

Vapaaehtoisen harjoittelun vaikutus kahden aerobiselta  
sopeutumiskyvyltään erilaisen rottakannan lihaksen  
hienorakenteeseen



Liisa Salonsaari  
Pro gradu  
Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos

## Alkusanat

Tämä tutkimus tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden sekä liikuntafysiologian laitoksissa. Tutkimus oli osa laajempaa projektia, jonka tarkoituksena on selvittää aerobisen liikunnan vaikutusta alati yleistyvien elintapasairauksien, kuten tyypin 2 diabeteksen kehittämisessä.

Ihan ensimmäiseksi haluaisin kiittää ohjaajiani Hilkka Reunasta sekä Heikki Kainulaista. He olivat kärsivällisiä vastaillessaan kysymyksiini ja heidän ohjeensa olivat tämän tutkimuksen kannalta välttämättömiä. Lisäksi haluan kiittää heitä mielenkiintoisesta aiheesta, tätä työtä oli mukava tehdä (kuva 0). Suuri kiitos myös Sira Torviselle, jonka käytännön neuvoista ja vinkeistä oli työni kannalta todella paljon hyötyä. Näytteiden leikkaamisesta haluan ystävällisesti kiittää Virpi Miettistä. Paavo Niutaselle haluan osoittaa myös ison kiitokseni elektronimikroskoopin käyttöön liittyvästä avusta.

Lisäksi haluan vielä kiittää perhettäni, erityisesti puolisoani Petteriä. Kiitos kuuluu myös vielä syntymättömälle lapsellemme. Hän antoi minulle päivittäisillä potkuillaan lisää motivaatiota työskennellä ahkerasti.

Rahallisesta tuesta haluan osoittaa erityiskiitoksen Riitta ja Jorma J. Takasen säätiölle.



Kuva 0. Iloinen verisuoni.

Jyväskylässä 19.11.2008

*Liisa Salonsaari*

<b>Tekijä:</b>	Liisa Salonsaari
<b>Tutkielman nimi:</b>	Vapaaehtoisen harjoittelun vaikutus kahden aerobiselta sopeutumiskyvyltään erilaisen rottakannan lihaksen hienorakenteeseen
<b>English title:</b>	The effect of voluntary exercise training on skeletal muscle ultrastructure of two rat strains with different adaptational capacity
<b>Päivämäärä:</b>	19.11.2008 <b>Sivumäärä:</b> 48
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
<b>Oppiaine:</b>	Solubiologia
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	Heikki Kainulainen (prof.) ja Hilikka Reunanen (FT)

---

**Tiivistelmä:**

Luustolihas on hyvin muuntuvainen kudosisältää erittäin runsaasti mitokondrioita. Mitokondrioiden tehtävänä on tuottaa työskentelevälle lihakselle tarpeellinen määrä energiaa ATP:n muodossa. Luustolihasessa mitokondriot muodostavat selkeästi kaksi eri populaatiota. Solukalvonalaiset mitokondriot sijaitsevat aivan solukalvon alla erikokoisina keräytyminä ja solunsisäiset mitokondriot sijaitsevat luustolihas-solun sisällä ryhmittyneenä säännöllisesti Z-levyn ympärille.

Kestävyys-harjoittelu aiheuttaa monenlaisia muutoksia luustolihas-morfologiassa. Aerobisen liikunnan onkin jo pitkään tiedetty olevan terveyden kannalta merkittävä tekijä. Tämän tutkimuksen tehtävänä onkin selvittää vapaaehtoisen aerobisen harjoittelun vaikutusta kahden hankitulta suorituskyvyltään toisistaan eroavan rottakannan luustolihas-hienorakenteeseen.

Tutkimuksessa käytettiin kahta keinotekoisesti kehitettyä eläinmallia. Korkean vasteen harjoittelijoista (high response trainers – HRT) puolet kuului koeryhmään ja puolet kontrolliryhmään. Alhaisen vasteen harjoittelijoilla (low response trainers – LRT) tilanne oli vastaavanlainen. Koeryhmien rotat asustivat häkeissä, joissa juoksupyörä oli vapaasti käytettävissä. Kontrolliryhmien rotilla mahdollisuutta juoksupyöräharjoitteluun ei ollut. Tutkittavia ryhmiä oli yhteensä siis neljä, joista kuhunkin kuului kuusi eläintä. Kolmen kuukauden koejakson jälkeen rotat lopetettiin ja *soleus*-lihaksesta otetut näytteet fiksoitiin ja valettiin eponiin. Näytteistä leikattiin ultramikrotomilla sekä puoliohut- että ohutleikkeitä. Puoliohutleikkeet tarkasteltiin ja kuvattiin valomikroskoopilla. Ohutleikkeet tarkasteltiin sekä kuvattiin elektronimikroskoopilla ja otetut kuvat analysoitiin tietokoneen avulla. Tilastoanalyyseissä ryhmiä vertailtiin solukalvonalaisten ja solunsisäisten mitokondrioiden sekä solunsisäisen rasvan osalta.

Solukalvonalaisten mitokondrioiden kohdalla erot sekä HRT- että LRT-juoksijaryhmien ja HRT-kontrolliryhmän välillä olivat tilastollisesti merkitseviä. Solunsisäisten mitokondrioiden osalta ryhmien ei havaittu poikkeavan tilastollisesti merkittävästi toisistaan. Myöskään solunsisäisen rasvan määrässä ei esiintynyt eroja ryhmien välillä. Aerobinen harjoittelu näyttäisi vaikuttavan suuresti erityisesti solukalvonalaisten mitokondrioiden määrään. Niiden rooli aerobisen suorituskapasiteetin kasvussa näyttäisi olevan merkittävä. Solukalvonalaisten mitokondrioiden viallinen toiminta onkin yhdistetty tyyppiin 2 diabetekseen ja siksi tämän tutkimuksen perusteella aerobisella liikunnalla näyttäisi olevan suuri merkitys terveyden kannalta. Koska harjoittelu ei merkittävästi vaikuttanut solunsisäisiin mitokondrioihin, voidaan olettaa, että solukalvonalaisten ja solunsisäisten mitokondrioiden tehtävissä harjoitteluvasteen kehittymisen osalta on merkittäviä toiminnallisia eroja.

---

**Avainsanat:** luustolihas, mitokondrio, solunsisäinen rasva, eläinmalli, harjoittelu, elektronimikroskopia

---

**Author:** Liisa Salonsaari  
**Title of thesis:** The effect of voluntary exercise training on skeletal muscle ultrastructure of two rat strains with different adaptational capacity  
**Finnish title:** Vapaaehtoisen harjoittelun vaikutus kahden aerobiselta sopeutumiskyvyltään erilaisen rottakannan lihaksen hienorakenteeseen  
**Date:** 19.11.2008 **Pages:** 48  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell Biology  
**Supervisor(s):** Heikki Kainulainen (Prof.) and Hilikka Reunanen (Ph.D.)

---

**Abstract:**

Skeletal muscle is a very malleable tissue containing lots of mitochondria. Mitochondria function as ATP-producing organelles which adjust their ATP regeneration to match cell's changing energetic demands. Skeletal muscle consists of two distinct mitochondrial populations. Subsarcolemmal mitochondria are located just beneath cell membrane forming aggregates and intermyofibrillar mitochondria are located between the contractile filaments, inside the muscle cell. Aerobic exercise induces lots of morphological changes in skeletal muscle and has long been recognized as a major factor for one's health. The aim of this study was to examine the effects of voluntary exercise training on ultrastructure of skeletal muscle.

There were two rat strains in this study, which differ in their adaptive aerobic response. High response trainers (HRT) and low response trainers (LRT) have been created by artificial breeding to contrast the adaptation response to training. Six HRT- and six LRT-rats were singly housed in cages with free access to running wheels (experimental groups). Control groups included six HRT- and six LRT-rats, which were also singly housed in cages but they had no access to running wheels. Rats lived in their cages for three months and after that they were killed and muscle samples (*soleus*) were taken and prepared further for electron microscopy. Thin sections were examined and photographed with electron microscope and the micrographs were then analyzed with computer. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial content was estimated as well as intramyocellular lipid content. Statistical analysis was performed to compare groups. Groups were compared based on their amount of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria as well as intramyocellular lipid content.

The subsarcolemmal mitochondrial area of both running groups was significantly larger compared to HRT-control group. Intermyofibrillar mitochondrial area as well as intramyocellular lipid content did not differ between rat groups. Therefore the function and the adaptation to aerobic response must differ a lot between subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. Aerobic exercise seems to be essential factor in defining the amount of subsarcolemmal mitochondria. The role of subsarcolemmal mitochondria for the growth of exercise response seems to be essential as their dysfunction seems to have a role in the development of type 2 diabetes.

---

**Keywords:** skeletal muscle, mitochondrion, intramyocellular lipid, animal model, aerobic exercise, electron microscopy

# Sisällysluettelo

**Alkusanat**

**Tiivistelmä**

**Sisällysluettelo**

**Lyhenteet**

<b>1. Johdanto .....</b>	<b>7</b>
1.1. Luustolihas .....	7
1.2. Mitokondriot .....	9
1.2.1. Solukalvonalaiset mitokondriot luustolihasessa .....	11
1.2.2. Solunsisäiset mitokondriot luustolihasessa .....	13
1.3. Solunsisäinen rasva .....	14
1.4. Kestävyysharjoittelun vaikutus luustolihaseseen .....	18
1.5. Eläinmallit .....	20
1.5.1. Luontaisen suorituskyvyn eläinmalli .....	21
1.5.2. Hankitun suorituskyvyn eläinmalli .....	22
<b>2. Tutkimuksen tarkoitus .....</b>	<b>24</b>
<b>3. Materiaalit ja menetelmät .....</b>	<b>25</b>
3.1. Koe-eläimet .....	25
3.2. Näytteiden fiksointi ja leikkaus .....	26
3.3. Näytteiden mikroskopointi ja kuvaaminen .....	26
3.4. Kuvien analysointi .....	27
3.5. Tilastanalyysi .....	28
<b>4. Tulokset .....</b>	<b>29</b>
4.1. Solukalvonalaiset mitokondriot .....	29
4.2. Solunsisäiset mitokondriot .....	35
4.3. Solunsisäinen rasva .....	36
<b>5. Tulosten tarkastelu .....</b>	<b>37</b>
5.1. Solukalvonalaiset mitokondriot .....	37
5.2. Solunsisäiset mitokondriot .....	39
5.3. Solunsisäinen rasva .....	40
5.4. Yhteenveto .....	42
<b>6. Lähdeluettelo .....</b>	<b>44</b>

## Lyhenteet

HCR	high capacity runner
HRT	high response trainer
HRT-R/C	high response trainer-juoksija/kontrolli
IMCL	luustolihasolunsisäinen rasva (engl. intramyocellular lipid)
IMF-mitokondriot	solunsisäiset mitokondriot (engl. intermyofibrillar mitochondria)
LCR	low capacity runner
LRT	low response trainer
LRT-R/C	low response trainer-juoksija/kontrolli
mtDNA	mitokondriaalinen DNA
nDNA	tuman DNA (engl. nuclear DNA)
SS-mitokondriot	solukalvonalaiset mitokondriot (engl. subsarcolemmal mitochondria)
$V_{O_2,max}$	maksimaalinen hapenottokyky

# 1. Johdanto

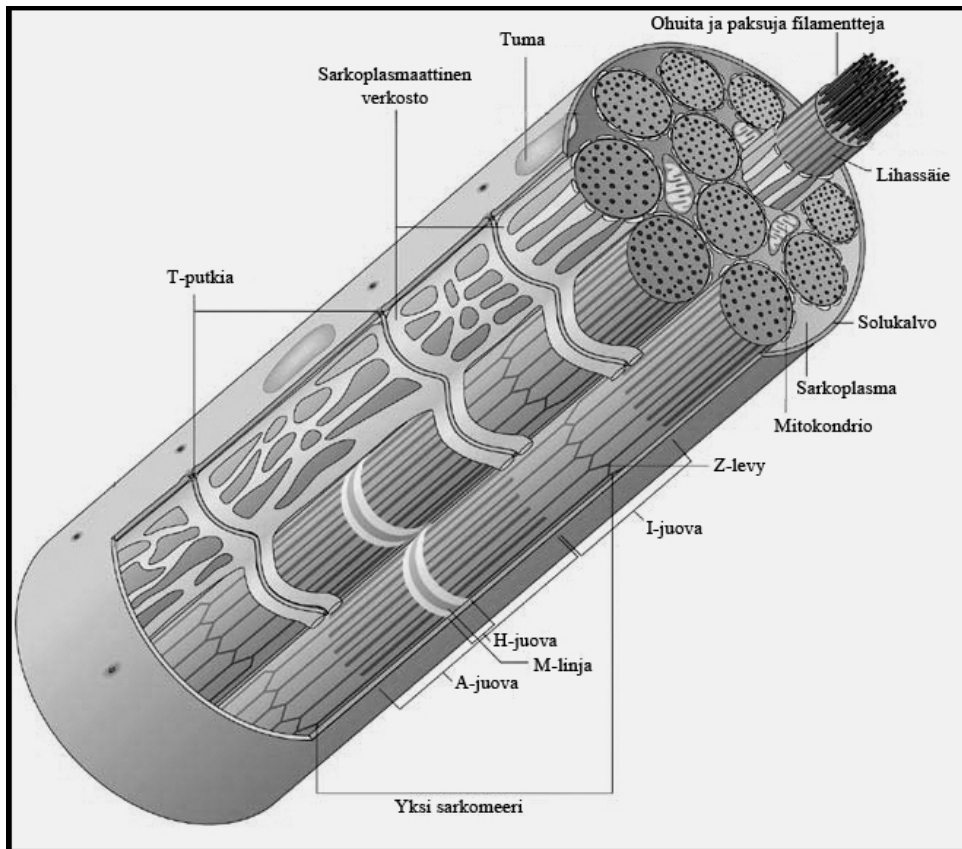
## 1.1. Luustolihas

Luustolihas eli poikkijuovainen lihas on sydänlihaksen ja sileän lihaksen lisäksi yksi lihaskudoksen kolmesta päätyypistä. Toisin kuin sydän- tai sileä lihas, jotka toimivat tahdosta riippumatta, luustolihaksen toiminta on tahdonalaista. Energia lihaksen toimintaan saadaan ATP:n hydrolyysistä.

Luustolihaksen solut ovat muodostuneet useiden luustolihassolujen esimuotojen, myoblastien, erilaistuessa ja fuusioituessa. Tästä johtuen luustolihassolut sisältävätkin useita tumia eivätkä enää fuusioitumisen jälkeen kykene jakautumaan. Kypsät luustolihassolut voivat olla jopa 30 cm pitkiä ja halkaisijaltaan 100  $\mu\text{m}$ . Suuren kokonsa vuoksi niitä kutsutaankin usein luustolihassyiksi. Luustolihassyt muodostavat yhdessä lihassykimppuja, joita on yhdessä luustolihasyksikössä useita. Luustolihas on nimensä mukaisesti useimmiten kiinnittynyt jänteiden avulla luuhun.

Luustolihassolujen solukalvosta kuroutuu solun sarkoplasmaan ja sarkoplasmaattiseen verkostoon yhteydessä olevia T-putkia. T-putket mahdollistavat lihakseen hermo- lihasliitoksen kautta tulleen impulssin etenemisen aktiopotentiaalina solukalvolta T-putkien kautta syvälle lihassolun sisään. Näin aina luustolihassolun sarkoplasmaattiseen verkostoon asti yltänyt aktiopotentiaali aiheuttaa kalsiumionien vapautumista sarkoplasmaattisesta verkostosta. Kalsiumionit saavat aikaan lihassolun lihassäikeiden supistumisen.

