

AEROBISEN JUOKSUHARJOITTELUN JA KORKEAN INTENSITEETIN INTERVALLIHARJOITTELUN VAIKUTUKSET HIPPOKAMPUKSEN NEUROGENEESIIN JA VASKULARISAATIOON ROTILLA

Petra Johansson

Liikuntafysiologia

Pro Gradu -tutkielma

Liikuntabiologian laitos

Jyväskylän yliopisto

Kevät 2014

Tutkimusohjaajat: Heikki Kainulainen

ja Miriam Nokia

Seminaariohjaaja: Antti Mero

TIIVISTELMÄ

Petra Johansson (2014). Aerobisen juoksuharjoittelun ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelun vaikutukset hippokampuksen neurogeneesiin ja vaskularisaatioon rotilla. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto, Pro gradu -tutkielma, 55 s.

Johdanto. Juoksuharjoittelun on todettu vaikuttavan myönteisesti oppimiseen, muistiin sekä aivojen toimintaan. Juoksuharjoittelu lisää hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiä eri ikäryhmissä. Lisäksi juoksun on todettu vaikuttavan nuorilla pykäläpoimun vaskularisaatioon.

Tarkoitus. Hippokampuksen neurogeneesiä ja vaskularisaatiota on tutkittu lähinnä vain aerobisella juoksuharjoittelulla. Tämän vuoksi tässä tutkimuksessa tutkittiin sekä aerobisen juoksun että korkean intensiteetin intervalliharjoittelun (high intensity interval training = HIIT) vaikutuksia neurogeneesiin. HIIT:ssä anaerobisen energiantuoton osuus on voimakas.

Menetelmät. Tutkimuksessa oli 44 Yhdysvalloista hankittua HRT -kannan rottia (high responders for aerobic training=korkea vastine aerobiseen harjoitteluun), jotka jaettiin neljään ryhmään. Ryhmät olivat juoksupyöräharjoitteluryhmä eli aerobinen juoksuhäkiharjoittelu (running wheel training=RW), HIIT ja kaksi eri kontrolliryhmää (C=control=kontrolliryhmä, joka juoksi testijuoksut ennen ja jälkeen harjoittelun ja SedC=sedentary control=kontrolliryhmä, joka ei juossut ollenkaan). Ennen intervention alkua C-, RW- ja HIIT -ryhmiltä testattiin maksimaalinen juoksukapasiteetti juoksutes-tillä. Interventio kesti seitsemän viikkoa. Intervention ajan RW -rotilla oli vapaa pääsy juoksupyörille vuorokauden ympäri. HIIT -rotat harjoittelivat kolmesti viikossa korkean intensiteetin intervalliharjoittelua. HIIT-ohjelma koostui 15 minuutin harjoituksesta, jossa vaihteli kolmen minuutin juoksu 85-90 % tasolla maksimikapasiteetista ja kahden minuutin juoksu 50 % tasolla maksimikapasiteetista. HIIT -rotille määritettiin viikoittain maksimaalinen juoksukapasiteetti. Intervention jälkeen myös C- ja RW -rotilta määritettiin uudestaan maksimaalinen juoksukapasiteetti. SedC -ryhmän rotat eivät juosseet ollenkaan kokeen aikana. Intervention jälkeen rotat lopetettiin ja rottien aivot kerättiin talteen. SedC-, HIIT- ja RW -ryhmien aivot viipaloitiin hippokampuksen alueelta. Viipaleista analysoitiin neurogeneesiä Doublecortin -värjäyksellä ja vaskularisaa-tiota RECA-1 -värjäyksellä.

Tulokset. Aerobisen juoksuharjoittelun todettiin lisäävän neurogeneesiä selvästi verrattuna SedC- ja HIIT -ryhmiin ($p < .001$ molemmissa). Tutkimus antoi myös viitteitä siitä, että HIIT voi lisätä neurogeneesiä kontrolliin verrattuna ($p = .089$). Vaskularisaatioissa ei saatu näkyviin eroja ryhmien välillä. Lisäksi neurogeneesin todettiin olevan positiivisesti yhteydessä parempaan fyysiseen suorituskykyyn ($p < .001$) ja juoksussa kehittymiseen ($p = .036$).

Johtopäätös. Rottien hippokampuksen neurogeneesin määrä kasvaa huomattavasti aerobisen harjoittelun seurauksena. Aerobisen harjoittelun todettiin olevan tehokkaampi harjoittelumuoto HIIT:iin verrattuna, kun tarkasteltiin neurogeneesiä. Vaikka juoksuharjoittelulla pystytään vaikuttamaan neurogeneesin määrään vielä rottien keski-ikässä, niin vaskularisaatioon aerobisella harjoittelulla ja HIIT:lla ei ole enää vaikutusta keski-ikäisillä rotilla.

Avainsanat: Hippokampus, neurogeneesi, vaskularisaatio, aerobinen juoksu, HIIT

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	1
SISÄLLYS	2
1 JOHDANTO	4
2 HIPPOKAMPUS.....	5
2.1 Hippokampuksen rakenne	5
2.2 Neurogeneesi aikuisen nisäkkään hippokampuksessa	7
2.3 Hippokampuksen vaskularisaatio.....	8
2.4 Hippokampuksen rooli oppimisessa ja muistissa.....	9
3 FYYSISEN HARJOITTELUN VAIKUTUKSET OPPIMISEEN	11
3.1. Juoksuharjoittelu ja oppiminen	11
3.2 VO ₂ max, hippokampuksen koko ja muisti.....	13
4 JUOKSUHARJOITTELUN VAIKUTUKSET HIPPOKAMPUKSEN NEUROGENEESIIN JA VASKULARISAATIOON	16
4.1 Rikastetun ympäristön suhde liikuntaan neurogeneesin lisääjänä	16
4.2 Juoksuharjoittelun vaikutus neurogeneesiin hippokampuksessa	17
4.3 Juoksuharjoittelun vaikutukset hermosolujen rakenteeseen ja toimintaan hippokampuksessa.....	20
4.4 Juoksuharjoittelun vaikutus hippokampuksen verisuonistoon.....	21
4.5 Liikunta sekä hermo- ja verisuonikasvutekijät aivoissa.....	23
4.5.1 Aivoperäinen hermokasvutekijä (BDNF)	23
4.5.2 Fibroblasti-kasvutekijä-2 (FGF-2) ja Hermokasvutekijä (NGF)	24
4.5.3 Verisuonten endoteelikasvutekijä (VEGF) ja Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1)	25
5 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT	26
6 MENETELMÄT	28
6.1 Koe-eläimet ja olosuhteet.....	28
6.2 Koeasetelma	28
6.3 Aineiston keräys.....	30
6.3.1 Verisuonien värjäys – RECA-1.....	30
6.3.2 Uusien hermosolujen värjäys – Doublecortin	31

