukevat oletusta, jonka mukaan solunsisäisen mitokondriopopulaation lukumäärä pysyy suhteellisen muuttumattomana lihaksen supistumisen muutoksista huolimatta. Tästä tutkimuksesta kyseisen populaation osalta saadut tulokset viittaavat samaan. 18 sukupolven yli suoritettu valinta ei tuottanut merkitsevää eroa rottalinjojen välille solunsisäisen

mitokondiosisällön suhteen. Aerobisen suorituskyvyn adaptaatiot näkyvät kasvaneena mitokondrioiden lukumääränä ja kokona. Koska rottalinjojen aerobiset suorituskyvyt erosivat toisistaan merkittävästi, voidaan olettaa etteivät suorituskyvyn muutokset olleet merkittävästi riippuvaisia tästä mitokondriopopulaatiosta.

Lihasten välisessä silmämääräisessä tarkastelussa havaittiin, että *soleus*- lihasten mitokondrioiden määrä oli suurempi kuin *edl*- lihaksen. Vertailun vuoksi yhden HCR-linjan rotan *edl*- solut analysoitiin, josta saatuja tuloksia ei pienen otannan vuoksi kuitenkaan vertailtu tilastollisesti. Glykolyyttisen lihaksen mitokondrioiden määrä on tutkitusti aerobista lihassolua pienempi, koska sen metabolia painottuu enemmän glykolyyttisen energiantuotannon puolelle (Moyes ja LeMoine 2005). Lisäksi glykolyyttisen lihassolun mitokondrioiden tehtävänä on pääasiassa tukea solun perusmetaboliaa, jolloin sen rooli ATP:n tuottamiseksi lihassupistukseen vähenee. (Moyes ym., 1992). Nämä seikat tukevat tehtyä silmämääräistä havaintoa glykolyyttisen *edl*-lihaksen mitokondrioiden määrän suhteen, vaikka tilastollisesti merkitsevää tietoa emme tästä tutkimuksesta saaneetkaan.

5.2 Solunsisäinen rasva

Lihassolun sisäinen triglyseridivarasto on luustolihasen pääasiallinen energian lähde. Triglyseridien kerääntyminen lihassoluihin on yhdistetty sekä rotilla että ihmisillä insuliiniresistenssiin (Kraegen ym., 1991; Pan ym., 1997). Insuliiniresistenssin ja solunsisäisen rasvan suhde ei kuitenkaan ole selvä, sillä kestävyysurheilijoiden lihaksisto on insuliiniherkkää solunsisäisen rasvan suuresta määrästä huolimatta (Goodpaster ym. 2001). Tutkimuksissa on havaittu parantunut insuliiniherkkyys, vaikka solunsisäisessä triglyseridisisällössä ei ole tapahtunut muutoksia, tai triglyseridien määrä on jopa lisääntynyt (Phillips ym., 1996; Bruce ym., 2006). Näiden seikkojen perusteella vaikuttaisi siltä, että triglyseridisisällön koolla ei ole suoraa vaikutusta insuliiniresistenssiin. Tätä suhdetta tutkitaan ja arvioina on esitetty triglyserideistä lähtöisin olevien metaboliittien vaikutusta insuliiniasignaalointia häiritsevinä ja sarkolemmakalvon toimintaa muuttavina tekijöinä (Cororan ym., 2007). Koska tässä tutkimuksessa ei saatu tilastollista tietoa solunsisäisen rasvan määrästä, jää valinnan vaikutus rottalinjojen lihassolujen

triglyseridipitoisuuteen selvittämättä. Silmämääräinen tarkastelu kuitenkin viittaa siihen, että eroja solunsisäisen rasvan määrän suhteen ei linjojen välillä ollut.

5.3 Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot

Lihassolun sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot tuottavat energiaa solun toimintaa tukeviin mekanismeihin kuten ionin vaihtoon ja substraattien kuljetukseen. Tämän mitokondriopopulaation adaptaatiokapasiteetti kestävyysharjoitteluun on solunsisäistä populaatiota suurempi (Bizeau ym., 1998). Syynä tähän saattaa olla mitokondrioiden sijainti, sillä sarkolemmakalvon alla on enemmän tilaa koon kasvulle kuin solun sisällä. Mitokondrioiden suuret kasaantumukset ovat myös yleensä sijoittuneet lähelle kapillaareja, jolloin molekyylien diffuusioaika- ja etäisyys ovat pieniä (Cogswell ym., 1993).

