

Iän ja hormonikorvaushoidon yhteys
tulehdustekijöihin sekä kehon koostumukseen
postmenopausaalisilla naisilla



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Suvi Pulkkinen

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

Alkusanat

Tämä Pro gradu-tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston terveystieteiden laitoksella, Vuokko Kovasen johtamassa tutkimusryhmässä. Ryhmän tutkimuskohteena ovat lihasten heikentymisen solu- ja molekyyli-tason mekanismit sekä hormonikorvaushoidon ja fyysisen aktiivisuuden vaikutukset näihin mekanismeihin.

Haluan lämpimästi kiittää ohjaajiani Maarit Ahtiaista ja Vuokko Kovasta asiantuntevasta ja kannustavasta ohjauksesta työni aikana. Kiitokset myös muille tutkimusryhmän jäsenille ja laboratorion väelle.

Haluan osoittaa suuret kiitokset myös muille tärkeille tukijoukoille: kotiväelle, sukulaisille ja ystäville sekä erityisesti Petterille kannustuksesta, neuvoista ja uskosta tutkielmani valmistumiseen.

Työni rahallisesta avustuksesta kiitokset kuuluvat Suomen Kulttuurirahaston Väinö Tannerin rahastolle.

Jyväskylässä 23.9.2010

Suvi Pulkkinen

Tekijä:	Suvi Pulkkinen
Tutkielman nimi:	Iän ja hormonikorvaushoidon yhteys tulehdustekijöihin sekä kehon koostumukseen postmenopausaalisilla naisilla
English title:	Association of age and hormone replacement therapy with inflammatory factors and body composition within postmenopausal women
Päivämäärä:	23.9.2010 Sivumäärä: 57+1
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	FT, dosentti Vuokko Kovanen ja FT Maarit Ahtiainen

Tiivistelmä: Vahvat ja hyvinvoivat lihakset ovat yksi tärkeimmistä ihmisen terveyttä ja hyvää elämänlaatua ylläpitävistä tekijöistä. Ihmisen ikääntyessä lihasproteiinien hajotus tehostuu johtaen lihassäikeiden pienenemiseen ja niiden määrän vähenemiseen. Tämä puolestaan johtaa lihasten massan, voiman ja toimintakyvyn heikkenemiseen. Kroonisen matalaintensiteettisen tulehduksen uskotaan olevan merkittävimpiä lihasproteiinien hajotusta lisääviä tekijöitä. Matalaintensiteettinen tulehdus on usein yhteydessä korkeaan ikään ja se ilmenee seerumin kohonneina sytokiinitasoina. Sytokiiniin lisäntymiseen vaikuttavat muun muassa immuunijärjestelmän heikentyminen, oksidatiivinen stressi ja rasvakudoksen lisääntyminen.

Estrogeeneilla on useita positiivisia vaikutuksia luurankolihasiin. Munasarjahormonien, etenkin estradiolin tuotanto vähenee nopeasti vaihdevuosisien aikana. Tämän tiedetään tapahtuvan samoihin aikoihin lihasten heikentymisen kanssa. Estrogeenien puute saattaa edesauttaa lihasheikkouden kehittymistä ainakin aktiivomalla tiettyjen sytokiiniinien tuotantoa sekä lisäämällä rasvakudoksen määrää kehossa. Muutamissa lihasten fyysisiin ominaisuuksiin keskittyneissä satunnaistetuissa tutkimuksissa on osoitettu hormonikorvaushoidon (HRT) olevan yhteydessä suurempaan lihasten massaan ja voimaan. HRT saattaa välittää positiiviset vaikutuksensa lihaksiin vähentämällä seerumissa olevia sytokiineja ja siten alentamalla kroonisen matalaintensiteettisen tulehduksen tasoa ikääntyneiden naisten kehossa.

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia ELISA:a ja qRT-PCR:ää käyttäen ikääntymisen ja HRT:n yhteyksiä tiettyjen sytokiiniinien (IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1Ra, TNF- α ja IL-10) seerumitasoihin sekä paikallisiin transkriptiotasoihin luurankolihasessa, valkosoluissa ja rasvassa. Lisäksi selvitettiin, onko koehenkilöiden kehon koostumus yhteydessä ikääntymiseen ja HRT:n käyttöön. Yhtenä koehenkilöryhmänä oli 54–62 vuotiaita, identtisiä kaksosisaruksia (n=11 paria). Kaksoset olivat postmenopausaalisia, eli he olivat kuukautisten loppumisen jälkeisessä elämänvaiheessa. Lisäksi he olivat HRT:n suhteen diskordantteja eli siskoksista toinen oli pitkäaikainen HRT:n käyttäjä ja toinen puolestaan ei ollut koskaan käyttänyt HRT:a. Toisena koehenkilöryhmänä käytettiin 30–35 vuotiaita fertiili-ikäisiä naisia (n=14), joilla ei ollut käytössään hormonaalista ehkäisyä.

Tulostemme mukaan ikääntyminen oli yhteydessä erityisesti reiden lihaspinta-alan pienenemiseen ($P=0,026$). Sytokiineista etenkin TNF- α ja IL-10 oli yhteydessä ikääntymiseen ollen postmenopausaalisten naisten seerumissa, valkosoluissa ja rasvassa korkeammalla kuin fertiili-ikäisillä. Lisäksi IL-1Ra:n transkriptio on postmenopausaalisten naisten valkosoluissa selkeästi vähäisempää fertiili-ikäisiin verrattuna. HRT:n käyttö puolestaan oli yhteydessä alhaisempaan koko kehon rasvaprosenttiin ($P=0,022$) sekä alhaisempaan reiden rasvapinta-alaan ($P=0,053$). Sytokiiniin proteiini- ja RNA-tasoissa ei juuri ollut merkitseviä eroja HRT:n käyttäjien ja ei-käyttäjien välillä.

Tämän tutkimuksen johtopäätöksenä voidaan sanoa, että ikääntyminen on yhteydessä kehon koostumuksen huononemiseen sekä IL-10:n TNF- α :n ja IL-1Ra:n erilaiseen ilmentymiseen fertiili-ikäisiin verrattuna. Pitkä-aikainen HRT ei ole yhteydessä tutkimimme sytokiineihin, mutta kehonkoostumus on HRT:n käyttäjillä parempi kuin ei-käyttäjillä.

Avainsanat: Luurankolihas, ikääntyminen, krooninen matalaintensiteettinen tulehdus, sytokiini, hormonikorvaushoito

Author: Suvi Pulkkinen
Title of thesis: Association of age and hormone replacement therapy with inflammatory factors and body composition within postmenopausal women
Finnish title: Iän ja hormonikorvaushoidon yhteys tulehdustekijöihin sekä kehon koostumukseen postmenopausaalisilla naisilla
Date: 23.9.2010 **Pages:** 57+1
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): PhD, docent Vuokko Kovanen and PhD Maarit Ahtiainen

Abstract: Strong skeletal muscles are one of the most important factors that maintain one's health and good quality of life. During aging rate of muscle protein degradation increases, leading to diminishing of muscle fibre size and number. This induces weakening of muscle mass, power and ability to function. Chronic low-grade inflammation is believed to be a marked contributor of protein degradation. Low-grade inflammation is often associated with advanced age and it can be seen as increased levels of serum cytokines. Factors promoting the development of low-grade inflammation are for example weakening of immune system, oxidative stress and increasing of fat tissue.

Estrogens have several positive effects on skeletal muscles. During menopause production of ovarian hormones, particularly estradiol decreases rapidly. This is known to happen at the same time with muscle weakening. Lack of estrogens may promote muscle wasting by activating the production of cytokines and increasing body fat. Some studies have shown that use of hormone replacement therapy (HRT) is associated with greater muscle mass and strength. HRT might decrease serum levels of cytokines and thereby lower the chronic low-grade inflammation in body of older women.

The purpose of this study was to investigate whether aging and long-term HRT are associated with protein and RNA levels of six cytokines (IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1Ra, TNF- α and IL-10) in skeletal muscle, leukocytes and fat tissue. ELISA and qRT-PCR were used to analyze the cytokines. It was also examined if body composition is associated with aging and HRT. There were two subject groups. One group consisted of 54- to 62-yr-old identical twin sisters (n=11 pairs). The twins were postmenopausal and discordant for HRT meaning one cotwin was a current HRT user and the other cotwin had never used HRT. Another group consisted of 30- to 35-yr-old fertile women (n=14) not using any hormonal contraceptives.

The results show that aging was particularly associated with decreasing thigh muscle area ($P=0,026$). TNF- α and IL-10 reacted on aging showing higher levels in serum, leukocytes and fat in postmenopausal women compared with fertile women. In addition the transcription of IL-1Ra in leukocytes decreases significantly in postmenopausal women compared with fertile women. The usage of HRT was associated with lower percentage of body fat ($P=0,022$) and lower thigh fat area ($P=0,053$). However long-term HRT did not have any significant effects on cytokines analyzed in this study.

A conclusion of this study is that aging is related to poorer body composition and different expression of IL-10, TNF- α and IL-1Ra compared with fertile women. Long-term HRT is not associated with cytokines we studied but body composition is better in HRT users compared with non-users.

Keywords: skeletal muscle, aging, chronic low-grade inflammation, cytokine, hormone replacement therapy

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällysluettelo

Lyhenteet

1	Johdanto	8
1.1	Ikääntyminen ja luurankolihakset	8
1.2	Luurankolihas.....	9
1.2.1	Lihassolut.....	9
1.2.2	Lihassolutyypit.....	11
1.2.3	Luurankolihasen massan säätely.....	11
1.3	Lihashäikkoutteen johtavia tekijöitä	13
1.3.1	Denervaatio	13
1.3.2	Oksidatiivinen stressi.....	14
1.3.3	Liikkumattomuus ja vähäproteiininen ravinto	14
1.4	Krooninen matalaintensiteettinen tulehdus	15
1.4.1	Matalaintensiteettisen tulehduksen kehittyminen	15
1.4.2	Signalointimolekyylit matalaintensiteettisessä tulehduksessa.....	17
1.4.2.1	NF- κ B	17
1.4.2.2	IL-6	17
1.4.2.3	TNF- α	18
1.4.2.4	IL-1	18
1.4.2.5	IL-1Ra.....	19
1.4.2.6	IL-10	20
1.4.3	Matalaintensiteettinen tulehdus ja lihasten heikentyminen	21
1.5	Vaihdevuodet	22
1.5.1	Vaihdevuosisoireet ja hormonikorvaushoito.....	23
1.6	Estrogeenit.....	24
1.6.1	Kehon estrogeenityypit	25
1.6.2	Estrogeenien vaikutustavat	25
1.6.3	Estrogeenien positiivinen vaikutus luurankolihasiin	26
1.6.3.1	Radikaalien ja tulehdussolujen torjuminen.....	26
1.6.3.2	Satelliittisolujen aktivoiminen	26
1.6.3.3	Apoptoosin inhiboiminen	27
1.6.4	Estrogeenien vähenemisen ja HRT:n vaikutus eri kudoksiin	27
1.6.4.1	Sytokiinien lisääntyminen.....	27
1.6.4.2	Rasvakudoksen lisääntyminen	28
1.6.4.3	HRT:n käyttö ja lihakset	29
2	Tutkimuksen tarkoitus	30
3	Materiaalit ja menetelmät	31
3.1	Koehenkilöt	31
3.2	Verinäytteenotto sekä valkosolujen ja seerumin eristäminen	33
3.3	Reiden koostumuksen määrittäminen	33

3.4	Lihäs- ja rasvakoepalojen ottaminen.....	34
3.5	RNA:n eristäminen lihasnäytteistä.....	35
3.6	RNA:n eristäminen rasvanäytteistä.....	35
3.7	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)	36
3.8	Käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio.....	36
3.9	Kvantitatiivinen Real Time-PCR (qRT-PCR)	37
3.10	Tilastoanalyysit.....	38
4	Tulokset.....	39
4.1	Sytokiinien systeemiset tasot	39
4.1.1	Iän yhteys	39
4.1.2	HRT:n yhteys	39
4.2	Sytokiinien paikalliset transkriptiotasot eri kudoksissa	39
4.2.1	Iän yhteys	40
4.2.2	HRT:n yhteys	40
4.3	Kehon koostumus.....	43
5	Tulosten tarkastelu	44
5.1	Iän ja HRT:n yhteys seerumin sytokiineihin.....	44
5.2	Sytokiinien paikallinen tuotanto	46
5.3	Iän ja HRT:n yhteys sytokiinien transkriptiotasoihin ja kehon koostumukseen...	47
5.4	Tulevaisuuden näkymät	49
6	Lähdeluettelo	50
7	Liitteet	58

Lyhenteet

Akt1	Proteiinikinaasi B
cDNA	Komplementaarinen DNA (engl. complementary DNA)
CK	Kreatiinikinaasi (engl. creatine kinase)
FOXO	(engl. forkhead box protein O)
FSH	Follitropiini (engl. follicle stimulating hormone)
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi
GnRH	Gonadoliberiini (engl. gonadotropin releasing hormone)
HRT	Hormonikorvaushoito (engl. hormone replacement therapy)
IGF-1	Insuliinin kaltainen kasvutekijä-1 (engl. insulin-like growth factor)
IL-1	Interleukiini 1
IL-1RI	Interleukiini 1:n tyypin I reseptori
IL-1RII	Interleukiini 1:n tyypin II reseptori
IL-6	Interleukiini 6
IL-10	Interleukiini 10
IL-1Ra	Interleukiini 1:n reseptoriantagonisti
I κ B	(engl. inhibitor of κ B)
LH	Lutropiini (engl. luteinizing hormone)
LPL	Lipoproteiinilipaasi
MCP-1	Monosyyttejä houkutteleva proteiini-1 (engl. monocyte chemotactic protein-1)
mTOR	(engl. mammalian target of rapamycin)
NF- κ B	(engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
qRT-PCR	Kvantitatiivinen Real Time-PCR (engl. quantitative Real Time-PCR)
PG	Prostaglandiini
PI3K	Fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi
PIP ₂	Fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatti
PIP ₃	Fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trisfosfaatti
TNF- α	Tuumorinekroositekijä- α (engl. tumor necrosis factor- α)

1 Johdanto

1.1 Ikääntyminen ja luurankolihakset

Ikääntyminen aiheuttaa kehossa monenlaisia muutoksia. Yksi merkittävimmistä muutoksista on luurankolihasmassan, voiman ja laadun progressiivinen heikentyminen iän karttuessa. Ilmiötä kutsutaan kirjallisuudessa usein sarkopeniaksi, mutta oikeammin sarkopenialla tarkoitetaan vain lihasten massan pienenemistä (ks. yleiskatsaus Clark ja Manini, 2008). Ihmisen lihasten massa ja toimintakyky on suurimmillaan nuorilla aikuisilla (ks. yleiskatsaus Vandervoort, 2002). Noin 40 ikävuoden paikkeilla se alkaa kuitenkin vähitellen pienentyä kiihtyen 75 ikävuoden jälkeen (ks. yleiskatsaus Waters ym., 2000). Lihasten surkastuminen eli atrofia johtuu suurelta osin lihasproteiinien hajoamisesta eli kataboliasta. Tällöin lihassäikeiden koko pienenee ja niiden määrä vähenee iän myötä. Erityisesti pienenevät nopeat, tyypin II lihassäikeet. Tästä johtuen 70-vuotiaalla ihmisellä lihaksen läpimitta voi olla 25–30 % pienempi nuoruusvuosiin verrattuna. Lisäksi lihasten voima on alentunut 30–40 % (ks. yleiskatsaus Lee ym., 2007). Lihaksen laadun ja voimantuottokyvyn huonontumiseen vaikuttaa myös rasvakudoksen tunkeutuminen lihaksen sisään (Goodpaster ym., 2001).

Vahvat ja hyvinvoivat lihakset ylläpitävät merkittävästi ihmisen terveyttä ja hyvää elämänlaatua. Vahvojen lihasten tiedetään suojaavan ihmistä useilta sairauksilta, kuten osteoporoosilta ja tyypin 2 diabetekselta (ks. yleiskatsaus Greenlund ja Nair, 2003). Lihasten surkastumista puolestaan pidetään tärkeänä ikääntyneen ihmisen terveyden huonontumisen ja toimintakyvttömyyden aiheuttajana. Lihasten heikentymiseen liittyy usein sairauksien lisääntyminen ja liikuntakyvyn merkittävä rajoittuminen, koska lihaksen voimantuottokyky alenee ja supistumis- ja rentoutumisvaiheet hidastuvat (ks. yleiskatsaus Ryall ym., 2008). Esimerkiksi kävely, portaiden nouseminen ja tavaroiden nostaminen voivat hankaloitua (Janssen ym., 2002). Liikunnan väheneminen ja energiaa kuluttavan lihasmassan pieneneminen johtavat yleensä painon nousuun, mikä huonontaa ihmisen terveyttä entisestään (Morley ym., 2001). Lihasten atrofia saattaa vaikuttaa negatiivisesti myös tasapainoon, jolloin kaatumisten ja sitä kautta murtumien määrä lisääntyy (Szulc ym., 2005). Siten lihasten massan ja voiman väheneminen on merkittävämpiä syitä

ikäntyneen ihmisen kyvyttömyyteen elää itsenäisesti ja laitoshoitoon joutumiseen (Morley ym., 2001).

Erään tutkimuksen mukaan yli 60-vuotiaista 13–24 % ja 80-vuotiaista sekä sitä vanhemmista ihmisistä yli 50 % kärsii lihasten heikentymisestä (Baumgartner ym., 1998). Iän mukana kehittyvää lihasheikkoutta on sekä miehillä että naisilla. Se näyttäisi kuitenkin olevan yleisempää miehillä, sillä 58 % yli 75-vuotiaista miehistä kärsii siitä. Saman ikäisistä naisista 45 % kärsii lihasheikkoudesta. Naisille lihasheikkous on silti suurempi ongelma, sillä heillä on lähtökohtaisesti pienempi lihasmassa (ks. yleiskatsaus Fisher, 2004). Lisäksi naiset elävät yleensä pidempään kuin miehet, jolloin he myös kärsivät lihasheikkoudesta pidempään (ks. yleiskatsaus Roubenoff ja Hughes, 2000). Ikääntyvien ihmisten määrä kasvaa jatkuvasti niin Suomessa kuin muualla maailmassa, minkä takia lihasatrofiasta johtuva sairaanhoidon ja vanhustenhuollon tarve sekä niistä syntyvät kulut tulevat lisääntymään huomattavasti.

1.2 Luurankolihas

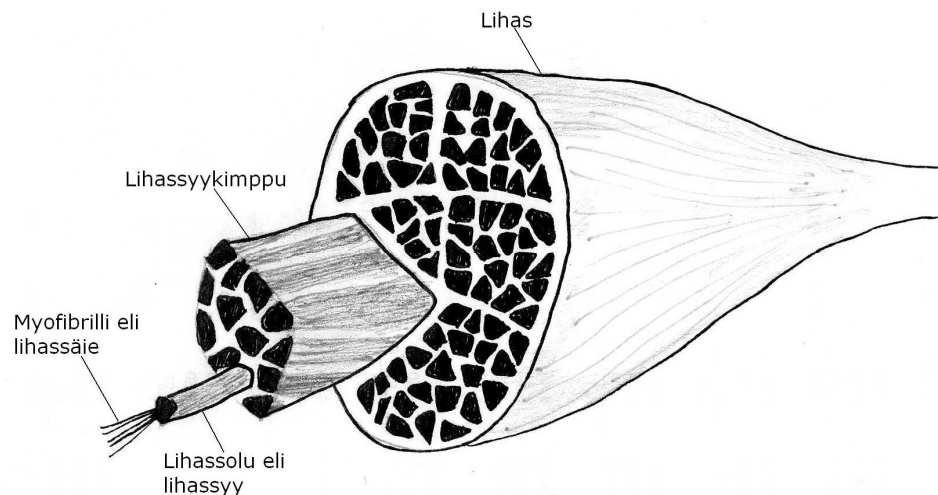
Luurankolihakset eli luustolihakset ovat elimistön suurin elinjärjestelmä. Ne ovat tahdonalaisesti ohjailtavissa olevia lihaksia, joista useimmat kiinnittyvät luihin jänteiden välityksellä. Luustolihakset mahdollistavat kehon eri osien liikkeen. Lihakset muodostuvat pitkistä ja monitumaisista lihassoluista eli lihassyistä. Jokaista lihassolua ympäröi ohut endomysium-sidekudoskalvo. Lihassyöt ryhmittyvät lihassykimpuiksi (kuva 1), joita ympäröi paksumpi sidekudoskalvo (perimysium). Useat lihassykimput puolestaan muodostavat kokonaisen lihaksen, jonka ympärillä on paksu sidekudosta oleva peitinkalvo eli faskia. Sidekudoksissa sijaitsevat lihasten aineenvaihdunnasta ja hermotuksesta huolehtivat verisuonet ja hermot.