6.3.3 Hermosolujen värjäys – Kresyylivioletti	32
6.4 Aineiston analysointi.....	32
6.5 Tilastolliset menetelmät	33
7 TULOKSET	35
7.1 Juoksuharjoittelun tulos	35
7.2 Neurogeneesi.....	36
7.3 Vaskularisaatio	37
7.4 Korrelaatioiden tarkastelu	39
8 POHDINTA	43
8.1 Neurogeneesi.....	43
8.2 Vaskularisaatio	46
8.3 Korrelaatioiden tarkastelu	48
8.4 Johtopäätökset	49
LÄHTEET	51

1 JOHDANTO

Hippokampuksen tiedetään olevan yksi aivojen alueista, jossa neurogeneesiä eli uusien hermosolujen muodostumista tapahtuu koko elämän ajan (Leuner & Gould 2010). Hippokampus on vahvasti liitetty oppimiseen sekä muistiin (Andersen ym. 2007 s. 581) ja neurogeneesin on ajateltu liittyvän oppimisprosesseihin (Leuner & Gould 2010). Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että liikunta lisää neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa (dentate gyrus) ja parantaa kognitiivisia kykyjä (mm. van Praag 1999a, van Praag 2005 ja Clark ym. 2008).

Normaalin ikääntymisen ja hermoston rappeumasairauksien on todettu vaikuttavan aivoihin vähentämällä neurogeneesiä sekä vaikuttamalla heikentävästi kognitiiviseen suoriutumiseen. Liikunta voi viivästyttää kognitiivisen kyvyn laskua ikääntyessä ja vähentää riskiä hermoston rappeumasairauksille. (Vivar ym. 2012.) Uudet hermosolut muodostuvat usein verisuonien läheisyyteen, joten myös vaskularisaatiolla eli verisuonitukella on vaikutusta neurogeneesiin (Ahlskog ym. 2011). Juoksuharjoittelun on todettu parantavan myös vaskularisaatiota hippokampuksen pykäläpoimussa samanaikaisesti kasvaneen neurogeneesin kanssa (van Praag ym 2005 ja Clark ym. 2009).

Vaikka liikunnalla on todettu olevan paljon myönteisiä vaikutuksia oppimiseen ja aivojen rakenteeseen, on vielä epäselvää, johtuvatko liikunnan edut tietyn kynnystason ylityksestä vai onko liikunnan kestolla ja intensiteetillä vaikutusta kognitiivisiin kykyihin ja aivojen toimintaan (Ahlskog ym. 2011). Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia kahden erityyppisen juoksuharjoittelun, aerobisen harjoittelun ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelun, vaikutuksia hippokampuksen neurogeneesiin sekä vaskularisaatioon rotilla. Tutkimuksessa pyrittiin myös vertailemaan näiden juoksuharjoittelumuotojen tuloksia toisiinsa. Lisäksi tutkimuksessa arvioitiin juoksukehityksen ja juoksuosituksen yhteyksiä hippokampuksen neurogeneesiin ja vaskularisaatioon.

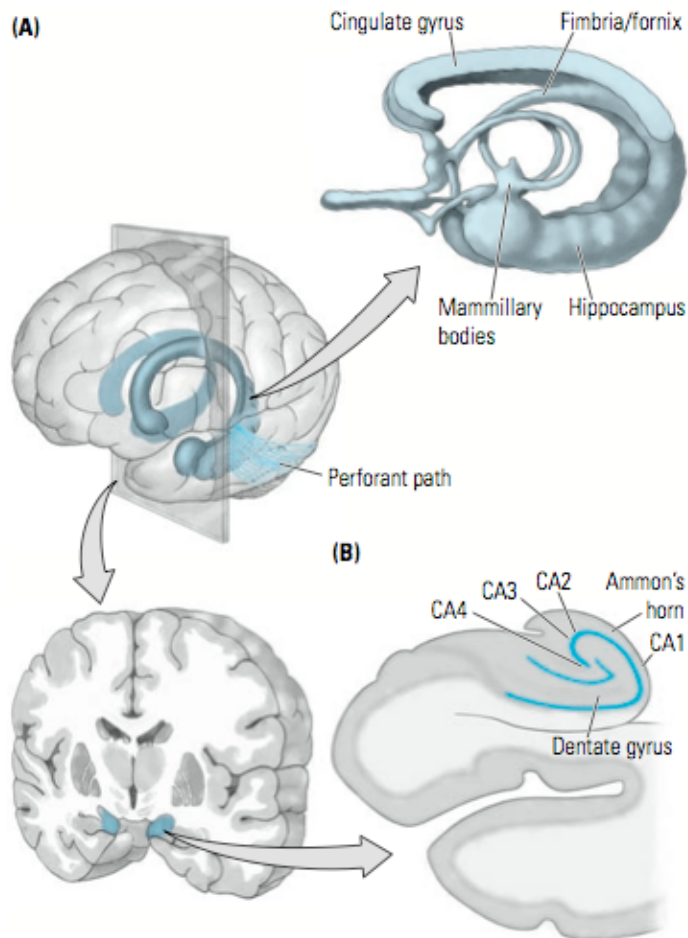
2 HIPPOKAMPUS

2.1 Hippokampuksen rakenne

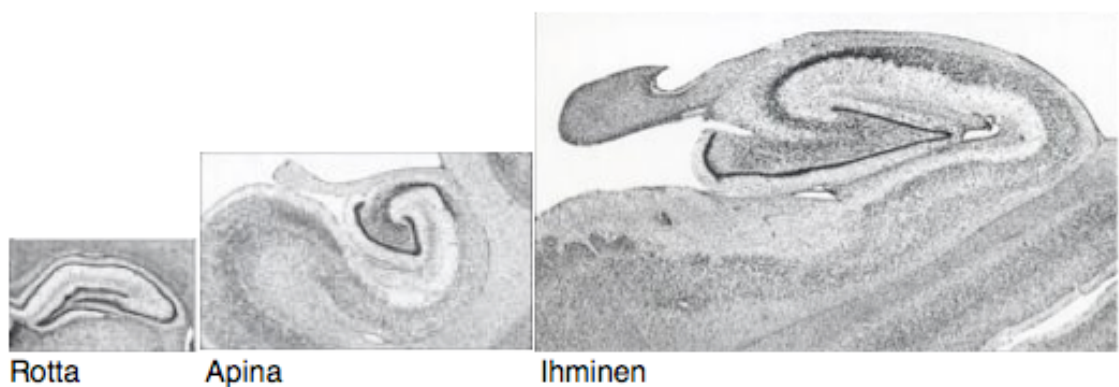
Rakenteeltaan putkimainen ja kaareva hippokampus sijaitsee temporaalilohkoissa molemmilla puolilla aivoja. Hippokampus koostuu Ammonin sarvesta (Ammon's horn), jossa on pyramidisoluja ja pykäläpoimusta, jossa on jyväsoluja. Ammonin sarven pyramidisolut on jaoteltu neljään ryhmään: CA1, CA2, CA3 ja CA4. Hippokampus ja sen rakenteet on kuvattu ihmisen aivoissa kuvassa 1. Hippokampuksen jyväsolujen ja pyramidisolujen välillä on lukuisia yhteyksiä. (Kolb & Whishaw, 2003, s. 461 – 464.)