Rotilla tehdyssä kokeessa on havaittu, että populaatio reagoi nopeasti myös supistuksen määrän vähenemiselle, joka näkyy oksidatiivisen kapasiteetin laskuna (Krieger ym., 1980). Tässä kokeessa tarkasteltiin aerobisen tyypin I lihaksen (soleus) sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation suhteellista määrää vertaamalla mitokondrioiden pinta-alaa solukalvon pituuteen. HCR- ja LCR- linjojen välillä havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero. Valinta tuotti siis tilastollisesti merkitsevän eron rottalinjojen välille mitokondriopopulaation suhteellisen pinta- alan suhteen. Kun lihasten parempi aerobinen suorituskyky näkyy mitokondrioiden kasvaneena lukumääränä ja kokona, tällä populaatiolla näyttäisi olevan yhteys myös HCR- linjan parempaan aerobiseen kapasiteettiin, koska solunsisäisen populaation välillä ei eroja havaittu. Sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation biogeneesistä vastaavien mekanismien toiminta HCR- linjan rotilla on muuttunut verrattuna LCR- linjan rottiin. Transgeeniset hiiret, joille oli luotu geenimanipulaatiolla kestävyysharjoittelua seuraavan aerobisen lihassolutyypin kasvanut osuus, osoittivat mitokondrioiden biogeneesiä lisäävän transkriptiotekijän (PGC-1 α) kasvanutta induktiota (Akimoto ym. 2004). Tämän tekijän epäiltiin tutkimuksessa säätelevän kestävyysharjoittelun seurauksena tapahtuvaa metabolista adaptaatiota ja lihassolutyypin muutoksia. PGC-1 α :n määrän on todettu kasvaneen oksidatiivisissa lihassoluissa. Siksi on mahdollista, että kestävyysharjoittelun aiheuttamat muutokset spesifisti sarkolemmakalvon alaiseen populaatioon välittyvät tämän tekijän kautta (Koves

ym., 2005). HCR- linjan rotilla valinnan seurauksena tapahtuneet metaboliaan liittyvät muutokset tarkoittavat parempaa aerobista kapasiteettia, joka ominaisuutena siirtyy sukupolvelta toiselle.

5.4 Sarkolemmakalvon alaiset mitokondriot ja tyypin 2 diabetes

Lihaksen mitokondrioiden metaboliseen kapasiteettiin vaikuttaa lihaksen solutyypikoostumus. Tyypin I lihassoluilla on suurempi mitokondriosisältö ja oksidatiivisen metabolian kapasiteetti. Kunkin lihassolutyypin metabolian tasoa voidaan lisäksi säädellä harjoittelulla (Koves ym., 2005). Kestävyysharjoittelu lisää lihasten aerobisen tyypin I lihassoluosuutta, jolloin lihaksen metabolian taso paranee. Ihmisellä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että moniin metabolian häiriöihin, kuten diabetekseen ja lihavuuteen, liittyy vähäinen tyypin I lihassoluosuus ja kasvanut tyypin II lihassoluosuus (Hickey ym., 1995). Geneettisesti muokatut hiiret, joilla on normaalia suurempi tyypin I lihassoluosuus, ovat tutkimuksissa osoittautuneet insuliiniherkemmiksi ja vähemmän alttiiksi ruokavalion aiheuttamalle lihavuudelle (Ryder ym., 2003). Aerobisen lihassolutyypin kasvanut osuus siis parantaa insuliiniherkkyyttä ja lisää lihaksen oksidatiivista kapasiteettia.

Tyypin 2 diabeteksessä sekä rasva- happojen, että hiilihydraattien metabolia on häiriintynyt (Kelley ym., 1996). Metabolian häiriöt johtuvat todennäköisesti useista tekijöistä. Tutkimuksissa on tyypin 2 diabetestä sairastavilla havaittu luustolihasien mitokondrioiden heikentynyt toiminnallinen kapasiteetti, sekä oksidatiivisten entsyymien vähentynyt aktivaatio (Simoneau ja Kelley 1997; Kelley ja Mandarino 2000). Mitokondrioiden toiminnan häiriöt ja vähentynyt lukumäärä luustolihasissa ja muissa kudoksissa voivat johtaa lipidien kerääntymiseen, joka on tyypin 2 diabeteksessä yhdistetty mitokondrioiden oksidatiivisten entsyymien vähentyneeseen kapasiteettiin ja insuliiniresistenssiin (He ym., 2001). Mitokondrioiden toiminnallisen kapasiteetin tiedetään riippuvan niiden morfologiasta sekä entsyymiaktiivisuudesta (Vogel 2001). Morfologiset muutokset aiheutuvat mitokondrioiden biokemiallisen toiminnan häiriöistä. Ihmisillä suoritetuissa tutkimuksissa havaittiin tyypin 2 diabetestä sairastavilla vaurioita