1.2.1 Lihassolut

Lihassolut eli lihassyöt syntyvät jo sikiökaudella, kun lihassolujen esiasteet, myoblastit, sulautuvat yhteen sylinterimäisiksi rakenteiksi (myotubes), jotka kypsyvät lihassoluiksi. Myoblastien fuusioitumisessa syntyy myös lihassoluille tyypillinen monitumaisuus. Tumot sijaitsevat heti soluja ympäröivän solukalvon, sarkolemman, alapuolella. Sarkolemman

yläpuolella on satelliittisoluja ja tyvikalvo, joka on yhtenäinen endomysiumin kanssa. Lapsen synnyttyä luustolihasolut eivät juuri enää uusiudu, vaan lihasten kasvu perustuu lähinnä yksittäisten lihasolujen suurenemiseen. Aikuisella lihasolut ovat läpimitaltaan 10–100 µm ja ne voivat olla useita senttimetrejä pitkiä.

Lihassolut rakentuvat tiiviisti pakkautuneista lihasäikeistä eli myofibrilleistä, joiden ympärillä on runsaasti mitokondrioita. Lihasäikeet ulottuvat koko solun päästä päähän ja vievät yhdessä mitokondrioiden kanssa noin 80 % sarkoplasman tilasta. Lihasäikeet puolestaan muodostuvat pääasiassa kahdenlaisesta proteiinista, aktiinista ja myosiinista. Aktiini- ja myosiinisäikeet ovat järjestäytyneet sarkomeereiksi, jotka ovat lihaksen supistuvia perusyksiköitä ja toistuvat koko lihasäikeen pituudelta. Lihas supistuu, kun sarkomeerien aktiini- ja myosiinisäikeet liukuvat toistensa lomiin. Ohuet aktiini- ja paksut myosiinisäikeet aiheuttavat luustolihasille tyypillisen tummien ja vaaleiden raitojen vuorottelun. Tämän vuoksi luurankolihasia kutsutaan myös poikkijuovaisiksi lihaksiksi. Mitokondrioiden lisäksi jokaista lihasäiettä ympäröi sarkoplasmakalvosto, mikä vastaa muiden solujen endoplasmakalvostoa. Sarkoplasmakalvosto yhdistyy ionikanavien kautta sormimaisiin T-putkiin, jotka ovat sarkolemmasta lähteviä ulokkeita. T-putkien tehtävänä on siirtää motorisen hermon kuljettama aktiopotentiaali lihasoluun. Motorinen hermo ja kaikki ne lihasolut, joita se hermottaa, muodostavat motorisen yksikön.



Kuva 1. Luurankolihasen rakenne. Mukailtu [www-sivulta http://www.supercoach.de/muskel.jpg](http://www.supercoach.de/muskel.jpg) 13.3.2010.

1.2.2 Lihassolutyypit

Luurankolihaaksissa on kahdenlaisia lihassoluja, jotka eroavat toisistaan aineenvaihdunnan ja supistumisominaisuuksiensa mukaan. Tyypin I solut supistuvat hitaasti, mutta pystyvät vastustamaan väsymystä pitkään, joten ne ovat aktiivisia pitkäaikaisissa lihassupistuksissa. Ne tuottavat energiansa aerobisesti. Tyypin I solut sisältävätkin runsaasti happea sitovaa myoglobiinia, mitokondrioita sekä niitä ympäröiviä hiussuonia. Tästä syystä tyypin I solut näyttävät punaisilta. Tyypin II solut tuottavat energiaa anaerobisesti eli glykogenea hajottamalla. Ne sekä supistuvat että väsyvät tyypin I soluja nopeammin. Niissä on vähemmän myoglobiinia ja mitokondrioita kuin tyypin I soluissa, joten ne ovat väriltään yleensä valkoisia. Tyypin II solut jaetaan kahteen alaluokkaan, IIA ja IIX, myosiinin eri isoformien mukaan. Kaikki luurankolihakset koostuvat sekä hitaista, että nopeista lihassoluista, jotka ovat järjestäytyneet tasaisesti lihaksen alueelle. Lihassolutyypien suhde riippuu lihaksen tehtävästä.

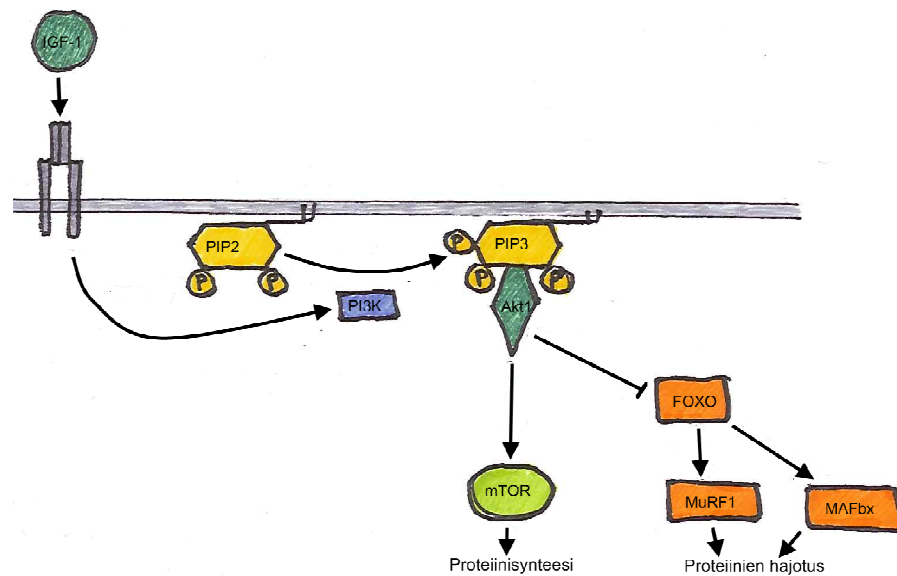
1.2.3 Luurankolihaasten massan säätely

Elimistö ylläpitää luurankolihaasten massaa lihasproteiinien synteesin ja hajotuksen tasapainon avulla, jota säätelee synteesiin ja hajotukseen liittyvien signaalireittien monimutkainen yhteistyö. Jos lihasproteiineja syntyy enemmän kuin niitä hajoaa, voi seurauksena olla lihassolujen suureneminen eli lihashypertrofia. Lihassolut kasvavat, koska niihin lisätään uusia supistumiskykyisiä aktiini- ja myosiinifilamentteja (Goldspink ym., 1983). Lihaasten hypertrofiaa voi saada aikaan esimerkiksi voimaharjoittelulla. Sen sijaan esimerkiksi lihaasten kuormituksen puute, ikääntyminen tai useat tautitilat voivat siirtää tasapainon lihasproteiinien hajotuksen puolelle, jolloin lihassäikeiden läpimitta pienenee ja voimantuotto heikentyy. Tämä johtaa lihaasten atrofiaan eli surkastumiseen (ks. yleiskatsaus Jackman ja Kandarian, 2004).

Yksi tärkeimmistä hypertrofiaan johtavista signaalireiteistä on fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi-reitti (PI3K), joka aktivoituu anabolisten tekijöiden vaikutuksesta (Bodine ym., 2001, b; Glass, 2003). Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) on anabolinen tekijä, jonka synteesi lihaksessa lisääntyy voimakkaan lihaskuormituksen aikana (DeVol ym., 1990). IGF-1:n sitoutuminen solukalvolla olevaan reseptoriin aktivoi PI3K:n, joka

katalysoi fosfatidyli-inositoli (4,5)-bifosfaatin (PIP₂) muuttumisen fosfatidyli-inositoli (3,4,5)-trifosfaatiksi (PIP₃). PIP₃ toimii sitoutumiskohtana seriini-treoniini-kinaasi Akt1:lle, joka tunnetaan myös proteiinikinaasi B:nä (PKB). Akt1 aktivoituu ja se fosforyloi puolestaan useita muita molekyyliä, kuten mTOR:n (mammalian target of rapamycin), johtaen proteiinisynteesin ja solun kasvun lisääntymiseen (ks. yleiskatsaus Matsui ym., 2003).

Hypertrofian säätelyn lisäksi Akt toimii lihasten atrofiaa edistävien signaalireittien inhibiittorina. Lihasten atrofia johtuu useiden eri hajotusreittien aktivoitumisesta. Näistä tärkein on ubikitiini-proteasomireitti (Jagoe ym., 2002). Ubikitiini on lyhyt proteiini, jonka avulla solu ohjaa hajotettavaksi tarkoitettuja proteiineja proteasomeihin. Ubikitiinin liittäminen proteiiniin tapahtuu kolmen eri entsyymin avulla. Näitä entsyymejä ovat ubikitiinia aktivoiva (E1), ubikitiinia konjugoiva (E2) ja ubikitiinia ligoiva (E3) entsyymi. Useiden, etenkin E3-luokkaan kuuluvien entsyymien ilmentymisen on havaittu lisääntyneen lihasatrofian aikana. MuRF1 (muscle ring finger) ja atrogiini-1/MAFbx (muscle atrophy F-box) ovat erityisesti luurankolihasessa ilmentyviä E3-ubikitiiniligaaseja, joiden ilmentymistä säätelevät FOXO-transkriptiotekijät (Bodine ym., 2001, a). Atrofian aikana FOXO:t ovat fosforyloimattomia ja aktivoivat tumassa ubikitiiniligaasien transkriptiota. Lihasten hypertrofiassa Akt lisää FOXO -proteiineihin useita fosfaattiryhmiä, jolloin ne inaktivoituvat ja siirtyvät sytoplasmaan estäen samalla ubikitiiniligaasien muodostumisen ja atrofian etenemisen (Brunet ym., 1999). Lihasmassan säätelyä on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. Yksinkertainen kaavio lihasmassan säätelystä. IGF-1:n sitoutuessa reseptoriinsa, PI3K aktivoituu ja saa aikaan PIP3:n muodostumisen, johon Akt1 sitoutuu. Akt1 edistää proteiinisynteesiä lihaksessa aktivoimalla useita molekyyliä, joista yksi on mTOR. Samalla Akt1 inaktivoi FOXO:n, jolloin proteiinien hajotusta edistävien ubikitiiniligaasien, MuRF1:n ja MAFbx:n syntyminen estyy. (Mukaiiltu katsausartikkelista Glass, 2003)

1.3 Lihasheikkouteen johtavia tekijöitä

1.3.1 Denervaatio

Ikääntyneillä ihmisillä lihasten koko on pienentynyt ja toimintakyky on huonontunut lihasproteiinien katabolian lisääntymisen vuoksi. Useat korkean iän mukanaan tuomat seikat vaikuttavat katabolian tehostumiseen. Motoristen hermojen kuoleminen (denervaatio) ja sen myötä motoristen yksiköiden uudelleen muokkautuminen on luultavasti merkittävin lihaksia heikentävä tekijä (Brown, 1972). Hermon kuollessa myös lihassolut voivat surkastua kokonaan, jolloin lihas pienenee. Toisaalta motorisen yksikön hermotus voi korjaantua niin, että jäljelle jääneet hermot kasvattavat haaroja, jotka liittyvät denervoituneeseen motoriseen yksikköön (reinnervaatio). Tällöin lihassolujen surkastuminen estyy. Usein reinnervoituneista lihassoluista tulee hitaasti supistuvia ja vähemmän voimaa tuottavia, vaikka ne olisivat alun perin olleet nopeasti supistuvia (Campbell ym., 1973).

1.3.2 Oksidatiivinen stressi

Oksidatiivinen stressi-hypoteesin mukaan aineenvaihdunnassa syntyvien vapaiden radikaalien aiheuttamia vaurioita kerääntyy elimistöön iän myötä, eikä antioksidanttien kapasiteetti riitä korjaamaan kaikkia niiden aiheuttamia vaurioita (ks. yleiskatsaus Yu ja Yang, 1996). Vapaat radikaalit saavat aikaan muun muassa mutaatioita mitokondrioiden DNA:han ja proteiineihin. Mutaatioiden kertyessä mitokondrioihin niiden toiminta heikkenee ja solun energiansaanti vähenee. Tästä kärsivät erityisesti luurankolihakset, joissa on aktiivisen aineenvaihdunnan vuoksi runsaasti mitokondrioita (ks. yleiskatsaus Dirks ym., 2006).

1.3.3 Liikkumattomuus ja vähäproteiininen ravinto

Fyysinen aktiivisuus on luultavasti tärkein vahvoja ja toimintakykyisiä lihaksia säilyttävä ympäristötekijä. Useiden tutkimusten mukaan kuormituksen puute, esimerkiksi vuodelevon aikana, nopeuttaa lihassäikeiden surkastumista (Bamman ym., 1998; Hortobagyi ym., 2000). Voimaharjoittelun avulla proteiinien katabolia voidaan kuitenkin estää. Myös jo menetettyä lihasmassaa ja voimantuottokykyä saadaan tehokkaasti palautettua voimaharjoittelulla (Bamman ym., 1998; Hortobagyi ym., 2000).

Lihaspoteiinien hajotusta voi tehostaa myös liian niukalti proteiineja sisältävä ravinto. Päivittäinen suositus aikuisen proteiinin saannille on 0,8 grammaa jokaista painokiloa kohti. Ikääntyneille ihmisille tämä suositus saattaa kuitenkin olla liian alhainen. Onkin esitetty, että heidän kohdallaan päivittäisen proteiinin saannin suositusta tulisi nostaa yhteen grammaan painokiloa kohti (ks. yleiskatsaus Chernoff, 2004). Suosituksista huolimatta ikääntyvät syövät usein liian vähän proteiineja (Roubenoff ja Hughes, 2000). Muita tärkeitä lihasheikkouden kehittymiseen vaikuttavia asioita ovat muun muassa anabolisten hormonien ja kasvutekijöiden väheneminen verenkierrossa sekä katabolisten tekijöiden lisääntyminen matalaintensiteettisen tulehduksen muodossa.

1.4 Krooninen matalaintensiteettinen tulehdus

Tulehdusprosessin tarkoituksena on valkosolujen ja niiden tuottamien tulehdustekijöiden avulla suojata elimistöä mikrobeilta, myrkyiltä ja muilta vierailta antigeeneiltä. Lisäksi elimistö käyttää tulehdusta vaurioituneen kudoksen korjaamiseen. Tulehdus voi olla akuutti, jolloin se kestää vain minuuteista muutamiin päiviin. Toisaalta tulehdus voi olla myös krooninen eli pitkäaikainen. Ikääntyminen on usein yhteydessä krooniseen tulehdukseen. Tämä on havaittavissa, kun verrataan nuorten ja vanhojen ihmisten seerumin tulehdustekijöiden pitoisuuksia. Esimerkiksi tulehdusta edistävien sytokiinien, interleukiini-6:n (IL-6) ja tuumorinekroositekijä- α :n (TNF- α) seerumitasojen on todettu olevan vanhoilla ihmisillä 2-4 kertaa korkeammat nuorempiin verrattuna (Paolisso ym., 1998; Dobbs ym., 1999; Greiwe ym., 2001; Krabbe ym., 2004). Tulehdustekijöiden pitoisuudet ovat kuitenkin alhaisemmat kuin akuuteissa tulehduksissa, minkä vuoksi ikääntyneiden ihmisten kroonista tulehdusta kutsutaan matalaintensiteettiseksi (ks. yleiskatsaus Sarkar ja Fisher, 2006).

1.4.1 Matalaintensiteettisen tulehduksen kehittyminen

Matalaintensiteettisen tulehduksen kehittymiseen vaikuttavat ikääntymisen aiheuttama immuunijärjestelmän säätelyn heikentyminen sekä oksidatiivinen stressi. Vapaat radikaalit ja eräät antioksidantit voivat aktivoida transkriptiotekijöitä, etenkin NF- κ B:tä (nuclear factor kappa B), jotka puolestaan aktivoivat tulehduksen syntyä edistävien, proinflammatoristen, molekyylien synteesin. Krooninen tulehdus tuottaa lisää vapaita radikaaleja, sillä niitä syntyy esimerkiksi valkosolujen toiminnan tuloksena. Näin syntyy positiivinen takaisinkytkentäkierre, joka vahvistaa tulehdusta ja oksidatiivista stressiä (ks. yleiskatsaus Chung ym., 2009). Oksidatiivinen stressi ja tulehdus liittyvät toisiinsa myös prostaglandiinien (PG) muodostumisessa. PG:t ovat kudoshormoneja, joita valmistetaan solukalvon arakidoni-rasvahaposta. Osa PG:eista osallistuu tulehdusreaktion kehittymiseen. Lisäksi niiden tuotannon sivuaineina syntyy vapaita radikaaleja ja muita herkästi reagoivia aineita, jotka aiheuttavat kudsvaurioita ja voimistavat tulehdusreaktiota (Kim ym., 2001; Chung ym., 2009).

Useiden tutkimusten pohjalta pidetään todennäköisenä, että myös rasvakudos osallistuu kroonisen matalaintensiteettisen tulehduksen kehittymiseen. Nykyaikana lihavuus on lisääntynyt etenkin hyvinvointivaltioissa ongelmaksi asti. Kehon koostumuksen muutokset ovat kuitenkin myös osa normaalia ikääntymistä. Lihasmassan pienentyessä rasvan suhteellinen osuus kasvaa, vaikka se ei näkyisikään painoindeksissä. Lisäksi rasvakudoksen sijainti kehossa muuttuu niin, että ihonalaisen rasvan määrä vähenee ja vatsaontelossa olevan rasvan määrä kasvaa (Enzi ym., 1986). Vatsaontelon rasva johtaa vyötärölihavuuteen, mikä lisää riskiä sairastua useisiin eri tauteihin, kuten tyyppin 2 diabetekseen ja sepelvaltimotautiin. Rasvasolut tuottavat useita erilaisia tulehdusreaktioiden kehittymistä edistäviä sytokiinejä, kuten TNF- α :aa ja IL-6:sta (Weisberg ym., 2003). Monissa tutkimusryhmissä on havaittu, että TNF- α :n ja IL-6:n tuotanto ja määrä verenkierrassa kasvavat lihomisen ja ikääntymisen myötä (Dandona ym., 1998; Fried ym., 1998; Kern ym., 2001). Sytokiinien muodostuminen on voimakkaampaa vatsaontelon rasvassa kuin ihonalaisessa rasvassa (ks. yleiskatsaus Fried ym., 1998). Tämän takia keskivartalolla oleva rasva on terveydelle haitallisempaa kuin ihonalaisrasva. Rasvasolut tuottavat myös MCP-1:stä (monocyte chemoattractant protein-1), joka on monosyyttejä houkutteleva kemokiini. MCP-1 saa monosyytit tunkeutumaan rasvakudokseen, jossa ne muuttuvat makrofageiksi, immuuni- ja tulehdusreaktioissa toimiviksi valkosoluiksi. Luultavasti MCP-1:stä syntyy sitä enemmän, mitä enemmän on rasvakudosta, mikä johtaa myös makrofagien lisääntyvään määrään rasvakudoksessa (Kamei ym., 2006). Eräässä hiirillä tehdyssä tutkimuksessa onkin todettu, että MCP-1:n tuotanto oli tehostunut lihavilla hiirillä hoikkiin hiiriin verrattuna. Myös makrofagit vaikuttavat kroonisen tulehduksen kehittymiseen tuottamalla muun muassa interleukiini-1:stä (IL-1), IL-6:sta ja TNF- α :aa. Nämä sytokiinit puolestaan aktivoivat uusia makrofageja ja muita immuunijärjestelmän soluja. Rasvasolujen ja makrofagien tuottamat molekyylit aiheuttavat paikallisen matalaintensiteettisen tulehduksen rasvakudoksessa. Verenkiertoon erittyessään ne ulottavat tulehdusta edistävän vaikutuksensa edelleen kaikkiin elimiin (Weisberg ym., 2003; Kamei ym., 2006).