Hippokampus on rakenteellisesti yhteydessä kahden reitin kautta myös muihin aivojen osiin. Perforant –rata kulkee hippokampuksen läpi posterioriselle neokorteksille ja fimbria-fornix –reitti yhdistää hippokampuksen talamukseen (thalamus), etuaivokuoreen (prefrontal cortex), hypotalamukseen (hypothalamus) ja tyvitumakkeeseen (basal ganglia). Hippokampus toimii näin väliasemana aivojen eri osien viestinnässä. Hippokampuksen sisällä viestintä neokorteksilta kulkee pykäläpoimun jyväsolujen kautta Ammonin sarven pyramidisoluille. Ammonin sarven CA1 osan solut viestivät temporaalilohkon subiculum-osan kanssa, joka lähettää tietoa eteenpäin talamukseen ja aivorunkoon sekä palautetietoa takaisin aivokuorelle. (Kolb & Whishaw, 2003, s. 464.)

Useat hippokampuksen rakenteeseen ja toimintaan liittyvät tutkimukset ovat ihmisten sijaan tehty eläimillä. Eri nisäkkäiden hippokampuksen rakenne eroaa jonkin verran toisistaan muun muassa hippokampuksen koossa, pykäläpoimun yhteyksien määrässä, CA1 alueen paksuudessa sekä soluarkkitehtuuristen ala-ryhmien määrässä. Perusrakenteeltaan hippokampus on kuitenkin samanlainen eri nisäkkäiden välillä; aivoista on helppo erottaa toisistaan pykäläpoimu sekä Ammonin sarven alueet kaikilta eri lajeilta. Kuvassa 2 on esitelty rotan, apinan ja ihmisen hippokampus. (Andersen ym. 2007 s. 39.)



KUVA 1. (A) Hippokampus sijaitsee temporaalilohkossa. Se on yhteydessä temporaaliseen aivokuoreen perforant –reitit kautta ja fimbria/fornix:n kautta aivorungon mamillaarisiin osiin. (B) Ammonin sarven ja sen pyramidisolujen (CA1-CA4) sekä pykäläpoimun sijainnit osoitettuna hippokampuksen poikkileikkauksessa. (Kolb & Whishaw, 2003, s. 461.)



KUVA 2. Nills –värjätty kuva hippokampuksesta eri nisäkkäillä. Rotan, apinan ja ihmisen hippokampuksen rakenteessa on eroavuuksia, mutta perusrakenteeltaan hippokampus on lajista riippumatta samanlainen. (mukaeltu Andersen ym. 2007 s. 4.)

2.2 Neurogeneesi aikuisen nisäkkään hippokampuksessa

Neurotieteessä uskottiin pitkään, lähes koko 1900 vuosisadan ajan, että nisäkkäiden aivojen muovautuvuus päättyy varhain syntymän jälkeen, jolloin aivojen rakenne on saavuttanut vakaan muotonsa. Tämän jälkeen aikuisuudessa ei uskottu tapahtuvan rakenteellisia muutoksia aivojen hermoverkoissa. 1960-luvulta lähtien on kuitenkin useissa tutkimuksissa eri nisäkkäillä osoitettu, että neurogeneesiä eli uusien hermosolujen syntymistä tapahtuu aivoissa myös aikuisuudessa. Nämä tutkimukset ovat kumonnet uskokuksen siitä, että aivot kehittyisivät lopulliseen muotoonsa varhain syntymän jälkeen. (Leuner & Gould 2010.)

Aikuisen aivojen neurogeneesi eroaa vastasyntyneen aivojen kehityksestä monella tavalla. Aikuisen aivojen muokkautuvuutta aktivoi aina jokin ärsyke, joka säätelee neurogeneesiä tarpeiden mukaan. Aikuisen hermosolujen muovautuvuus myös kestää pidempään kuin lapsilla. Aikuisuudessa uusia hermosoluja syntyy muun muassa hippokampuksen pykäläpöimun subgranulaariselle vyöhykkeelle (subgranular zone, SGZ). SGZ-alueella uusista hermosoluista muodostuu jyväsoluja (granule cells). Näillä uusilla hermosoluilla on rooleja monissa aivojen toiminnoissa, kuten oppimisessa ja muistissa. Uusien solujen lähtökohtana on pidetty monipotentiaalisia hermokantasoluja (multipotent neural stem cells,). Nämä solut edustavat erityistä somaattista solutyyppejä, jolle on ominaista tuottaa erilaisia hermosolujen muotoja. Näiden solujen tunnistaminen aikuisen nisäkkään aivoista on kuitenkin vielä epätarkkaa ja hermokantasoluiksi on ehdotettu useampia eri solutyyppejä. On myös mahdollista, että erilaiset solut voivat toimia hermokantasoluina ja saada itsenäisesti aikaan neurogeneesiä. (Duan ym. 2008.)

Ympäristö säätelee hermokantasolujen olemassaoloa ja kehittymistä. Useiden fysiologisten, patologisten ja farmakologisten tekijöiden on todettu säätelevän aikuisen nisäkkään neurogeneesiä SGZ –alueella. Näitä ovat muun muassa liikunta, aivohalvaus, leikkaukset ja masennuslääkkeet. Erilaisilla kasvutekijöillä, kuten fibroplastien kasvutekijöillä (fibroblast growth factors), verisuonten endoteelin kasvutekijöillä (vascular endothelial growth factor, VEGF) ja neuregulins -kasvutekijöillä, on todettu olevan merkittävä rooli solujen lisääntymisessä. Myös hermovälittäjäaineet, kuten GABA (gamma-aminobutyric acid), säätelevät hermosolujen lisääntymistä. (Duan ym. 2008.)