mitokondrioiden rakenteessa sekä mitokondrioiden pienentynyt koko ja pinta-ala. Molemmat tekijät korreloivat insuliiniresistenssin vakavuustason kanssa (Kelley ym., 2002). Mitokondrioiden toiminnallisen kapasiteetin häiriöiden uskotaan siksi myötävaikuttavan insuliiniresistenssin syntyyn luustolihasessa (Schmitz- Peiffer ym., 1999; Vogel 2001).

Sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation toiminnallisella kapasiteetilla arvellaan oleva suuri merkitys lihassolun lipidimetabolialle ja insuliinisignaaloinnille (Ritov ym., 2005). Tyypin 2 diabetestä sairastavilla havaittiin sarkolemmakalvon alaisen mitokondrioiden koon, määrän ja niiden sisältämän elektroninsiirtoketjun entsyymipitoisuuden lasku. Samoin havaittiin myös elektroninsiirtoketjun kokonaisaktiivisuuden väheneminen. Kokonaisaktiivisuuden laskun syynä tyypin 2 diabeteksessä ei voida pitää pelkkää mitokondrioiden määrän tai toiminnallisen kapasiteetin laskua. Fyysisen aktiivisuuden puuttumisen epäillään vaikuttavan ilmiöön, mutta taustalla on oletettavasti useita tekijöitä, joita on vielä tutkittava. Tässä tutkimuksessa havaitut erot sarkolemmakalvon alaisten mitokondrioiden suhteen osoittavat, että kestävyysharjoittelu kasvattaa tämän mitokondriopopulaation pinta- alaa. Yllä mainittujen seikkojen perusteella voidaan olettaa, että myös mitokondrioiden toiminnallinen kapasiteetti paranee kestävyysharjoittelulla. Kestävyysharjoittelulla on tunnetusti insuliiniresistenssiä parantava ja tyypin 2 diabetestä ehkäisevä vaikutus, jonka vaikutus perustuu moniin mekanismeihin, mutta merkittävän osana on sen mitokondrioiden toimintaa adaptoiva vaikutus. Koska sarkolemmakalvon alainen mitokondriomäärä oli merkittävästi pienempi kuin HCR- linjalla, voidaan edellä mainittujen seikkojen perusteella olettaa, että LCR- linjalla tyypin 2 diabeteksen riskitekijät ovat koholla.

5.5 Yhteenveto

Tutkimuksessa selvitettiin HCR ja LCR rottien kahden eri mitokondriopopulaation eroja sekä solunsisäisen rasvan määrää luustolihasessa. Kuten rotilla aiemmin suoritetuissa tutkimuksissa, niin myös tässä suurimmat erot tulivat esiin sarkolemmakalvon alaisessa populaatiossa, kun taas solunsisäisen populaation välillä ei havaittu eroja (Koves ym.,

2005). Rottalinjojen väliset erot sarkolemmakalvon alaisen mitokondriopopulaation suhteen olivat tilastollisesti merkitseviä, mutta solunsisäisten populaatioiden välillä ei todettu tilastollisesti merkitsevää eroa.