Kroonista matalaintensiteettistä tulehdusta voi edistää ja ylläpitää myös tupakointi, joka voi aiheuttaa verisuonistossa tulehdustilan. Kun IL-6:n ja neljän muun tulehdustekijän ilmentymistä selvitettiin tupakoivien ja ei-tupakoivien, suhteellisen terveiden naisten välillä, havaittiin kyseisten molekyylien plasmakonsentraatioiden olevan koholla

tupakoivilla koehenkilöillä (Bermudez ym., 2002). Myös korkea verenpaine voi vaikuttaa kroonisen tulehduksen kehittymiseen, sillä angiotensiini II, verenpainetta nostava hormoni, stimuloi TNF- α :n, IL-1:n ja IL-6:n tuotantoa sekä aktivoi MCP-1:stä ja NF- κ B:aa (Han ym., 1999; Sanz-Rosa ym., 2005).

1.4.2 Signaalintimolekyylit matalaintensiteettisessä tulehduksessa

1.4.2.1 NF- κ B

Tulehdusprosessin keskeisin säätelijämolekyylä on transkriptiotekijä NF- κ B. Kun NF- κ B on inaktiivinen, se sijaitsee sytoplasmassa sitoutuneena I κ B-inhibiittoriproteiiniin. NF- κ B voi aktivoitua esimerkiksi vapaiden radikaalien vaikutuksesta, jolloin I κ B fosforyloidaan ja hajotetaan ubiquitiini-proteasomireitillä. I κ B:n hajotessa NF- κ B:n tumalokalisatiosignaali paljastuu ja NF- κ B kulkeutuu tumaan, jossa se aktivoi tulehdusta edistävien tekijöiden transkriptiota. Useissa eläinkokeissa on havaittu, että NF- κ B:n sitoutuminen DNA:han lisääntyy eläinten vanhetessa, joten on mahdollista, että sillä on merkittävä osuus ikääntyneiden kroonisen tulehduksen säätelyssä (Helenius ym., 1996; Yan ym., 1999; Kim ym., 2001).

NF- κ B:n säätelemiin geeneihin kuuluvat muun muassa TNF- α , IL-1 ja IL-6. Näiden geenien koodittamat molekyylit voivat puolestaan aktivoida NF- κ B:n transkription (Chung ym., 2009). Ne kuuluvat sytokiineihin, jotka ovat hormonien kaltaisia, solujenvälisessä viestinnässä toimivia proteiineja tai glykoproteiineja. Sytokiinien aikaansaamat signaalit säätelevät esimerkiksi solujen jakautumista, erilaistumista ja apoptoosia (ks. yleiskatsaus Larrubia ym., 2009).

1.4.2.2 IL-6

IL-6 on sytokiini, jolla on sekä tulehdusta edistäviä että hillitseviä ominaisuuksia (Xing ym., 1998). Sitä tuottavat immuunijärjestelmän solut, endoteelisolut sekä rasva- ja lihassolut (ks. yleiskatsaus Maggio ym., 2006). IL-6 toimii erityisesti akuutissa tulehdusvasteessa muun muassa aktivoiden T- ja B-soluja, hypotalamus-aivolisäkelisämunuais-akselia ja C-reaktiivisen proteiinin tuotantoa. Toisaalta IL-6 myös rajoittaa tulehdusta vähentäen TNF- α :n ja IL-1 β :n tuotantoa (Xing ym., 1998; Maggio ym., 2006).

Akuutin tulehduksen lisäksi IL-6 on merkittävä tekijä myös kroonisten tautien kehitymisessä (Xing ym., 1998). IL-6 signaloi kahdesta glykoproteiiniosta, IL-6R:sta ja gp130:stä, koostuvan reseptorikompleksin kautta. IL-6R on IL-6:n spesifisesti tunnistava osa, mikä esiintyy maksasolujen ja tiettyjen immuunijärjestelmän solujen kalvoon sitoutuneena sekä liukoisena (sIL-6R). Sitouduttuaan IL-6:een, IL-6R kiinnittyy kahteen gp130-molekyyliin, mitkä välittävät signaalin solun sisään. Liukoisen IL-6R:n ja yleisesti ilmentyvän gp130:n ansiosta IL-6 voi vaikuttaa myös niihin soluihin, jotka eivät ilmennä kalvoon sitoutunutta IL-6R:ää (Keller ym., 2005). Tätä kutsutaan trans-signaloinniksi (Maggio ym., 2006).

1.4.2.3 TNF- α

TNF- α :aa tuottavat pääasiassa monosyytit ja makrofagit, mutta myös jonkin verran lymfosyytit, keratinosyytit, sileät lihassolut ja kasvainsolut. Sen ilmentymistä stimuloi esimerkiksi lipopolysakkaridi eli LPS, joka on gramnegatiivisten bakteerien ulkokalvon rakenneosaa. Lisäksi sytokiinit, kuten IL-1 ja TNF- α itse, lisäävät sen aktivoitumista. TNF- α on tulehdusta edistävä sytokiini, jolla on useita biologisia vaikutuksia. Sen tehtävänä on muun muassa aktivoita valkosoluja ja edistää niiden siirtymistä verenkierrosta kudoksien tulehduspaikoille. Lisäksi TNF- α :lla on kyky tuhota kasvainsoluja sekä ohjailla solujen kasvua, erilaistumista ja apoptoosia. TNF- α :lla on kaksi reseptoria, TNF-R1 ja TNF-R2, joiden kautta se välittää signaalinsa solun sisään. TNF-R1 esiintyy lähes kaikissa soluissa, kun taas TNF-R2:ta löytyy vain immuunijärjestelmän soluista (ks. yleiskatsaus Barbara ym., 1996).

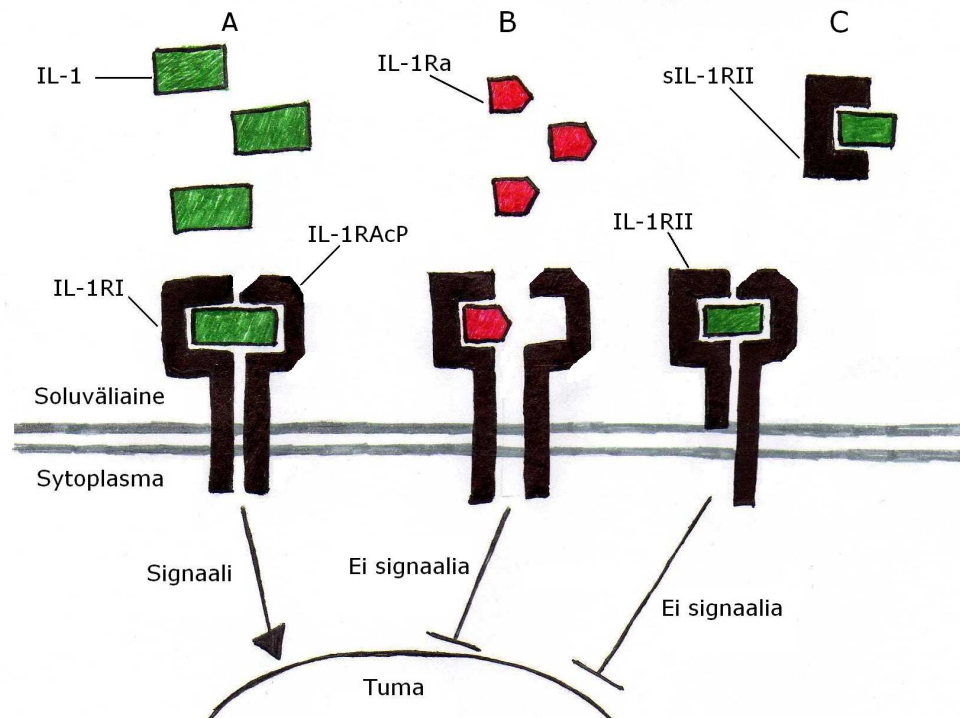
1.4.2.4 IL-1

IL-1 on tulehdusta edistävä sytokiini, joka toimii immuunipuolustuksen välittäjänä infektioiden ja tulehdusten aikana. Se ohjaa neutrofiilien, T- ja B-solujen sekä luonnollisten tappajasolujen toimintaa. Valkosolujen lisäksi IL-1 vaikuttaa muun muassa luuihin, lihaksiin, rustoihin, maksaan, aivoihin ja haimaan (ks. yleiskatsaus Dinarello, 1985). IL-1 esiintyy α - ja β -muodoissa. IL-1 α sijaitsee joko solun sisällä tai sen pinnalla. IL-1 α toimii luultavasti autokriinisella tavalla välittäen signaalin samaan soluun, joka on sen tuottanut. IL-1 β on IL-1:n kahdesta muodosta yleisempi. Se eritetään solusta ulos,

jonka jälkeen se sitoutuu muiden solujen pinnalla oleviin reseptoreihin (ks. yleiskatsaus Hallegua ja Weisman, 2002). IL-1:n molemmat muodot sitoutuvat kahdenlaisiin IL-1-reseptoreihin, joita ilmentyy useissa eri kudoksissa. Tyypin I reseptori (IL-1RI) on biologisesti aktiivinen proteiini, joka aktivoi solunsisäisen signaalireitin IL-1:n sitoutuessa siihen. Tyypin II reseptori (IL-1RII), jota on sekä liukoisena että solukalvoon sitoutuneena, on biologisesti toimimaton, eikä välitä signaalia solun sisään. Sen sijaan se sitoo IL-1:stä estäen sen vuorovaikutuksen aktiivisen tyypin I reseptorin kanssa (ks. yleiskatsaus Arend, 2002). IL-1:n toimintaa ja sen säätelyä on havainnollistettu kuvassa 3.

1.4.2.5 IL-1Ra

IL-1-perheeseen kuuluu myös IL-1-reseptoriantagonisti (IL-1Ra), joka on tulehdusta hillitsevä sytokiini. IL-1Ra on rakenteellisesti hyvin samankaltainen IL-1:n kanssa ja esiintyy sekä solunsisäisenä että liukoisena proteiinina. IL-1Ra:ia tuottavat muun muassa monosyytit, makrofagit, neutrofiilit, epiteeli- ja endoteelisolut sekä hepatosyytit (ks. yleiskatsaus Arend, 1993). Antagonisti pystyy sitoutumaan molempiin IL-1:n reseptoreihin, RI:een kuitenkin 100-kertaisella affiniteetilla RII:een verrattuna. IL-1Ra ei kuitenkaan pysty aktivoimaan signaalireittejä solun sisällä. Sitoutuessaan reseptoreihin IL-1Ra estää IL-1:stä, sekä α - että β -muotoa, kiinnittymästä niihin, jolloin niiden aiheuttama tulehdusreaktio heikkenee. IL-1Ra toimii siten IL-1:n kompetitiivisena inhibiittorina (Arend, 1993). Kyetäkseen tehokkaasti inhiboimaan IL-1:stä, IL-1Ra:n paikallisen konsentraation täytyy olla jopa sata kertaa IL-1:stä suurempi. Tämä johtuu siitä, että jo hyvin pieni määrä IL-1:stä riittää aktivoimaan tulehdusreaktion (Arend ym., 1990). Lisäksi IL-1Ra:n puoliintumisaika on hyvin lyhyt, vain kuusi minuuttia (ks. yleiskatsaus Dinarello, 1996). IL-1:n ja IL-1Ra:n välinen tasapaino on tärkeä useiden kudosten normaalissa toiminnassa. Tasapainon horjuminen puolestaan on osallisena monien sairauksien kehittymisessä. Liiallinen IL-1:n määrä tai liian alhainen IL-1Ra:n määrä vaikuttaa esimerkiksi osteoporoosin, niveltulehduksen, munuaistautien, diabeteksen ja keskushermostotautien kehittymiseen (Arend, 1993). Näistä taudeista ainakin niveltulehduksia voidaan tehokkaasti hoitaa käyttämällä antagonistia sisältävää lääkettä.



Kuva 3. IL-1:n toiminnan säätely. (A) IL-1 sitoutuu IL-1RI:een, joka saa reseptorin apuproteiiniin (IL-1RAcP) muodostamaan heterodimeerin IL-1RI:n kanssa. Tällöin reseptorikompleksi aktivoituu ja signaali kulkeutuu tumaan. (B) IL-1Ra sitoutuu myös IL-1RI:een. IL-1RAcP on kuitenkin kykenemätön kiinnittymään kompleksiin, minkä vuoksi signaalireitti ei aktivoitu. (C) IL-1RII esiintyy sekä liukoisena (sIL-1RII) että solukalvoon kiinnittyneenä muotona. Liukoinen muoto sitoo IL-1:n ja estää sitä sitoutumasta IL-1RI:een. Solukalvolla oleva muoto ei voi aktivoida signaalireittiä, koska siitä puuttuu signaalin välittämisessä olennainen sytoplasman puoleinen rakenneosaa. (Mukaiitu katsausartikkelista Dayer, 2003)

1.4.2.6 IL-10

IL-10:n tehtävänä on ehkäistä ja hillitä kehon tulehdusprosesseja rajoittamalla valkosolujen, kuten luonnollisten tappajasolujen, monosyyttien, makrofagien ja Th1-solujen toimintaa. IL-10:llä on useita tapoja tulehdusten vaimentamiseksi. Yksi keino on estää valkosoluja tuottamasta tulehdusta edistäviä sytokiinejä, kuten IL-1:stä, IL-6:sta ja TNF- α :aa. Lisäksi IL-10 heikentää makrofagien ja dendriittisten solujen kykyä tunnistaa antigeenejä ja esitellä niitä muille valkosoluille. IL-10 estää myös dendriittisten solujen erilaistumista ja kypsymistä sekä vähentää TNF- α :n reseptoreiden ilmentymistä solujen pinnalla (ks. yleiskatsaus Opal ja DePalo, 2000). Tasapaino on olennaista IL-10:n toiminnassa. Jos tätä sytokiinia on liian vähän, saattaa tulehdus voimistua vaaralliselle tasolle. Jos taas IL-10 ilmentyy liian voimakkaasti, estää se immuunipuolustusta tuhoamasta taudinaiheuttajia (ks. yleiskatsaus Mosser ja Zhang, 2008).

1.4.3 Matalaintensiteettinen tulehdus ja lihasten heikentyminen

Kroonisen matalaintensiteettisen tulehduksen tiedetään vaikuttavan monien, vanhoilla ihmisillä yleisten, tautien patogeneesiin. Muun muassa ateroskleroosiin, osteoporoosiin, dementiaan, metaboliseen oireyhtymään sekä syöpään liittyy krooninen tulehdustila (ks. yleiskatsaukset Sarkar ja Fisher 2006; Chung ym., 2009). Tulehdus on todennäköisesti myös luurankolihasien heikentymisen taustalla. Useissa sekä ihmisillä että eläimillä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu pienentyneen lihasmassan ja korkeiden sytokiini-konsentraatioiden liittyvän toisiinsa (Charters ja Grimble 1989; Roubenoff ym., 1994; Anker ym., 1999; Visser ym., 2002). Esimerkiksi Visser ym. (2002) selvittivät tutkimuksessaan, ovatko plasman korkeat IL-6- ja TNF- α -pitoisuudet yhteydessä sarkopeniaan. Tulosten mukaan henkilöillä, joilla IL-6- ja TNF- α -pitoisuudet olivat koholla, raajojen lihasmassa oli 2–4 % pienempi kuin alhaisen sytokiini-pitoisuuden omaavilla henkilöillä. Sama tutkimusryhmä havaitsi myös, että henkilöillä, joilla sytokiinitasot olivat koholla, käden puristusvoima oli alentunut 8–11 % ja polven ojennusvoima 6–9 %. Näin ollen kohonneet sytokiinitasot näyttävät olevan yhteydessä heikentyneeseen lihasvoimaan. Eräissä rottatutkimuksissa on selvitetty, että lihasten proteiinipitoisuus vähenee TNF- α :n, IL-6:n ja IL-1:n vaikutuksesta, sillä niiden infuusio käynnistää lihasproteiinien katabolian. Lisäksi TNF- α :n on havaittu inhiboivan proteiinisynteesiä sekä *in vitro*- että *in vivo*-tutkimuksissa (Charters ja Grimble 1989; Flores ym., 1989; Garcia-Martinez ym., 1993; Frost ym., 1997; Cooney ym., 1999; Greiwe ym., 2001; Haddad ym., 2005).

Kroonisella tulehduksella on itsessään katabolisia vaikutuksia, sillä tulehdusta edistävät sytokiinit edesauttavat ikääntymiseen liittyvän anoreksian kehittymistä sekä elimistön kuihtumista ja näivettymistä (kakeksia). Lisäksi on havaittu, että lihasten kasvulle olennaisten anabolisten kasvutekijöiden ja hormonien (kasvuhormoni ja IGF-1) määrä on alentunut kroonisen tulehduksen yhteydessä. IGF-1:n konsentraation aleneminen kuuluu normaaliin ikääntymiseen, mutta myös korkea IL-6:n määrä alentaa IGF-1:n tasoa (De Benedetti ym., 1997). Tutkimuksessa, joka käsitti 718 yli 65-vuotiasta naista, todettiin kävelyn heikentyneen eniten niillä, joilla oli korkeimmat IL-6:n tasot ja matalimmat IGF-1:n tasot. Samoilla henkilöillä oli myös eniten ongelmia päivittäisten liikkumista vaativien askareiden suorittamisessa, sekä korkein kuolleisuus (Cappola ym., 2003).

Yksi mekanismi, jolla krooninen matalaintensiteettinen tulehdus voi lisätä lihasten surkastumista, on TNF- α :n suora kyky vähentää proteiinisynteesiä. TNF- α pystyy myös estämään IGF-1:stä stimuloimasta proteiinisynteesiä, sekä mahdollisesti häiritsemään translaatiokoneiston muodostumista (Frost ym., 1997; Greiwe ym., 2001). Lisäksi lihasten proteiinikato tehostuu, kun TNF- α aktivoi ubikitiinin sitomista proteiineihin, jolloin ne siirretään proteasomeihin hajotettavaksi (Li ym., 1998). Näiden asioiden ohella osa tulehdustekijöistä saattaa toimia myogeneesin eli lihassyiden muodostumisen inhibiittorina. Erään *in vitro*-tutkimuksen mukaan TNF- α :n aktivoima NF- κ B vähentää myogeneesissä olennaisen MyoD-transkriptiotekijän ilmentymistä ja toimintaa (Guttridge ym., 2000).

Krooninen tulehdus saattaa edesauttaa lihasten surkastumista myös lihassolujen apoptoosin eli ohjelmoidun solukuoleman aktivoinnin kautta. Dirks ja Leeuwenburgh (Dirks ja Leeuwenburgh, 2002) havaitsivat tutkimuksessaan, että apoptoosi oli lisääntynyt 50 % 24 kuukautta vanhojen rottien lihaksissa verrattuna kuuden kuukauden ikäisiin rottiiin. TNF- α :n tiedetään olevan tärkeä apoptoosin laukaisija lihaksessa. TNF- α aktivoi solun pinnalla olevat kuolonreseptorit, jotka puolestaan käynnistävät apoptoosiin johtavan kaspasireitin (Phillips ja Leeuwenburgh, 2005). Apoptoosin voivat aloittaa myös oksidatiivisen stressin aiheuttamat vauriot mitokondrioissa (ks. yleiskatsaus Leeuwenburgh, 2003).