Noin 80 % lihassolun sarkoplasmaasta on lihassäikeiden valtaamaa. Supistuksesta vastuussa olevat lihassäikeet koostuvat ohuista aktiinifilamenteista sekä paksuista myosiinifilamenteista. Aktiini- ja myosiinifilamentit muodostavat lihaksen pienimmät toiminnalliset yksiköt eli lihaksen supistumisesta vastuussa olevat sarkomeerit (kuva 1).



**Kuva 1. Kaavakuva luustolihasolun rakenteesta.** Solukalvon ympäröimässä sarkoplasmassa on useita supistumisesta vastaavia yksiköitä, lihassäikeitä. Lihassäikeet koostuvat ohuista ja paksuista filamenteista, jotka muodostavat järjestäytymisellään peräkkäisiä perusyksiköitä niin kutsuttuja sarkomeerejä. Sarkomeerejä on yhdessä lihassäikeessä useita. Aktiini- ja myosiinifilamentit ovat kiinnittyneenä sarkomeeriyksiköistä toisistaan erottavaan Z-levyyn. Sarkomeeriyksiköistä on Z-levyn lisäksi erotettavissa A-, H- ja I-juovat sekä myosiinifilamenttien keskikohta (M-linja). A-juova erottuu tummempana sen sisältäessä sekä aktiini- että myosiinifilamentteja. H-juovan pystyy erottamaan vain lihaksen ollessa lepotilassa. I-juova on puolestaan kohta, jossa on ainoastaan aktiinifilamentteja. Aktiopotentiaalin lihassoluun tuovat T-putket ulottuvat syvälle solun sisälle ja ovat yhteydessä sarkoplasmaattiseen verkostoon. Kuva on mukailtu artikkelista Davies ja Novak, 2006.

Luustolihaksesta löytyy kahta erilaista lihassolutyyppiä, jotka eroavat toisistaan sekä rakenteeltaan että ominaisuuksiltaan. Lihassolutyypit jaetaan hitaisiin (tyyppi I) ja nopeisiin (tyyppi II) lihassoluihin. Tyypin II lihassolut voidaan lisäksi jakaa kolmeen alatyypin: tyyppi IIa, tyyppi IIb ja tyyppi IIx. Tyypin I lihassolut sisältävät paljon hiussuonia sekä mitokondrioita ja ne kestävät pitkäaikaista rasitusta tyypin II lihassoluja paremmin. Tyypin II lihassolut supistuvat tyypin I lihassoluja nopeammin. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että tyypin II lihassolujen myosiini-ATPaasi pystyy pilkkomaan ATP:tä tyypin I vastaavaa ATPaasia nopeammin (Bouchard ym., 1997). Siten tyypin II lihassolussa ATP:tä on saatavilla tyypin I



lihassoluja nopeammin ja supistuminen on nopeampaa. Esimerkiksi pohkeen takaosan leveän kantalihaksen, *soleus*-lihaksen, lihassoluista n. 88 % on tyyppin I lihassoluja (ks. yleiskatsaus Schrauwen-Hinderling ym., 2006). Kestävyysharjoittelun on tyypillisesti todettu kasvattavan tyyppin I lihassolujen määrää lihaksessa (ks. yleiskatsaus Howald, 1982).

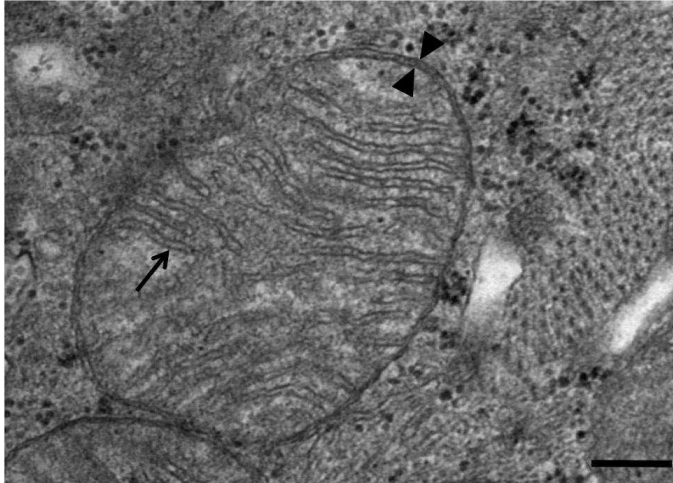
Luustolihas sisältää useita erittäin ohuita verisuonia eli hiussuonia. Hiussuonet kuljettavat työskentelevään lihakseen happea ja erilaisia aineenvaihduntatuotteita. Hiussuonten pinta-alan suhde lihassolujen pinta-alaan on havaittu korreloivan voimakkaasti luustolihasmitokondrioiden määrän kanssa (Mathieu-Costello ym., 1992).

## 1.2. Mitokondriot

Mitokondriot ovat solun energiametabolian kannalta oleellisia organelleja. Niillä on kyky jakautua ja fuusioitua, siten ne muuntuvatkin aina solun senhetkisiä energiatarpeita vastaaviksi. Mitokondrioiden matriksissa eli ydinosassa tapahtuvista kemiallisista reaktioista energiametabolian kannalta merkittävimpiä ovat  $\beta$ -oksidatio, sitruunahappokierto ja oksidatiivinen fosforylaatio, lisäksi mitokondrioissa syntetisoidaan kolesterolia ja lipidejä. ATP:n tuottamisen lisäksi mitokondrioiden tärkeisiin tehtäviin kuuluu mm. kalsiumin ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostaasin sekä ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin säätely.

Rakenteeltaan mitokondriot ovat sauvamaisia, muodoltaan bakteerien kaltaisia. Mitokondrioiden uskotaankin kehittyneen alun perin tumallisten solujen esimuotojen fagosytoimisista bakteerisoluista. Ulkokalvon lisäksi mitokondrioilla on sisäkalvo, joka on poimuttunut mitokondrion sisälle muodostaen niin sanottuja kristoja (kuva 2). Mitokondrioiden ulkokalvolla sijaitsee niin kutsuttuja porineja, jotka mahdollistavat ionien ja erilaisten mitokondriaalisten aineenvaihduntatuotteiden diffuusion ulko- ja sisäkalvojen väliseen tilaan. Sisäkalvo läpäisee aineita ulkokalvoa heikommin. Siinä sijaitsee ATP-syntaasin ja elektroninsiirtoketjun proteiinien lisäksi lukuisia kuljetusproteiineja (engl.

transport proteins), jotka säätelevät aineenvaihduntatuotteiden kuljetusta kalvojen välisen tilan ja mitokondrion ydinosan välillä.



**Kuva 2. Mitokondrio.** Tässä elektronimikroskooppikuvassa erottuu hyvin mitokondrioiden kaksoiskalvorakenne. Ulko- ja sisäkalvot on osoitettu kuvassa nuolenpäillä. Mitokondrion sisäkalvosta ulottuu useita kistoja (nuoli). Mittajanan pituus 200 nm.

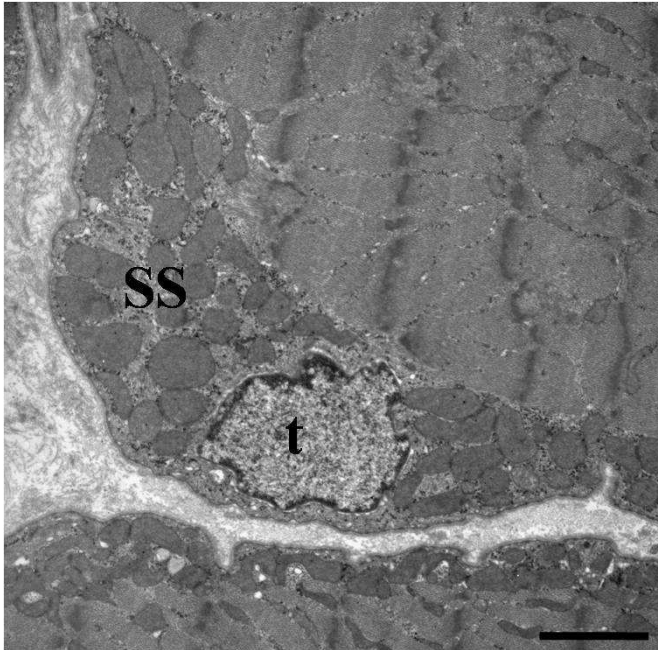
Mitokondrioilla on oma mitokondriaalinen DNA:nsa (mtDNA), joka on kooltaan useimpia tuman genejäkin pienempi. Pienen kokonsa vuoksi mtDNA ei pysty koodittamaan kaikkia mitokondriaalisia proteiineja, vaan suurinta osaa näistä proteiineista koodittaa tuman DNA (nDNA). Tumassa kooditettu proteiinin esimuoto sitten kuljetetaan sarkoplasmasta mitokondrioihin tiettyä mitokondriaalista signaalisekvenssiä apuna käyttäen. Mitokondrion kalvojen proteiini- ja lipiinkompleksit tunnistavat signaalisekvenssin ja auttavat proteiinia pääsemään mitokondrion ydinosaan. Päästyään mitokondrion sisään, signaalisekvenssi katkaistaan ja proteiini laskostuu. Mutaatio mtDNA:ssa tai mitokondriaalisia proteiineja koodittavassa nDNA:n geenissä voi johtaa mitokondrioiden toimintahäiriöihin ja siten erilaisiin mitokondriosairauksiin (ks. yleiskatsaus Sreekumar ja Nair 2007). Koska mtDNA ei sisällä histoneita eikä DNA:n korjausjärjestelmä ole nDNA:n korjausjärjestelmään verrattuna niin kehittynyt, suurin osa mitokondriosairauksista johtuu mutaatioista mtDNA:ssa (ks. yleiskatsaus Chabi ym., 2005). Solun kaikissa mitokondrioissa voi olla samanlainen, mitokondriosairauden aiheuttava mutatoitunut mtDNA (homoplasmia) tai solu voi sisältää sekä villityypin mtDNA:ta että mutatoitunutta mtDNA:ta (heteroplasmia). Virheellisen mtDNA:n määrä voi vaihdella saman kudoksen eri solujen välillä runsaasti. Yleisin mtDNA-

mutaatiosta johtuva sairaus on näköhäiriöitä aiheuttava Leberin perinnöllinen näköhermorappeuma (ks. yleiskatsaus Chinnery ja Schon 2003).

Kudoksesta ja solutyypistä riippuen mitokondrioiden määrä solussa vaihtelee muutamista mitokondrioista tuhansiin. Eniten niitä löytyy runsaasti energiaa vaativien kudosten soluista kuten sydän- ja luustolihasn soluista. Luustolihasn soluissa mitokondriot muodostavat selkeästi kaksi eri populaatiota, toisen populaation sijaitessa aivan solukalvon alapuolella ja toisen solun sisällä. Solukalvonalaiset (SS – subsarcolemmal) mitokondriot eroavat morfologialtaan ja tehtäviltään solunsisäisistä (IMF – intermyofibrillar) mitokondrioista (Krieger ym., 1980; Cogswell ym., 1993; Lombardi ym., 2000; Adihetty ym., 2005). SS- ja IMF-mitokondrioiden erojen suuruus riippuu lihaksen harjoittuneisuuden lisäksi myös lihassolun tyypistä (Koves ym., 2005). Joissakin tutkimuksissa on jopa ehdotettu, että nämä kaksi mitokondriopopulaatiota ovat yhteydessä toisiinsa muodostaen ikään kuin ketjun, joka ulottuu SS-mitokondrioista syvälle lihassoluun aina IMF-mitokondrioihin saakka (ks. yleiskatsaus Skulachev, 2001).

### **1.2.1. Solukalvonalaiset mitokondriot luustolihasn**

Suuret ja muodoltaan pallomaiset SS-mitokondriot sijaitsevat nimensä mukaisesti aivan luustolihasn solukalvon alla muodostaen erikokoisia kerääntymiä (kuva 3). Kerääntymät ovat usein ryhmittyneet luustolihasn kärkiosiin. Kokonaisuudessaan luustolihasn mitokondrioista SS-mitokondrioita on arviolta 10–15 %, tosin huippu-urheilijoilla SS-mitokondrioiden osuus voi olla jopa 30 % (ks. yleiskatsaus Hoppeler, 1986). SS-mitokondrioiden on todettu tuottavan energiaa solukalvoon liittyviin prosesseihin, kuten Na<sup>+</sup>- ja K<sup>+</sup>-ionien aktiiviseen kuljetukseen solukalvon läpi sekä glukoosin ja solukalvon proteiinien fosforylaatioon (Sjodin ja Beauge, 1973; Walaas ym., 1977; Krieger ym., 1980). Lisäksi SS-mitokondrioiden uskotaan tuottavan ATP:tä erilaisiin tuman prosesseihin, kuten proteiinisynteesiin (Krieger ym., 1980). Luustolihasn useat tumat sijaitsevat aivan solukalvon alla ja siksi usein myös SS-mitokondriokerääntymän keskellä (kuva 3).



**Kuva 3. Luustolihasen SS-mitokondrioita.** SS-mitokondriot ovat asettuneet aivan solukalvon alapuolelle erikokoisiksi kerääntymiksi. Tuma sijaitsee usein mitokondriokerääntymän keskellä. SS, solukalvonalaisia mitokondrioita; t, tuma. Mittajanan pituus 2  $\mu\text{m}$ .

Harjoittelun seurauksena SS-mitokondrioiden tilavuusosuuden on todettu kasvavan IMF-mitokondrioihin verrattuna suhteessa enemmän (Krieger ym., 1980; Bizeau ym., 1998). Tutkimusten perusteella SS-mitokondrioita syntetisoidaan ja hajotetaan IMF-mitokondrioita nopeammalla tahdilla ja niiden on huomattu reagoivan nopeasti lihaksen käytössä tapahtuviin muutoksiin (Krieger ym., 1980; Howald ym., 1985). Esimerkiksi 12 päivän pituisen avaruuslennon aikana SS-mitokondrioiden määrä väheni 31 % (Riley ym., 1990). SS-mitokondrioiden määrän nopean lisääntymisen arvellaan johtuvan esimerkiksi siitä, että näillä mitokondrioilla on IMF-mitokondrioita parempi kyky säädellä biogeneesinsä nopeutta (Krieger ym., 1980; Cogswell ym., 1993). Tähän viittaa myös SS-mitokondrioista mitattu korkeampi kardiolipiinin taso (Cogswell ym., 1993). Kardiolipiini on mitokondrioiden sisäkalvon fosfolipidi, jota syntetisoidaan mitokondrioissa ja jota voidaan pitää merkinä mitokondrioiden synteessin ja hajotuksen suhteesta. Mitokondrioiden ATP:n tuotannon tehokkuudesta viestivä oksidatiivinen kapasiteetti on SS-mitokondrioissa IMF-mitokondrioita heikompi, mutta se kuitenkin muuntuu vastaamaan solun muuttuvia energiatarpeita (Krieger ym., 1980; Takahashi ja Hood 1996). Ainakin SS-mitokondrioiden tapauksessa oksidatiivisen kapasiteetin kasvusta päävastuun kantaa mitokondrioiden lisääntynyt määrä.

Harjoittelun myötä lisääntyneet SS-mitokondriot mitä todennäköisimmin helpottavat solua pääsemään käsiksi hiussuonista lihassoluun otettaviin aineenvaihduntatuotteisiin (Howald ym., 1985). Mitokondriokerääntymä sijaitseekin usein aivan luustolihasen hiussuonien läheisyydessä. SS-mitokondrioiden on myös ehdotettu suojelevan solunsisäisiä rakenteita solun ulkopuolella olevalta korkealta happikonsentraatiolta, toimimalla ikään kuin suodattavana esteenä solun ja solun ulkopuolisen tilan välillä sekä säätelemällä hapen diffuusiota punasoluilta mitokondrioille (Lombardi ym., 2000; ks. yleiskatsaus Skulachev, 2001).