Sarkolemmakalvon alainen ja solunsisäinen mitokondriopopulaatio osoittivat aikaisempien tutkimustulosten mukaisesti erilaista adaptaatiokapasiteettia (Bizeau ym., 1998). Erilainen adaptaatiokapasiteetti puolestaan osoittaa mitokondrioilla erilaista metabolista kapasiteettia, joka heijastuu solun eri mitokondrioita hyödyntäviin mekanismeihin. Molemmat kapasiteetin muutokset edellyttävät proteiiniekspression muutoksia sekä nukleaarissa että mitokondrionaalisessa DNA:ssa. Näiden ekspressioiden pysyvät muutokset siirtyvät seuraavalle sukupolvelle. Molempien mitokondriopopulaatioiden metaboliset ominaisuudet muuttuvat kestävyysharjoittelun seurauksena (Koves ym., 2005). Morfologiset muutokset ovat helpoimmin havaittavissa, mutta metaboliseen kapasiteettiin vaikuttavat muutokset ovat vaikeammin todettavissa. Näiden muutosten tutkiminen voi antaa selvitystä sille, miten ja miksi sarkolemmakalvon alainen populaatio osoittaa suurimmat morfologian muutokset vasteena kestävyysharjoittelulle, vaikka solunsisäiset mitokondriot vastaavat supistumiseen tarvittavan ATP:n tuotannosta.

Tyypin 2 diabetes on voimakkaasti perinnöllinen sairaus. Tunnetuimmat perinnölliset komponentit liittyvät mitokondrioiden mutaatioihin, jotka ilmenevät metabolisen kapasiteetin häiriönä. Perinnöllisen komponentin vaikutusta voidaan taudin hoidossa ja ennaltaehkäisyssä kompensoida liikunnan ja ruokavalion avulla. Ruokavaliosta saatava liika rasva kertyy mm. luustolihaksiin, jossa sen metaboliittien on epäilty häiritsevän glukoosimetabolialle olennaista insuliinisignalointia. Liikunta aikaansaa monia muutoksia metabolian ja lihasrakenteen tasolla, jotka parantavat insuliiniherkkyyttä ja lihaksen metaboliaa. Samoin kuin tyypin 2 diabetekselle altistavat perinnölliset tekijät, niin myös aerobisen kestävyuden osatekijät ovat geeniekspressioiden tuloksia, jotka fiksoituessaan perimään siirtyvät seuraavalle sukupolvelle. Perinnöllisellä aerobisella kapasiteetilla on merkitystä kun määritellään alttiutta sairastua tyypin 2 diabetekseen. Aerobisen kapasiteetin mekanismien tunteminen voi auttaa löytämään keinoja hoitaa ja ennaltaehkäistä tyypin diabetestä. Näiden mekanismien tutkimiseen näyttäisivät LCR- ja

HCR- rottamallit olevan erinomainen keino, koska ne antavat mahdollisuuden tutkia synnynnäisiä aerobiseen kapasiteettiin liittyviä ominaisuuksia. Perinnöllisen aerobisen suorituskyvyn kompensoivaa vaikutusta metabolisiin sairauksiin, kuten tyypin 2 diabetekseen, on siten merkittävää selvittää kun etsitään hoitokeinoja näihin yhä määrällisesti lisääntyviin sairauksiin.

Lähteet

- Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol.* 88:99-107.
- Akimoto T, Ribar TJ, Williams RS, Yan Z. 2004. Skeletal muscle adaptation in response to voluntary running in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-deficient mice. *Am.J.Physiol.Cell Physiol.* 287:C1311-9.
- Alcolado JC, Alcolado R 1991.Importance of maternal history of non-insulin dependent diabetic patients. *B Med J.* 302:1178-80
- Bassett DR Jr, Howley ET. 2000. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med.Sci.Sports Exerc.*32:70-84.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. 1990. Review. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care.* 13:198-208.
- Bizeau ME, Willis WT, Hazel JR. 1998. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol.* 85: 1279–1284.
- Blaak EE, Wagenmakers AJ, Glatz JF, Wolffenbuttel BH, Kemerink GJ, Langenberg CJ, Heidendal GA, Saris WH. 2000. Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle. *Am .J. Physiol.* 279:146-154.
- Bonen A., Luiken, JJ., Arumugam Y. , Glatz JF., Tandon NN. 2000. Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 275: 14501-14508.
- Bouchard, C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Pérusse L, Leon AS, Rao DC. 1999. Familial aggregation of VO_{2 max} response to exercise training: results from the Heritage family study. *J.Appl.Physiol.* 87:1003-1008.
- Britton, SL., Koch, LG. 2001. Animal models for complex traits of physical capacity. *Exerc.Sport. Sci.Rev.* 29:7-14.
- Bruce CR, Thrush AB, Mertz VA, Bezaire V, Chabowski A, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. 2006. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 291:E99–107.
- Brändle M, Lehmann R, Maly FE, Schmid C,Spinas GA. 2001. Diminished insulin secretory response to glucose but normal insulin and glucagon secretory responses to arginine in a family with maternally inherited diabetes and deafness caused by mitochondrial tRNA(LEU(UUR)) gene mutation. *Diabetes Care.* 24:1253-1258.
- Buick FJ, Gledhill N, Froese AB, Spriet LL, and Meyers EC. 1980. Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity. *J Applied Physiol.* 48:636-642.
- Campbel N, Reese J. 2002. Fourth edition. *Pearson Benjamin Cummings.*
- Chalkey SM Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. 1998. Five hour fatty acid elevation increases muscle lipids and impairs glykogen synthesis in the rat. *Metabolism.* 47:1121-6.