1.5 Vaihdevuodet

Vaihdevuodet (klimakterium) ovat noin 45–55 vuoden iässä alkava ajanjakso naisen elämässä, jolloin munasarjojen toiminta pikkuhiljaa päättyy. Tämä johtuu munarakkuloiden asteittaisesta vähenemisestä, mikä alkaa jo noin 35 vuoden iässä. Sen myötä myös munasarjojen tuottaman estrogeenin määrä vähenee vähitellen. Ennen vaihdevuosia estradiolia, estrogeenien voimakkainta muotoa, syntyy noin 400 μ g vuorokaudessa, kun taas vaihdevuosien jälkeen sen muodostuminen on pudonnut noin kuuteen μ g:aan vuorokaudessa (ks. yleiskatsaus Purohit ja Reed, 2002). Lisäksi ovulaatioita ei juuri enää tapahdu, jolloin ei myöskään synny progesteronia tuottavia keltarauhasia. Munasarjahormonien tuotannon heikentyminen näkyy muutoksina kuukautiskierrossa. Kuukautisten väli muuttuu ensin lyhyemmäksi, sitten pidemmäksi ja epäsäännöllisemmäksi. Lopulta munarakkulat loppuvat kokonaan ja kuukautiset jäävät

lopullisesti pois (menopaussi). Menopaussi ajoittuu yleensä vaihdevuosien keskivaiheille. Suomalaisilla naisilla menopaussi tapahtuu keskimäärin 51 vuoden iässä (Punnonen, 2004).

1.5.1 Vaihdevuosisoireet ja hormonikorvaushoito

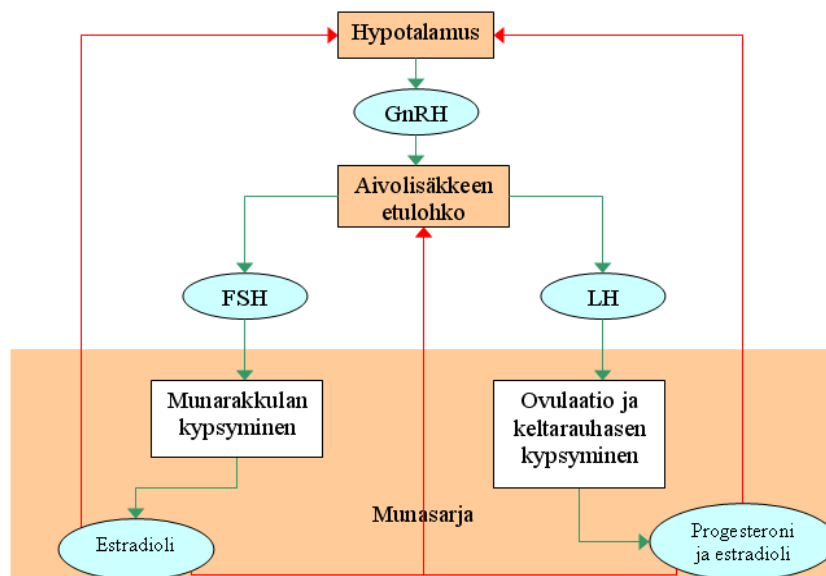
Estrogeenin väheneminen aiheuttaa useimmille naisille monenlaisia vaihdevuosisoireita. Oireet ovat yleensä vaikeimpia menopaussin jälkeisen vuoden aikana, mutta ne voivat alkaa jo ennen menopaussia. Tavallisimpia oireita ovat kuumat aallot ja hikoilupuuskat. Monilla naisilla on myös unihäiriöitä, jotka johtavat helposti väsymykseen, ärtyneisyyteen ja mielialanvaihteluihin. Muita yleisiä oireita ovat rintakivut, sydämen tykytys, päänsärky, nivel- ja lihaskivut, emättimen kuivuminen, haluttomuus ja painonnousu. Lisäksi estrogeenin puute lisää riskiä sairastua osteoporoosiin, sydän- ja verisuonitauteihin, sekä emättimen ja virtsateiden tulehduksiin. Munasarjahormonien vähenemisen uskotaan vaikuttavan myös lihasheikkouden kehittymiseen.

Vaihdevuosisoireita voi hoitaa hormonikorvaushoidolla (hormone replacement therapy, HRT), jolla korvataan elimistöstä vähenevää estrogeeniä. HRT:sta on myös merkittävä apu osteoporoosin ehkäisyssä ja hoidossa. Hormonivalmisteita on saatavilla pillereinä, laastareina, geeleinä sekä paikallishoitovalmisteina. Naisille, joilla kohtu on tallella, suositellaan estrogeenin ja progesteronin yhdistelmää, sillä progesteroni suojaa kohdun limakalvoa liikakasvulta ja siten vähentää kohtusyövän riskiä. Naiset, joilta kohtu on poistettu, voivat käyttää pelkkää estrogeeniä sisältävää korvaushoitoa. Hormonihoitona voidaan käyttää myös synteettistä tiboloni-hormonia, jolla on sekä estrogeenin, progesteronin että androgeenin (mieshormonin) kaltaisia vaikutuksia. Androgeenin vuoksi tiboloni helpottaa tavanomaisten vaihdevuosisoireiden lisäksi myös sukupuolista haluttomuutta. HRT:a ei kuitenkaan suositella kaikille. Vasta-aiheita hoidolle ovat esimerkiksi rinta- tai kohdunrungonsyöpä, endometrioosi, akuutin vaiheen veritulpat, vaikeat maksasairaudet sekä synnynnäiset, vaikeat rasva-aineenvaihdunnan häiriöt (Punnonen, 2004).

1.6 Estrogeenit

Estrogeenit on yhteisnimitys luonnollisille ja synteettisille naissukupuoliormoneille. Niiden tehtävänä on säädellä naisille tyypillisten sukupuoliominaisuuksien kehitystä ja ylläpitää niitä. Näitä ominaisuuksia ovat muun muassa kuukautiskierron alkaminen, rintojen ja kohdun kasvaminen, lantion leveneminen, emättimen limakalvon muutokset sekä sukupuolisen mielenkiinnon herääminen. Sukupuoliominaisuuksien lisäksi estrogeenit vaikuttavat lähes kaikkialla elimistössä, kuten luissa ja lihaksissa.

Estrogeenit ovat kolesterolista valmistettavia steroidihormoneja. Niiden valmistusta ja erityistä säätelevät hypotalamuksesta ja aivolisäkkeestä erittyvät hormonit. Hypotalamuksen tuottama gonadoliberiini (GnRH) kulkeutuu aivolisäkkeeseen, jossa se stimuloi gonadotropiinin, lutropiinin (LH) ja follitropiinin (FSH), vapautumista (kuva 4). LH ja FSH siirtyvät verenkierron mukana kohdekudoksiin, pääasiassa munasarjoihin. FSH säätelee munasarjoissa munarakkuloiden kypsymistä ja niiden estrogeenin tuotantoa. LH puolestaan edistää ovulaatiota sekä munarakkuloiden ja keltarauhasen kypsymistä, jolloin myös niiden estrogeenien ja progesteronin tuotanto lisääntyy. Estrogeenejä syntyy naisilla munasarjojen lisäksi istukassa, lisämunuaisen kuorikerroksessa ja rasvakudoksessa.



Kuva 4. Yksinkertainen kaavio siitä, kuinka aivot säätelevät munasarjahormonien tuotantoa. Vihreät nuolet kuvaavat positiivista säätelyä. Punaiset nuolet kuvastavat puolestaan negatiivista takaisinkytkentää eli estradioli ja progesteroni vaikuttavat hypotalamukseen ja aivolisäkkeeseen niin, että GnRH:n, FSH:n ja LH:n vapautuminen vähenee. GnRH=gonadoliberiini, FSH=follitropiini, LH=lutropiini.

1.6.1 Kehon estrogeenityypit

Elimistön luontaisia estrogeeneja ovat estradioli (E_2), estroni (E_1) ja estrioli (E_3), joista estradioli on voimakkaimmin vaikuttava. Se on myös tärkein estrogeeni hedelmällisessä iässä olevalla naisella. Estradiolia syntyy naisilla munasarjojen munarakkuloissa ja keltarauhasessa, istukassa, lisämunuaisen kuorikerroksessa sekä rasvakudoksessa. Estronista tulee merkittävä hormoni vaihdevuosien jälkeen, kun estradiolia ei enää juuri synny. Estronia muodostuu eniten lisämunuaisen kuoreessa, mutta myös munasarjoissa ja rasvakudoksessa. Estriolia puolestaan syntyy raskauden aikana istukasta sekä maksassa estradiolin ja estronin aineenvaihdunnan tuloksena.

1.6.2 Estrogeenien vaikutustavat

Klassinen mekanismi, jolla estrogeenit välittävät vaikutuksensa, on sitoutua sytoplasmassa ja tumassa sijaitseviin estrogeenireseptoreihin (ER). Niistä tyypillisimpiä ovat ER α ja ER β . Estrogeenit ovat rasvaliukoisia ja kulkeutuvat sen vuoksi helposti solu- ja tumakalvojen läpi reseptoriensa luo. Estrogeenin kiinnittyminen saa reseptorit dimerisoitumaan. ER-dimeerit kiinnittyvät kohdegeenien promoottorialueella olevaan estrogeeniherkkään elementtiin (ERE) ja saavat yleensä aikaan geenin transkription tehostumisen (ks. yleiskatsaus Björnström ja Sjöberg, 2005). Eräissä tapauksissa ER:t voivat toimia myös transkription repressoreina eli estäjinä. ER:t pystyvät säätelemään myös muiden transkriptiotekijöiden toimintaa proteiini-proteiini-vuorovaikutuksen kautta. Siten ER:t voivat epäsuorasti säädellä myös geenejä, joissa ei ole ERE-alueita. Osa estrogeenien aikaansaamista vaikutuksista on hyvin nopeita ja ei-genomisia, jotka saattavat tapahtua solukalvolla olevien ER:ien kautta (Björnström ja Sjöberg, 2005). Estrogeenien ei-genominen toiminta saa yleensä aikaan toisioläheisten muodostumisen ja solunsisäisten signaalireittien aktivoitumisen. Ei-genomiset vaikutuksetkin johtavat usein lopulta joidenkin transkriptiotekijöiden aktivaatioon (ks. yleiskatsaus Lösel ja Wehling, 2003). Varsinaisten sukupuolielinten lisäksi estrogeenit vaikuttavat useisiin eri kudoksiin. Estrogeenireseptoreita on löydetty esimerkiksi sydän- ja verisuonijärjestelmästä, keskushermostosta, immuunijärjestelmän soluista, rasvakudoksesta, luista ja lihaksista (Vidal ym., 1999; Wiik ym., 2003; ks. yleiskatsaus Turgeon ym., 2006).

1.6.3 Estrogeenien positiivinen vaikutus luurankolihasiin

1.6.3.1 Radikaalien ja tulehdussolujen torjuminen

Useissa tutkimuksissa on havaittu, että estrogeeni saattaa suojata naisten ja naaraspuolisten eläinten lihassolujen sarkolemmaa voimakkaan liikunnan aiheuttamilta vaurioilta. Liikunnasta johtuva sarkolemman rikkoutuminen saa lihasproteiineja ja – entsyymejä, kuten kreatiinikinaasia (CK), vapautumaan verenkiertoon (ks. yleiskatsaus Tiidus, 2000). Monissa tutkimuksissa on verrattu liikunnan jälkeistä veren CK-tasoa normaaleilla naarailla, uroksilla ja naarailla, joilta munasarjat on poistettu. Tällöin on huomattu, että CK-taso on pienempi normaaleilla naarailla kuin muilla vertailuryhmillä. Tämä viittaa mahdollisesti siihen, että estrogeeneilla on sarkolemmaan vahvistava vaikutus (Shumate ym., 1979; Amelink ja Bär, 1986; Amelink ym., 1990). Estrogeenien suojaava vaikutus saattaa perustua niiden kykyyn toimia antioksidanttina, jolloin ne pystyvät vähentämään sarkolemman vaurioita, joita liikunnan aikana syntyvät vapaat radikaalit aiheuttavat (Enns ja Tiidus, 2010). Lisäksi estrogeeni voi vähentää jo syntyneen lihasvaurion aiheuttamaa tulehdusta. Eräässä tutkimuksessa esimerkiksi huomattiin, että lihasvaurion aikaansaama valkosolujen, kuten neutrofiilien ja makrofagien, tunkeutuminen lihaskudokseen oli paljon vähäisempää naisilla verrattuna miehiin (Stupka ym., 2000). Valkosolujen määrä lihasvauriossa oli pienempi myös naarasrotilla ja estrogeenia saaneilla urosrotilla kuin normaaleilla urosrotilla (St Pierre Schneider ym., 1999).

1.6.3.2 Satelliittisolujen aktivoiminen

Estrogeenit osallistuvat mahdollisesti myös jo syntyneiden lihasvaurioiden korjaamiseen aktivoimalla lihaksen kantasoluja eli satelliittisoluja. Eräässä tutkimuksessa estrogeenia saaneiden urosrottien satelliittisolujen havaittiin lisääntyneen juoksuharjoituksen jälkeen. Sen sijaan satelliittisolut eivät lisääntyneet uroksilla, jotka eivät olleet saaneet estrogeenia. Samassa laboratoriossa suoritettiin juoksutuskokeita myös naarasrotilla, joilta munasarjat oli poistettu ja joille annettiin estrogeenia. Näillä rotilla aktivoituneiden ja jakautuvien satelliittisolujen määrä oli lisääntynyt (Enns ja Tiidus, 2008).

1.6.3.3 Apoptoosin inhiboiminen

Estrogeeneilla on havaittu olevan apoptoosia ehkäiseviä vaikutuksia useissa kudoksissa, kuten sileissä lihaksissa, verisuonten endoteelissa ja myös luurankolihasissa. Hiiren C2C12-lihassolulinjan avulla suoritetuissa tutkimuksissa estradioli pystyi aktivoimaan PI3K-Akt-signaalintireitin ja Akt puolestaan esti apoptoosia edistävän BAD-proteiinin toiminnan (Vasconsuelo ym., 2008). Estradiolin suojaavaa vaikutusta selvitettiin myös estämällä sitä sitoutumasta lihassoluissa oleviin reseptoreihinsa käyttäen joko anti-ER-vasta-ainetta tai siRNA-menetelmää. Tällöin mitokondrioiden sytokromi c vapautui sytoplasmaan (Vasconsuelo ym., 2008). Sytokromi c toimii normaalisti mitokondrioissa osana elektroninsiirtoketjua, mutta sytoplasmassa se aktivoi apoptoosia (Vempati ym., 2007).

1.6.4 Estrogeenien vähenemisen ja HRT:n vaikutus eri kudoksiin

Vaihdevuosien aikana tapahtuvan munasarjahormonien tuotannon nopean vähenemisen tiedetään olevan yhteydessä luurankolihasen heikentymiseen (Phillips ym., 1993). Siten on mahdollista, että estrogeenien puute osallistuu merkittävällä tavalla sarkopenian kehittymiseen ja lihasvoiman pienenemiseen vaihdevuosi-ikäisillä naisilla. Erityisesti estrogeenin väheneminen saattaa vaikuttaa tyyppin II eli nopeisiin lihassoluihin, sillä niissä ilmentyy enemmän ER α :aa kuin hitaissa lihassoluissa. Tästä saattaa johtua se, että iän myötä surkastuvista lihassoluista suurin osa on nopeita lihassoluja (Brown, 2008).

1.6.4.1 Sytokiinin lisääntyminen

Yksi tapa, jolla estrogeenien puute voi edesauttaa lihasheikkouden kehittymistä, on tulehdusta edistävien sytokiinin, kuten IL-6:n ja TNF- α :n tuotannon lisääminen. Ainakin erään reumaan liittyvän tutkimuksen perusteella tiedetään, että estrogeenien puute edesauttaa CD-16-reseptorin ilmentymistä monosyyttien ja makrofagien pinnalla. Kyseisen reseptorin aktivoituminen puolestaan lisää sytokiinin tuotantoa näissä soluissa (Kramer ym., 2004). Lisäksi estradiolin puute aiheuttaa TNF- α :n ja IL-6:n vapautumista ainakin luuytimessä ja luuperäisistä soluista, kun taas estradiolin lisääminen inhiboi sitä (Pottratz ym., 1994; Srivastava ym., 1999). IL-6:n liukoisen reseptorin (sIL-6R) seerumitasojen on

raportoitu kohonneen naisilla, joille on tehty munasarjojen poisto. Kun tällaisille naisille annettiin estrogeenia sisältävää hormonikorvaushoitoa, sIL-6R:n lisääntyminen seerumissa estyi (Girasole ym., 1999).

1.6.4.2 Rasvakudoksen lisääntyminen

Estrogeenin väheneminen vaikuttaa normaalin ikääntymisen ohella myös kehon koostumuksen muuttumiseen niin, että rasvakudoksen määrä kasvaa ja sen sijainti painottuu vatsaonteloon ihonalaiskudoksen sijasta (Meli ym., 2004). Tämä johtaa rasvasolujen tuottamien tulehdussytokiinien lisääntymiseen. Sytokiinit taas edistävät matalaintensiteettistä tulehdusta. Mekanismeja, joilla estrogeenin puute vaikuttaa rasvan lisääntymiseen, ei tiedetä tarkkaan. Yksi tapa voi kuitenkin olla se, että estrogeeni inhiboi lipoproteiinilipaasin (LPL) toimintaa (Pedersen ym., 2004). LPL on entsyymi, joka hajottaa rasvaa sellaiseen muotoon, että rasvasolut voivat ottaa sitä sisäänsä varastoitavaksi. LPL-geenissä on ERE -alue, johon estrogeeni voi sitoutua ja inhiboida LPL-geenin transkriptiota. Menopausin kokeneilla naisilla tätä inhibitiota ei tapahdu, joten LPL:n määrä ja toiminta lisääntyvät ja rasvan varastointi tehostuu (Homma ym., 2000).

Estrogeenit saattavat vaikuttaa rasvan määrään myös epäsuorasti, sillä estrogeenien yhteydestä fyysisen aktiivisuuden lisääntymiseen on havaittu viitteitä (Brown, 2008). Siten on mahdollista, että vaihdevuosina estrogeenien väheneminen vaikuttaa liikuntainnostuksen hiipumiseen ja sitä kautta rasvakudoksen kasvamiseen (Brown, 2008). Estrogeenien puutteen aiheuttamaa inaktiivisuutta on selvitetty naarasrottien juoksutuskokeilla. Tutkimuksen alussa rotat juoksivat yli kuusi kilometriä päivässä. Munasarjojen poiston jälkeen niiden juoksumatka lyheni aluksi noin kahteen kilometriin päivässä, josta se lyheni entisestään niiden 20 viikon aikana, jonka rotat elivät estrogeenipuutteessa. Tämän jälkeen rotille annettiin hormonikorvausta, jolloin juoksumatka piteni lähes alkuperäiseksi (Brown, 2008). Samantyyllisiä tuloksia on saatu myös tutkimuksesta, jossa rottien juoksumatkaa seurattiin normaalin estruskierron aikana. Näillä rotilla juoksumatka oli kolme kertaa pidempi voimakkaan estrogeenin erityksen vaiheessa verrattuna matalan estrogeenin vaiheeseen (Eckel ym., 2000).