Uuden hermosolun synnyttyä se alkaa kasvaa ja siirtyä syntymäpaikastaan kohti tavoitepaikkaansa. Pykäläpoimussa solut siirtyvät paikallisesti sisimpään jyväsolutkerrokseen. Uudet hermosolut myös kasvattavat nopeasti aksoniaan ja dendriittejään. Aksoni kulkee hippokampuksen CA3 alueelle kahden viikon sisällä syntymästään ja dendriitit saavuttavat molekyylikerroksen viikon sisällä syntymästään ja jatkavat kehittymistään ainakin neljän viikon ajan. Sekä migraatiota eli solujen siirtymistä sekä dendriittien ja aksonien kehittymistä säätelevät useat eri molekyylit ja säätelyreitit. (Duan ym. 2008.)

2.3 Hippokampuksen vaskularisaatio

Kehittyvään keskushermostoon kasvaa verisuonia jo ennen kuin hermosolut ovat kehittyneet lopulliseen muotoonsa. Lisäksi keskushermostoon syntyy verisuonia jatkuvasti, samalla, kun hermoverkko laajenee eli neurogenesin yhteydessä. Uusien hermosolujen ja verisuonien yhtäaikainen synty tuottaa neurovaskulaarisia yksiköitä, jotka mahdollistavat aivojen verenvirtauksen säätelyn vastaamaan aivojen toimintaa. (Ruhrberg & Bautch, 2013.) Hippokampuksessa verisuonten tiheys on saatu lisääntymään aikuisuudessa pitämällä eläimiä vähähappisessa ympäristössä eli aiheuttamalla elimistöön hypoksiaa. Patt'in ym. (1997) tutkimuksessa hypoksian vaikutus aivojen verisuonitiheyteen oli suurinta juuri hippokampuksessa sekä eräissä toisessa aivoalueessa, stiatumisissa. Myös liikunnalla on saatu muutoksia aikaan verisuonten määrässä sekä rakenteessa (van Praag ym. 2005, Creer ym 2010 ja Clark ym. 2008).

Aivoissa verisuonten päällimmäiset endoteelisolut reagoivat verisuonistoa kasvattaviin signaaleihin, kuten VEGF:iin, aloittamalla migraation eli siirtymisen paikasta toiseen. Samanaikaisesti luumenen puoleiset endoteelisolut vastaavat signaaliin lisääntymällä, kasvattamalla uuden verisuonen runkoa ja muokkaamalla uuden verisuonen haaran sisäpuolta. VEGF on välttämätön aivojen verisuoniston kehityksen kannalta. VEGF jakautuu eri isoformeihin, joilla on erilaisia tehtäviä verisuonten kehityksessä. Uusien verisuonien kasvu vaatii useampien VEGF:in isoformien ilmentymistä. Toisaalta yksittäiset isoformit voivat muokata verisuonen rakennetta ja toimintaa myös ilman muiden isoformien läsnäoloa. VEGF:n lisäksi on myös muita verisuonikasvutekijöitä, joita tar-

vitaan aivojen vaskularisaation kehittymiseen. Esimerkiksi neuropiliini-1:den (neuropiliin 1, NRP1) puute estää keskushermoston vaskularisaation lisääntymisen täysin vaikka periferiassa NRP1:n puute ei vaikuta yhtä radikaalisti vaskularisaatioon. (Ruhrberg & Bautch, 2013.)

2.4 Hippokampuksen rooli oppimisessa ja muistissa

Hippokampuksella on suuri rooli muistin ja oppimisen kannalta. Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että hippokampuksen sekä sen viereisten osien tai ratojen vauriot ja toimintahäiriöt ovat johtaneet erilaisiin muistiongelmiin. (Kolb & Whishaw, 2003, s. 464.) Myös erilaiset ärsykkeet, joiden on todettu vähentävän hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiä, ovat lisäksi johtaneet heikentyneisiin muistisuorituksiin. Muistia heikentäviä ärsykejä ovat esimerkiksi pitkäkestoinen stressi, lisääntynyt glukokortikoidipitoisuus veressä sekä ikääntyminen. Pykäläpoimun lisääntynyt neurogeneesi, esimerkiksi rikastetun ympäristön tai liikunnan seurauksena, on vuorostaan johtanut parantuneisiin oppimis- ja muistisuorituksiin. (Leuner & Gould 2010.)

Useimpien teorioiden mukaan hippokampus ei kuitenkaan vastaa kaikenlaisesta muistista, vaan se on erityisesti yhdistetty deklarativiseen ja spatiaaliseen muistiin. Deklaratiivisella muistilla tarkoitetaan muistia, joka koostuu päivittäisistä tosiasioista ja tapahtumista. Tälle muistille on ominaista, että muistot voidaan tietoisesti palauttaa mieleen. Spatiaaliseen muistilla tarkoitetaan tilaan ja avaruudellisiin suhteisiin liittyvää muistia. Spatiaalisessa muistissa hippokampus vastaa erityisesti kognitiivisten karttojen muodostumisesta sekä näiden käytöstä suunnistamisen apuna. (Andersen ym. 2007 s. 581.)

Erään teorian mukaan hippokampuksen ajatellaan olevan paikka, jossa muistissa tapahtuu konsolidaatiota eli uusista muistoista tehdään pysyviä. Tämä on yhdistetty varsinkin elämäkertamuistiin, joka on deklarativisen muistin osa. Konsolidaation jälkeen muistojen ajatellaan siirtyvän vähän ajan kuluttua pois hippokampuksesta varastoon muihin aivojen osiin. Tämä selittäisi sen, että joissakin tapauksissa, joissa hippokampus on vaurioitunut, varhaisemmat muistot ovat säilyneet (muistot, jotka ovat siirtyneet jo muihin

aivojen osiin), mutta viimeaikaisemmat muistot ovat kadonneet (hippokampusessa olleet muistot). (Kolb & Whishaw, 2003, s. 464.)

Koska hippokampus on liitetty erilaisiin muistitoimintoihin myös deklaraatiivisen ja spatiaalisen muistin ohella, on viimeaikaisissa tutkimuksissa keskitytty tutkimaan hippokampuksen eri osa-alueiden rooleja muistisuorituksissa (Leuner & Gould 2010). Tutkimuksissa on huomattu neurogeneesin pykäläpoimussa olevan yhteydessä parantuneeseen spatiaaliseen muistiin ja täten pykäläpoimun on todettu olevan tärkeä rakenteiden erottelussa. On myös huomattu, että CA1 alue on tärkeä koodaamisessa ja CA3 tehtävien toteuttamisessa. (Vivar ym. 2012.)