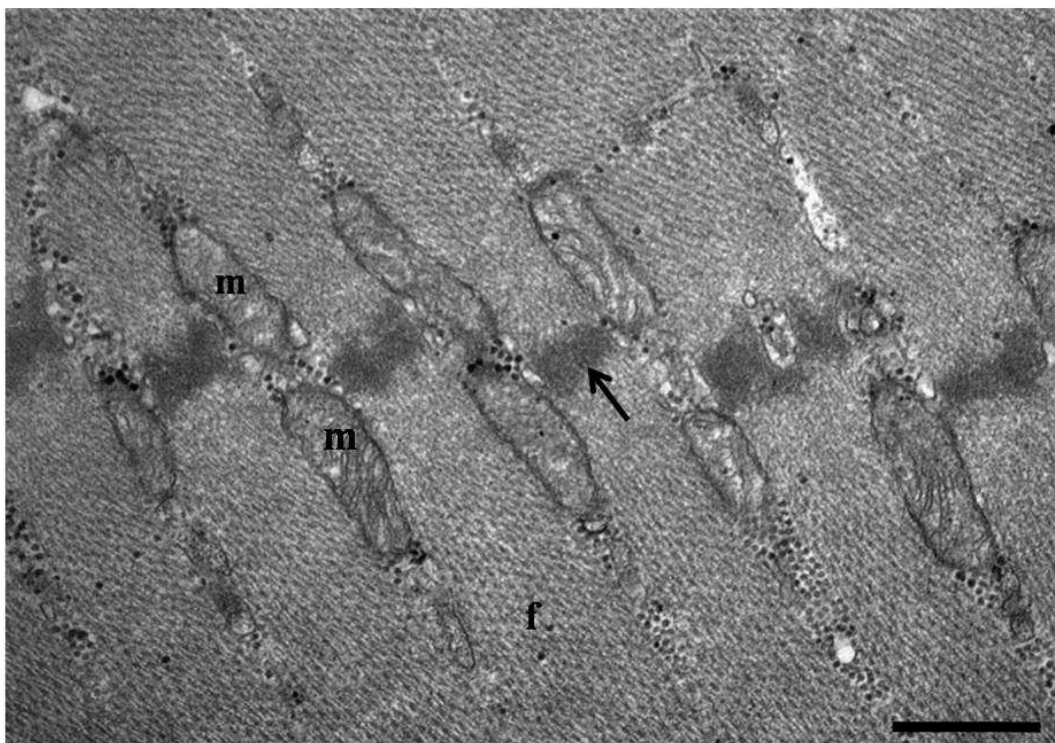
IMF- ja SS-mitokondrioiden entsyymiaktiivisuuksissa esiintyy merkittäviä eroja (Cogswell ym., 1993). Esimerkiksi sukkiinaattidehydrogenaasin aktiivisuus on SS-mitokondrioissa IMF-mitokondrioita 40 % suurempi, mutta sytokromi c-oksidaasin aktiivisuus puolestaan on IMF-mitokondrioissa 20 % suurempi. Koska useimmat mitokondriaaliset proteiinit ovat tuman geenien koodittamia, erot näiden mitokondriopopulaatioiden biogeneesissä ja entsyymiaktiivisuuksissa voivat osittain johtua myös eroista proteiinien kuljetusprosessissa mitokondrioihin (Takahashi ja Hood, 1996).

### **1.2.2. Solunsisäiset mitokondriot luustolihasessa**

Solukalvonalaisia mitokondrioita pienemmät ja pitkänomaiset IMF-mitokondriot sijaitsevat luustolihasen sisällä järjestäytyneinä yleensä Z-levyn molemmin puolin pareittain (kuva 4). IMF-mitokondrioiden on todettu olevan vastuussa lähinnä lihaksen supistumiseen tarvittavan ATP:n tuottamisesta sekä  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasin säätelystä (Krieger ym., 1980; Cogswell ym., 1993; Lombardi ym., 2000). IMF-mitokondrioiden oksidatiivisen fosforylaation onkin havaittu olevan SS-mitokondrioita aktiivisempaa ja ATP:n synteesin tapahtuvan IMF-mitokondrioissa noin kolme kertaa SS-mitokondrioita nopeammalla tahdilla (Cogswell ym., 1993). Samassa tutkimuksessa huomattiin, että IMF-mitokondrioiden proteiinisynteesi on 80 % aktiivisempaa SS-mitokondrioiden proteiinisynteesiin verrattuna. IMF-mitokondrioiden entsyymien aktiivisuus, mitokondriaalinen hengitys sekä proteiinien esimuotojen kuljetusnopeudet ovat

SS-mitokondrioita suurempia (Cogswell ym., 1993; Schmidt ja Herpin 1997; Lombardi ym., 2000).

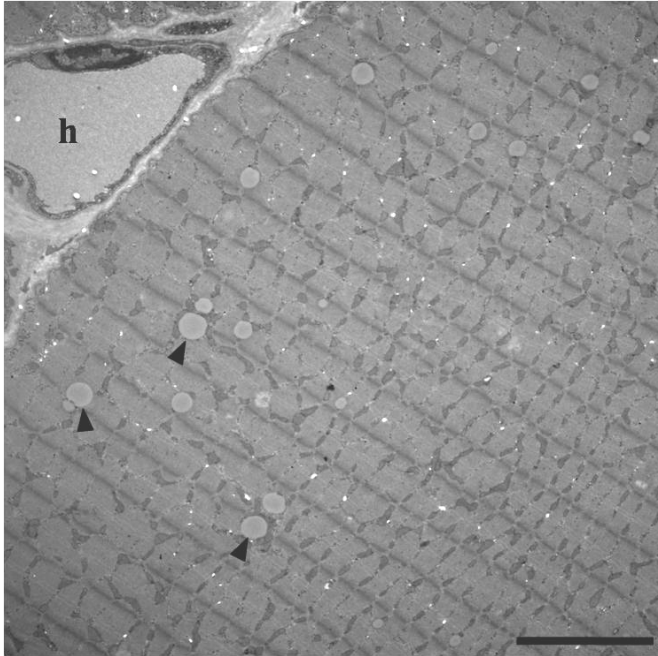
Mitokondriot on yhdistetty apoptoosin säätelyyn, sillä niiden on havaittu sisältävän apoptoottisia proteiineja sekä olevan pääasiallisessa vastuussa apoptoosiin liitetyn solulle haitallisen hapen muodostumisesta. IMF-mitokondrioilla on todettu olevan SS-mitokondrioita suurempi rooli apoptoosin laukaisemisessa (Adhihetty ym., 2005).



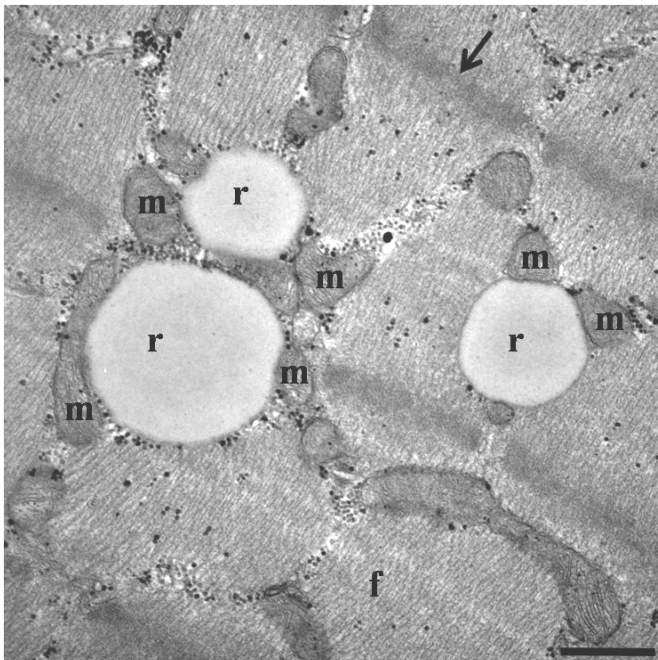
**Kuva 4. Luustoli hassolunsisäisiä mitokondrioita.** Mitokondriot ovat asettuneet pareittain Z-levyn molemmin puolin. Z-levy osoitettu nuolella. f, lihassäikeitä; m, mitokondrio. Mittajanan pituus 500 nm.

### 1.3. Solunsisäinen rasva

Rasvaa varastoidaan rasvakudoksen lisäksi myös muihin kudoksiin, luustoli haskudos mukaan lukien. Luustoli haksen elektronimikroskooppia varten valmistetuissa leikkeissä rasva näyttäytyy sarkoplasmassa tasaisen pyöreinä, yleensä mitokondrioiden läheisyydessä sijaitsevina vaaleina ja säännöllisen muotoisina pisaroina (kuvat 5 ja 6).



**Kuva 5. Luustoli hassolun sisäisiä rasvapisarotia.** Tässä lihassolussa näkyy runsaasti vaaleana, säännöllisen muotoisina erottuvia rasvapisarotia. Suurimmat rasvapisarot on osoitettu kuvassa nuolenpäällä. Rasvapisaroiden sijainti solun sisällä on melko satunnaista. Hiussuoni merkitty kuvaan (h). Mittajanan pituus 5  $\mu\text{m}$ .



**Kuva 6. Rasvapisaroiden sijoittuminen solussa.** Rasvapisarot esiintyvät luustoli haksessa usein aivan mitokondrioiden vieressä. f, lihassäikeitä; m, mitokondrio; r, rasvapisara. Nuolella on osoitettuna Z-levy. Pienet ja pyöreät tummana näkyvät pisteet ovat lihaksen varastoitunutta glykogeenia. Mittajanan pituus 500 nm.

Luustolihakseen glykokeenin muodossa varastoidun glukoosin lisäksi, myös pääasiassa triasyyliglyserolina luustolihakseen varastoidun rasvan tehtävänä on toimia nopeana energianlähteenä lihaksen supistuessa. Rasvapisaroiden on oletettu toimivan mitokondrioiden rasvaoksidaation energianlähteenä erityisesti pitkäkestoisen harjoittelun aikana (ks. yleiskatsaus Hoppeler, 1986). Tätä hypoteesia tukee jo aiemminkin mainittu havainto siitä, että rasvapisarot sijoittuvat usein aivan mitokondrioiden viereen. Luustolihakseen rasvapisaroista käytetään englanninkielessä nimitystä ”intramyocellular lipid” (IMCL).

Luustolihakseen sisältämän rasvan määrään vaikuttavat useat tekijät. Näitä ovat esimerkiksi ruokavalio, lihassolun tyyppi, sukupuoli ja ikä (ks. yleiskatsaukset van Loon, 2004a; Kiens, 2006). Esimerkiksi *soleus*-lihaksen IMCL-pitoisuus on huomattavasti korkeampi miehillä naisiin verrattuna (ks. yleiskatsaus Machann ym., 2004). Myös sukupuolihormonien vaikutusta rasvahappometabolian säätelyyn pidetään todennäköisenä ja naisilla onkin mitattu harjoittelusta riippumatta miehiä korkeampi levonaikainen IMCL-pitoisuus (Perseghin ym., 2001; ks. yleiskatsaus Kiens, 2006). IMCL-pitoisuuden hyvänä ennustajana on lisäksi pidetty vyötärö-lantio-suhdetta (Thamer ym., 2003). Myös se, sairastaako henkilö tyypin 2 diabetesta tai onko hänen perhehistoriassaan tyypin 2 diabetesta sairastavia henkilöitä, näyttää vaikuttavan IMCL-pitoisuuteen (Goodpaster ym., 2001; Thamer ym., 2003). Tyypin 2 diabetesta sairastavien henkilöiden jälkeläisiltä on mitattu muita korkeampia IMCL-pitoisuuksia (ks. yleiskatsaus Machann ym., 2004).

Yllä mainittujen IMCL-pitoisuuteen vaikuttavien tekijöiden lisäksi yhdeksi merkittävimmistä IMCL-pitoisuuden määrittäjistä on paljastunut kestävyysharjoittelu. Jo vuonna 1989 julkaistussa tutkimuksessa kerrottiin, että maratonjuoksijoiden IMCL-pitoisuus oli 42 % pienempi kaksoiskantalihaksessa kilpailun jälkeen, verrattuna kilpailua edeltäneeseen tilanteeseen (ks. yleiskatsaus Schrauwen-Hinderling ym., 2006). Korkean rasva-pitoisuuden omaavalla ravinnolla lihaksen IMCL-varastot saadaan kuitenkin palautumaan vähärasvaista ravintoa nopeammin samaan tapaan kuin harjoittelun jälkeinen hiilihydraattipitoinen ravinto palauttaa lihaksen glykokeenivarastot (Decombaz ym., 2000). Pitkällä aikavälillä kestävyysharjoittelun on todettu kasvattavan luustolihakseen IMCL-pitoisuutta, sillä kestävyysurheilijoiden IMCL-pitoisuus on harjoittelemattomia henkilöitä korkeampi



(Hoppeler ym., 1973; Goodpaster ym., 2001; Schrauwen-Hinderling ym., 2003; Pruchnic ym., 2004). Erään tutkimuksen mukaan kestävyysurheilijoiden luustolihasen IMCL-pitoisuus on 75 % suurempi tyypin 2 diabetesta sairastaviin yksilöihin verrattuna (van Loon ym., 2004). Tyypin I lihassolujen on raportoitu varastoivan noin kolme kertaa enemmän rasvaa verrattuna tyypin II lihassoluihin (Malenfant ym., 2001). Tutkimuksessaan van Loon ym. (2004) huomasi kuitenkin, että urheilijoiden tyypin I lihassolujen suurempi osuus tyypin 2 diabetesta sairastaviin yksilöihin verrattuna selitti rasvapitoisuuksien erosta 40 %. Ylipainoisilla ja tyypin 2 diabetesta sairastavilla yksilöillä onkin raportoitu tyypin I lihassolujen vähenemistä (Kern ym., 1990).

Korkeaa IMCL-pitoisuutta on tyypillisesti pidetty riskitekijänä luustolihasen insuliiniresistenssin ja tyypin 2 diabeteksen kehittymiselle. Tästäkin huolimatta kestävyysurheilijoiden IMCL-pitoisuus on muita korkeampi, mutta he ovat kuitenkin yleensä myös muita insuliiniherkempiä (Ebeling ym., 1993; Goodpaster ym., 2001). Insuliiniherkkyyteen vaikuttavana tekijänä pidetään myös luustolihasen oksidatiivista kapasiteettia, jonka on todettu kasvavan säännöllisen urheilun myötä (Goodpaster ym., 2001). Harjoittelemattomilla yksilöillä korkea IMCL-pitoisuus on usein yhdistetty esimerkiksi insuliiniresistenssin kehittymiseen. Goodpaster ym. (2001) pitivätkin mahdollisena, että urheilijoiden oksidatiivisen kapasiteetin kasvun avulla korkea IMCL-pitoisuus aiheuttaisi insuliiniresistenssin sijaan paremminkin insuliiniherkkyyttä. Korkean IMCL-pitoisuuden on ehdotettu toimivan lihaksen kannalta hyödyllisenä sopeutumana kestävyysurheilulle (ks. yleiskatsaus van Loon ja Goodpaster, 2006). Kestävyysurheilun seurauksena kohonnut IMCL-pitoisuus voi johtua esimerkiksi siitä, että luustolihasen hiussuonten määrä kasvaa harjoittelun myötä, mikä helpottaa rasvahappojen pääsyä lihassyhyn. Lisäksi harjoittelun seurauksena karnitiinitransferaasin määrä lisääntyy, minkä myötä rasvahappojen pääsy mitokondrioiden sisälle helpottuu (ks. yleiskatsaus Horowitz ja Klein 2000).

Kuitenkin tulokset kestävyysurheilun vaikutuksista luustolihasen rasvapitoisuuteen vaihtelevat runsaasti. Esimerkiksi Bergmanin ym. (1999) tekemän tutkimuksen mukaan harjoittelu ei kasvata luustolihasen IMCL-pitoisuutta. Myös yksilöiden välillä on havaittu runsaasti vaihtelua IMCL-pitoisuuden suhteen (Wendling ym., 1996).