1.6.4.3 HRT:n käyttö ja lihakset

Muutamissa lihasten fyysisiin ominaisuuksiin keskittyneissä satunnaistetuissa tutkimuksissa on osoitettu, että HRT:lla on positiivisia vaikutuksia ikääntyneiden naisten lihaksiin (Skelton ym., 1999; Sipilä ym., 2001). Hormonihoidon avulla naiset voivat mahdollisesti säilyttää lihastensa voiman vaihdevuosia edeltävällä tasolla tai jopa parantaa sitä. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa peukalon lähentäjälihaksen isometrinen voima parani noin 15 % naisilla, jotka käyttivät estrogeenivalmistetta 6–12 kuukautta (Skelton ym., 1999). Toisessa tutkimuksessa ylöspäin suuntautuva hyppyvoima oli kontrolliryhmään verrattuna 11 % parempi naisilla, jotka olivat käyttäneet HRT:a 12 kuukautta. Sen sijaan polven ojennusvoiman parantumiseen HRT:lla ei ollut merkitsevää yhteyttä, mutta se huononi hiukan kontrolliryhmäläisillä. Hormonihoitoon yhdistetty voimakas liikunta paransi lihasvoimaa enemmän kuin HRT yksinään (Sipilä ym., 2001). HRT:n vaikutuksia on tutkittu myös postmenopausaalisilla identtisillä kaksosnaisilla, joista toinen käyttää HRT:a, kun taas toinen ei ole koskaan käyttänyt sitä. HRT:a käyttävillä naisilla havaittiin positiivisia muutoksia kehon koostumuksessa, sillä rasvan määrä reisilihaksen sisällä ja koko reiden alueella oli pienentynyt HRT:a käyttämättömiin sisaruksiin verrattuna. Myös koko kehon rasvaprosentti oli alentunut (Ronkainen ym., 2009). Tutkimustieto HRT:n hyödyistä ei kuitenkaan ole täysin yhdenmukaista, sillä useat tutkimusryhmät eivät ole havainneet merkittävää eroa HRT:a käyttävien ja ei-käyttävien naisten lihasmassassa ja -voimassa (Ribom ym., 2002; Tanko ym., 2002; Kenny ym., 2005).

2 Tutkimuksen tarkoitus

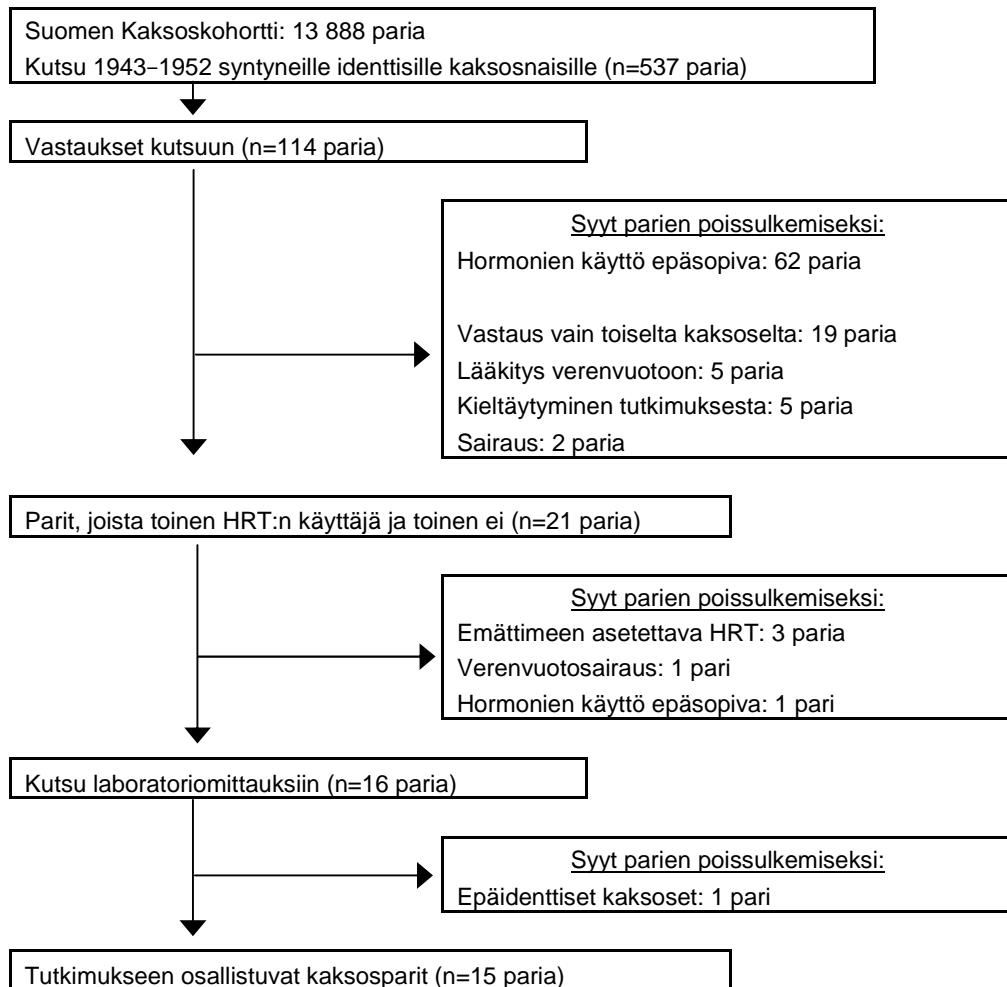
Tämän tutkimuksen tavoitteena oli saada lisätietoa iän ja hormonikorvaushoidon yhteyksistä tulehdustekijöihin, joiden arvellaan edistävän luurankoli hasten heikentymistä vanhemmalla iällä. Tutkimustulosten kautta pystytään paremmin ymmärtämään, kuinka vaihdevuosi-ikäiset naiset voivat säilyttää luurankoli hastensa massan ja voiman ja siten ylläpitää parempaa elämänlaatua. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää:

1. Onko ikä yhteydessä tiettyjen tulehdussytokiinien (IL-1 β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1Ra, TNF- α ja IL-10) määrään seerumissa?
2. Onko ikä yhteydessä näiden sytokiinien geenien ilmentymiseen luurankoli haksissa, rasvassa ja valkosoluissa?
3. Miten hormonikorvaushoito on yhteydessä sytokiinien määrään seerumissa?
4. Onko hormonikorvaushoito yhteydessä sytokiinien paikalliseen ilmentymiseen lihaksessa, rasvassa ja valkosoluissa?
5. Ovatko ikä tai HRT yhteydessä koehenkilöiden kehon tai lihaksen koostumukseen?

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Koehenkilöt

Tämä tutkimus pohjautuu SAWES-projektiin (“Sarcopenia –Skeletal Muscle Adaptation to Postmenopausal Hypogonadism, Effects of Physical Activity and Hormone Replacement Therapy in Older Women - Genetic and Molecular Biological Study on Estrogen-related Pathways and Physical Activity”), joka koostuu neljästä alatutkimuksesta. Tutkimuksessa on kaksi eri koehenkilöryhmää. Toisen ryhmän muodostavat identtiset kaksosnaiset, jotka on rekrytoitu projektiin vuonna 1974 perustetusta Suomen Kaksoskohortista (n=13888 paria). Tutkimuskutsu ja alustava kyselylomake lähetettiin pareille, jotka ovat syntyneet vuosina 1943–1952 (n=537 paria). Niitä pareja, jotka olivat diskordantteja HRT:n suhteen (kaksosista toinen oli parhaillaan HRT:n käyttäjä ja toinen ei), pyydettiin vastaamaan kutsuun. Vastauksen lähetti 114 kaksosparia. Heistä valittiin ne parit, jotka olivat halukkaita osallistumaan laboratoriotutkimuksiin ja joista toinen ei ollut koskaan käyttänyt HRT:a (n=21 paria). Lopulta tutkimukseen osallistui 15 kaksosparia, jotka ovat iältään 54–62 vuotiaita ja joilla ei ollut mitään vasta-aiheita tutkimukselle. Kaksosten rekrytoinnin kulku on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Kaavio postmenopausaalisten identtisten kaksosnaisten rekrytoimisesta SAWES-projektiin.

SAWES-projektiin osallistuessaan HRT-koehenkilöillä oli ollut hoito käytössään keskimäärin 6,9 vuotta (\pm 4,1 vuotta). Osa heistä käytti hormonihoitoa, joka sisälsi sekä estradiolia että progesteronia ($n=6$). Osalla naisista oli käytössään pelkkä estradioli ($n=5$). Loput HRT-ryhmän naiset ($n=4$) käyttivät tibolonia. Tässä tutkimuksessa tibolonin käyttäjät ja heidän sisarensa päätettiin jättää tilastollisista analyyseistä pois heidän vähäisen lukumääränsä vuoksi. Näin voitiin myös keskittyä estradiolia sisältävän hoidon aikaansaamiin vaikutuksiin tibolonin androgeenisten ominaisuuksien häiritsemättä. Tästä johtuen HRT- ja ei-HRT-ryhmissä on 11 koehenkilöä.

Toinen SAWES-projektin koehenkilöryhmä (fertiili-ikäiset) koostuu 60 hedelmällisessä iässä olevista (30–40-vuotta) naisista, jotka on valittu tutkimukseen satunnaisotannalla väestörekisteristä. Tutkimukseen osallistumisen edellytyksenä oli, että he eivät käytä

hormonivalmisteita, joilla tarkoitetaan raskauden ehkäisyyn käytettäviä ehkäisytabletteja, hormonilaastareita, emätinrenkaita ja hormonikierukoita, tai kuukautishäiriöihin tarkoitettua keltarauhashormonivalmistetta. Fertiili-ikäisten ryhmästä valittiin satunnaisotannalla tätä tutkimusta varten 30–35 vuotiaita naisia (n=14).

3.2 Verinäytteenotto sekä valkosolujen ja seerumin eristäminen

Koehenkilöiltä otettiin laskimoverinäyte aamulla 12 tunnin paaston jälkeen. Kyynärtaivessa oleva näytteenotto kohta desinfioidiin ja siitä otettiin verta muun muassa valkosolujen ja seerumin eristystä varten. Valkosolut eristettiin natriumsitraattia sisältävillä BD Vacutainer™ CPT™ Cell Preparation-putkilla valmistajan ohjeiden mukaan (BD Vacutainer Systems, Preanalytical solutions, Becton, Dickinson and Company, USA). Valkosolut säilöttiin -80 °C:een.

Seerumin saamiseksi verta otettiin noin 8 ml seerumigeeliputkiin ja niitä seisotettiin 15 minuuttia huoneenlämmössä. Seisotuksen jälkeen putkia sentrifugoitiin 10 minuuttia (3500 g, +4°C), jonka tuloksena saatu seerumi jaettiin pienempiin putkiin (500µl/putki) ja säilöttiin -80 °C:een.

3.3 Reiden koostumuksen määrittäminen

Koehenkilöiden vasemman reiden lihas- ja rasvakoostumus tutkittiin Keski-Suomen keskussairaalassa tietokonetomografian (CT) avulla (Siemens Somatom Emotion scanner, Siemens AG, Erlangen, Saksa). CT-kuvat otettiin ison sarvennoisen (trochanter major) ja polven lateraalisen nivellinjan välisen alueen keskeltä. Kuvat analysoitiin Jyväskylän yliopistossa kehitetyllä ohjelmalla (Geanie 2.1, Commit Oy, Espoo). Ohjelma erottaa rasvan ja rasvattoman kudoksen toisistaan tiettyjen radiologisten tiheysarvojen perusteella. CT-kuvista määritettiin koko reiden poikkipinta-ala (sisältää ihonalaisen ja lihaksen sisään tunkeutuneen rasvan), ihonalaisen rasvan pinta-ala sekä rasvattoman- ja rasvakudoksen suhteelliset osuudet. Lihassaition sisäisen rasvan pinta-ala laskettiin niin, että lihasaitio rajattiin piirtämällä viiva peitinkalvon eli faskian kohdalle. Tällöin saatiin ihonalainen rasva poissuljettua kuvasta. Sen jälkeen ohjelma automaattisesti erotteli lihasaition rasvan

ja rasvattoman kudoksen. Lisäksi koehenkilöiltä mitattiin koko kehon rasvaprosentti bioelektristä impedanssia käyttäen (InBody (720), Biospace, Seoul, Korea).

3.4 Lihas- ja rasvakoepalojen ottaminen

Koepalojen otto suoritettiin aamupäivän aikana yön yli kestäneen paastoamisen jälkeen. Koehenkilöitä ohjeistettiin myös välttämään voimakasta liikuntaa näytteiden ottoa edeltävinä päivinä sekä näytteenottopäivän aamuna. Koepalojen otto suoritettiin asiantuntevan lääkärin ja hoitajan avulla käyttäen steriilejä välineitä ja toimintatapoja.

Lihaskoepalat otettiin vastus lateralis-lihaksen keskikohdasta, joka on lihaksen paksuin kohta, ja jossa ei kulje suuria verisuonia tai hermoja. Ihokarvojen ajelun ja desinfioinnin jälkeen näytteenottokohtaan tehtiin ihonsisäinen, ihonalainen ja lihaksen sidekudoskalvon paikallispuudutus (2-3 ml Lidocain 10 mg/ml cum adrenalin 10µg/ml, Orion, Finland). Puudutusta ei ulotettu lihaksen sisälle asti, jotta vältettäisiin puudutteen mahdolliset haitalliset vaikutukset näytteeseen. Iho ja lihaksen päällä oleva sidekudoskalvo avattiin kirurgin veitsellä, jonka jälkeen otettiin lihasnäyte (noin 50–100 mg) käyttäen 5 mm Bergströmin neulaa. Haava suljettiin perhosteipillä. Lisäksi haavan ympärille laitettiin joustava kompressioside. Koehenkilöt saivat lähteä kotiin noin 20 minuutin levon jälkeen. Heitä neuvottiin poistamaan kompressioside 6-8 tunnin kuluttua tai viimeistään seuraavana aamuna. Haavan aiheuttamaa kipua he voisivat hoitaa ottamalla 500 mg parasetamolia 2-3 kertaa vuorokaudessa 24 tunnin ajan. Heitä neuvottiin myös välttämään saunomista ja raskasta fyysistä kuormitusta kolmen päivän ajan. Lihasnäyte puhdistettiin mahdollisesta side- ja rasvakudoksesta, jonka jälkeen se jäädytettiin välittömästi nestemäisessä työssä ja säilöttiin -80 °C:een biokemiallisia analyysejä varten.

Ennen rasvakoepalan ottoa suoritettiin ihonsisäinen paikallispuudutus (1 ml Lidocain cum adrenalin) 12 G:n neulalla. Rasvanäyte otettiin navan tasolta noin 10 cm navasta sivulle, jonka jälkeen näytteenottokohta suljettiin steriilillä teipillä. Koepalasta puhdistettiin näkyvä veri steriilin fysiologisen suolaliuoksen avulla, jonka jälkeen näyte käsiteltiin samoin kuin lihaskoepala.

3.5 RNA:n eristäminen lihasnäytteistä

RNA-eristys suoritettiin käyttäen Trizol -reagenssia (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Lihasnäytettä käytettiin eristykseen 20–100 mg/1ml Trizol:ia. Homogenoinnissa käytettiin FastPrep -homogenointiputkia (MP Biomedicals, Illkrich, Ranska) sekä FastPrep FP120 -laitetta (ThermoSavant, Savant Instruments, Holbrook, NY, USA). Näytteitä homogenoitiin FastPrep -laitteessa 1-2 kertaa 10 sekunnin ajan nopeudella 6. Homogenointien välillä putkien annettiin olla jäällä noin minuutin ajan. Homogenoinnin jälkeen putkien annettiin olla huoneenlämmössä 5 minuuttia, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 10 minuuttia (12000 g, +4°C). Homogenaatti siirrettiin puhtaisiin Eppendorf-putkiin ja niiden annettiin olla huoneenlämmössä viisi minuuttia. Tämän jälkeen homogenaattiin lisättiin 200 µl kloroformia ja putkia sekoitettiin käänтелеlemällä. Putkien annettiin olla huoneenlämmössä 2-3 minuuttia, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 15 minuuttia (12000 g, +4°C). Sentrifugoinnissa muodostunut yläfaasi pipetoitiin puhtaisiin Eppendorf-putkiin ja niihin lisättiin 500 µl isopropanolia RNA:n saostamiseksi. Putkien annettiin seistä huoneenlämmössä 10 minuuttia, minkä jälkeen niitä sentrifugoitiin 10 minuuttia (12000 g, +4°C). Supernatantti poistettiin ja pellettejä pestiin 75 % etanolilla (1 ml). Putkia sekoitettiin vortexilla ja sentrifugoitiin viisi minuuttia (7500 g, +4°C), minkä jälkeen supernatantti poistettiin ja pellettejä kuivattiin antamalla putkien olla avoinna pöydällä. Pelletit liuotettiin jäällä 20-40 µl:aan DEPC-ddw-vedeen (DEPC treated double distilled water). RNA:n puhtauden ja saannon määrittäminen tehtiin NanoDrop ND-1000 -spektrifotometrillä (Thermo Scientific, Wilmington, USA). Valmiit RNA-näytteet säilöttiin -80 °C:een.

3.6 RNA:n eristäminen rasvanäytteistä

Rasvanäytteiden RNA eristettiin Helsingin Biomedicumissa käyttäen RNAqueous-Microkittiä (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA). Näytteet homogenoitiin neulan (18 G) ja ruiskun avulla, jonka jälkeen eristys suoritettiin kitin ohjeiden mukaan.

3.7 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)

Tässä tutkimuksessa määritettiin IL-1 β :n, IL-1Ra:n TNF- α :n, ja IL-10:n proteiinitasoja fertiili-ikäisten ja postmenopausaalisten naisten seerumissa. Tämä tehtiin ELISA-menetelmällä, jolla voidaan havaita biologisesta näytteestä tietty antigeeni spesifisen vasta-aineen avulla. ELISA suoritettiin kaupallisella kitillä (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, USA) valmistajan ohjeiden mukaan. Tulokset mitattiin aallonpituudella 450 nm.

3.8 Käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktio

Koehenkilöiden lihas- ja rasva ja valkosolunäytteistä eristettyä RNA:ta käännettiin sitä vastaavaksi komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) kvantitatiivista Real Time-PCR-menetelmää (qRT-PCR) varten. Lisäksi cDNA:ksi käännettiin kaupallista valkosolun RNA:ta (Yorkshire Bioscience Blood TL total RNA, 1 μ g/ μ l), jota käytetään standardisuorien tekoon qRT-PCR:ssä. Käännöt tehtiin kaupallisen kitin (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, CA, USA) avulla. Yksi reaktioseos oli 40 μ l ja se tehtiin jäällä taulukossa 1. esitetyn ohjeen mukaan.

Taulukko 1. Reaktioseoksen valmistus käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktiota varten.

1x reaktioseos

	Tilavuus (μ l)
10x RT Buffer	4
25x dNTP Mix (100 mM)	1,6
10x RT Random Primers	4
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	2
Nuclease-free H ₂ O	} 28,4
RNA	
Yhteensä	

Reaktioseokseen tarvittavan RNA:n määrä laskettiin kunkin näytteen konsentraation perusteella niin, että reaktioon tuli 1 µg RNA:ta. Reaktio suoritettiin PCR-laitteella (Eppendorf Mastercycler Epgradient S, Eppendorf, Hampuri, Saksa) taulukossa 2. esitetyn ohjelman mukaan.

Taulukko 2. Ohjelma, jota käytettiin käänteistranskriptaasipolymeraasiketjureaktiossa.

	Vaihe 1	Vaihe 2	Vaihe 3	Vaihe 4
Lämpötila (°C)	25	37	85	4
Aika	10 min	120 min	5 s	∞

3.9 Kvantitatiivinen Real Time-PCR (qRT-PCR)

Kvantitatiivisella Real Time PCR-menetelmällä määritettiin IL-1β:n, IL-1RI:n, IL-1RII:n, IL-1Ra:n, TNF-α:n ja IL-10:n lähetti-RNA:n paikallistasot luurankolihasessa, rasvassa ja valkosoluissa. Normalisointigeeninä käytettiin GAPDH:ta, johon kaikki tulokset suhteutettiin. Standardisuoria varten käännetyistä cDNA:sta tehtiin laimennossarja veteen (0,2, 2, 20 ja 200 ng /5 µl). Lisäksi näytteiden cDNA:t laimennettiin vedellä 1:10. Reaktioseoksen valmistamiseen käytettiin kaupallisia mastermix- (Taqman Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems) ja alukeseoksia (Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Alukkeiden tuotenumero on esitetty liitteessä 1. Yhteen näytteeseen riittävän reaktioseoksen tilavuus oli 20 µl ja sen ohje oli seuraava: 12,5 µl mastermix-seosta, 1 µl alukeseosta ja 6,5 µl vettä. Reaktioseosta pipetoitiin 96-kuoppalevyn kaivoihin 20 µl. Reaktioseokseen lisättiin 5 µl standardisuora- tai näyte-cDNA:ta, jolloin reaktion kokonaistilavuudeksi tuli 25 µl. Kutakin näytettä pipetoitiin kolmeen rinnakkaiseen kuoppaan. Pipetoinnin jälkeen nesteet spinnattiin nopeasti kuoppien pohjalle sentrifugilla (Jouan C3i Multifunction Centrifuge, Thermo Electron Corporation, Ranska). PCR-reaktio suoritettiin 7300 Real Time PCR System-laitteella (Applied Biosystems) taulukossa 3 esitetyn ohjelman mukaan.