3 FYYSISEN HARJOITTELUN VAIKUTUKSET OPPIMISEEN

3.1. Juoksuharjoittelu ja oppiminen

Useat tutkimukset osoittavat, että juoksuharjoittelulla on myönteisiä vaikutuksia oppimiseen ja muistiin. Juoksuharjoittelu vaikuttaa etenkin spatiaaliseen muistiin, mikä on nähty Morris'in water maze –testissä sekä erilaisissa labyrinthi-tehtävissä, jotka mittaavat tilallista oppimiskykyä. Juoksuharjoittelu edesauttaa myös kognitiivista kyvykkyyttä tehtävissä, jotka eivät ole sidoksissa spatiaaliseen muistiin. Esimerkiksi kontekstuaalissa pelkoehdollistamisessa, uuden kohteen tunnistamisessa sekä passiivisessa välttämistehtävässä juoksuharjoittelu parantaa jyrsijöiden suorituskykyä. (Vivar ym. 2008.)

Morris'in water maze -testissä hiiri tai rotta laitetaan uimaan ympyrän muotoiseen altaaseen. Jossain kohtaa allasta hieman veden pinnan alapuolella on koroke, joka eläimen on tarkoitus löytää. Testi tehdään useana päivänä ja siinä mitataan eläimen kykyä oppia korokkeen paikka vedessä. Mittareina toimii uintimatka ja latenssiaika, joka kuluu eläimen altaaseen laittamisesta siihen, kun eläin löytää korokkeen. (van Praag 2005.) Juoksuharjoitelleet jyrsijät ovat useissa tutkimuksissa pärjänneet kontrollieläimiä paremmin tässä testissä. Sekä latenssiaika että uintimatka ovat olleet lyhyempiä liikunnallisilla eläimillä muutaman päivän harjoittelun jälkeen. (van Praag 1999a, van Praag 2005 ja Clark ym. 2008.)

Tutkimuksissa juoksuharjoittelu on lisännyt hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiä, joka todennäköisesti toimii liikunnan välittävänä tekijänä parempaan oppimiskykyyn. (van Praag 1999a, van Praag 2005, Clark ym. 2008.) Rhodes'in ym. (2003) tutkimus kuitenkin osoitti, että juoksuharjoittelu ei aina lisää oppimiskykyä spatiaalisen muistin tehtävissä, vaikka neurogeneesi olisikin liikunnan vaikutuksesta suurentunut. Heidän tutkimuksessaan hiiret, jotka oli valikoivasti jalostettu juoksupyöräharjoitteluun eivät menestyneet water maze –testissä, vaikka hiirten neurogeneesi hippokampuksessa oli suurentunut. Samassa tutkimuksessa juoksuharjoitelleilla kontrollihiirillä, joita ei ollut jalostettu juoksupyöräharjoitteluun, pykäläpoimun neurogeneesi oli kasvanut ja

lisäksi hiiret menestyivät water maze –testissä kontrollihiiriä, jotka eivät juosseet, paremmin.

Pykäläpoimuun syntyvien uusien hermosolujen roolin on uskottu olevan erottelukyvyn kehittymisessä (Vivar ym. 2012). Creer ym. (2010) totesivat tutkimuksessaan spatiaalisen erottelukyvyn parantuvan juoksuharjoittelun seurauksena aikuisilla hiirillä, kun erotteltavien ärsykkeiden välinen aika on lyhyt. Juoksuharjoittelu ei kuitenkaan parantanut erottelukykyä kontrolliryhmään nähden, kun ärsykkeiden välinen aika on pitkä. Samassa tutkimuksessa liikunta lisäsi pykäläpoimun neurogeneesiä aikuisilla hiirillä ja pykäläpoimun neurogeneesin todettiin olevan selvässä suhteessa erottelukyvyn paranemiseen.

Ikä vaikuttaa muistiin hidastamalla taitojen oppimiskykyä. Kognitiivisen kyvykkyyden laskun takana voi olla vähentynyt pykäläpoimun neurogeneesi. Van Praag:in ym. (2005) tutkimuksessa spatiaalisen muistin tehtävissä vanhat hiiret oppivat tehtäviä hitaammin kuin nuoret hiiret. Liikunta voi kuitenkin helpottaa oppimiskykyä. Tutkimuksessa hieinan yli kuukauden kestävä juoksupyöräharjoittelu vaikutti myönteisesti hiirten spatiaaliseen oppimiskykyyn water maze –testissä niin nuorilla kuin vanhoilla hiirillä verrattuna ikäkontrolliinsa. Vanhat hiiret (19 kk), joilla oli juoksupyörä häkissään selviytyivät spatiaalisen muistin tehtävästä paremmin kuin nuoret hiiret (3 kk), joilla ei ollut juoksupyörää häkissään. (van Praag ym. 2005.) Creer:in ym. (2010) tutkimuksessa erittäin vanhat hiiret (22 kk) eivät parantaneet suorituskyykyään kuvion erottelutehtävässä juoksuharjoittelun seurauksena. Creer:in ym. (2010) tutkimuksessa vanhoilla hiirillä pykäläpoimun neurogeneesi ei myöskään parantunut liikunnan seurauksena, kun taas van Praag:in ym. (2005) tutkimuksessa vanhoilla hiirillä juoksuharjoittelu paransi neurogeneesiä. Näin ollen juoksuharjoittelu ei ilmeisesti yksistään ilman pykäläpoimun neurogeneesiä kykene lisäämään oppimiskykyä.

Berchtold ym. (2010) tutkivat kognitiivista kyvykkyyttä liikunnan lopettamisen jälkeen. Heidän tutkimuksessaan 3 viikon vapaaehtoisin juoksuharjoittelun jälkeen nuorilta hiiriltä mitattiin kognitiivisia kykyjä vesilabyrinttitehtävällä. Tutkimuksessa heti juoksujakson päätyttyä testatuilla hiirillä oli paras suorituskyyky muistissa, mutta toisessa kognitiivisesta tehtävästä nopeimmin suoriutuivat hiiret, joiden kykyjä mitattiin viikko

juoksujakson päätyttyä. Tutkimus osoitti, että erilaisten kognitiivisten kykyjen huippu ajoittuu eri tavalla juoksuharjoittelun jälkeen.

3.2 VO₂max, hippokampuksen koko ja muisti

Maksimaalinen hapenottokyvyn (VO₂max) on todettu olevan positiivisesti yhteydessä hippokampuksen kokoon. Hippokampuksen koon kasvun on taas arvioitu viittaavan ihmisillä neurogeneesin lisääntymiseen hippokampuksessa. (Choddokc ym. 2010, Erikson ym. 2011.) VO₂max kuvastaa hengitys ja verenkierto-elimistön kykyä kuljettaa maksimaalisen määrän happea kudoksille maksimaalisen rasituksen aikana. VO₂max:n mittaamista käytetään arvioitaessa fyysistä kuntoa: mitä parempi yksilön VO₂max on, sitä paremman fyysisen kunnan hän omaa. (Thomas ym. 2010.)