#### 1.4. Kestävyysharjoittelun vaikutus luustolihakseen

Luustolihas on hyvin mukautuvainen kudos, jossa säännöllinen harjoittelu saa aikaan useita erilaisia metabolisia ja rakenteellisia muutoksia (Hoppeler ym., 1985, Phillips ym., 1996). Kestävyysharjoittelu saa aikaan muutoksia esimerkiksi luustolihasolun morfologiassa, substraattimetaboliassa sekä lihassolutyypeissä (Hoppeler ym., 1985; Howald ym., 1985). Sopeutumien tyyppiin vaikuttaa harjoittelun kesto ja tehokkuus, sekä se, kuinka usein harjoittelu on suoritettu (ks. yleiskatsaus Coffey ja Hawley 2007). Kestävyysharjoittelun seurauksena tulleet luustolihasen sopeutumiset eroavatkin suuresti voimaharjoittelun luustolihasen tuomista sopeutumisista (ks. yleiskatsaus Hoppeler, 1986).

Kestävyysharjoittelu lisää lihaksen glykogeenivarastoja sekä kasvattaa tyypin I lihassolujen määrää (Howald ym., 1985). Kestävyysharjoittelun on myös havaittu lisäävän lihaksen hiussuonten määrää, näin helpottaen lihasta pääsemään käsiksi tarvittaviin happeen sekä erilaisiin aineenvaihduntatuotteisiin pitkäkestoisenkin harjoittelun aikana (Muller, 1976; Hoppeler ym., 1985; Howlett ym., 2003). Hiussuonten pinta-alan suhde lihassolujen pinta-alaan korreloi voimakkaasti mitokondrioiden määrän kanssa, mikä viittaa siihen, että hiussuonten tiheys kasvaa lihaksen hapen kulutuksen kasvaessa (ks. yleiskatsaus Howald, 1982; Mathieu-Costello ym., 1992).

Kestävyysharjoittelun seurauksena erityisesti SS-mitokondrioiden määrän ja koon sekä SS- ja IMF-mitokondrioiden oksidatiivisen kapasiteetin on todettu kasvavan (Hoppeler ym., 1973; Hoppeler ym., 1985; Bizeau ym., 1998). Kuuden viikon kestäväsharjoittelujakson jälkeen mitokondrioiden määrä koehenkilöiden luustolihasessa (*m. vastus lateralis*) kasvoi kaikissa lihassytyypeissä (Howald ym., 1985). Kestävyysharjoittelun aiheuttama mitokondrioiden lisääntyminen on urheilijan kannalta hyödyllistä, sillä se vähentää laktaatin syntymistä sekä tehostaa jo muodostuneen laktaatin hävittämistä (ks. yleiskatsaus Hood, 2001). Tutkimusten mukaan kestäväsharjoittelu kasvattaa luustolihasen oksidatiivisten entsyymien aktiivisuutta, mikä johtuu pääasiassa lihaksen mitokondrioiden määrän lisääntymisestä (Gollnick ym., 1985; Berthon ym., 1998). Mitokondrioiden määrän lisääntymisen onkin havaittu korreloivan positiivisesti oksidatiivisten entsyymien aktiivisuuksien kasvun kanssa (ks. yleiskatsaus

Hoppeler, 1986). Muutokset luustolihasen kahdessa mitokondriopopulaatiossa, SS- ja IMF-mitokondrioissa, tapahtuvat kuitenkin eri tahdilla. SS-mitokondrioiden on huomattu sopeutuvan kestävyysharjoitteluun IMF-mitokondrioita nopeammin ja tehokkaammin (Krieger ym., 1980). Lisäksi kestävyysharjoittelu kasvattaa kristojen pinta-alaa luustolihasen mitokondrioissa (Hoppeler ym., 1973). Toistuvasti suoritettuna kestävyysharjoittelu muuttaa lihaksen fenotyyppiä ja tekee siitä rasituksessa kestävämmän (Holloszy, 1967; Hoppeler ym., 1985; ks. yleiskatsaus Adhihetty ym., 2003; ks. yleiskatsaus Coffey ja Hawley 2007).

Molekyyllitasolla kestävyysharjoittelun on todettu lisäävän metaboliaan ja mitokondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien lähetti-RNA-molekyylien määrää (Mahoney ym., 2005). Mitokondrioiden biogeneesi vaatii useiden tarkkaan säädelyjen nDNA:n ja mtDNA:n geenien yhteistyötä sekä yhtäaikaista ekspressiota (ks. yleiskatsaukset Goffart ja Wiesner 2003; Gleyzer ym., 2005). Vaikka vielä ei ole löydetty yhtä tiettyä mitokondrioiden biogeneesin kannalta oleellista transkriptiotekijää, on joitakin mitokondrioiden kannalta tärkeitä tekijöitä kuitenkin jo tiedossa. Näitä ovat esimerkiksi tuman respiratoriset tekijät 1 ja 2 (NRF-1 ja NRF2) (ks. yleiskatsaus Hood ym., 2006). NRF-transkriptiotekijöiden on todettu säätelevän useita mitokondriaalisia geenejä, mukaan lukien mitokondriaalista transkriptiotekijä A:ta, joka on välttämätön mtDNA:n transkription kannalta (ks. yleiskatsaus Gleyzer ym., 2005). NRF-transkriptiotekijöiden määrän onkin huomattu lisääntyvän kestävyysharjoittelun myötä (Baar ym., 2002).

Luustolihasen mitokondrioiden määrän on puolestaan todettu vähenevän esimerkiksi lihassairauksien tai ikääntymisen vaikutuksen lisäksi myös fyysisen aktiivisuuden puutteen vuoksi (Krieger ym., 1980). Päävastuun luustolihasen kestävyyskapasiteetin kasvusta kantaa kuitenkin suurimmalta osin mitokondrioiden biogeneesin vilkastuminen (Holloszy, 1967). Lihaksen käyttämättömyys vähentää erityisesti SS-mitokondrioiden määrää ja aiheuttaa mitokondriaalisen ATP:tä tuottavan hengityksen (engl. state III respiration) heikentymistä (Krieger ym., 1980).

Vaikka kestävyysharjoittelun onkin havaittu lisäävän merkittävästi luustolihasen mitokondrioiden tilavuusosuutta, ei voimaharjoittelulla ole havaittu olevan vastaavaa vaikutusta luustolihasen mitokondrioihin (ks. yleiskatsaus Hoppeler ja Fluck 2003).

## 1.5. Eläinmallit

Liikunnan vaikutusten tutkiminen ihmisillä on melko hankalaa ja aikaa vievää. Siksi tutkijat ovatkin kehittäneet keinotekoisesti jalostamalla erilaisia eläinmalleja, joiden avulla tuloksia voidaan saada suhteellisen nopeasti. Eläinmallien avulla voidaan tutkia jonkun tietyn yksittäisen ominaisuuden kannalta kiinnostavia fysiologisia tekijöitä.

Aerobinen suorituskyky voidaan luokitella luontaiseen ja hankittuun suorituskykyyn. Luontainen suorituskyky on pelkästään geenien aiheuttamaa, eikä sitä voida kehittää harjoittelemalla. Sen sijaan hankitulla suorituskyvyllä tarkoitetaan yksilön kykyä sopeutua harjoitteluun ja liikuntaan ja sitä voidaan kehittää harjoittelun avulla. Aerobinen suorituskyky on kokonaisvaltaisen terveyden kannalta oleellinen tekijä ja sen on havaittu olevan esimerkiksi korkeaa verenpainetta, tupakointia tai diabetesta parempi kuolleisuuden ennustaja (Myers ym., 2002).

Happimetabolian kehittymisen merkitys on ollut evoluutiossa erittäin merkittävä tekijä, joten sen pääteltiin olevan myös monimutkaisten elämänmuotojen kehittymisen ja tautien kannalta keskeistä (Britton ja Koch, 2001; ks. yleiskatsaus Koch ja Britton 2008). Britton ja Koch (2001) päättivätkin lähteä kehittämään eläinmallia, jonka avulla pystyttäisiin tutkimaan luontaisen aerobisen suorituskyvyn vaikutuksia terveyden kannalta oleellisiin ominaisuuksiin, kuten hapenottokykyyn ja sydämen toimintaan (Britton ja Koch, 2001). Tämä onnistui kehittämällä luontaiselta suorituskyvyltään geneettisesti toisistaan merkittävästi eroavia rottakantoja. Myöhemmin he kehittivät myös hankitulta aerobiselta suorituskyvyltään kaksi geneettisesti toisistaan eroavaa kantaa (julkaisematon tieto).

### 1.5.1. Luontaisen suorituskyvyn eläinmalli

Valikoivan jalostuksen keinoin kehitetyt luontaisen suorituskyvyn eläinmallien eli ns. high-capacity runners (HCR)- ja low-capacity runners (LCR)-rottien mittava kasvatus aloitettiin vuonna 1996 (Britton ja Koch, 2001). Siinä perustajapopulaationa toimi 96 heterogeenistä uros- ja 96 heterogeenistä naarasrottaa. Rottien aerobista suorituskykyä testattiin yksinkertaisten juoksumattokokeiden avulla. Näissä kokeissa 13 parhaiten ja 13 huonoiten menestyntä rottaa kummastakin sukupuolesta valittiin jatkoon ja paritettiin satunnaisesti. Perustajapopulaation parhaiten menestyneet naaraat juoksivat keskimäärin 3,1 ja urokset 3,2 kertaa huonoiten menestyneitä pidemmän matkan ennen uupumusta. Kuudennen sukupolven HCR-rotat erosivat aerobiselta juoksukapasiteetiltaan LCR-rotista 171 %, 11. sukupolven kohdalla ero oli jo 347 %. Vuoden 2007 kesäkuussa saatiin 21. sukupolvi päätökseen ja ero HCR- ja LCR-rottien aerobisen juoksukapasiteetin välillä oli 461 % (ks. yleiskatsaus Koch ja Britton, 2008).

Juoksukapasiteetin kasvu toimii merkinä siitä, että lihaksessa on tapahtunut sopeutumista kestävyysharjoittelulle. Maksimaalinen hapenottoikyky ( $V_{O_2,max}$ ) korreloi kestävyyskapasiteetin kanssa ja siinä tapahtuvien muutosten on huomattu kulkevan käsi kädessä lihaksessa tapahtuvien fysiologisten muutosten kanssa (Howlett ym., 2003). Sukupolven 15 HCR-rottien  $V_{O_2,max}$  oli LCR-rottiin verrattuna 50 % parempi (Howlett ym., 2008). Tämän pääteltiin johtuvan eroista HCR- ja LCR-rottien kapasiteetissa kuljettaa happea työskentelevään lihakseen. Myöhemmin 18. sukupolven HCR-rottien *soleus*-lihaksesta tehdyssä tutkimuksessa hiussuonten havaittiin olevan LCR-rottien lihakseen verrattuna merkittävästi tiheämmässä siten mahdollistaen hapen ja ravinteiden paremman pääsyn lihakseen (Kivelä ym., 2007).  $V_{O_2,max}$ :n lisäksi HCR- ja LCR-rotat erosivat toisistaan myös muilta terveyden kannalta oleellisilta tekijöiltä. Näitä olivat esimerkiksi insuliiniherkkyys, ruumiinpaino sekä luustolihasen oksidatiivinen kapasiteetti (Noland ym., 2007).

Tautiriskien kannalta HCR-rottien tulevaisuus näyttää LCR-rottia valoisammalta. LCR-rotilla on HCR-rottia suurempi riski sairastua sydän- tai verisuonitauteihin (Wisloff ym., 2005). Myös 18. sukupolven HCR- ja LCR-rotilla tehdyssä tutkimuksessa päädyttiin siihen

johtopäätökseen, että aerobinen suorituskyky on merkittävä tekijä erityisesti metabolisen terveyden kannalta (Kivelä ym., 2007). LCR-rotat olivat HCR-rottia huomattavasti painavampia ja niillä havaittiin metaboliseen oireyhtymään viittaavia riskitekijöitä, kuten korkeaa paastoglukoosia sekä matalaa HDL-kolesterolia. Mitokondrioihin ja erityisesti rasva-aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentyminen oli vähentynyt LCR-rotilla. Lisäksi HCR-rotat olivat halukkaampia juoksemaan juoksupyörässä ja viettivät kolmen viikon koejakson aikana siellä LCR-rottiin verrattuna 2,6 kertaa enemmän aikaa.

### **1.5.2. Hankitun suorituskyvyn eläinmalli**

Aiempien HCR- ja LCR-rottien avulla tehtyjen tutkimusten perusteella näytti siltä, että luontaisella aerobisella suorituskyvyllä olisi suuri merkitys tautien kehittymisen ja terveyden kannalta. Siksi tutkijoita alkoi kiinnostaa myös terveyden ja hankitun suorituskyvyn välinen yhteys. High response trainers (HRT)- ja low response trainers (LRT)-rotat onkin kehitetty, jotta voitaisiin tutkia hankitun suorituskyvyn merkitystä yksilön energiametabolian ja terveyden kannalta.

Steven L. Britton ja Lauren Gerard Koch Michiganin yliopistosta aloittivat HRT- ja LRT-rottien valikoivan jalostuksen vuonna 2002 (julkaisematon tieto). Silloin fenotyypitettiin 152 rottaa. Nämä rotat harjoittelivat juoksupyörissä 8 viikon ajan, minkä jälkeen harjoittelussa kehittyneimmät valittiin HRT-kannan perustajayksilöiksi ja heikoimmin kehittyneet yksilöt puolestaan LRT-kannan perustajayksilöiksi. Näistä kehitysjakauman ääripäitä edustavista rotista aloitettiin 10 HRT- ja 10 LRT-perheen jalostaminen. Siitä eteenpäin kustakin sukupolvesta fenotyypitettiin noin 200 rottaa harjoitteluvasteen perusteella ja vasteen ääripäitä edustavat rotat valittiin seuraavan sukupolven perustajiksi.

Tällä hetkellä HRT- ja LRT-rottien jalostuksessa ollaan menossa 8. sukupolven kohdalla. Näiden kahden eri kannan rottien ei ole havaittu eroavan luontaisessa suorituskyvyssä, mutta sen sijaan hankitun suorituskyvyn kannalta eroja on jo syntynyt HRT- ja LRT-rottien välille. Kahdeksannen sukupolven HRT-rotat juoksivat 1. sukupolven HRT-rottiin verrattuna

137  $\pm$ 17 m enemmän. Vastaavasti 8. sukupolven LRT-rotat juoksivat 1. sukupolven LRT-rottiin verrattuna 109  $\pm$ 14 m vähemmän. HRT-rottien harjoitteluvaste on kehittynyt keskimäärin 22  $\pm$ 3 %, LRT-rottien harjoitteluvasteen kehitys oli puolestaan tippunut 15  $\pm$ 2 %. Lisäksi 80 %:lla 8. sukupolven HRT-rotista suorituskyvyn muutos oli keskiarvoa suurempi. Vastaavasti 8. sukupolven LRT-rotista 78 %:lla suorituskyky oli keskiarvoa heikompi. Se, mitkä tekijät tarkalleen ottaen aiheuttavat eroja näiden rottakantojen harjoitteluvasteessa, on vielä epäselvää. Yksi selittävä tekijä voi olla esimerkiksi harjoittelumotivaatio. HRT-rotat juoksivatkin vielä julkaisemattoman tiedon mukaan LRT-rottia halukkaammin häkissä, jossa juoksupyörä oli vapaasti käytettävissä. Vapaaehtoisen juoksupyöräharjoittelun aiheuttamat fysiologiset muutokset ovat yksi tutkijoiden kiinnostuksen kohteista tällä hetkellä.

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää vapaaehtoisen aerobisen harjoittelun vaikutusta HRT- ja LRT-rottien luustolihasen hienorakenteeseen.