Taulukko 3. Ohjelma, jota käytettiin kvantitatiivisessa Real Time-PCR:ssä.

	Vaihe 1	Vaihe 2	Vaihe 3	Vaihe 4
Lämpötila (°C)	50	95	95	60
Aika	2 min	10 min	15 s	1 min

3.10 Tilastoanalyysit

Tilastoanalyysit suoritettiin Excel 2002 ja SPSS 15.0 ohjelmilla. Tässä tutkimuksessa koehenkilöryhminä olivat nuoret fertiili-ikäiset naiset (n=14), HRT:a käyttämättömät naiset (n=11) sekä HRT:a käyttävät naiset (n=11). Jokaisen tulehdussytokiinin eri kudoksista saaduista lähetti-RNA-tasoista sekä seerumin proteiinitasoista laskettiin kullekin koehenkilöryhmälle keskiarvo ja -hajonta. Keskiarvojen normaalijakautuneisuuden selvittämiseksi käytettiin Shapiro-Wilk-testiä. Tulosta pidettiin normaalisti jakautuneena, kun *P*-arvo oli vähintään 0,05. Tutkittaessa, eroavatko kaksoset sytokiinin paikallis- ja seerumitasojen suhteen, käytettiin parittaista t-testiä. Ei-parametristä testiä käytettiin, kun muuttujat eivät olleet normaalisti jakautuneet. Ikääntymisen yhteyttä sytokiineihin selvitettiin vertaamalla fertiili-ikäisiä ja ei-HRT:a käyttäviä naisia. Heidän erojensa tutkimiseen käytettiin riippumattomien otosten t-testiä tai ei-parametristä testiä. Eri koehenkilöryhmien väliset erot reiden lihas- ja rasvakoostumuksessa sekä kehon rasvaprosentissa selvitettiin laskemalla ryhmien keskiarvot ja -hajonnat.

4 Tulokset

4.1 Sytokiinien systeemiset tasot

4.1.1 Iän yhteys

Iän merkitystä matalaintensiteettisen tulehduksen kehitykseen selvitettiin vertaamalla sytokiinien systeemisiä ja paikallisia tasoja fertiili-ikäisillä ja postmenopausaalisilla naisilla, jotka eivät ole käyttäneet hormonivalmisteita. Postmenopausaalisten naisten TNF- α :n taso oli fertiili-ikäisiin naisiin verrattuna merkitsevästi korkeampi ($P < 0,001$, kuva 6). Myös seerumin IL-10:ä oli postmenopausaalisilla noin kaksinkertainen määrä fertiili-ikäisiin verrattuna, joskaan ero ei ollut merkitsevä (kuva 7). Muiden sytokiinien kohdalla merkitseviä eroja ei ollut (kuvat 9 ja 11).

4.1.2 HRT:n yhteys

Hormonikorvaushoidon yhteyttä sytokiinien seerumi- ja paikallistasoihin tutkittiin vertaamalla keskenään postmenopausaalisia kaksossisaruksia, joista toinen oli käyttänyt hormonivalmistetta useita vuosia ja toinen ei ollut koskaan käyttänyt. Seerumista tutkituissa sytokiinien proteiinitasoissa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja hormonia käyttävien ja ei-käyttävien naisten välillä.

4.2 Sytokiinien paikalliset transkriptiotasot eri kudoksissa

Sytokiinien ilmentymistä lähetti-RNA-tasolla lihas- ja rasvakudoksessa sekä valkosoluissa tutkittiin qRT-PCR-menetelmällä. Rasvakudos oli IL-10:n ja IL-1RI:n ylivoimainen tuottaja (kuvat 7 ja 8). Myös muut sytokiinit IL-1RII:sta lukuun ottamatta, ilmentyivät rasvassa hyvin. Valkosolut ilmensivät sytokiinejä hyvin IL-1RII:sta lukuun ottamatta. Sen sijaan luurankolihakset eivät näytä tuottavan IL-1 β :aa, IL-1RII:sta ja IL-1Ra:a juuri ollenkaan (kuvat 9, 10 ja 11). Myös muiden sytokiinien ilmentyminen lihaksessa oli hyvin vaatimatonta. Tutkimme sytokiinien lähetti-RNA-tasot ensimmäisenä kaksosten lihasnäytteistä. Koska ilmentymistä ei käytännössä ollut lainkaan, päätettiin osa

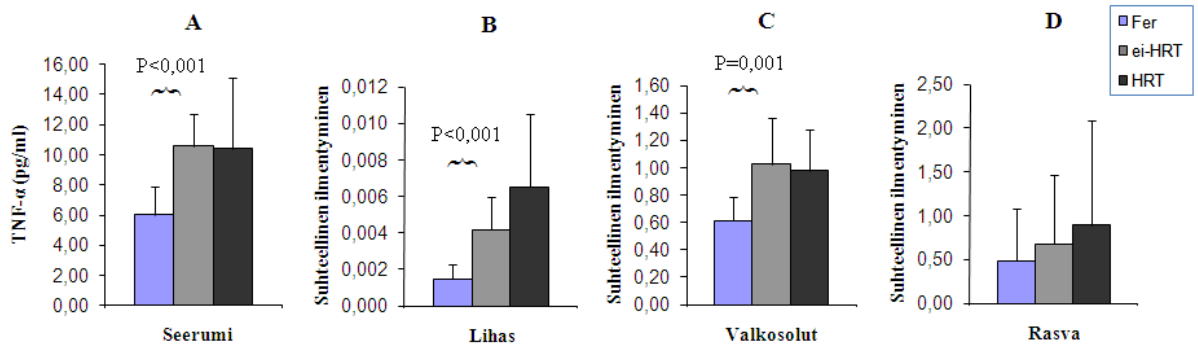
sytokiineistä (IL-1 β ja IL-1Ra) jättää tutkimatta kokonaan fertiili-ikäisten naisten lihasnäytteistä.

4.2.1 Iän yhteys

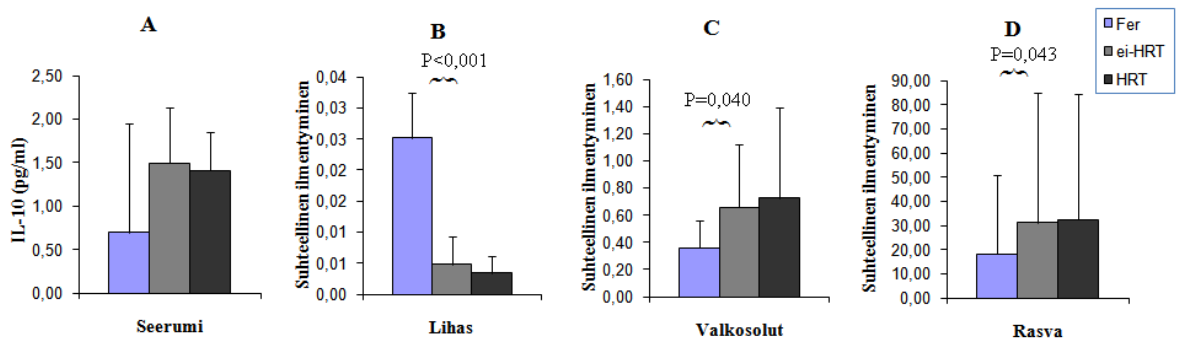
Lihaskudoksessa havaittiin TNF- α :n ja IL-1RI:n lähetti-RNA-tasojen olevan merkitsevästi suurempia postmenopausaalisilla naisilla fertiili-ikäisiin verrattuna ($P < 0,001$ ja $P = 0,004$ edellä mainitussa järjestyksessä, kuvat 6 ja 8). IL-10:n ilmentyminen lihaksessa oli puolestaan matalampaa postmenopausaalisilla kuin fertiili-ikäisillä ($P < 0,001$, kuva 7). Valkosoluista tutkituista sytokiineistä IL-1 β :n ja IL-1Ra:n lähetti-RNA-tasot olivat merkitsevästi matalammat postmenopausaalisilla naisilla fertiili-ikäisiin verrattuna ($P < 0,001$ ja $0,001$ edellä mainitussa järjestyksessä). Sen sijaan valkosolujen TNF- α ja IL-10 olivat korkeammalla postmenopausaalisilla kuin fertiili-ikäisillä ($P = 0,001$ ja $0,040$ edellä mainitussa järjestyksessä). Rasvakudoksessa IL-10:n ilmentyminen oli postmenopausaalisilla naisilla tilastollisesti merkitsevästi voimakkaampaa ($P = 0,043$, kuva 7) ja IL-1RI:n puolestaan alhaisempaa ($P = 0,005$, kuva 8), kuin fertiili-ikäisillä naisilla.

4.2.2 HRT:n yhteys

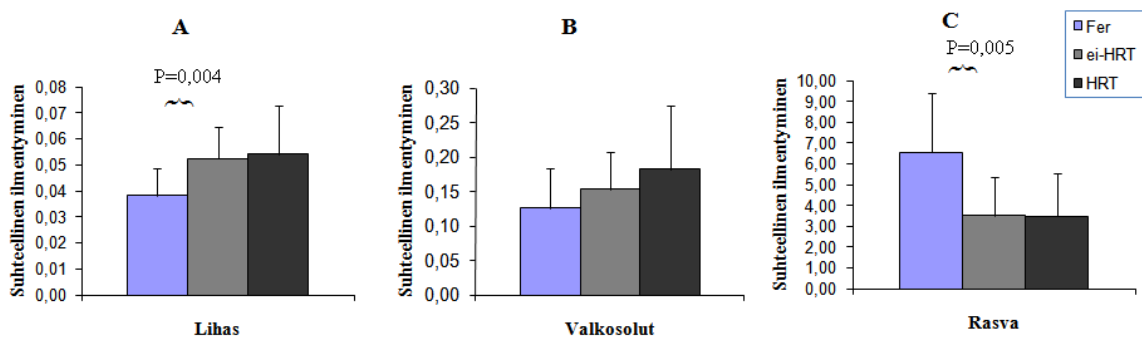
Hormonikorvaushoidolla ei havaittu olevan tilastollisesti merkitsevää yhteyttä lihaksista ja valkosoluista tutkittuihin sytokiineihin. Sen sijaan rasvakudoksessa IL-1RII:n ilmentyminen oli vähäisempää hormonihoidon käyttävillä naisilla kuin ei-käyttäjillä ($P = 0,043$, kuva 10).



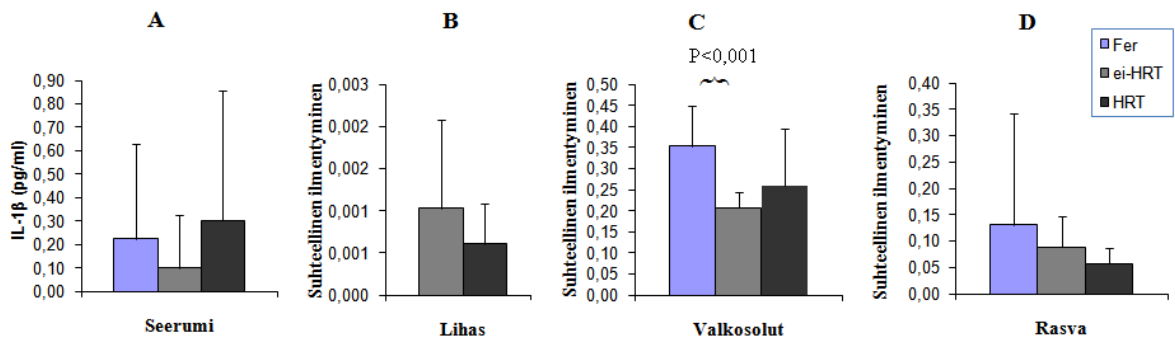
Kuva 6. TNF- α :n määrät seerumissa (A) ja ilmentyminen lihaksessa (B), valkosoluissa (C) ja rasvassa (D). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P* -arvoilla. Seerumikuvassa (A) koehenkilöiden lukumäärä on 14 (Fer), 11 (ei-HRT) ja 11 (HRT).



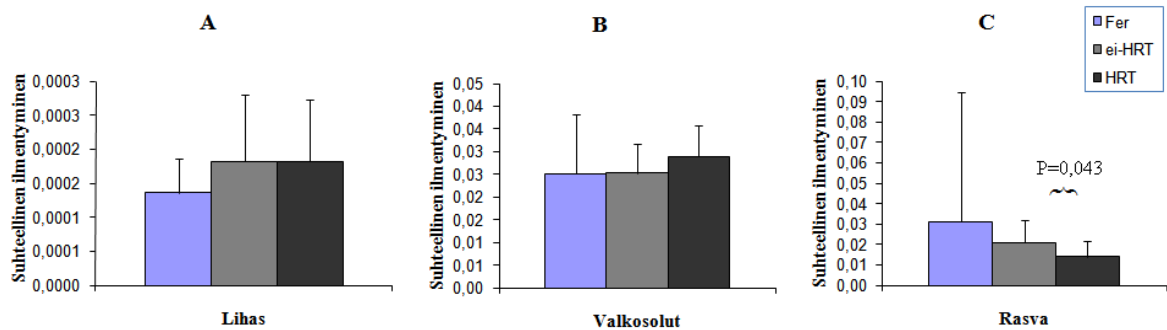
Kuva 7. Interleukiini 10:n määrät seerumissa (A) ja ilmentyminen lihaksessa (B), valkosoluissa (C) ja rasvassa (D). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P* -arvoilla. Seerumikuvassa (A) koehenkilöiden lukumäärä on 14 (Fer), 11 (ei-HRT) ja 11 (HRT).



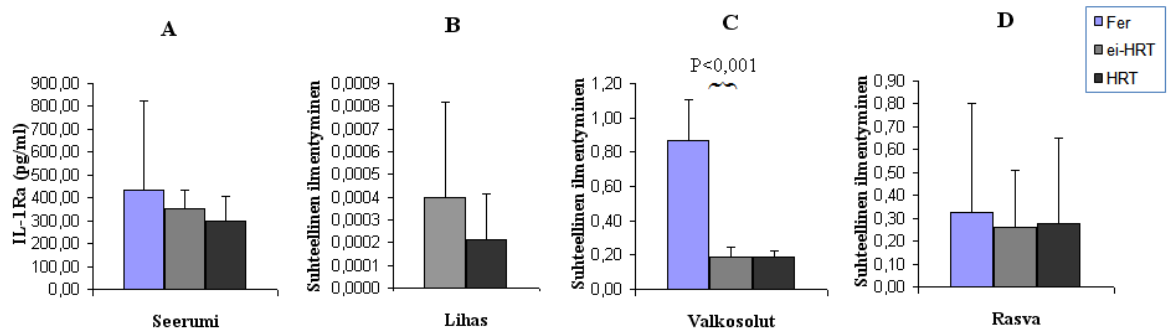
Kuva 8. Interleukiini 1RI:n ilmentyminen lihaksessa (A), valkosoluissa (B) ja rasvassa (C). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P* -arvoilla.



Kuva 9. Interleukiini 1 β :n määrät seerumissa (A) ja ilmentyminen lihaksessa (B), valkosoluissa (C) ja rasvassa (D). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P*-arvolla. Seerumikuvassa (A) koehenkilöiden lukumäärä on 7 (Fer), 4 (ei-HRT) ja 6 (HRT). Koehenkilöiden pieni lukumäärä seerumimittauksissa johtuu ELISA:n epäonnistumisesta useiden koehenkilöiden kohdalla.



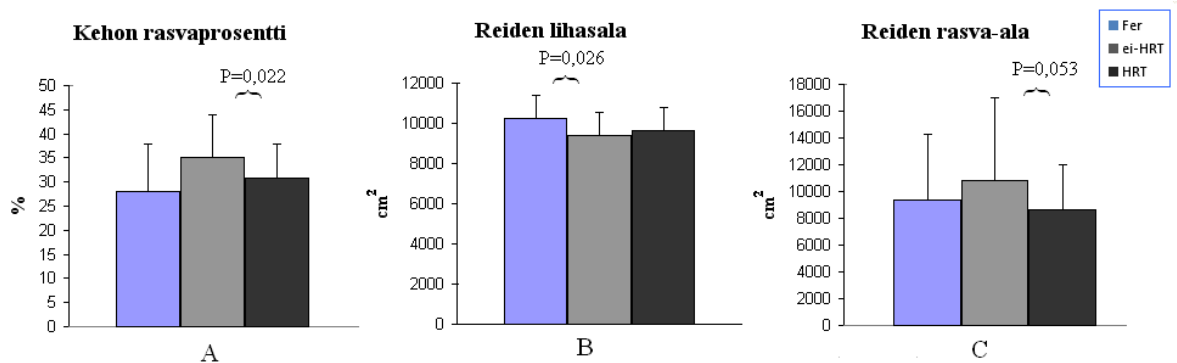
Kuva 10. Interleukiini 1RII:n ilmentyminen lihaksessa (A), valkosoluissa (B) ja rasvassa (C). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P*-arvolla.



Kuva 11. Interleukiini 1 reseptoriantagonistin määrät seerumissa (A) ja ilmentyminen lihaksessa (B), valkosoluissa (C) ja rasvassa (D). Koehenkilöryhmät, joiden välille syntyi merkitsevä ero sytokiinin lähetti-RNA:n tasoissa, on merkitty kuvaan ko. *P*-arvolla. Seerumikuvassa (A) koehenkilöiden lukumäärä on 14 (Fer), 11 (ei-HRT) ja 11 (HRT).

4.3 Kehon koostumus

Koehenkilöiden kehon koostumusta analysoitaessa havaittiin ikääntymisen olevan yhteydessä erityisesti reiden lihaspinta-alaan ($P = 0,026$, kuva 12 B). Lisäksi ikääntyminen oli yhteydessä rasvan määrään sekä koko kehossa että reidessä (kuva 12 A ja C), vaikkakaan muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. HRT:n käyttö ei juuri ollut yhteydessä lihaksen pinta-alaan, mutta koko kehon rasvaprosentti ($P = 0,022$, kuva 11 A) ja reiden rasvapinta-ala ($P = 0,053$, kuva 12 C) olivat HRT:n käyttäjillä pienempiä ei-käyttäjiin verrattuna.



Kuva 12. Erot kehon rasvaprosentissa (A), reiden lihasalassa (B) sekä reiden rasva-alassa eri koehenkilöryhmillä (C). Koehenkilöryhmät, joiden välillä oli merkitsevä ero, on merkitty ko. P -arvolla.