Chaddokc ym. (2010) mittasivat fyysisen suorituskyvyn (VO₂max) yhteyttä hippokampuksen pinta-alaan ja kognitiiviseen kyvykkyyteen 9–10 -vuotialla lapsilla. Korkeampi fyysinen suorituskyky oli yhteydessä isompaan hippokampuksen kokoon molemmilla aivopuoliskoilla sekä parempaan suorituskykyyn kognitiivisissa tehtävissä. Hippokampuksen koko oli yhteydessä assosiatiiviseen muistiin ja lisäksi tutkimuksessa osoitettiin, että hippokampuksen koko toimi välittävänä tekijänä fyysisen suorituskyvyn (VO₂max) sekä assosiatiivisen muistin välillä.

Erikson:in ym. (2011) tutkimuksessa 55–80 -vuotiaat, kognitiivisesti samantasoiset koehenkilöt, jaettiin aerobisen liikunnan ryhmään, joka suoritti kävelyharjoituksia viikoittain ja kontrolliryhmään, joka suoritti lihasharjoituksia ja venyttelyä. Hippokampuksen pinta-ala on todettu pienenevän 1–2 % vuosittain terveellä ikääntyvällä aikuisväestöllä. Vuoden kestävän intervention jälkeen kontrolliryhmän hippokampuksen pinta-ala oli 1,4 % pienempi kuin vuotta aiemmin, kun taas kävelyryhmällä hippokampuksen koko oli kasvanut 2 %. Tutkimuksessa mitattiin myös kahden muun aivoalueen, caudate tumakkeen ja talamuksen, pinta-alaa. Näissä aivoalueissa ei tapahtunut muutoksia intervention seurauksena. Hippokampuksessa koko oli kasvanut lähinnä anteriorisessa hippokampuksessa, jonka hermosolut on yhdistetty spatiaaliseen muistiin. Koehenkilöiltä mitattiin myös VO₂max ennen ja jälkeen intervention. Kävelyryhmän hapenottokyky oli

kasvanut kontrolliryhmää enemmän. Mitä suurempi parannus hapenottokyvyssä oli tapahtunut, sitä suurempi oli myös hippokampuksen koon muutos. Lisäksi suurentunut hippokampuksen koko oli yhdistetty parempaan suoriutumiseen kognitiivisissa tehtävissä.

Useimmiten $VO_2\text{max}$:ä on parannettu aerobisen harjoittelun avulla. Aerobisella harjoittelulla tarkoitetaan pitkäkestoista kohtalaisella rasituksella tehtävää liikuntaa. Usein aerobinen harjoitus suoritetaan 65–85 % tasolla henkilön sen hetkisestä $VO_2\text{max}$:n tasosta. (Thomas ym. 2012.) Aerobisella harjoittelulla on myös saatu myönteisiä tuloksia hippokampuksen neurogeneesiin ja verisuonien pinta-alaan (esim. van Praag 2005 ja Clark ym. 2008). Kuitenkin $VO_2\text{max}$:n paranemiseen vaikuttaa harjoittelumuodon ohella monet muutkin tekijät, kuten ikä sekä fyysisen harjoittelun intensiteetti, tiheys ja kesto (Thomas ym. 2012).

Korkean intensiteetin harjoittelu koostuu harjoittelusta yli 85 % tasolla henkilökohtaisesta $VO_2\text{max}$:sta. Tällä tasolla energia tuotetaan anaerobisesti. Anaerobisen harjoittelun vaikutuksia hippokampuksen neurogeneesiin tai vaskularisaatioon ei ole vielä tutkittu. (Thomas ym. 2012.) Myöskään korkean intensiteetin intervalliharjoittelun (high intensity interval training, HIIT) vaikutuksia hippokampukseen tai oppimiskykyyn ei ole tutkittu. HIIT:ssa anaerobinen ja aerobinen harjoittelu vaihtelevat. Helgerud ym. (2007) tutkimuksessa vertailtiin aerobista harjoittelua, anaerobista harjoittelua sekä kahta eri HIIT:lua keskenään ihmisillä tehdyssä tutkimuksessa. Heidän tutkimuksessaan molemmat HIIT:t lisäsivät $VO_2\text{max}$:a enemmän kuin aerobinen harjoittelu tai anaerobinen harjoittelu.

Vaikka tutkimuksia anaerobisen ja HIIT:n vaikutuksista hippokampuksen neurogeneesiin tai vaskularisaatioon liittyen ei ole, Winter ym. (2007) osoittivat anaerobisen harjoittelun johtavan parempiin tuloksiin kognitiivisissa tehtävissä sekä korkeampaan seerumin BDNF-tasoon akuutisti heti suorituksen jälkeen verrattuna henkilöihin, jotka lepäsivät tai jotka suorittivat aerobisen harjoituksen ennen kognitiivisia tehtäviä. Nykytiedon valossa ei ole varmaa, onko aerobisen kunnon nousu $VO_2\text{max}$:lla mitattuna välttämätöntä, jotta voitaisiin nähdä muutoksia aivojen rakenteessa sekä kognitiivisissa kyvyissä. Voi olla, että jo liikunnalla aikaansaatu akuutti verenvirtauksen kasvu aivoissa

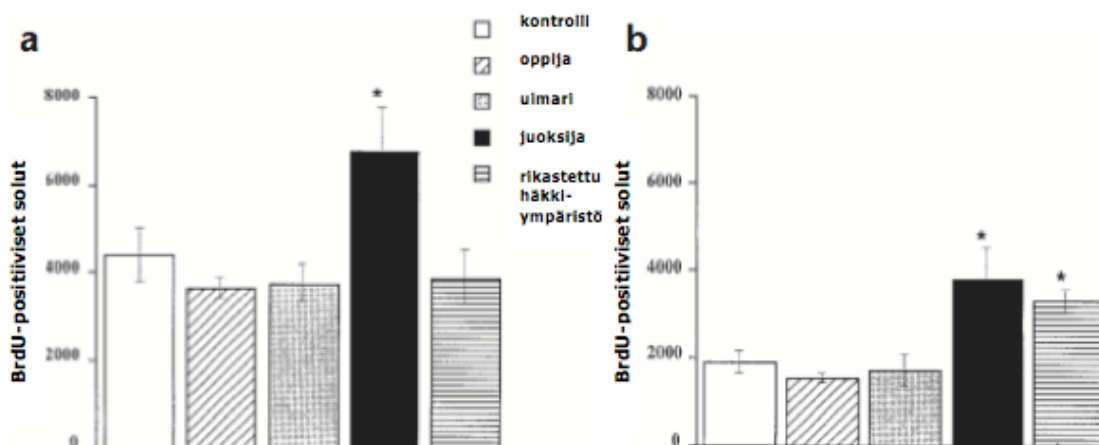
voi stimuloida muutoksia aivojen rakenteessa ja muistitoiminnoissa. (Thomas ym. 2010.)