Tutkimuskysymykset:

1. Miten vapaaehtoinen aerobinen harjoittelu vaikuttaa SS-mitokondrioiden määrään?
2. Onko SS-mitokondrioiden määrän ja vapaaehtoisen juoksukertymän tai maksimaalisen juoksutestin välillä tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota?
3. Miten vapaaehtoinen aerobinen harjoittelu vaikuttaa IMF-mitokondrioiden määrään?
4. Miten vapaaehtoinen aerobinen harjoittelu vaikuttaa solunsisäisen rasvan määrään?



## 3. Materiaalit ja menetelmät

### 3.1. Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytettiin HRT- ja LRT- kantojen 15 kuukauden ikäisiä 8. sukupolven naarasrottia (eläinkoeluvan numero ESLH-2007-06894/Ym-23). Rotat tilattiin Michiganin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan laboratoriosta ja niiden annettiin sopeutua uuteen ympäristöön viikon ajan ennen kokeiden alkamista. Kokeessa oli mukana yhteensä 24 eläintä, joista 12 eläintä kuului HRT-kantaan ja 12 LRT-kantaan. HRT-kannan rotista puolet asui häkissä, jossa oli juoksupyörä vapaasti käytettävissä (koeryhmä HRT-R) ja puolet asui häkissä, jossa juoksupyörää ei ollut (kontrolliryhmä HRT-C). LRT-rotilla tilanne oli vastaavanlainen. Koe-asetelma on esitetty taulukossa 1. Juoksijaryhmien HRT-R- ja LRT-R-rottien vapaaehtoisen juoksun määrä mitattiin kokeen ajan päivittäin (67 päivää).

**Taulukko 1. Koe-asetelma.** HRT-kannan rotat jaettiin juoksijoiden ryhmään (HRT-R) ja kontrolliryhmään (HRT-C), joihin molempiin kuului 6 eläintä. Myös LRT-kannan rotista puolet kuului juoksijoiden ryhmään (LRT-R) ja puolet eläimistä kontrolliryhmään (LRT-C).

	<b>Koe</b> (juoksupyörä käytettävissä)	<b>Kontrolli</b> (ei juoksupyörää)
HRT	HRT-R (6 eläintä)	HRT-C (6 eläintä)
LRT	LRT-R (6 eläintä)	LRT-C (6 eläintä)

Maksimaalinen juoksutesti suoritettiin kaikille koe-eläimille juoksumatalla 1 asteen kulmassa juoksumatolla, jonka vauhtia lisättiin joka kolmas minuutti 1 m/min. Rottien juoksema matka ennen uupumusta kirjattiin ylös.

### 3.2. Näytteiden fiksointi ja leikkaus

Eläimet tainnutettiin hiilidioksidilla, lopetettiin sen jälkeen dekapitaatiolla ja preparoitiin mahdollisimman nopeasti. Näytteet elektronimikroskopialle otettiin *soleus*-lihaksen keskeltä, pilkottiin partakoneenterällä fiksaatiivipisarassa (3 % glutaraldehydi 0,1 M fosfaattipuskurissa, pH 7,4) ja fiksoitiin sen jälkeen 2-3 tuntia jääkaapissa. Jälkifiksointi tehtiin 1 % osmiumtetroksidilla 0,1 M fosfaattipuskurissa (pH 7,4) 4°C:ssa yhden tunnin ajan. Näytteet värjättiin 2 % uranyliasetaatilla *en block*, vesi poistettiin etanolin avulla ja näytteet valettiin Epon LX-112-petausaineeseen (Ladd). Ohutleikkeiden leikkauksen ultramikrotomilla suoritti Virpi Miettinen Kuopion yliopiston BioMater-keskuksesta. Leikkeitä värjättiin uranyliasetaatissa 30 minuutin ajan ja lyijysitraatissa 2 minuutin ajan. Ohutleikkeiden lisäksi leikattiin myös puoliohutleikkeitä. Puoliohutleikkeille suoritettiin toluidiinivärjäys (15 min).

### 3.3. Näytteiden mikroskopointi ja kuvaaminen

Puoliohutleikkeet tarkastettiin ja kuvattiin valomikroskoopilla (Leitz DMRBE). Näytteistä arvioitiin solukalvonalaisten mitokondrioiden runsautta käyttämällä asteikkoa 1-3 siten, että asteikon 1 soluissa mitokondrioiden määrä oli pienin ja asteikon 3 soluissa mitokondrioiden määrä oli suurin. Näytteet tutkittiin käyttämällä 40-kertaista objektiivia. Arviointia hankaloitti toluidiinivärjäyksen epätasaisuus näytteiden välillä sekä tuman värjäytyminen mitokondrioiden kaltaisesti. Arviointi suoritettiin tietämättä, minkä ryhmän leikkeet olivat kyseessä.

Elektronimikroskooppinäytteet tarkasteltiin ja kuvattiin läpivalaisuelektronimikroskoopilla (Jeol JEM 1200-EX, kamera: Veleta). SS-mitokondriot kuvattiin 3000-kertaisella primaarisuurenoksella. Kuvat otettiin yleensä solun ”kärjestä”, sillä silloin solukalvoa saatiin kuvaan mukaan mahdollisimman pitkältä matkalta. IMF-mitokondrioiden analysointia varten solut kuvattiin 5000-kertaisella primaarisuurenoksella satunnaisesti kohdasta, missä oli

vähiten analysointia häiritseviä tekijöitä, kuten sakkaa. Solunsisäisen rasvan analysointiin käytettiin samoja kuvia kuin IMF-mitokondrioiden analysointiin.

Kustakin näytteestä oli kolme joko 100 mesh- tai 200 mesh-hilaa. Paras leike kunkin näytteen parhaalta hilalta valittiin kuvattavaksi. Yhden näytteen solut kuvattiin siis vain yhdeltä leikkeeltä. Soluja kuvattaessa pidettiin tarkasti huolta siitä, ettei samaa solua kuvattu kahta tai useampaa kertaa. Tämä onnistui siten, että leikkeestä ja sen soluista piirrettiin tarkka kartta ruutupaperille, johon merkittiin kuvattavat solut. Kuvatut solut merkittiin karttaan, eikä jo kuvattua solua siten ollut mahdollista sekoittaa kuvaamattomaan soluun. Yhdestä näytteestä kuvattiin keskimäärin 15–25 solua.

### **3.4. Kuvien analysointi**

Vaikka kuvia saatiinkin useimmista elektronimikroskooppinäytteistä yli 20 kappaletta, otettiin analyysiin satunnaisesti valitsemalla 10–12 kuvausteknisesti parhaiten onnistunutta kuvaa. Mitokondrioiden osalta kuvia analysoitiin yhteensä 546 kpl ja solunsisäisen rasvan osalta 261 kpl. Kuvien analysointiin käytettiin Olympus-laitevalmistajan analySIS-tuoteperheen iTEM-ohjelman versiota 5.0.

SS-mitokondrioista otetuista kuvista laskettiin kalvonalaisen mitokondrioiden pinta-alan ( $\mu\text{m}^2$ ) suhde solukalvon pituuteen (1000  $\mu\text{m}$ ). Kaikki solukalvonalaiset mitokondriokerääntymät, joissa mitokondrioita oli yhdessä viisi tai enemmän, otettiin mukaan laskentaan. Solun sisältä otetuista kuvista laskettiin mitokondrioiden pinta-alan suhde kokonaispinta-alaan ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ) sekä rasvan osuus kokonaispinta-alasta ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ ).

### 3.5. Tilastoanalyysi

Tilastoanalyysiin käytettiin SPSS 16.0-ohjelmaa. Rottaryhmien välisiä eroja kummankin mitokondriopopulaation (SS- ja IMF-mitokondriot) ja solunsisäisen rasvan kohdalla testattiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (One-way ANOVA). Varianssianalyysin oletukset olivat kaikkien ryhmien osalta kunnossa, ainoastaan solunsisäisen rasvan kohdalla samavarianssisuus-ehto ei täytynyt. Tästä huolimatta solunsisäisen rasvan kohdalla päädyttiin varianssianalyysiin.

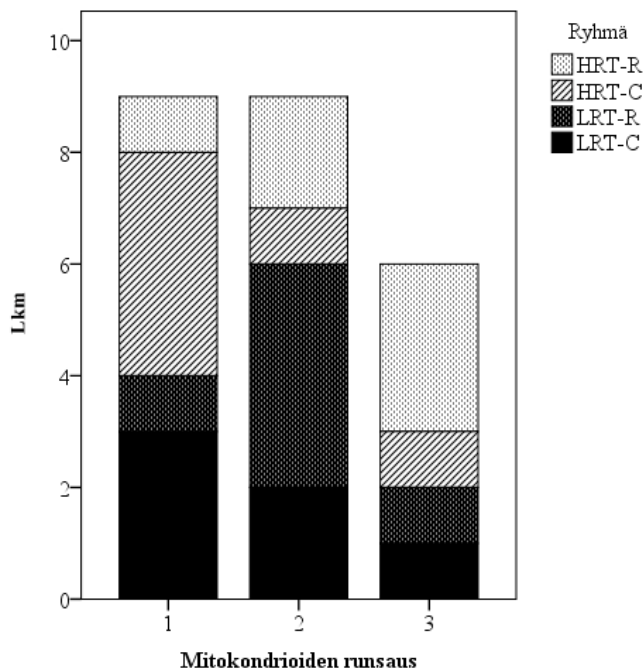
Nollahypoteesina ( $H_0$ ) oli ”ryhmien välillä ei tilastollisesti merkitsevää eroa” ja vastahypoteesina ( $H_1$ ) ”ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevä ero”. Mikäli varianssianalyysin perusteella päädyttiin  $H_0$ :n hylkäämiseen, tilastollisesti merkitsevästi eroavat ryhmät selvitettiin käyttämällä Post Hoc-testinä Tukey-menetelmää.

Koska kyseessä oli hyvin pieni otoskoko, käytettiin juoksumäärän sekä maksimaalisen juoksutestin tuloksen ja SS-mitokondrioiden määrän välistä korrelaatiota testattaessa Pearsonin korrelaatiokerroimen sijasta Spearmanin korrelaatiokerrointa.

## 4. Tulokset

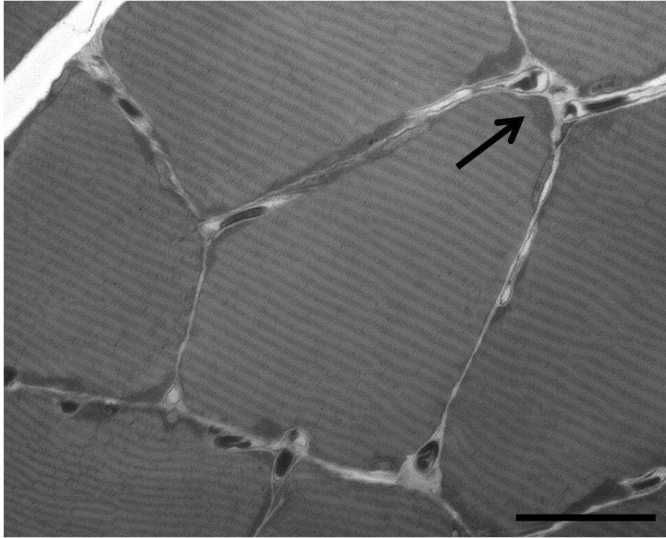
### 4.1. Solukalvonalaiset mitokondriot

*Puoliohutleikkeet.* SS-mitokondrioiden määrää arvioitiin valomikroskoopin avulla puoliohutleikkeistä. Runsauden arvioinnin tulokset ovat jo suuntaa antavia (kuva 7). Yhdeksän eläimen mitokondrioiden määrä arveltiin vähäiseksi (asteikko 1). Näistä yhdeksästä eläimestä suurin osa kuului kontrolliryhmiin, kolme eläintä LRT-C-ryhmään ja neljä eläintä HRT-C-ryhmään. Niin ikään yhdeksän eläimen kohdalla mitokondrioiden runsauden arveltiin olevan keskivertoa (asteikko 2). Tähän runsausasteeseen määritellyt eläimet olivat peräisin melko tasaisesti jokaisesta neljästä ryhmästä. Eniten mitokondrioita (asteikko 3) esiintyi kuuden eläimen kohdalla. Näistä kuudesta eläimestä puolet kuului HRT-R-ryhmään.

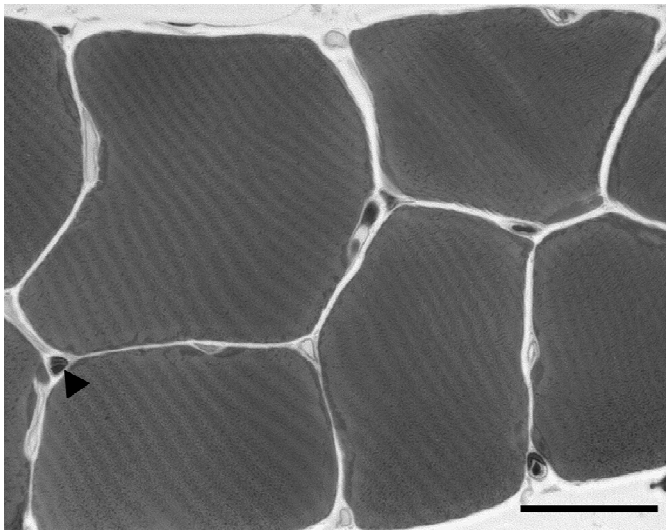


**Kuva 7. Puoliohutleikkeistä tehty arvio SS-mitokondrioiden runsaudesta.** Arviointiin käytettiin seuraavanlaista asteikkoa: 1 = vähän mitokondrioita, 2 = mitokondrioita keskiverroksi, 3 = mitokondrioita runsaasti. Pystyakselilla on kuvattuna havaittujen eläinten lukumäärä. Kontrolliryhmistä HRT-C ja LRT-C löytyi eniten vähän mitokondrioita sisältäviä eläimiä. Keskiverroksi mitokondrioita sisältäviä eläimiä oli eniten ryhmässä LRT-R. Eläimiä, joiden mitokondrioiden määrä arvioitiin olevan runsas, löytyi eniten ryhmästä HRT-R.

Valomikroskoopilla otetuissa kuvissa nähdään useita luustolihasen soluja, joista on erotettavissa solukalvon alle keräytyneitä mitokondrioita (kuvat 8 ja 9). Erot eniten SS-mitokondrioita sisältäneiden ja vähiten SS-mitokondrioita sisältäneiden solujen välillä olivat pienelläkin suurennoksella helposti havaittavissa.

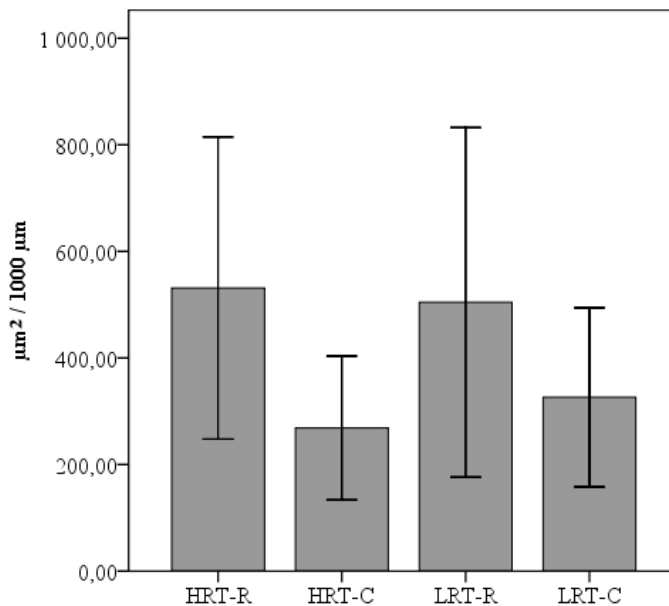


**Kuva 8. Valomikroskooppikuva HRT-rotan luustolihasen puoliohutleikkeestä.** Näissä luustolihasen soluissa solukalvonalaista mitokondrioita oli silminnähtävää runsaasti. SS-mitokondrioiden runsautta arvioivalla asteikolla 1-3 (1 = vähän mitokondrioita, 2 = mitokondrioita keskiverrosta, 3 = mitokondrioita runsaasti) tämän HRT-kantaan kuuluneen juoksija-rotan mitokondrioiden runsaus määriteltiin olevan asteikolla 3. Runsaista mitokondriokerääntymiä onkin havaittavissa tummempana erottuvina ryhmittyminä erityisesti solujen kärjissä (nuoli). Mittajanan pituus 30 µm.