5 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksemme tavoitteena oli selvittää molekyylitasolla, miten ikääntyminen ja HRT ovat yhteydessä tulehdustekijöihin sekä systeemisesti että paikallisesti kudostasolla. Lisäksi selvitimme ovatko havaitut muutokset yhteydessä lihaskoostumukseen. Tutkimme useiden sytokiinien tasoa verenkierrassa ja niiden transkriptiota tulehdukseen oleellisesti liittyvissä kudoksissa (luurankolihas, rasva ja valkosolut) HRT:n suhteen diskordanteilla identtisillä kaksosnaisilla, jotka elävät kuukautisten loppumisen eli menopaussin jälkeistä elämää. Tämä tutkimusasetelma mahdollisti vertailun HRT:tä käyttävien ja ei-käyttävien naisten välillä tilanteessa, jossa geneettistä vaihtelua tai herkkyyttä aiheuttavat tekijät oli suljettu pois. Verrattuna moniin muihin aiheesta julkaistuihin tutkimuksiin, asetelmamme edustaa myös hyvin vallitsevaa käytäntöä HRT:n usein vuosia kestävästä käytöstä. Tietojemme mukaan tulehdustekijöiden paikallista säätelyä suhteessa lihaskoostumukseen ei ole aiemmin tutkittu. HRT:n vaikutusten lisäksi pystyimme tutkimaan iän yhteyttä tulehdustekijöihin käyttämällä fertiili-ikäisiä naisia kontrolliryhmänä. Työmme tärkeimmät havainnot olivat, että ikääntyminen on yhteydessä erityisesti lihaskudoksen vähenemiseen, mutta myös rasvan osuus kehossa on hieman suurempi fertiileihin naisiin verrattuna. Sytokiineista etenkin TNF- α on yhteydessä ikääntymiseen ollen postmenopausaalisten naisten seerumissa ja valkosoluissa korkeammalla kuin fertiili-ikäisillä. Myös IL-10:n taso seerumissa, valkosoluissa ja rasvassa oli postmenopausaalisilla suurempi fertiili-ikäisiin naisiin verrattuna. Lisäksi IL-1Ra:n transkriptio postmenopausaalisten naisten valkosoluissa on selkeästi vähäisempää kuin fertiili-ikäisillä. HRT puolestaan ei juuri ollut yhteydessä tulehdustekijöihin. Sen sijaan rasvan osuus kehossa oli merkitsevästi pienempi HRT:n käyttäjillä ei-käyttäjien verrattuna.

5.1 Iän ja HRT:n yhteys seerumin sytokiineihin

Tässä tutkimuksessa selvitettiin ensiksi vanhenemisen yhteyttä tulehdustekijöihin vertailemalla nuorten ja ikääntyneiden naisten sytokiinien määrää proteiini- ja lähetti-RNA-tasolla. Tulostemme mukaan postmenopausaalisten naisten TNF- α :n proteiinitaso oli merkitsevästi korkeampi kuin fertiili-ikäisillä. Tuloksemme mukailevat aiempia tutkimuksia, joiden mukaan seerumin TNF- α on korkeammalla tasolla

postmenopausaalisilla kuin fertiili-ikäisillä naisilla (Paolisso ym., 1998; Bruunsgaard ym., 2000). TNF- α :n kohonnut proteiinitaso postmenopausaalisilla naisilla voi ainakin osittain olla peräisin leukosyyteistä, sillä myös niiden ilmentämän TNF- α :n määrä oli suurempi postmenopausaalisilla fertiili-ikäisiin naisiin verrattuna.

Vain muutamat tutkimusryhmät ovat aiemmin selvittäneet ikääntymisen yhteyksiä seerumin IL-10:een. Heidän mukaansa kyseisen sytokiinin plasmatasoissa ei ole eroja nuorten ja vanhojen koehenkilöiden välillä (Forsey ym., 2003; Stowe ym., 2010). Meidän tutkimuksessamme seerumin IL-10:tä oli postmenopausaalisilla naisilla noin kaksinkertainen määrä fertiili-ikäisiin verrattuna. Suuri ero koehenkilöryhmien välillä voi johtua IL-10:n pyrkimyksestä tasoittaa tulehdusta edistävän TNF- α :n vaikutusta.

Tutkimuksemme seerumin IL-1Ra:ssa ei ilmennyt merkitseviä eroja koehenkilöryhmien välillä. Tulos on yhteneväinen tutkimusten kanssa, joissa ei ole ilmennyt eroja nuorten ja vanhojen IL-1Ra:ssa (Stowe ym., 2010). Toisaalta useissa julkaisuissa on raportoitu kohonneista seerumin tai plasman IL-1Ra:n arvoista (Catania ym., 1997; Ferrucci ym., 2005). Erilaiset tulokset omiin tuloksiimme verrattuna voivat johtua koehenkilöistä, jotka ovat muiden tutkimuksissa iältään vanhempia kuin meidän koehenkilömme. Meidän tutkimuksemme postmenopausaaliset kaksoset olivat iältään suhteellisen nuoria (54 – 62 vuotta), jolloin tulehdustekijöiden määrä kehossa on vasta saattanut alkaa kohoamaan. Tällöin ei vielä voida puhua kroonisesta matalaintensiteettisestä tulehduksesta.

Tässä tutkimuksessa analysoidut seerumin sytokiinit eivät poikenneet hormonikorvaushoitoa käyttäneillä naisilla ei-käyttäjien verrattuna. Useat muut soluja, eläimiä tai ihmisiä tutkimuksissaan käyttäneet ryhmät ovat raportoineet, että sytokiinien (mm. IL-6, TNF- α ja IL-1 β) aktiivisuus alenee HRT:n vaikutuksesta (ks. yleiskatsaus Pfeilschifter ym., 2002). Tämän tutkimuksen ja muiden tutkimusryhmien (Pfeilschifter ym., 2002) julkaisemat erilaiset tulokset voivat johtua käytettyjen hormonihoitojen kestosta, jotka ovat olleet muiden tutkimuksissa varsin lyhyitä: kolmesta viikosta kuuteen kuukauteen. Sen sijaan meidän tutkimuksemme naiset olivat käyttäneet HRT:tä pitkään, keskimäärin 7 vuotta. On mahdollista, että lyhytaikaisen hoidon vaikutukset sytokiinien aktiivisuuteen tasaantuvat pidempään kestäneen hoidon aikana. Tutkimustuloksemme vastaavat ikääntyneiden naisten normaalia elämää todennäköisesti paremmin kuin

suhteellisen lyhyitä hoitajaksoja käyttäneet aiemmin tutkimukset (Pfeilschifter ym., 2002), sillä yleensä vaihdevuosisoireita hoidetaan HRT:n avulla useita vuosia, keskimäärin 3-5 vuotta (ks. yleiskatsaus Baber ym., 2003). Omiin tutkimustuloksiimme voivat vaikuttaa myös useat erilaiset hormonivalmisteet ja hormonin annostelutavat, joita koehenkilöillämme oli käytössään.

5.2 Sytokiinien paikallinen tuotanto

Sytokiinien transkriptiotasot analysoitiin qRT-PCR-menetelmällä kolmesta kudoksesta: lihaksesta, rasvasta ja valkosoluista. Valkosolu- ja rasvanäytteissä suurin osa sytokiineistä ilmentyi hyvin. Tämä havainto oli odotusten mukainen, useiden tutkimusten mukaan immuunijärjestelmän solut ovat merkittävimpiä sytokiinien tuottajia. Useiden sytokiinien interleukiini-nimitys juontaa juurensa siitä, että nämä sytokiinit löydettiin alun perin leukosyyttien eli valkosolujen tuottamina. Myös rasvan tiedetään tuottavan sytokiineja runsaasti (Dandona ym., 1998; Juge-Aubry ym., 2003; Ikeoka ym., 2010).

Tutkimuksessamme tiettyjen sytokiinien (IL-1 β , IL-1RII ja IL-1Ra) lähetti-RNA:ta ei ilmentynyt käytännössä lainkaan luurankolihasnäytteissä. Tämä antaa aiheutta ajatella, että luurankolihas ei kuulu sytokiinien pääasiallisiin tuottajakudoksiin. Toisaalta useissa tutkimuksissa lihassäikeiden on havaittu ilmentävän IL-1:stä (Gherardi ym., 1994; Authier ym., 1997; Belec ym., 1997; Authier ym., 1999). Näissä tutkimuksissa on kuitenkin tutkittu lihasnäytteitä henkilöiltä, joilla on jokin lihaksia koetteleva sairaus, joka voi olla riittävän voimakas aiheuttamaan IL-1:n synteessin lihaksessa. Voitaneen ajatella, että luurankolihasella on kapasiteettia syntetisoida sytokiineja, mutta se ei normaalitilassa niitä juurikaan tuota, mikä selittänee sytokiinien heikon ilmentymisen tutkimuksemme lihasnäytteissä. IL-1:n ja sen reseptorien heikko ilmentyminen lihaksessa saattaa johtua myös siitä, että signaalireitin aktivoimiseksi riittää jo hyvin pieni määrä kyseisiä molekyylejä (Arend, 1993; Dinarello, 1996), jolloin niitä ei ole tarpeen tuottaa enempää. Lihaksen voi toimia kuitenkin IL-1:n vaikutuksen merkittävänä kohdekudoksena ja reagoida sen systeemisiin muutoksiin, sillä IL-1:n tyypin I reseptoria ilmentyi kaikkien koehenkilöryhmien lihasnäytteissä kohtuullisesti.

5.3 Iän ja HRT:n yhteys sytokiinien transkriptiotasoihin ja kehon koostumukseen

TNF- α :n transkriptiotaso valkosoluissa selittää ainakin osittain seerumissa havaitun ikävaikutuksen. Postmenopausaalisten valkosoluissa TNF- α :n ilmentyminen oli selkeästi korkeampi fertiili-ikäisiin verrattuna. Tämä kertoo mahdollisesti siitä, että valkosolut ovat postmenopausaalisilla naisilla tärkeimpiä TNF- α :n tuottajia. Lihaksen TNF- α :ssa fertiili-ikäisten ja postmenopausaalisten välillä oli merkitsevä nousu, mutta sen ilmentyminen on kuitenkin niin vähäistä, että tulosta ei voida pitää fysiologisesti merkittävänä.

Iän yhteys IL-10:een näkyi seerumin lisäksi hyvin rasvassa ja valkosoluissa, jotka todennäköisesti tuottavat valtaosan seerumin IL-10:stä. Fertiili-ikäisillä naisilla lihas ilmentää jonkin verran IL-10:tä, mutta sen tuotanto on huomattavasti vähäisempää postmenopausaalisten lihaksessa. Ikääntyminen saattaa olla yhteydessä IL-10:n transkriptioon niin, että se painottuu lihaksen sijasta muihin kudoksiin, kuten rasvaan ja valkosoluihin. Koska IL-10 toimii IL-1Ra:n tapaan tulehdusta vaimentavana molekyylinä rajoittaen muun muassa TNF- α :n toimintaa, on mahdollista, että lihaksessa tapahtuva IL-10:n väheneminen aiheuttaa epätasapainoa sytokiinien toiminnassa. Tämä taas saattaa edistää matalaintensiteettisen tulehduksen kehittymistä sekä proteiinien hajotusta lihaksessa.

Seerumin IL-1Ra-tasoissa ei ollut eroja eri koehenkilöryhmien välillä. Fertiili-ikäisillä osa seerumin IL-1Ra:sta syntyy valkosoluissa. Postmenopausaalisten naisten valkosoluissa IL-1Ra:n transkriptio oli huomattavasti vähäisempää fertiili-ikäisiin verrattuna. IL-1Ra:n tehtävänä on toimia IL-1:n vastavaikuttajana ja siten hillitä tulehdusta. Siksi IL-1Ra:n väheneminen saattaa vaikuttaa matalaintensiteettiseen tulehdukseen voimistavasti. Seerumitasojen sekä valkosolujen ja rasvan transkriptiotasojen välinen ristiriita voi johtua jonkin muun kudoksen tuottamasta IL-1Ra:sta tai paikallisten säätelymekanismien eroista. Ylipäätään geenin ilmentyminen RNA-tasolla ei aina ole yhdenmukainen proteiinituotteen määrän kanssa.

Kolmen tutkimamme kudoksen sekä seerumin mukaan IL-1 β :n aktiivisuus ei lisäännä ikääntymisen myötä. Myöskään muutamat aikaisemmat tutkimukset eivät ole havainneet

eroja nuorien ja vanhojen koehenkilöiden seerumista tai soluviljelmistä mitatussa IL-1 β :ssa (Ahluwalia ym., 2001; Ferrucci ym., 2005). Toisaalta havaitsimme postmenopausaalisten naisten lihaksen tuottamassa IL-1RI:ssä merkitsevän lisääntymisen fertiili-ikäisiin verrattuna, mikä voisi olla merkki ikääntymisen aiheuttamasta tulehdustason kohoamisesta. Lihaksen on alttiimpi ottamaan vastaan enemmän IL-1-sytokiinia kuin nuoremmilla ihmisillä. Nämä IL-1-molekyylit saattavat olla peräisin muista kuin tutkimistamme kudoksista. Ne voivat olla myös IL-1:n α -muotoa, joka sitoutuu samaan reseptoriin kuin β -muoto. Lihaksesta poiketen postmenopausaalisten naisten rasvan tuottamassa IL-1RI:ssä ilmeni merkitsevä lasku; rasvan IL-1RI:n transkriptiotaso oli vain lähes puolet fertiili-ikäisten naisten tasosta. IL-1RI:n transkriptio rasvassa ei poikennut HRT:n käyttäjillä ei-käyttäjiin verrattuna. Rasvan suhteellisen osuuden tiedetään kuitenkin kasvavan ihmisen ikääntyessä (Enzi ym., 1986). Omat kehonkoostumukseen liittyvät tuloksemme ovat samansuuntaisia tämän tiedon kanssa, sillä koko kehon rasvaprosentti sekä reiden rasvapinta-ala olivat postmenopausaalisilla naisilla korkeampia kuin fertiili-ikäisillä. HRT:n käyttäjillä kehon koostumus oli ei-käyttäjiin verrattuna parempi, sillä heillä reiden rasvapinta-ala ja kehon rasvaprosentti olivat pienempiä. Koska IL-1RI:n ilmentyminen vähenee postmenopausaalisilla naisilla rasvakudoksen lisääntymisestä huolimatta, IL-1RI ei todennäköisesti ole rasvasolujen tuottamaa. Sen sijaan IL-1RI saattaa syntyä muissa rasvakudoksen soluissa, esimerkiksi makrofageissa ja fibroblasteissa. Matalampi IL-1RI:n ilmentyminen saattaa johtua siitä, että makrofagien ja muiden solujen määrä vähenee rasvakudoksen suhteellisen osuuden kasvaessa.

Tässä tutkimuksessa analysoidut sytokiinien transkriptiotasot poikkesivat hormonikorvaushoitoa käyttäneillä naisilla ainoastaan IL-1RII:n kohdalla. Reseptorin ilmentyminen rasvassa oli kuitenkin niin vähäistä, että tulosta ei voida pitää oleellisena. Tuloksistamme voidaan yhteenvedon sanoa, että ikääntyminen on yhteydessä erityisesti lihaskudoksen pienenemiseen. Sytokiineista etenkin TNF- α :n ja IL-10:n seerumi- ja transkriptiotasot poikkesivat postmenopausaalisilla naisilla fertiili-ikäisiin verrattuna. HRT:n käyttö puolestaan on yhteydessä kehonkoostumukseen vähentäen rasvan osuutta. Sitä vastoin tutkimiemme sytokiinien proteiini- tai transkriptiotasoihin pitkäaikaisella HRT:lla ei ollut yhteyttä.

5.4 Tulevaisuuden näkymät

Tulevaisuudessa tutkimusta tullaan jatkamaan ainakin selvittämällä miten ikääntyminen ja HRT ovat yhteydessä rasvasoluihin ja muihin rasvakudoksessa oleviin soluihin. Samalla voidaan saada selville, miksi sytokiiniinien tuotanto rasvassa ei reagoi HRT:n käyttöön niin kuin kehon koostumusmuutoksista voisi päätellä. Koska lihaskunnan on osoitettu paranevan HRT:a käyttävillä naisilla (Skelton ym., 1999; Sipilä ym., 2001), on syytä tutkia tarkemmin lihasten voimistumiseen johtavia mekanismeja. IGF-1:n kautta kulkevalla reaktiotiellä voi olla merkittävä yhteys lihaskunnan elpymiseen. IGF-1 tehostaa proteiinien synteesiä ja ehkäisee niiden hajoitusta, mutta ikääntyminen ja tulehdusta edistävät sytokiinit voivat vaikuttaa sen signalointiin negatiivisesti, esimerkiksi vähentämällä IGF-1:n eritystä. Tutkimusryhmässämme on jo aiemmin saatu viitteitä IGF-1:n reaktiotien aktiivisuuden vähenemisestä iän myötä ja sen palautumisesta hedelmällisen iän tasolle HRT:n käyttäjillä (Ahtiainen ym., 2010). Sekä tällä työllä että tulevaisuuden tutkimuksilla voidaan saada arvokasta tietoa selventämään käsitystämme HRT:n yhteyksistä matalaintensiteettiseen tulehdukseen ja lihasten massan, voiman ja toimintakapasiteetin säilymiseen. Tämä tieto on tarpeen eri puolilla maailmaa tehtyjen tutkimusten ristiriitaisuuden vuoksi. Lisäksi tämän tutkimuksen tuloksia voidaan parhaimmillaan hyödyntää kehitettäessä hoitomenetelmiä, joilla voidaan tulevaisuudessa paremmin hoitaa ja ennaltaehkäistä ikääntyvien naisten lihaskatoa ja liikuntakyvyn heikkenemistä. Tämä tulee pienentämään julkisen sektorin terveyden- ja vanhustenhuollon aiheuttamia kustannuksia sekä ennen kaikkea parantamaan vanhenevien ihmisten elämänlaatua.

6 Lähdeluettelo

- Ahluwalia, N., A.M. Mastro, R. Ball, M.P. Miles, R. Rajendra ja G. Handte. 2001. Cytokine production by stimulated mononuclear cells did not change with aging in apparently healthy, well-nourished women. *Mech.Ageing Dev.* 122:1269-1279.
- Ahtiainen, M., E. Pöllänen, P. Ronkainen, M. Alen, J. Puolakka, J. Kaprio, S. Sipilä ja V. Kovanen. 2010. Age and hormone replacement therapy affect systemic and local IL-6 and IGF-1 pathways in women.
- Amelink, G.J. ja P.R. Bär. 1986. Exercise-induced muscle protein leakage in the rat. Effects of hormonal manipulation. *J.Neurol.Sci.* 76:61-68.
- Amelink, G.J., R.W. Koot, W.B. Erich, J. Van Gijn ja P.R. Bär. 1990. Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta Physiol.Scand.* 138:115-124.
- Anker, S.D., P.P. Ponikowski, A.L. Clark, F. Leyva, M. Rauchhaus, M. Kemp, M.M. Teixeira, P.G. Hellewell, J. Hooper, P.A. Poole-Wilson ja A.J. Coats. 1999. Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur.Heart J.* 20:683-693.
- Arend, W.P. 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:323-340.
- Arend, W.P. 1993. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv.Immunol.* 54:167-227.
- Arend, W.P., H.G. Welgus, R.C. Thompson ja S.P. Eisenberg. 1990. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J.Clin.Invest.* 85:1694-1697.
- Authier, F.J., B. Chazaud, C. Mhiri, M.C. Eliezer-Vanerot, F. Poron, G. Barlovatz-Meimon ja R.K. Gherardi. 1997. Interleukin-1 expression in normal motor endplates and muscle fibers showing neurogenic changes. *Acta Neuropathol.* 94:272-279.
- Authier, F.J., B. Chazaud, A. Plonquet, M.C. Eliezer-Vanerot, F. Poron, L. Belec, G. Barlovatz-Meimon ja R.K. Gherardi. 1999. Differential expression of the IL-1 system components during in vitro myogenesis: implication of IL-1beta in induction of myogenic cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 6:1012-1021.
- Baber, R.J., J.L. O'Hara ja F.M. Boyle. 2003. Hormone replacement therapy: to use or not to use? *Med.J.Aust.* 178:630-633.
- Bamman, M.M., M.S. Clarke, D.L. Feedback, R.J. Talmadge, B.R. Stevens, S.A. Lieberman ja M.C. Greenisen. 1998. Impact of resistance exercise during bed rest on skeletal muscle sarcopenia and myosin isoform distribution. *J.Appl.Physiol.* 84:157-163.
- Barbara, J.A., X. Van ostade ja A. Lopez. 1996. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol.Cell Biol.* 74:434-443.
- Baumgartner, R.N., K.M. Koehler, D. Gallagher, L. Romero, S.B. Heymsfield, R.R. Ross, P.J. Garry ja R.D. Lindeman. 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am.J.Epidemiol.* 147:755-763.
- Belec, L., F.J. Authier, B. Chazaud, C. Piedouillet, G. Barlovatz-Meimon ja R.K. Gherardi. 1997. Interleukin (IL)-1 beta and IL-1 beta mRNA expression in normal and diseased skeletal muscle assessed by

immunocytochemistry, immunoblotting and reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56:651-663.