4 JUOKSUHARJOITTELUN VAIKUTUKSET HIPPOKAM- PUKSEN NEUROGENEESIIN JA VASKULARISAATIOON

4.1 Rikastetun ympäristön suhde liikuntaan neurogeneesin lisääjänä

Kempermann ym. osoittivat jo vuonna 1997 hiirillä tehdyssä tutkimuksessaan, että hippokampuksen neurogeneesiin voidaan vaikuttaa pitämällä eläimiä rikastetussa ympäristössä. Rikastettu ympäristö lisäsi hippokampuksen pykäläpoimuun syntyvien uusien hermosolujen määrää verrattuna standardiympäristössä kasvatettuihin hiiriin. Rikastettu ympäristö voi kuitenkin koostua eri komponenteista, kuten laajennetuista oppimismahdollisuuksista, suuremmasta asumisympäristöstä, laajemmasta sosiaalisesta vuorovaikutuksesta sekä fyysisestä aktiivisuudesta (van Praag ym. 1999b), joten ilman tarkempaa tutkimusta ei voida sanoa, mikä rikastetussa ympäristössä lisää neurogeneesiä.

Van Praag ym. (1999b) jaottelivat rikastetun ympäristön komponentteja nähdäkseen, kuinka ne yksittäin lisäävät pykäläpoimun neurogeneesiä aikuisen nisäkkään aivoissa. Ryhmät oli jaoteltu kontrolliin, oppijoihin, uimareihin, juoksijoihin ja rikastettuun häkkiympäristöön. Uusia hermosoluja tutkittiin bromodeoxyuridine (BrdU) –värjäyksellä. Hermosolujen jakaantuminen heti BrdU-injektion päätyttyä oli suurempaa juoksijaryhmällä verrattuna muihin ryhmiin (kuva 3a). Solujen säilymistä mitattiin neljä viikkoa viimeisen BrdU-injektion päätyttyä. Oppijat ja uimarit eivät eronneet kontrollista säilyneiden uusien solujen määrässä. Juoksuharjoittelu lisäsi säilyneiden uusien solujen määrää kaksinkertaisesti verrattuna kontrolliin. Myös rikastetuttu häkkiympäristö ilman juoksupyörää lisäsi uusien säilyneiden solujen määrää lähes samaan tapaan, kuin juoksuharjoittelu (kuva 3b).



KUVA 3. Y-akselilla BrdU-positiivisten solujen määrä, x-akselilla ryhmät. (a) juoksuharjoittelu oli ainoa tekijä, joka lisäsi neurogeneesiä heti intervention jälkeen mitattuna. (b) juoksuharjoittelun lisäksi rikastettu ympäristö lisää solujen säilymistä 4 viikkoa intervention jälkeen mitattuna. (mukaeltu van Praag ym 1999b.)

Kobilo ym. (2011a) tutkivat myös rikastetun ympäristön ja juoksuharjoittelun suhdetta hiirillä. Heidän tutkimuksensa osoitti, että hippokampuksen hermosolujen jakaantuminen, hermosolujen säilyminen ja neurotrofinen taso lisääntyivät vain juoksuharjoittelun seurauksena. Näin ollen juoksuharjoittelu on kriittinen tekijä BDNF-kasvutekijän ja neurogeneesin lisääjänä. On kuitenkin huomioitava, että rikastetulla ympäristöllä voi olla muita hyödyllisiä elementtejä aivojen terveyteen. Rikastetun ympäristön on muun muassa todettu lisäävän synapsien muovautuvuutta (Vivar ym. 2012).

4.2 Juoksuharjoittelun vaikutus neurogeneesiin hippokampuksessa

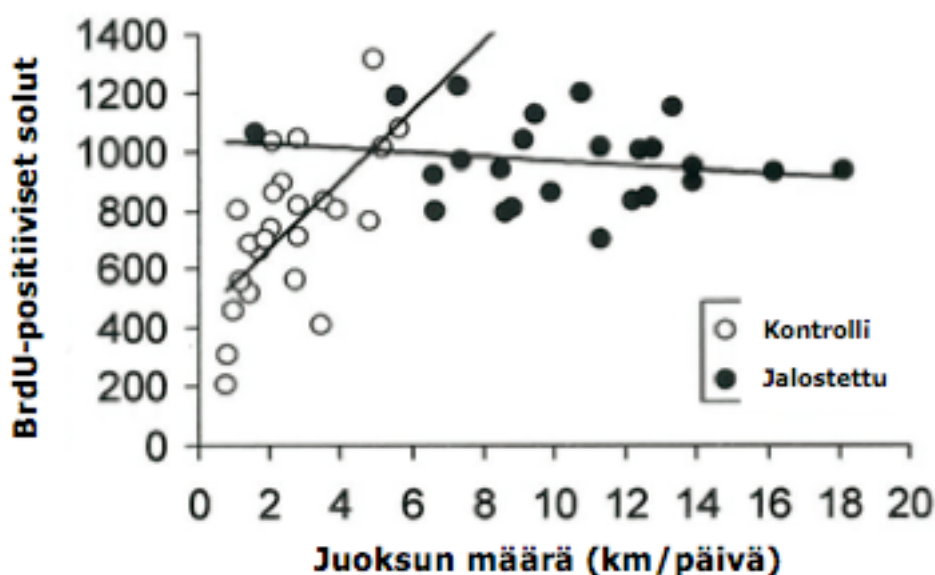
Neurogeneesi alkaa laskea jo ennen keski-ikää normaalin ikääntymisen myötä ja säilyy alemmalla tasolla keski-ian jälkeen (Wu ym. 2008). Lisäksi hermosolukon muovautuvuutta ja määrää vähentävät erilaiset hermoston rappeumasairaudet. Liikunnan on todettu useissa eläinkokeissa kasvattavan neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpöimussa ja ehkäisevän ikääntymiseen liittyvää neurogeneesin vähentymistä. (Vivar ym. 2012, van Praag 1999a, van Praag 2005 ja Clark ym. 2008.)