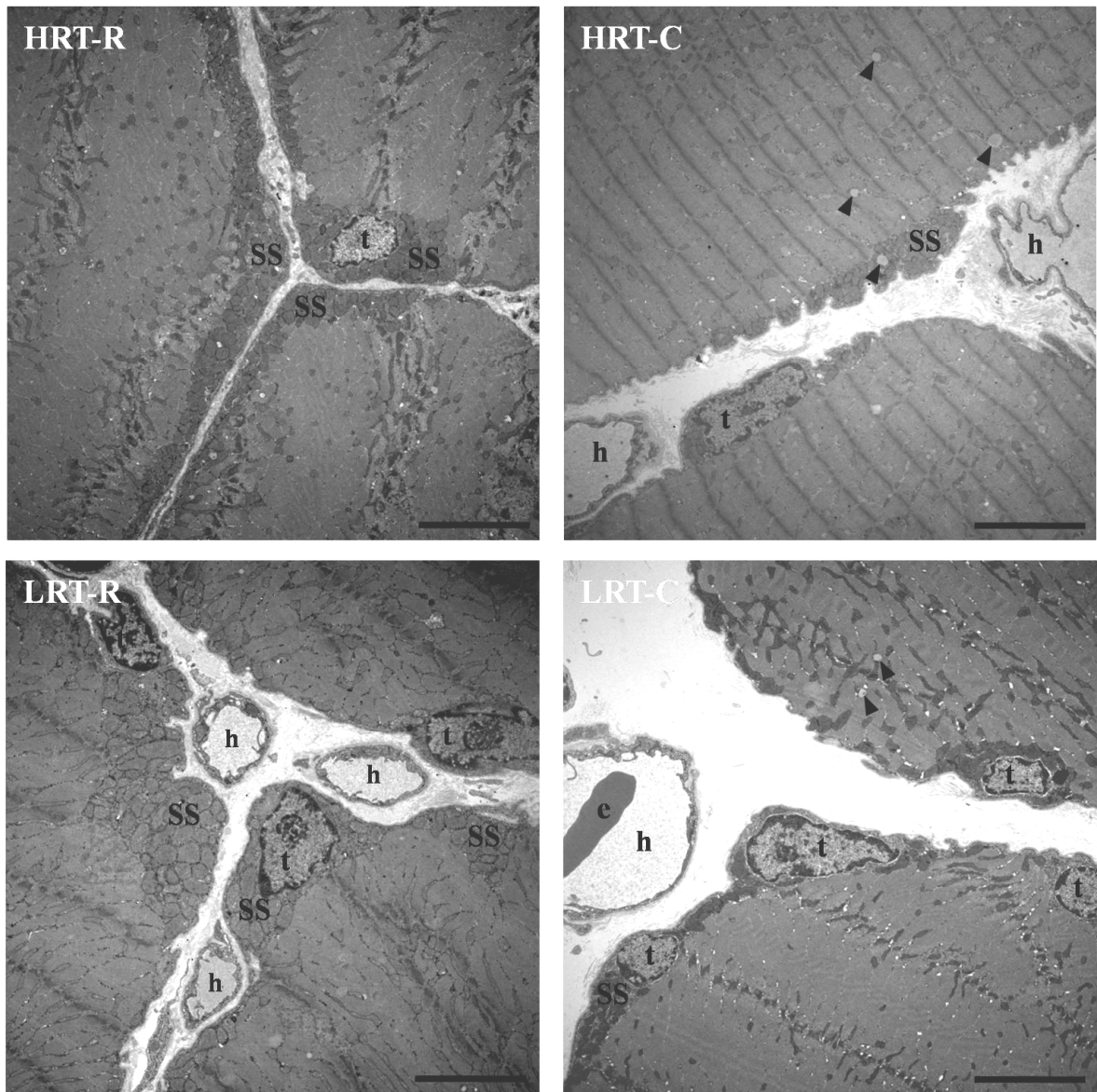
**Kuva 9. Valomikroskooppikuva LRT-kantaan kuuluneen rotan luustolihasen puoliohutleikkeestä.** Tämän LRT-kannan kontrolli-ryhmään kuuluneen rotan solukalvonalaisten mitokondrioiden runsaus arvioitiin olevan asteikolla 1. Luustolihas soluissa ei ollut havaittavissa suuria mitokondriokerääntymiä. Solujen välissä oleva hiussuoni on merkitty nuolenpäällä. Mittajanan pituus 30 µm.

*Ohutleikkeet.* Solukalvonalaisen mitokondrioiden pinta-alan määrän ( $\mu\text{m}^2$ ) suhteesta solukalvon pituuteen (1000  $\mu\text{m}$ ) lasketun suhdeluvun perusteella piirrettyjen pylväiden perusteella huomataan, että ryhmien välillä on eroja (kuva 10). Erityisen suuria erot näyttäisivät olevan juoksija- ja kontrolliryhmien välillä. Myös varianssianalyysissä havaittiin, että tilastollisesti merkitseviä eroja löytyy ( $P < 0,05$ ) ja  $H_0$  hylättiin. Ryhmien sisällä esiintyi runsaasti hajontaa (kuva 10).



**Kuva 10. SS-mitokondrioiden pinta-alan suhde solukalvon pituuteen ( $\mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}$ ).** Pylväät kuvaavat SS-mitokondrioiden määrän keskiarvoa, mittajanan kuvassa keskihajontaa. Sekä HRT-R- että LRT-R-ryhmien rotilla SS-mitokondrioita on kontrolliryhmiin verrattuna huomattavasti enemmän. Koe-ryhmien HRT-R ja LRT-R välillä ei näyttäisi olevan suurta eroa. Kontrolliryhmät HRT-C ja LRT-C eroavat vain hieman toisistaan. HRT-R- ja LRT-R-ryhmien sisällä näyttäisi olevan eniten hajontaa eläinten välillä.

Ryhmien väliset erot SS-mitokondrioiden määrässä ovat hyvin havaittavissa elektronimikroskooppikuvissa (kuva 11). Juoksijaryhmien (HRT-R ja LRT-R) rotilla SS-mitokondriot olivat usein kerääntyneet erittäin suurikokoisiksi ryhmittymiksi solun ”kärkiosiin”. Kontrolliryhmilläkin (HRT-C ja LRT-C) kerääntymisiä esiintyi, mutta ne olivat huomattavasti juoksijaryhmien SS-mitokondriokerääntymiä pienempiä.



**Kuva 11. SS-mitokondrioita rottaryhmien luustolihaksesta.** Juoksijaryhmien (HRT-R ja LRT-R) SS-mitokondriokerääntymät olivat merkittävästi kontrolliryhmien (HRT-C ja LRT-C) mitokondriokerääntymiä kookkaampia. Erityisesti LRT-R-ryhmän rotan luustolihaksesta otetussa kuvassa on nähtävissä mitokondriokerääntymien hakeutuminen hiussuonten läheisyyteen. Kuviin on merkittynä suurimmat SS-mitokondriokerääntymät (SS). Nuolenpäällä on osoitettuna solunsisäisiä rasvapisaroiita. e; punasolu, h; hiussuoni, t; tuma. Mittajan pituus 5  $\mu\text{m}$ .



Ryhmien välisen Tukey-testillä tehdyn parittaisen vertailun tulokset näkyvät taulukosta 2. Taulukosta 2 huomataan tulosten olevan johdonmukaisia. Molempien kantojen koe-ryhmät eroavat saman kannan kontrolliryhmästä tilastollisesti merkitsevästi. Lisäksi koeryhmät ja kontrolliryhmät eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Jos merkitsevyystaso testissä olisi 10 %, olisi ero tilastollisesti merkitsevä molempien kantojen koeryhmän ja LRT-kannan kontrolliryhmän välillä.

**Taulukko 2. Kooste SS-mitokondrioiden parittaisen vertailun tuloksista (Tukey).** Taulukosta nähdään parittaisen vertailun tilastollisesti merkitsevät tulokset riskitasoilla 5 %, 10 % sekä ryhmäparit, joiden välillä ei havaittu olevan tilastollisesti merkitsevää eroa ( $P > 0,1$ ). Tilastollisesti 5 % merkitsevyystasolla toisistaan erosivat molempien kantojen juoksijaryhmät HRT-C-ryhmästä. 10 % merkitsevyystasolla toisistaan erosivat molempien kantojen juoksijaryhmät ja LRT-C-ryhmä. Tilastollisesti merkitsevää eroa ei löytynyt HRT-R- ja LRT-R-ryhmien sekä HRT-C ja LRT-C-ryhmien väliltä.

Tilastollinen merkitsevyys	$P < 0,05$ *	$0,5 < P < 0,1$ **	$P > 0,1$ ***
	HRT-R	HRT-R	HRT-R
	HRT-C	LRT-C	LRT-R
	LRT-R	LRT-R	HRT-C
	HRT-C	LRT-C	LRT-C

\* Ero tilastollisesti merkitsevä tasolla 5 %

\*\* Ero tilastollisesti merkitsevä tasolla 10 %

\*\*\* Ero ei tilastollisesti merkitsevä

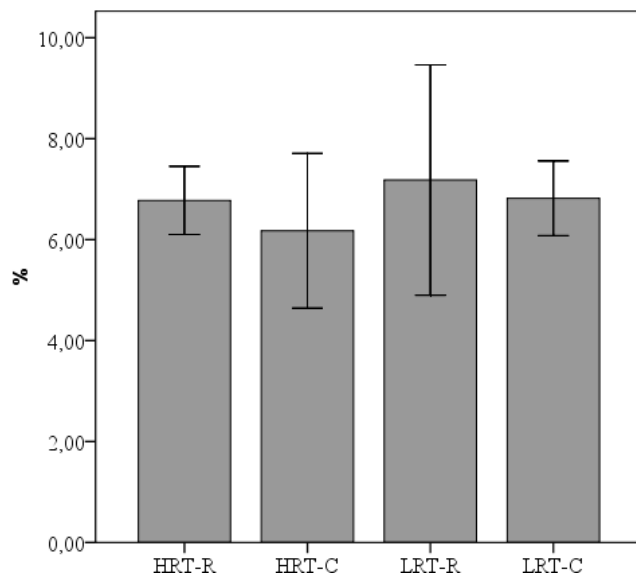
Vapaaehtoisen juoksukertymän ja maksimaalisen juoksutestin yhteys SS-mitokondrioiden määrään. Tuloksissa havaittiin vahvaa positiivista korrelaatiota ( $r = 0,886$ ,  $P < 0,01$ ) LRT-R-ryhmän rottien juoksumäärän ja SS-mitokondrioiden välillä. HRT-R-ryhmän rottien kohdalla vastaavaa tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota ei ollut havaittavissa ( $r = 0,429$ ,  $P < 0,2$ ). Kummankaan juoksijaryhmän kohdalla ei havaittu tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota SS-mitokondrioiden ja maksimaalisen juoksutestin tulosten välillä. Vapaaehtoisen juoksun kertymä, maksimaalisen juoksutestin tulos sekä saman eläimen SS-mitokondrioiden määrä on esitetty taulukossa 3.

**Taulukko 3. Vapaaehtoinen juoksukertymä, maksimaalisen juoksutestin tulos sekä SS-mitokondrioiden määrä.** Taulukossa on esitettyä kunkin eläimen vapaaehtoisen juoksun kertymä 67 päivän koejakson ajalta, maksimaalisen juoksutestin tulos sekä saman eläimen SS-mitokondrioiden määrä ( $\mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}$ ). Tuloksissa oli havaittavissa vahvaa korrelaatiota LRT-R-ryhmän eläinten juoksukertymän ja mitokondrioiden määrän välillä.

Ryhmä	Vapaaehtoisen juoksun kertymä (km)	Maksimaalisen juoksutestin tulos (m)	SS-mitokondrioiden määrä ( $\mu\text{m}^2/1000 \mu\text{m}$ )
HRT-R	447,09	ei tulosta	633,41
	376,88	1856,00	739,29
	596,14	614,25	519,46
	40,52	355,00	414,92
	625,70	190,50	530,65
	90,49	785,00	349,48
LRT-R	437,77	172,67	438,41
	746,44	639,00	629,45
	166,36	328,33	348,21
	173,28	484,00	556,47
	526,16	1667,00	735,20
	145,12	1194,00	319,65

## 4.2. Solunsisäiset mitokondriot

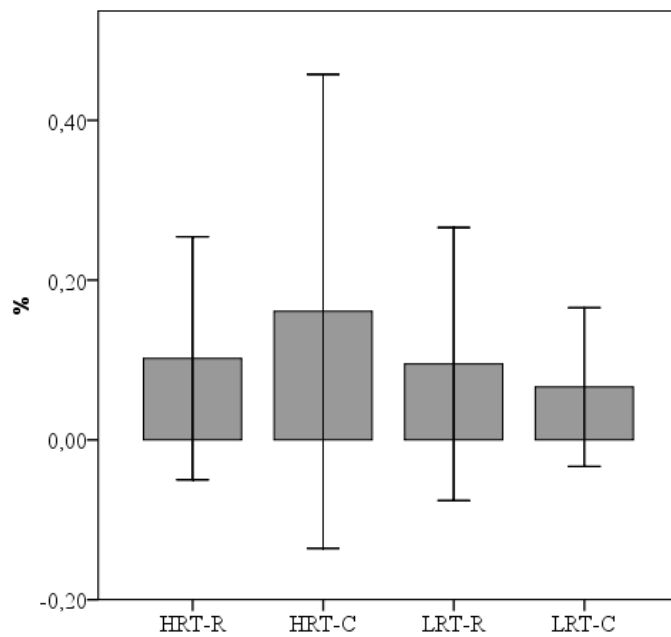
Solunsisäisten mitokondrioiden keskimääräinen osuus solun kokonaispinta-alasta oli suurin LRT-R-ryhmän eläimillä ja pienin HRT-C-ryhmän eläimillä (kuva 12). Myös juuri näiden ryhmän eläinten välillä esiintyi eniten hajontaa. Vaikka eroja ryhmien välillä olisikin kuvan x pylväiden mukaan hieman havaittavissa, eivät erot varianssianalyysin perusteella yltäneet tilastolliseen merkitsevyyteen ( $P > 0,1$ ).



**Kuva 12. IMF-mitokondrioiden osuus kokonaispinta-alasta (%).** Kuvassa on esitettyä kunkin ryhmän IMF-mitokondrioiden keskimääräinen osuus pylväänä, mittajanat kuvaavat keskihajontaa. IMF-mitokondrioiden osalta ryhmät ovat hyvin samankaltaisia. Pientä eroa näyttäisi pylväiden perusteella olevan juoksijaryhmien ja kontrolliryhmien välillä. Erot eivät kuitenkaan olleet riittävän suuria ollakseen tilastollisesti merkitseviä. Eniten hajontaa löytyy LRT-R-ryhmän eläimistä.

### 4.3. Solunsisäinen rasva

Solunsisäisen rasvan määrässä ei varianssianalyysin perusteella havaittu olevan eroja ryhmien välillä ( $P > 0,1$ ). Tuloksissa oli havaittavissa runsaasti hajontaa saman ryhmän eläinten välillä (kuva 13).