Bermudez, E.A., N. Rifai, J.E. Buring, J.E. Manson ja P.M. Ridker. 2002. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am.J.Cardiol.* 89:1117-1119.

Björnström, L. ja M. Sjöberg. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol.Endocrinol.* 19:833-842.

Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, W.T. Poueymirou, F.J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z.Q. Pan, D.M. Valenzuela, T.M. DeChiara, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos ja D.J. Glass. 2001, a. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 294:1704-1708.

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

Brown, M. 2008. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv.Physiol.Educ.* 32:120-126.

Brown, W.F. 1972. A method for estimating the number of motor units in thenar muscles and the changes in motor unit count with ageing. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 35:845-852.

Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis ja M.E. Greenberg. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96:857-868.

Brunsgaard, H., K. Andersen-Ranberg, B. Jeune, A.N. Pedersen, P. Skinhoj ja B.K. Pedersen. 1999. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 54:M357-64.

Brunsgaard, H., P. Skinhoj, A.N. Pedersen, M. Schroll ja B.K. Pedersen. 2000. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin.Exp.Immunol.* 121:255-260.

Campbell, M.J., A.J. McComas ja F. Petito. 1973. Physiological changes in ageing muscles. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 36:174-182.

Cappola, A.R., Q.L. Xue, L. Ferrucci, J.M. Guralnik, S. Volpato ja L.P. Fried. 2003. Insulin-like growth factor I and interleukin-6 contribute synergistically to disability and mortality in older women. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 88:2019-2025.

Catania, A., L. Airaghi, P. Motta, M.G. Manfredi, G. Annoni, C. Pettenati, F. Brambilla ja J.M. Lipton. 1997. Cytokine antagonists in aged subjects and their relation with cellular immunity. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 52:B93-7.

Charters, Y. ja R.F. Grimble. 1989. Effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha on protein synthesis in liver, skeletal muscle and skin of rats. *Biochem.J.* 258:493-497.

Chernoff, R. 2004. Protein and older adults. *J.Am.Coll.Nutr.* 23:627S-630S.

Chung, H.Y., M. Cesari, S. Anton, E. Marzetti, S. Giovannini, A.Y. Seo, C. Carter, B.P. Yu ja C. Leeuwenburgh. 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res.Rev.* 8:18-30.

Clark, B.C. ja T.M. Manini. 2008. Sarcopenia \neq dynapenia. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 63:829-834.

- Cooney, R.N., G.O. Maish 3rd, T. Gilpin, M.L. Shumate, C.H. Lang ja T.C. Vary. 1999. Mechanism of IL-1 induced inhibition of protein synthesis in skeletal muscle. *Shock*. 11:235-241.
- Dandona, P., R. Weinstock, K. Thusu, E. Abdel-Rahman, A. Aljada ja T. Wadden. 1998. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:2907-2910.
- Dayer, J.M. 2003. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 42 Suppl 2:ii3-10.
- De Benedetti, F., T. Alonzi, A. Moretta, D. Lazzaro, P. Costa, V. Poli, A. Martini, G. Ciliberto ja E. Fattori. 1997. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *J.Clin.Invest.* 99:643-650.
- DeVol, D.L., P. Rotwein, J.L. Sadow, J. Novakofski ja P.J. Bechtel. 1990. Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am.J.Physiol.* 259:E89-95.
- Dinarello, C.A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 87:2095-2147.
- Dinarello, C.A. 1985. An update on human interleukin-1: from molecular biology to clinical relevance. *J.Clin.Immunol.* 5:287-297.
- Dirks, A. ja C. Leeuwenburgh. 2002. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 282:R519-27.
- Dirks, A.J., T. Hofer, E. Marzetti, M. Pahor ja C. Leeuwenburgh. 2006. Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Res.Rev.* 5:179-195.
- Dobbs, R.J., A. Charlett, A.G. Purkiss, S.M. Dobbs, C. Weller ja D.W. Peterson. 1999. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta Neurol.Scand.* 100:34-41.
- Eckel, L.A., T.A. Houpt ja N. Geary. 2000. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol.Behav.* 70:397-405.
- Enns, D.L. ja P.M. Tiidus. 2010. The influence of estrogen on skeletal muscle: sex matters. *Sports Med.* 40:41-58.
- Enns, D.L. ja P.M. Tiidus. 2008. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J.Appl.Physiol.* 104:347-353.
- Enzi, G., M. Gasparo, P.R. Biondetti, D. Fiore, M. Semisa ja F. Zurlo. 1986. Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am.J.Clin.Nutr.* 44:739-746.
- Ferrucci, L., A. Corsi, F. Lauretani, S. Bandinelli, B. Bartali, D.D. Taub, J.M. Guralnik ja D.L. Longo. 2005. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 105:2294-2299.
- Fisher, A.L. 2004. Of worms and women: sarcopenia and its role in disability and mortality. *J.Am.Geriatr.Soc.* 52:1185-1190.
- Flores, E.A., B.R. Bistran, J.J. Pomposelli, C.A. Dinarello, G.L. Blackburn ja N.W. Istfan. 1989. Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J.Clin.Invest.* 83:1614-1622.

- Forsey, R.J., J.M. Thompson, J. Ernerudh, T.L. Hurst, J. Strindhall, B. Johansson, B.O. Nilsson ja A. Wikby. 2003. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech.Ageing Dev.* 124:487-493.
- Fried, S.K., D.A. Bunkin ja A.S. Greenberg. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 83:847-850.
- Frost, R.A., C.H. Lang ja M.C. Gelato. 1997. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology.* 138:4153-4159.
- Garcia-Martinez, C., F.J. Lopez-Soriano ja J.M. Argiles. 1993. Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. *Mol.Cell.Biochem.* 125:11-18.
- Gherardi, R.K., A. Florea-Strat, G. Fromont, F. Poron, J.C. Sabourin ja J. Authier. 1994. Cytokine expression in the muscle of HIV-infected patients: evidence for interleukin-1 alpha accumulation in mitochondria of AZT fibers. *Ann.Neurol.* 36:752-758.
- Girasole, G., N. Giuliani, A.B. Modena, G. Passeri ja M. Pedrazzoni. 1999. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblastic cells in vitro. *Clin.Endocrinol.(Oxf).* 51:801-807.
- Glass, D.J. 2003. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol.Med.* 9:344-350.
- Goldspink, D.F., P.J. Garlick ja M.A. McNurlan. 1983. Protein turnover measured in vivo and in vitro in muscles undergoing compensatory growth and subsequent denervation atrophy. *Biochem.J.* 210:89-98.
- Goodpaster, B.H., C.L. Carlson, M. Visser, D.E. Kelley, A. Scherzinger, T.B. Harris, E. Stamm ja A.B. Newman. 2001. Attenuation of skeletal muscle and strength in the elderly: The Health ABC Study. *J.Appl.Physiol.* 90:2157-2165.
- Greenlund, L.J. ja K.S. Nair. 2003. Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech.Ageing Dev.* 124:287-299.
- Greiwe, J.S., B. Cheng, D.C. Rubin, K.E. Yarasheski ja C.F. Semenkovich. 2001. Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB J.* 15:475-482.
- Guttridge, D.C., M.W. Mayo, L.V. Madrid, C.Y. Wang ja A.S. Baldwin Jr. 2000. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science.* 289:2363-2366.
- Haddad, F., F. Zaldivar, D.M. Cooper ja G.R. Adams. 2005. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J.Appl.Physiol.* 98:911-917.
- Hallegrua, D.S. ja M.H. Weisman. 2002. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann.Rheum.Dis.* 61:960-967.
- Han, Y., M.S. Runge ja A.R. Brasier. 1999. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ.Res.* 84:695-703.
- Helenius, M., M. Hanninen, S.K. Lehtinen ja A. Salminen. 1996. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem.J.* 318 (Pt 2):603-608.

- Homma, H., H. Kurachi, Y. Nishio, T. Takeda, T. Yamamoto, K. Adachi, K. Morishige, M. Ohmichi, Y. Matsuzawa ja Y. Murata. 2000. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J.Biol.Chem.* 275:11404-11411.
- Hortobagyi, T., L. Dempsey, D. Fraser, D. Zheng, G. Hamilton, J. Lambert ja L. Dohm. 2000. Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J.Physiol.* 524 Pt 1:293-304.
- Ikeoka, D., J.K. Mader ja T.R. Pieber. 2010. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Rev.Assoc.Med.Bras.* 56:116-121.
- Jackman, R.W. ja S.C. Kandarian. 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 287:C834-43.
- Jagoe, R.T., S.H. Lecker, M. Gomes ja A.L. Goldberg. 2002. Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation. *FASEB J.* 16:1697-1712.
- Janssen, I., S.B. Heymsfield ja R. Ross. 2002. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J.Am.Geriatr.Soc.* 50:889-896.
- Juge-Aubry, C.E., E. Somm, V. Giusti, A. Pernin, R. Chicheportiche, C. Verdumo, F. Rohner-Jeanrenaud, D. Burger, J.M. Dayer ja C.A. Meier. 2003. Adipose tissue is a major source of interleukin-1 receptor antagonist: upregulation in obesity and inflammation. *Diabetes.* 52:1104-1110.
- Kamei, N., K. Tobe, R. Suzuki, M. Ohsugi, T. Watanabe, N. Kubota, N. Ohtsuka-Kowatari, K. Kumagai, K. Sakamoto, M. Kobayashi, T. Yamauchi, K. Ueki, Y. Oishi, S. Nishimura, I. Manabe, H. Hashimoto, Y. Ohnishi, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, R. Nagai ja T. Kadowaki. 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J.Biol.Chem.* 281:26602-26614.
- Keller, P., M. Penkowa. C. Keller, A. Steensberg, C.P. Fischer, M. Giralt, J. Hidalgo ja B.K. Pedersen. 2005. Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *FASEB J.* 19:1181-1183.
- Kenny, A.M., A. Kleppinger, Y. Wang ja K.M. Prestwood. 2005. Effects of ultra-low-dose estrogen therapy on muscle and physical function in older women. *J.Am.Geriatr.Soc.* 53:1973-1977.
- Kern, P.A., S. Ranganathan, C. Li, L. Wood ja G. Ranganathan. 2001. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 280:E745-51.
- Kim, J.W., B.S. Baek, Y.K. Kim, J.T. Herlihy, Y. Ikeno, B.P. Yu ja H.Y. Chung. 2001. Gene expression of cyclooxygenase in the aging heart. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 56:B350-5.
- Krabbe, K.S., M. Pedersen ja H. Bruunsgaard. 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp.Gerontol.* 39:687-699.
- Kramer, P.R., S.F. Kramer ja G. Guan. 2004. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum.* 50:1967-1975.
- Larrubia, J.R., S. Benito-Martinez, J. Miquel-Plaza, E. Sanz-de-Villalobos, F. Gonzalez-Mateos ja T. Parra. 2009. Cytokines - their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. *Rev.Esp.Enferm.Dig.* 101:343-351.

- Lee, C.E., A. McArdle ja R.D. Griffiths. 2007. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin.Nutr.* 26:524-534.
- Leeuwenburgh, C. 2003. Role of apoptosis in sarcopenia. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 58:999-1001.
- Li, Y.P., R.J. Schwartz, I.D. Waddell, B.R. Holloway ja M.B. Reid. 1998. Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB J.* 12:871-880.
- Losel, R. ja M. Wehling. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4:46-56.
- Maggio, M., J.M. Guralnik, D.L. Longo ja L. Ferrucci. 2006. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 61:575-584.
- Matsui, T., T. Nagoshi ja A. Rosenzweig. 2003. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell.Cycle.* 2:220-223.
- Meli, R., M. Pacilio, G.M. Raso, E. Esposito, A. Coppola, A. Nasti, C. Di Carlo, C. Nappi ja R. Di Carlo. 2004. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology.* 145:3115-3121.
- Morley, J.E., R.N. Baumgartner, R. Roubenoff, J. Mayer ja K.S. Nair. 2001. Sarcopenia. *J.Lab.Clin.Med.* 137:231-243.
- Mosser, D.M. ja X. Zhang. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol.Rev.* 226:205-218.
- Opal, S.M. ja V.A. DePalo. 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117:1162-1172.
- Paolisso, G., M.R. Rizzo, G. Mazziotti, M.R. Tagliamonte, A. Gambardella, M. Rotondi, C. Carella, D. Giugliano, M. Varricchio ja F. D'Onofrio. 1998. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am.J.Physiol.* 275:E294-9.
- Pedersen, S.B., K. Kristensen, P.A. Hermann, J.A. Katzenellenbogen ja B. Richelsen. 2004. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 89:1869-1878.
- Pfeilschifter, J., R. Koditz, M. Pfohl ja H. Schatz. 2002. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr.Rev.* 23:90-119.
- Phillips, S.K., K.M. Rook, N.C. Siddle, S.A. Bruce ja R.C. Woledge. 1993. Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin.Sci.(Lond).* 84:95-98.
- Phillips, T. ja C. Leeuwenburgh. 2005. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.* 19:668-670.
- Pottratz, S.T., T. Bellido, H. Mocharla, D. Crabb ja S.C. Manolagas. 1994. 17 beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J.Clin.Invest.* 93:944-950.
- Punnonen, R. 2004. Estrogeeniä koko elämä. WSOY, Helsinki.

- Purohit, A. ja M.J. Reed. 2002. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids*. 67:979-983.
- Ribom, E.L., K. Piehl-Aulin, S. Ljunghall, O. Ljunggren ja T. Naessen. 2002. Six months of hormone replacement therapy does not influence muscle strength in postmenopausal women. *Maturitas*. 42:225-231.
- Ronkainen, P.H., V. Kovanen, M. Alen, E. Pöllänen, E.M. Palonen, C. Ankarberg-Lindgren, E. Hämäläinen, U. Turpeinen, U.M. Kujala, J. Puolakka, J. Kaprio ja S. Sipilä. 2009. Postmenopausal hormone replacement therapy modifies skeletal muscle composition and function: a study with monozygotic twin pairs. *J.Appl.Physiol*. 107:25-33.
- Roubenoff, R. ja V.A. Hughes. 2000. Sarcopenia: current concepts. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci*. 55:M716-24.
- Roubenoff, R., R.A. Roubenoff, J.G. Cannon, J.J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawson-Hughes, C.A. Dinarello ja I.H. Rosenberg. 1994. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J.Clin.Invest*. 93:2379-2386.
- Ryall, J.G., J.D. Schertzer ja G.S. Lynch. 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*. 9:213-228.
- Sanz-Rosa, D., M.P. Oubina, E. Cediel, N. de Las Heras, O. Vegazo, J. Jimenez, V. Lahera ja V. Cachofeiro. 2005. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol*. 288:H111-5.
- Sarkar, D. ja P.B. Fisher. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett*. 236:13-23.
- Shumate, J.B., M.H. Brooke, J.E. Carroll ja J.E. Davis. 1979. Increased serum creatine kinase after exercise: a sex-linked phenomenon. *Neurology*. 29:902-904.
- Sipilä, S., D.R. Taaffe, S. Cheng, J. Puolakka, J. Toivanen ja H. Suominen. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin.Sci.(Lond)*. 101:147-157.
- Skelton, D.A., S.K. Phillips, S.A. Bruce, C.H. Naylor ja R.C. Woledge. 1999. Hormone replacement therapy increases isometric muscle strength of adductor pollicis in post-menopausal women. *Clin.Sci.(Lond)*. 96:357-364.
- Srivastava, S., M.N. Weitzmann, S. Cenci, F.P. Ross, S. Adler ja R. Pacifici. 1999. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J.Clin.Invest*. 104:503-513.
- St Pierre Schneider, B., L.A. Correia ja J.G. Cannon. 1999. Sex differences in leukocyte invasion in injured murine skeletal muscle. *Res.Nurs.Health*. 22:243-250.
- Stowe, R.P., M.K. Peek, M.P. Cutchin ja J.S. Goodwin. 2010. Plasma cytokine levels in a population-based study: relation to age and ethnicity. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci*. 65:429-433.
- Stupka, N., S. Lowther, K. Chorneyko, J.M. Bourgeois, C. Hogben ja M.A. Tarnopolsky. 2000. Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J.Appl.Physiol*. 89:2325-2332.
- Szulc, P., T.J. Beck, F. Marchand ja P.D. Delmas. 2005. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men--the MINOS study. *J.Bone Miner.Res*. 20:721-729.

- Tanko, L.B., L. Movsesyan, O.L. Svendsen ja C. Christiansen. 2002. The effect of hormone replacement therapy on appendicular lean tissue mass in early postmenopausal women. *Menopause*. 9:117-121.
- Tiidus, P.M. 2000. Estrogen and gender effects on muscle damage, inflammation, and oxidative stress. *Can.J.Appl.Physiol.* 25:274-287.
- Turgeon, J.L., M.C. Carr, P.M. Maki, M.E. Mendelsohn ja P.M. Wise. 2006. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr.Rev.* 27:575-605.
- Vandervoort, A.A. 2002. Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve*. 25:17-25.
- Vasconsuelo, A., L. Milanesi ja R. Boland. 2008. 17Beta-estradiol abrogates apoptosis in murine skeletal muscle cells through estrogen receptors: role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J.Endocrinol.* 196:385-397.
- Waters, D.L., R.N. Baumgartner ja P.J. Garry. 2000. Sarcopenia: current perspectives. *J.Nutr.Health Aging*. 4:133-139.
- Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel ja A.W. Ferrante Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J.Clin.Invest.* 112:1796-1808.
- Vempati, U.D., F. Diaz, A. Barrientos, S. Narisawa, A.M. Mian, J.L. Millan, L.H. Boise ja C.T. Moraes. 2007. Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol.Cell.Biol.* 27:1771-1783.
- Vidal, O., L.G. Kindblom ja C. Ohlsson. 1999. Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone. *J.Bone Miner.Res.* 14:923-929.
- Wiik, A., B. Glenmark, M. Ekman, M. Esbjornsson-Liljedahl, O. Johansson, K. Bodin, E. Enmark ja E. Jansson. 2003. Oestrogen receptor beta is expressed in adult human skeletal muscle both at the mRNA and protein level. *Acta Physiol.Scand.* 179:381-387.
- Visser, M., M. Pahor, D.R. Taaffe, B.H. Goodpaster, E.M. Simonsick, A.B. Newman, M. Nevitt ja T.B. Harris. 2002. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 57:M326-32.
- Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X-F. Lei ja M.K. Achong. 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J.Clin.Invest.* 101:311-320.
- Yan, Z.Q., A. Sirsjo, M.L. Bochaton-Piallat, G. Gabbiani ja G.K. Hansson. 1999. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:2854-2862.
- Yu, B.P. ja R. Yang. 1996. Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 786:1-11.

7 Liitteet

Liite 1. qRT-PCR -alukkeet

Taulukko 4. Taqman Gene Expression Assays -alukkeiden tuotenumerot.

Geeni		Tuotenumero
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi	Hs99999905_ml
IL-1 β	Interleukiini-1 β	Hs00174097_ml
IL-1RI	Interleukiini-1:n tyypin I reseptori	Hs00168392_ml
IL-1RII	Interleukiini-1:n tyypin II reseptori	Hs01030384_ml
IL-1Ra	Interleukiini-1:n reseptoriantagonisti	Hs00277299_ml
TNF- α	Tuumorinekroositekijä- α	Hs00174128_ml
IL-10	Interleukiini-10	Hs00174086_ml