- Chavez JA, Summers SA. 2003. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and DAG accumulation. *Arch Biochem Biophys*. 419:101-109.
- Choo-Kang AT, Lynn S, Taylor GA, Daly ME, Sihota SS, Wardell TM, Chinnery PF, Turnbull DM, Walker M. 2002. Defining the importance of mitochondrial gene defects in maternally inherited diabetes by sequencing the entire mitochondrial genome. *Diabetes*. 51:2317-2320.
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. 1999. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 341:240-246.
- Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. 1993. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am. J. Physiol*. 264:C383-389.
- Cook JTE, Shields DC, Page RCL, Levy JC, Hattersley AT, Shaw JAG, Neil HAW, Wainscoat JS, Turner RC. 1994. Segregation analysis of NIDDM in Caucasian families. *Diabetologia* 37:1231-1240.
- Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. 2007. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr*. 85:662-677.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378:785-789.
- Daugaard JR., Richter EA. 2001. Relationship between muscle fibre composition, glucose transporter protein 4 and exercise training: possible consequences in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Physiol Scand*. 171:267-76.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. 1999. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest*. 103:253-259.
- El-Assaad W, Buteau J, Peyot M-L, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M. 2003. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic-cell death. *Endocrinology*. 144:4154-4160.
- Fernström, M., Tonkonogi M., Sahlin K. 2004. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle. *J Physiol*. 554:755-63
- Froguel P, Velho G. 2001. Review. Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Programming of Hormone Receptors*. 56:91-105.
- Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schröder HD, Handberg A. 2001. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 50:1324-1329.
- Gogswill AM, Stevens RJ, Hood DA. 1993. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol*. 264:383-389.
- Gonzalez NC, Howlett RA, Henderson KK, Koch LG, Britton SL, , Wagner HE, Favret F, Wagner PD. 2006 Systemic oxygen transport in rats artificially selected for running endurance. *Respir.Physiol.Neurobiol*. 28:141-150.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. 2001. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J. Clin. Endokr*. 86:5755-5761.

- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. 2001. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 86:5755–5761.
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. 1999. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 48:1270-1274.
- He J, Watkins S., Kelley DE. 2001. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes.* 50:817-823.
- Henriksson, J., Chi MM., Hintz CS., Young DA., Kaiser KK., Salmons S., and Lowry OH. 1986. Chronic stimulation of mammalian muscle changes in enzymes of six metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 251:614-632.
- Hepple RT. 2000. Skeletal muscle: microcirculatory adaptation to metabolic demand. *Med. Sci.Sports Exerc.* 32:117-123.
- Hesselink MK, Keizer HA, Borghouts LB, Schaart G, Kornips CF, Slieker LJ, Sloop KW, Saris WH, Schrauwen P. 2001. Protein expression of UCP3 differs between human type 1, type 2a, and type 2b fibers. *FASEB J.* 15:1071–1073.
- Hickey MS, Carey JO, Azevedo JL, Houmard JA, Pories WJ, Israel RG, and Dohm GL. 1995. Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am.J. Physiol. Endocrinol.Metab.* 268: E453–E457.
- Holloszy, J. O., Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. 1984. *J. Appl. Physiol.* 56: 831-838.
- Hood, DA. 2001. Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl. Physiol.* 90:1137–1157.
- Howlett RA, Gonzalez NC, Wagner HE, Fu Z, Britton SL, Koch LG, Wagner PD. 2003. Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. *J. App. Physiol.* 94:1682-1688.
- James, M., Lindpaintner K. 1997. Why map the rat? *Trends Genet.* 13: 171-173.
- Jeukendrup AE.. 2002. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann NY Acad of Sciences.* 967:217-235.
- Kahn CR. 1994. Review. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes.* 43:1066-1084.
- Kanety H, Hemi R, Papa MZ, Karasik A. 1996. Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem.* 271:9895-9897.
- Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G J. 2005. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biol.Chem.* 20:19507-195015.
- Kauffman FR. 2002. Type 2 diabetes mellitus in children and youth: a new epidemic. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab.* 15:737-744.