**Kuva 13. Solunsisäisen rasvan osuus kokonaispinta-alasta (%).** Kuvan diagrammissa rasvan keskimääräistä osuutta kuvaavat rottaryhmittäin piirretyt pylväät. Mittajanat esittävät keskihajontaa. Kaikissa ryhmissä, erityisesti HRT-C-ryhmässä on havaittavissa erittäin runsaasti hajontaa eläinten välillä. HRT-C-ryhmän eläimillä näyttäisi olevan keskimääräisesti eniten solunsisäistä rasvaa, mutta muihin ryhmiin verrattaessa eron ei kuitenkaan todettu olevan tilastollisesti merkitsevä.

## 5. Tulosten tarkastelu

### 5.1. Solukalvonalaiset mitokondriot

Merkittäviä eroja eri ryhmien SS-mitokondrioiden määrän välillä oli havaittavissa jo puoliohuteleikkeitä tarkasteltaessa. Ohuteleikkeistä saatuja tuloksia tutkittaessa todettiin erojen olevan joidenkin ryhmien välillä merkitseviä. Erityisen merkitseviä erojen havaittiin olevan molempien juoksijaryhmien ja HRT-C-ryhmän välillä. LRT-C-ryhmään verrattuna juoksijakannat erosivat tilastollisesti merkitsevästi ainoastaan 10 % merkitsevyytasolla, eikä tulos siksi yltänyt varsinaiseen tilastolliseen merkitsevyyteen.

Se, että juoksijaryhmien ero oli merkitsevä nimenomaan HRT-C-ryhmään eikä LRT-C-ryhmään verrattuna, voi johtua esimerkiksi Troxellin ym. (2003) tekemästä havainnosta liittyen geeneihin, jotka vastaavat harjoitteluvasteeseen sopeutumisesta. Heidän mukaansa vähemmän harjoitteleiden yksilöiden ”alhaisen” harjoitteluvasteen kehittymisestä vastaavista geeneistä suurin osa ei ole aiemmin aktivoitunut ja siten aktivoituessaan tuottaa suuremman kasvun harjoitteluvasteessa jo pienelläkin harjoittelulla. Yksilöt, joiden harjoitteluvaste on jo alun perinkin ollut kehittyneempi, täytyy harjoitella paljon enemmän, saadakseen saman kasvun harjoitteluvasteessa. Troxellin ym. (2003) mukaan tämä johtuu siitä, että ”alhaisen” harjoitteluvasteen geenit ovat näillä yksilöillä aktivoituneet jo aiemmin eivätkä siten aiheuta nopeaa harjoitteluvasteen kehittymistä. HRT-kannan kontrolliryhmän yksilöiden olisi siis kenties pitänyt harjoitella LRT-kannan kontrolliryhmään verrattuna huomattavasti enemmän. Tätä Troxellin ym. (2003) väitettä tukee se, että vaikka LRT-rotat juoksivat kolmen kuukauden koejakson aikana HRT-rottia vähemmän, vaste harjoittelulle näyttäisi mitokondrioiden osalta olevan sama HRT- ja LRT-juoksijoiden kohdalla, sillä HRT-R- ja LRT-R-kannat eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. LRT-rotat näyttävät saavuttaneen HRT-rottien kanssa samankaltaisen vasteen vähemmällä harjoittelulla.

Tutkimusryhmämme on mitannut myös korkean luontaisen aerobisen kapasiteetin omaavilla HCR-rotilla alhaisen juoksukapasiteetin LCR-rottiin verrattuna huomattavasti suuremman

(96 %) määrän SS-mitokondrioita (julkaisematon tieto). Harjoitteluprotokollat olivat tutkimuksessa rottakannoilla samanlaiset, ero SS-mitokondrioiden määrässä näyttää siis kehittyneen puhtaasti geneettisten tekijöiden tuloksena. HCR- ja LCR-rotilla tehdystä tutkimuksesta poiketen, tässä tutkimuksessa kyse on pikemminkin siitä, että harjoitteluympäristö aiheuttaa eroja HRT- ja LRT-rottien välille. Kontrolliryhmät eivät eronneetkaan toisistaan merkitsevästi. Tämän tutkimuksen perusteella näyttää siten siltä, että HRT- ja LRT-kannat eivät eroa luontaiselta aerobiselta kapasiteetiltaan, vaan erot ovat kehittyneet puhtaasti siitä syystä, että kantojen harjoitteluvasteen kehittymisessä on eroja.

Tässä tutkimuksessa SS-mitokondrioiden määrän vaihtelu ryhmien välillä oli melko suurta. Ihmisillä tehdyissä kaksostutkimuksissa on havaittu harjoitteluvasteessa esiintyvän vaihtelun olevan 6-9 kertaa suurempaa monotsygoottisten kaksosparien välillä verrattuna kaksosten välillä havaittuun vaihteluun (Bouchard ym., 1997). Tämä viittaa siihen, että harjoitteluvasteessa havaittu runsas vaihtelu johtuisi nimenomaan geneettisistä eroista yksilöiden välillä. Harjoitteluvasteen maksimaalisen periytyvyyden on arvioitu olevan 47 %, maternaalisen periytyvyyden ollessa 28 % (Bouchard ym., 1999). Tämä onkin herättänyt kysymyksen siitä, kuinka suuri osuus mitokondriaalisella DNA:lla on harjoitteluvasteen määrittelyssä ja siinä havaitussa vaihtelussa (Bouchard ym., 1999).

Myös tässä tutkimuksessa ainoastaan LRT-R-rotilla havaittu vapaaehtoisen juoksumäärän ja SS-mitokondrioiden määrän välinen vahva positiivinen korrelaatio viittaisi siihen, että LRT-rottien mitokondrioilla on taipumus sopeutua HRT-rottien mitokondrioita tehokkaammin ja nopeammin harjoittelulle. Kenties tässäkin on osasyynä jo aiemmin mainittu väite ”alhaisen” ja ”korkean” vasteen geeneistä (Troxell ym., 2003).

SS-mitokondrioiden merkitys terveyden kannalta näyttäisi olevan merkittävä. Ritov ym. (2005) havaitsivat SS-mitokondrioiden toimintahäiriöitä, kuten heikentynyttä elektroninsiirtoketjun aktiivisuutta tyypin 2 diabeteksesta ja ylipainosta kärsivillä yksilöillä. Luustolihasen mitokondrioiden on lisäksi havaittu olevan tyypin 2 diabetesta sairastavilla ja ylipainoisilla henkilöillä pienentyneitä sekä morfologialtaan muuttuneita ja hajonneita (Kelley ym., 2002). Kelley ym. (2002) esittivätkin, että mitokondrioiden heikentyneen toiminnan

yhteys luustolihaksen insuliiniresistenssiin voisi johtua esimerkiksi luustolihakseen kerääntyneestä rasvasta. Rasvan kerääntymisen on havaittu korreloivan heikentyneen oksidatiivisen kapasiteetin kanssa tyypin 2 diabetesta sairastavilla ja ylipainoisilla henkilöillä (He ym., 2001). Kelleyn ym. (2002) mukaan rasvan kerääntyminen luustolihakseen johtuisi nimenomaan mitokondrioiden vähentyneestä määrästä tai niiden toiminnan heikentymisestä. Sen lisäksi, että tutkittavat henkilöt sairastivat tyypin 2 diabetesta ja olivat ylipainoisia, yhdeksi mitokondrioiden pienentymisen ja muuttumisen syyksi he esittivät myös liikunnan puutetta (Kelley ym., 2002).

Tämän tutkimuksen perusteella, aerobista liikuntaa lisäämällä SS-mitokondrioiden määrää saadaan kasvatettua ja sitä kautta riski sairastua esimerkiksi tyypin 2 diabetekseen vähenee. Mitokondrioiden määrä toimiikin hyvänä merkinä harjoitteluvasteen kehittymisestä, sillä  $V_{O_{2,max}}$ :n kasvun on todettu olevan riippuvainen mitokondrioiden määrän lisääntymisestä (Robinson ym., 1994).

## 5.2. Solunsisäiset mitokondriot

Tässä tutkimuksessa ryhmien ei havaittu eroavan IMF-mitokondrioiden osalta merkitsevästi. Pieniä eroja näyttää keskiarvoista ja keskihajonnasta piirrettyjen pylväiden perusteella juoksija- ja kontrolliryhmien välillä olevan ja otoskokoa kasvattamalla olisivat mahdolliset erot ehkä tulleet voimakkaammin näkyviin. Aiemmassa luontaisen suorituskyvyn rotilla tehdyssä tutkimuksessa oli korkean vasteen rottien IMF-mitokondrioiden määrä 32 % alhaisen vasteen rottia suurempi (julkaisematon tieto). Näiden tulosten perusteella näyttäisi siltä, IMF-mitokondrioiden sopeutuminen harjoitteluun tapahtuu SS-mitokondrioihin verrattuna hyvin hitaasti tai kenties mitokondrioiden määrällisen kasvun sijaan jollain muulla tavoin.

Solunsisäiset mitokondriot ovat tutkimusten perusteella vastuussa pääasiassa lihaksen supistumiseen tarvittavan ATP:n synteesistä (Cogswell ym., 1993). Tähän viittaa myös se, IMF-mitokondrioiden ATP:tä tuottavan mitokondriaalisen hengityksen on mitattu etenevän

kaksi kertaa SS-mitokondrioita nopeammalla tahdilla (Lombardi ym., 2000). IMF-mitokondrioiden hitaampaan sopeutumiseen viittaa myös se, että lihaksen käyttämättömyys ei aiheuttanut merkittäviä muutoksia mitokondriaalisessa hengityksessä (Krieger ym., 1980). Samassa tutkimuksessa havaittiin, että myöskään kestävyysharjoittelu ei muuttanut tämän mitokondriopopulaation mitokondriaalista hengitystä suuntaan tai toiseen. IMF-mitokondrioiden ei olekaan todettu lisääntyvän määrällisesti niin nopealla tahdilla, kuin SS-mitokondrioiden on havaittu lisääntyvän kestävyysharjoittelun seurauksena (Hoppeler ym., 1973; Krieger ym., 1980).

Mistä tällainen sopeutumisen hitaus IMF-mitokondrioiden kohdalla sitten johtuu? Oletettavaa olisi, että näissä supistumiseen energiaa tuottavissa mitokondrioissa kestävyysharjoittelun vaikutukset näkyisivät selkeästi kasvaneena oksidatiivisena kapasiteettina eli mitokondrioiden määrän lisääntymisenä. Luontaisen kapasiteetin kohdalla erot IMF-mitokondrioiden määrässä olivat kuitenkin selkeästi havaittavissa korkean ja alhaisen vasteen rottien välillä (Kivelä ym., 2007). IMF-mitokondrioiden kohdalla kyse voikin olla siitä, että niiden ominaisuudet periytyvät eikä harjoittelu aiheuta niissä merkittävää tai ainakaan nopeaa vastetta.

### **5.3. Solunsisäinen rasva**

Veren mukana rasvakudoksesta lihakseen tulevien rasvahappojen hyödyntäminen lihaksen rasvaoksidaatiassa on luustolihasoluun varastoituneena olevaan rasvaan verrattuna melko hidasta. Solunsisäisen rasvan tehtävänä onkin toimia supistuvan lihaksen nopeasti saatavilla olevana energialähteenä (ks. yleiskatsaus Hoppeler, 1986).

Tämän tutkimuksen perusteella harjoittelulla ei näyttäisi olevan vaikutusta *soleus*-lihaksen IMCL-pitoisuuteen. Pienen otoskoon johdosta tuloksiin on kuitenkin syytä suhtautua pienellä varauksella. Eläinten ja laskettavien solujen määrää kasvattamalla olisi mahdollista saada luotettavampia tuloksia. Elektronimikroskopia menetelmänä ei ehkä ole paras vaihtoehto



IMCL-pitoisuuden määrittelyyn juuri korkean suurennoksen myötä tulevien rajoitteiden (pieni otoskoko) takia.

Tutkimustulokset kestävyysharjoittelun vaikutuksista luustolihasen IMCL-pitoisuuteen ovatkin olleet toisistaan poikkeavia. Jotkut tutkimukset väittävät kestävyysharjoittelun kasvattavan luustolihasen IMCL-pitoisuutta ja kasvun on ennustettu olevan ensimmäisiä vasteita kestävyysharjoittelulle (Phillips ym., 1996; Schrauwen-Hinderling ym., 2003). Koska harjoittelu lisää tyypin I lihassolujen osuutta, on kestävyysurheilijoiden luustolihasessa tyypin I lihassolujen osuus huomattavan paljon muita suurempi (ks. yleiskatsaus Howald, 1982; Andersson ym., 2000). Tyypin I lihassolut varastoivat rasvaa kuitenkin tyypin II lihassoluihin verrattuna jopa kolme kertaa enemmän (Malenfant ym., 2001). Tämä voi osittain selittää kestävyysurheilijoiden korkean IMCL-pitoisuuden sekä väitteet IMCL-pitoisuuden toimimisesta ensimmäisenä vasteena harjoittelulle (Schrauwen-Hinderling ym., 2003). Tässä HRT- ja LRT-rotilla tehdyssä tutkimuksessa käytetty *soleus*-lihas koostuu pääasiassa tyypin I lihassoluista (ks. yleiskatsaus Schrauwen-Hinderling ym., 2006).

Kaikki tutkimustulokset eivät kuitenkaan ole aina viitanneet kestävyysharjoittelun kasvattaneen rasvan määrää luustolihasessa. Esimerkiksi Bergmanin ym. (1999) tekemän tutkimuksen mukaan kestävyysharjoittelu ei lisää luustolihasen riippuvuutta käyttäen solunsisäistä rasvaa energialähteenään. Koetilanteiden erotessa toisistaan runsaasti, tulee tuloksista myös herkästi toisistaan paljon poikkeavia. Tulosten ristiriitaisuutta lisää myös tutkimuksissa käytetyt eri menetelmät. Luustolihasen rasvan analysointiin on käytetty mm. elektronimikroskopiaa, <sup>1</sup>H-magneettiresonanssi spektroskopiaa sekä triasyyliglyserolin eristystä kemiallisesti (ks. yleiskatsaukset Schrauwen-Hinderling ym., 2006; van Loon, 2004b).

Yksilöiden välillä on havaittu olevan runsaasti eroja IMCL-pitoisuuden suhteen, mikä voi myös selittää toisistaan poikkeavia tutkimustuloksia (Wendling ym., 1996). Myös tässä tutkimuksessa HRT- ja LRT-ryhmien eläinten välillä havaittiin runsaasti hajontaa. Runsas hajonta selkeästi vääristää tuloksia, sillä hajonta ei rajoittunut pelkästään saman ryhmän

eläinten välille, vaan myös saman eläimen eri solujen välillä IMCL-pitoisuudet poikkesivat toisistaan merkittävästi.

#### 5.4. Yhteenveto

Tämän tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että vastuu kehittyvästä harjoitteluvasteesta mitokondrioiden osalta rajoittuu SS-mitokondrioihin. IMF-mitokondrioiden määrä ei näyttänyt lisääntyneen harjoittelun myötä, mikä ei myöskään viittaa kasvaneeseen oksidatiiviseen kapasiteettiin IMF-mitokondrioiden osalta. On myös mahdollista, että IMF-mitokondriot ovat sopeutuneet lisääntyneeseen harjoitteluun kasvattamalla tehokkuuttaan ilman, että mitokondriot olisivat määrällisesti lisääntyneet. Saattaa olla, että SS-mitokondriot sopeutuvat harjoittelun seurauksena lisääntymällä määrällisesti ja IMF-mitokondriot puolestaan kasvattamalla määrän sijasta tehoa. Tämän varmistaminen toki vaatisi lisää tutkimuksia esimerkiksi molempien mitokondriopopulaatioiden oksidatiivisten entsyymien aktiivisuuksien osalta. Tämän tutkimuksen perusteella voisi olettaa, että on olemassa jokin vielä tunnistamaton tekijä, joka aiheuttaa näin merkittäviä eroja SS- ja IMF-mitokondrioiden harjoitteluvasteessa.