- Kelley DE, He J, Menshikova EV. 2002. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*. 51:2944-50.
- Kelley DE, Mandarino LJ. 2000. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance. *Diabetes* 49 :677 –683.
- Kelley DE, Mintun MA, Watkins SC, Simoneau JA, Jadali F, Fredrickson A, Beattie J, Theriault R. 1996 The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle. *J.Clin.Invest*. 97 :2705 –2713.
- Kelley DE., He J., Menshikova EV., Ritov VB. . 2002. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 51:2944-2950.
- Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ, Saltin B. 1993. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol*. 469:459-78.
- Kiens, B., Essen-Gustavsson, B., Christensen NJ., Saltin B. 1993. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J.Physiol*. 469:459-478.
- Klein BEK, Klein R, Moss SE, Cruikshanks KJ. 1996. Parental history of diabetes in a population-based study. *Diabetes Care* 19:827–830.
- Klein HH, Vestergaard H, Kotzke G, Pedersen O. 1995. Elevation of serum insulin concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp studies leads to similar activation of insulin receptor kinase in skeletal muscle of subjects with and without NIDDM. *Diabetes*. 44:1310-1307.
- Klissouras, V. 1971. Heritability of adaptive variation. *J.Appl.Physiol*. 31: 338-344.
- Knowler WC, Pettitt DJ, Savage PJ, Bennett PH. 1981. Diabetes incidence in Pima Indians: contributions of obesity and parental diabetes. *Am J Epidemiol*. 113:144–156.
- Koch LG, Britton SL. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*. 5:45-52.
- Koch LG, Meredith TA, Fraker TA, Metting PJ, Britton SL. 1998. Heritability of treadmill running endurance in rats *AmJ Physiol* 187: 567-572
- Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM, Cortright RN. 2005. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *J Appl.Fysiol*. 288:C1074-1082.
- Koves TR, Noland RC, Bates AL, Henes ST, Muoio DM, Cortright RN. 2005. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am. J. Cell. Physiol*. 288: C1074-C1082.
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. 1991. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*. 40:1397-403.
- Kralisch S., Klein J., Lossner U., Bluher M., Paschke R., Stumvoll M., Fasshauer M. 2005. Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of endocrinology* 185:R1-8.
- Krieger, D. A., Tate C. A, J. McMillin-Wood, and F. W. Booth. 1980. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol*. 48: 23-28.

Krieger, DA., Tate CA., McMillin-Wood J., Booth, FW. 1980. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J. Appl. Physiol.* 48: 23-28.

Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. 2000. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from T2D patients. *Diabetes.* 49:284-292.

Krssak M, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. 2000. Intramuscular glycogen and IMCL utilization during prolonged exercise and recovery in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:748-754.

Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, Cho IH, Pyo JH, Kim CK, Sinclair AJ, Febbraio MA, Watt MJ. 2006. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance. *J. Appl. Physiol.* 100:1467-1474.

Lehninger A, Nelson D, Cox M. 2002. Principles of Biochemistry. Fourth Edition. *WH Freeman & Co.*

Lodish H, Berk A, Matsudau P, Kaiser C, Kneeger M, Scott M, Zipursky L, Darnell J. 2003. Molecular cell Biology. Fifth Edition. *Palgrave Macmillan.*

Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WG, Zawadzki JK, Yki-Järvinen H, Christin L, Secomb TW, Bogardus C. 1987. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J. Clin. Invest.* 80:415-424.

Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WG, Zawadzki JK, Yki-Järvinen H, Christin L, Secomb TW, Bogardus C. 1987. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. *J. Clin. Invest.* 80:415-424.

Lynn S, Wardell T, Johnson MA, Chinnery PF, Daly ME, Walker M, Turnbull DM. 1998. Mitochondrial diabetes: investigation and identification of a novel mutation. *Diabetes.* 47:1800-1802.

Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. 1998. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *A.m J. Hum. Genet.* 63:447-54.