Kuten on jo aiemminkin mainittu, solunsisäisestä rasvasta on monenlaisia tuloksia kaikkien kuitenkin viitatessa siihen, että harjoittelu muuttaa solunsisäisen rasvan määrää joko lisäämällä tai vähentämällä sitä. Tässä tutkimuksessa muutosta ei kuitenkaan pystytty havaitsemaan, sillä hajonta sekä eläinten välillä että saman eläimen sisällä oli liian suurta. Eläinten toisistaan paljon poikkeavat harjoittelumäärät voivat toki osaltaan selittää solunsisäisessä rasvassa havaittua hajontaa. Tätäkin olisi mielenkiintoista tutkia lisää esimerkiksi selvittämällä kunkin eläinyksilön solunsisäisen rasvan määrä sekä ennen että jälkeen harjoittelujakson.

Vapaaehtoinen harjoittelu näyttää siis vähentäneen eläinten metabolisten sairauksien riskitekijöitä kasvattamalla SS-mitokondrioiden määrää. Lisääntynyt mitokondrioiden määrä

viittaa kasvaneeseen aerobiseen kapasiteettiin ja siten parempaan fyysiseen kuntoon. Aerobisessa metaboliassa tapahtuvia häiriöitä onkin havaittu useissa taudeissa, kuten tyypin 2 diabeteksessa ja rytmihäiriöissä (Mootha ym., 2003, Akar ym., 2005). Mitokondrioiden toimintahäiriöt tai mitokondrioiden vähentynyt määrä on myös yhdistetty tyypin 2 diabeteksen kehittymiseen (Morino ym., 2005). Tämän tutkimuksen perusteella vapaaehtoisella harjoittelulla ei näyttäisi olevan vaikutusta IMCL-pitoisuuteen.

## 6. Lähdeluettelo

- Adhihetty, P.J., I. Irrcher, A.M. Joseph, V. Ljubicic ja D.A. Hood. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp.Physiol.* 88:99-107.
- Adhihetty, P.J., V. Ljubicic, K.J. Menzies ja D.A. Hood. 2005. Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 289:C994-C1001.
- Akar, F.G., M.A. Aon, G.F. Tomaselli ja B. O'Rourke. 2005. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J.Clin.Invest.* 115:3527-3535.
- Andersson, A., A. Sjodin, A. Hedman, R. Olsson ja B. Vessby. 2000. Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipids in trained and untrained young men. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 279:E744-51.
- Baar, K., A.R. Wende, T.E. Jones, M. Marison, L.A. Nolte, M. Chen, D.P. Kelly ja J.O. Holloszy. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 16:1879-1886.
- Bergman, B.C., G.E. Butterfield, E.E. Wolfel, G.A. Casazza, G.D. Lopaschuk ja G.A. Brooks. 1999. Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am.J.Physiol.* 276:E106-17.
- Berthon, P.M., R.A. Howlett, G.J. Heigenhauser ja L.L. Spriet. 1998. Human skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase I activity determined in isolated intact mitochondria. *J.Appl.Physiol.* 85:148-153.
- Bizeau, M.E., W.T. Willis ja J.R. Hazel. 1998. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J.Appl.Physiol.* 85:1279-1284.
- Bouchard, C., R.M. Malina ja L. Perusse. 1997. Genetics of Fitness and Physical Performance. Human kinetics, Yhdysvallat. 337-342.
- Bouchard, C., P. An, T. Rice, J.S. Skinner, J.H. Wilmore, J. Gagnon, L. Perusse, A.S. Leon ja D.C. Rao. 1999. Familial aggregation of VO(2max) response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J.Appl.Physiol.* 87:1003-1008.
- Britton, S.L. ja L.G. Koch. 2001. Animal genetic models for complex traits of physical capacity. *Exerc.Sport Sci.Rev.* 29:7-14.
- Chabi, B., P.J. Adhihetty, V. Ljubicic ja D.A. Hood. 2005. How is mitochondrial biogenesis affected in mitochondrial disease? *Med.Sci.Sports Exerc.* 37:2102-2110.
- Chinnery, P.F. ja E.A. Schon. 2003. Mitochondria. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 74:1188-1199.
- Coffey, V.G. ja J.A. Hawley. 2007. The molecular bases of training adaptation. *Sports Med.* 37:737-763.
- Cogswell, A.M., R.J. Stevens ja D.A. Hood. 1993. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am.J.Physiol.* 264:C383-9.
- Davies, K.E. ja K.J. Novak. 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.* 7:762-773.

- Decombaz, J., M. Fleith, H. Hoppeler, R. Kreis ja C. Boesch. 2000. Effect of diet on the replenishment of intramyocellular lipids after exercise. *Eur.J.Nutr.* 39:244-247.
- Ebeling, P., R. Bourey, L. Koranyi, J.A. Tuominen, L.C. Groop, J. Henriksson, M. Mueckler, A. Sovijarvi ja V.A. Koivisto. 1993. Mechanism of enhanced insulin sensitivity in athletes. Increased blood flow, muscle glucose transport protein (GLUT-4) concentration, and glycogen synthase activity. *J.Clin.Invest.* 92:1623-1631.
- Gleyzer, N., K. Vercauteren ja R.C. Scarpulla. 2005. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol.Cell.Biol.* 25:1354-1366.
- Goffart, S. ja R.J. Wiesner. 2003. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp.Physiol.* 88:33-40.
- Gollnick, P.D., M. Riedy, J.J. Quintinskie ja L.A. Bertocci. 1985. Differences in metabolic potential of skeletal muscle fibres and their significance for metabolic control. *J.Exp.Biol.* 115:191-199.
- Goodpaster, B.H., J. He, S. Watkins ja D.E. Kelley. 2001. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5755-5761.
- He J., S. Watkins ja D.E. Kelley. 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.
- Holloszy, J.O. 1967. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 242:2278-2282.
- Hood, D.A. 2001. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 90:1137-1157.
- Hood, D.A., I. Irrcher, V. Ljubicic ja A.M. Joseph. 2006. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J.Exp.Biol.* 209:2265-2275.
- Hoppeler, H., P. Luthi, H. Claassen, E.R. Weibel ja H. Howald. 1973. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch.* 344:217-232.
- Hoppeler, H., H. Howald, K. Conley, S.L. Lindstedt, H. Claassen, P. Vock ja E.R. Weibel. 1985. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 59:320-327.
- Hoppeler, H. 1986. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int.J.Sports Med.* 7:187-204.
- Hoppeler, H. ja M. Fluck. 2003. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med.Sci.Sports Exerc.* 35:95-104.
- Horowitz, J.F. ja S. Klein. 2000. Lipid metabolism during endurance exercise. *Am.J.Clin.Nutr.* 72:558S-63S.
- Howald, H. 1982. Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int.J.Sports Med.* 3:1-12.
- Howald, H., H. Hoppeler, H. Claassen, O. Mathieu ja R. Straub. 1985. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch.* 403:369-376.

- Howlett, R.A., N.C. Gonzalez, H.E. Wagner, Z. Fu, S.L. Britton, L.G. Koch ja P.D. Wagner. 2003. Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. *J.Appl.Physiol.* 94:1682-1688.
- Howlett, R.A., S.D. Kirkton, N.C. Gonzalez, H.E. Wagner, S.L. Britton, L.G. Koch ja P.D. Wagner. 2008. Peripheral oxygen transport and utilization in rats following continued selective breeding for endurance running capacity. *J.Appl.Physiol.* doi:10.1152/jappphysiol.00914.2007
- Kelley, D.E., J. He, E.V. Menshikova ja V.B. Ritov. 2002. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 51:2944-2950.
- Kern, M., J.A. Wells, J.M. Stephens, C.W. Elton, J.E. Friedman, E.B. Tapscott, P.H. Pekala ja G.L. Dohm. 1990. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem.J.* 270:397-400.
- Kiens, B. 2006. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol.Rev.* 86:205-243.
- Kivelä, R., M. Lehti, M. Silvennoinen, R. Rinnankosi, M. Vuento, N. Mutanen, K. Pullinen, T. Purhonen, H. Reunanen, L.G. Koch, S.L. Britton ja H. Kainulainen. 2007. Perinnöllisen fyysisen suorituskyvyn taustatekijät ja niiden yhteyks aineenvaihduntasairauksien riskitekijöihin. *Liikunta & Tiede.* 44: 50.
- Koch, L.G. ja S.L. Britton. 2008. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J.Physiol.* 586:83-95.
- Koves, T.R., R.C. Noland, A.L. Bates, S.T. Henes, D.M. Muoio ja R.N. Cortright. 2005. Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria play distinct roles in regulating skeletal muscle fatty acid metabolism. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 288:C1074-82.
- Krieger, D.A., C.A. Tate, J. McMillin-Wood ja F.W. Booth. 1980. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J.Appl.Physiol.* 48:23-28.
- Lombardi, A., M. Damon, A. Vincent, F. Goglia ja P. Herpin. 2000. Characterisation of oxidative phosphorylation in skeletal muscle mitochondria subpopulations in pig: a study using top-down elasticity analysis. *FEBS Lett.* 475:84-88.
- Machann, J., H. Haring, F. Schick ja M. Stumvoll. 2004. Intramyocellular lipids and insulin resistance. *Diabetes Obes.Metab.* 6:239-248.
- Mahoney, D.J., G. Parise, S. Melov, A. Safdar ja M.A. Tarnopolsky. 2005. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. *FASEB J.* 19:1498-1500.
- Malenfant, P., D.R. Joannisse, R. Theriault, B.H. Goodpaster, D.E. Kelley ja J.A. Simoneau. 2001. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord.* 25:1316-1321.
- Mathieu-Costello, O., R.K. Suarez ja P.W. Hochachka. 1992. Capillary-to-fiber geometry and mitochondrial density in hummingbird flight muscle. *Respir.Physiol.* 89:113-132.
- Mootha, V.K., C.M. Lindgren, K.F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M.J. Daly, N. Patterson, J.P. Mesirov, T.R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E.S. Lander, J.N. Hirschhorn, D. Altshuler ja L.C. Groop. 2003. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat.Genet.* 34:267-273.

- Morino, K., K.F. Petersen, S. Dufour, D. Befroy, J. Frattini, N. Shatzkes, S. Neschen, M.F. White, S. Bilz, S. Sono, M. Pypaert ja G.I. Shulman. 2005. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J.Clin.Invest.* 115:3587-3593.
- Muller, W. 1976. Subsarcolemmal mitochondria and capillarization of soleus muscle fibers in young rats subjected to an endurance training. A morphometric study of semithin sections. *Cell Tissue Res.* 174:367-389.
- Myers, J., M. Prakash, V. Froelicher, D. Do, S. Partington ja J.E. Atwood. 2002. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N.Engl.J.Med.* 346:793-801.
- Noland, R.C., J.P. Thyfault, S.T. Henes, B.R. Whitfield, T.L. Woodlief, J.R. Evans, J.A. Lust, S.L. Britton, L.G. Koch, R.W. Dudek, G.L. Dohm, R.N. Cortright ja R.M. Lust. 2007. Artificial selection for high-capacity endurance running is protective against high-fat diet-induced insulin resistance. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 293:E31-41.
- Perseghin, G., P. Scifo, E. Pagliato, A. Battezzati, S. Benedini, L. Soldini, G. Testolin, A. Del Maschio ja L. Luzzi. 2001. Gender factors affect fatty acids-induced insulin resistance in nonobese humans: effects of oral steroidal contraception. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:3188-3196.
- Phillips, S.M., H.J. Green, M.A. Tarnopolsky, G.J. Heigenhauser ja S.M. Grant. 1996. Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* 270:E265-72.
- Pruchnic, R., A. Katsiaras, J. He, D.E. Kelley, C. Winters ja B.H. Goodpaster. 2004. Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 287:E857-62.
- Riley, D.A., E.I. Ilyina-Kakueva, S. Ellis, J.L. Bain, G.R. Slocum ja F.R. Sedlak. 1990. Skeletal muscle fiber, nerve, and blood vessel breakdown in space-flown rats. *FASEB J.* 4:84-91.
- Ritov, V.B., E.V. Menshikova, J. He, R.E. Ferrell, B.H. Goodpaster ja D.E. Kelley. 2005. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 54:8-14.
- Robinson, D.M., R.W. Ogilvie, P.C. Tullson ja R.L. Terjung. 1994. Increased peak oxygen consumption of trained muscle requires increased electron flux capacity. *J.Appl.Physiol.* 77:1941-1952.
- Schmidt, I. ja P. Herpin. 1997. Postnatal changes in mitochondrial protein mass and respiration in skeletal muscle from the newborn pig. *Comp.Biochem.Physiol.B.Biochem.Mol.Biol.* 118:639-647.
- Schrauwen-Hinderling, V.B., P. Schrauwen, M.K. Hesselink, J.M. van Engelshoven, K. Nicolay, W.H. Saris, A.G. Kessels ja M.E. Kooi. 2003. The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 88:1610-1616.
- Schrauwen-Hinderling, V.B., M.K. Hesselink, P. Schrauwen ja M.E. Kooi. 2006. Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring).* 14:357-367.
- Sjodin, R.A. ja L.A. Beauge. 1973. An analysis of the leakages of sodium ions into and potassium ions out of striated muscle cells. *J.Gen.Physiol.* 61:222-250.
- Skulachev, V.P. 2001. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem.Sci.* 26:23-29.
- Sreekumar, R. ja K.S. Nair. 2007. Skeletal muscle mitochondrial dysfunction & diabetes. *Indian J.Med.Res.* 125:399-410.

- Takahashi, M. ja D.A. Hood. 1996. Protein import into subsarcolemmal and intermyofibrillar skeletal muscle mitochondria. Differential import regulation in distinct subcellular regions. *J.Biol.Chem.* 271:27285-27291.
- Thamer, C., J. Machann, O. Bachmann, M. Haap, D. Dahl, B. Wietek, O. Tschritter, A. Niess, K. Brechtel, A. Fritsche, C. Claussen, S. Jacob, F. Schick, H.U. Haring ja M. Stumvoll. 2003. Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 88:1785-1791.
- Troxell, M.L., S.L. Britton ja L.G. Koch. 2003. Selected contribution: Variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. *J.Appl.Physiol.* 94:1674-1681.
- van Loon, L.J. 2004a. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J.Appl.Physiol.* 97:1170-1187.
- van Loon, L.J. 2004a. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J.Appl.Physiol.* 97:1170-1187.
- van Loon, L.J. 2004b. Intramyocellular triacylglycerol as a substrate source during exercise. *Proc.Nutr.Soc.* 63:301-307.
- van Loon, L.J., R. Koopman, R. Manders, W. van der Weegen, G.P. van Kranenburg ja H.A. Keizer. 2004. Intramyocellular lipid content in type 2 diabetes patients compared with overweight sedentary men and highly trained endurance athletes. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 287:E558-65.
- van Loon, L.J. ja B.H. Goodpaster. 2006. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch.* 451:606-616.
- Walaas, O., E. Walaas, E. Lystad, A.R. Alertsen, R.S. Horn ja S. Fossum. 1977. A stimulatory effect of insulin on phosphorylation of a peptide in sarcolemma-enriched membrane preparation from rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 80:417-422.
- Wendling, P.S., S.J. Peters, G.J. Heigenhauser ja L.L. Spriet. 1996. Variability of triacylglycerol content in human skeletal muscle biopsy samples. *J.Appl.Physiol.* 81:1150-1155.
- Wisloff, U., S.M. Najjar, O. Ellingsen, P.M. Haram, S. Swoap, Q. Al-Share, M. Fernstrom, K. Rezaei, S.J. Lee, L.G. Koch ja S.L. Britton. 2005. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science.* 307:418-420.