Marshall BA, Ren JM, Johnson DW, Gibbs EM, Lillquist JS, Soeller WC, Holloszy JO, Mueckler M. 1993. Germline manipulation of glucose homeostasis via alteration of glucose transporter levels in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 268:18442-18445

Matschinsky FM 1995. Banting Lecture: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 45:23-241.

McGarry JD, Dobbins RL. 1999. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia.* 42:128-138.

McGarry JD. 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51:7-18.

Mogensen M., Sahlin K., Fernström M., Glinborg D., Birgitte F., Beck-Nielsen H. 2007. Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 56:1592-1599.

- Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Macé K, Gómez-Foix AM. 2001. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrin Metab.* 280:E229-37.
- Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noé V, Ciudad CJ, Macé K, Gomez-Foix AM. 2001. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.*280:229-37.
- Moyes CD, LeMoine CM. 2005. Control of muscle bioenergetic gene expression: implications for allometric scaling relationships of glycolytic and oxidative enzymes. *Journal of experimental Physiol.* 208:1601-1610.
- Moyes CD, Schulte PM, Hochachka PW. 1992. Recovery metabolism in fish white muscle: the role of the mitochondria. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 262: R295-R304.
- Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K. 2006. Altered Fiber Distribution and Fiber-Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 29:895-900.
- Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K. 2006. Altered fiber distribution and fiberspecific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care.* 29:895-900.
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, et al. 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 46:983–988.
- Patti M, Butte A, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, M C, Saccone R, Landaker E, Goldfine A, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn C, Mandarino L. 2003. Coordinated reduction in genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential roles of PGC1 and NRF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8466–8471.
- Phillips SM, Green HJ, Tarnopolsky MA, Heigenhauser GJ, Grant SM. 1996. Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *Am.J. Physiol.* 270:E265–72.
- Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS. 2006. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136:873– 876.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes.* 51:S405–S413.
- Randle PJ .1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 14:263-283.
- Ritov VB., Menshikova EV, He J, RE., Goodpaster BH., Kelley DE. 2002. Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 54:8-14.
- Ritz P, Berrut G. Review. Mitochondrial function, energy expenditure, aging and insulin resistance. 2005. *Diabetes Metab.* 2:5S67-5S73.
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J.Clin.Invest.* 97:2859-2865.

- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Massé F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M. 2004. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53:1007–1019.
- Rolfe DF, Brand MD. 1996. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *Am J Physiol.* 271:1380–1389.
- Ryder JW, Bassel-Duby R, Olson EN, and Zierath JR. 2003. Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. *J.Biol.Chem.* 278: 44298–44304.
- Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ. 1999. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J.Biol.Chem.* 274 :24202 –24210.
- Simoneau JA, Kelley DE. 1997. Altered skeletal muscle glycolytic and oxidative capacities contribute to insulin resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* 83:166-171.
- Simoneau J-A, Kelley DE. 1997. Altered skeletal muscle glycolytic and oxidative capacities contribute to insulin resistance in NIDDM. *J.Appl.Physiol.* 83 :166 –171.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. 1999. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss.
- Simoneau JA., Bouchard C. 1995. Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *Faseb J.* 9:1091-1095.
- Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD. 1996. Essentiality of circulating fatty acids for glucosestimulated insulin secretion in the fasted rat. *J.Clin.Invest.* 97:2728–2735.
- Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA.. 2004. Regulation of insulin action by ceramide. *J Biol Chem.* 27;279(35):36608-15.
- T Kadowaki, H Kadowaki, Y Mori, K Tobe, R Sakuta, Y Suzuki, A Tanabe. 1994. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 330:962-8.
- Toledo FG, Watkins S, Kelley DE. 2006. Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3224–3227.
- Troxell ML, Britton SL, Koch LG. 2003. Selected contribution: Variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *J.Appl,Physiol.* 94:1674-1681.
- Troxell ML,Britton SL, Koch LG, Dohm MR,Hayes JP,Garland TJ. 1996. Quantative genetics of sprint running speed and swimming endurance in laboratory house mice. *Evolution.* 50:1688-1701.
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. 2001. Prevention of t2d by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J.Med.* 344:1343-50.
- Unger RH, Zhou YT, Orci L. 1999. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: Novel role of leptin. *Natl. Acad. Sci. USA.* 96:2327–2332.

White MF. 1998. Review. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell Biochem.* 182:3-11.

Vogel H. 2001. Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 60 :217 –227.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. 2002. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem.* 277:50230-50236.