Van Praag:in ym. (1999a) tutkimuksessa aikuisten naarashiirten neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa tutkittiin BrdU -värjäyksen avulla. Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisäsi neurogeneesiä kontrolliryhmään verrattuna. Juoksijoiden uudet hermosolut säilyivät myös paremmin kuin kontrollin. Clark:in ym. (2008) tutkimuksessa C57BL/6J –kannan uroshiirillä 50 päivän vapaaehtoisen juoksuharjoittelun jälkeen uusien hermosolujen määrä oli kaksinkertainen kontrolliin verrattuna ja B6D2F1/J –kannalla neurogeneesi oli 4,5 -kertainen kontrolliin nähden. Myös Creer:in ym. (2010) tutkimuksessa aikuisilla uroshiirillä vapaaehtoinen juoksupyöräharjoittelu lisäsi neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa.

Liikunnan myönteinen vaikutus neurogeneesiin ei näyttäisi olevan riippuvainen iästä, sillä van Praag:in ym. (2005) tutkimuksessa hiirten juoksupyöräharjoittelu 45 päivän ajan lisäsi sekä nuorten että vanhojen hiirten neurogeneesiä pykäläpoimussa verrattuna ikäkontrolleihin. Vanhoilla hiirillä (19 kk), jotka olivat juosseet, neurogeneesi oli 25,6 % suurempaa kuin ikäkontrollillaan. Juoksun vaikutus neurogeneesiin on kuitenkin suurempi nuorilla. Lisäksi vanhojen liikkuvien hiirten neurogeneesi ei ole samaa luokkaa, kuin nuorilla ei liikkuvilla hiirillä vaan nuorilla uusia soluja kasvaa enemmän kuin vanhoilla liikunnasta riippumatta. (van Praag ym. 2005.) Creer:in ym. (2010) tutkimuksessa vielä iäkkäämmillä hiirillä (22 kk) vapaaehtoinen juoksuharjoittelu ei lisännyt pykäläpoimun neurogeneesiä kontrolliryhmään nähden, joten liikunnan hyödyt eivät välttämättä enää näy tietyn ikätason saavutettua.

Uda:n ym. (2006) tutkimuksessa juoksumattoharjoittelulla (nopeus 22 m/min, 30 min/päivä, seitsemän päivän ajan) saatiin myönteisiä tuloksia aikuisten rottien pykäläpoimun neurogeneesiin. Juoksuharjoittelu lisäsi jakautuvien neuroplastien sekä jakautuvien astrosyyttien määrää. Myös postmitoottisten hermosolujen määrä näytti lisääntyneen juoksuharjoittelun seurauksena. Wu ym. (2008) tutkivat juoksumattoharjoittelun vaikutusta keski-ikäisten hiirten neurogeneesiin. Heidän tutkimuksessaan viisi viikkoa kestänyt juoksumattoharjoittelu (60 min/d, intensiteetti n. 70 % maksimaalisesta hapenottokyvystä) lisäsi hermosolujen jakautumista, epäkypsien hermosolujen määrää heti harjoittelun jälkeen. Lisäksi liikunta edisti hermosolujen kypsymistä ja säilymistä hippokampuksen pykäläpoimussa.

Rhodes ym. (2003) osoittivat, että liikunnan määrä ei suoraviivaisesti ole yhteydessä neurogeneesin määrään. Heidän tutkimuksessaan valikoivasti juoksuharjoitteluun jalostetuilla hiirillä ei saatu aikaan positiivista korrelaatiota päivittäisen juoksumatkan ja neurogeneesin välillä, vaan neurogeneesi oli lähes yhtä suurta kaikilla hiirillä. Kuitenkin jalostamattomilla hiirillä, jotka eivät juosseet niin pitkiä matkoja kuin juoksuharjoitteluun jalostetut hiiret, positiivinen korrelaatio saatiin näkyviin. Korrelaatiot näkyvät kuvassa 4. Tutkimus antoi osviittaa siitä, että neurogeneesi ei kasva äärettömästi liikunnan määrän lisääntyessä. Todennäköisesti liikunnalla voidaan kasvattaa neurogeneesiä tiettyyn rajaan saakka, jonka jälkeen neurogeneesin määrä hiljalleen tasaantuu.

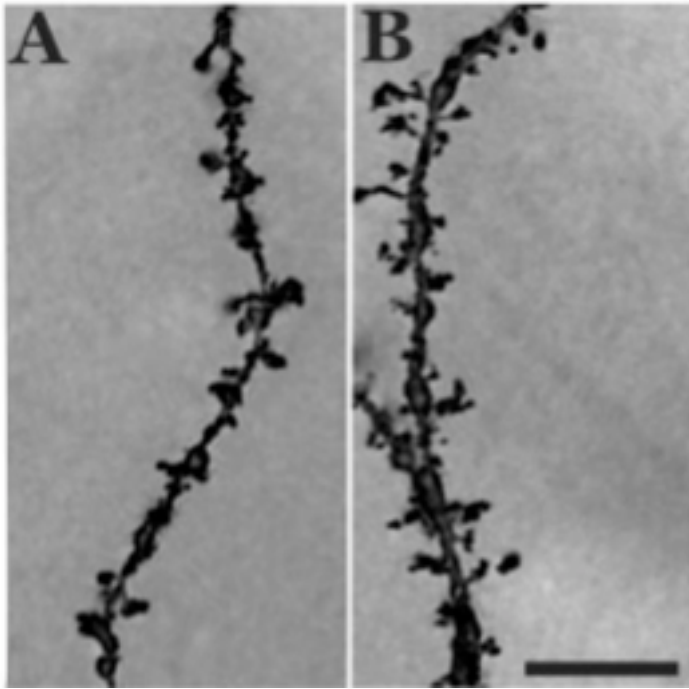


KUVA 4. Rhodes ym. tutkimuksessa valikoivasti juoksuharjoitteluun jalostetuilla hiirillä päivittäinen juoksumatka ei ollut positiivisesti yhteydessä neurogeneesin määrään. Kontrollihiirillä, jotka juoksivat päivittäin vähemmän, kuin juoksukannan hiiret, positiivinen korrelaatio saatiin näkyviin. Tulos antaa osviittaa siitä, että neurogeneesin määrä ei kasva suoraviivaisesti liikunnan määrän kasvaessa, vaan tasaantuu, kun juoksumäärä ylittää tietyn tason. (Rhodes ym. 2003)

4.3 Juoksuharjoittelun vaikutukset hermosolujen rakenteeseen ja toimintaan hippokampuksessa

Juoksuharjoittelu voi vaikuttaa hermosolujen muovautuvuuteen ja aktiivisuuteen (Vivar ym. 2012). Van Praag:in ym. (1999a) tutkimuksessa liikunta lisäsi pitkäkestoista potentiaatiota (long term potentiation, LPT) hippokampuksen pykäläpoimussa samanaikaisesti lisääntyneen hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesin ja parantuneen spatiaalisen oppimiskyvyn kanssa. LPT on fysiologinen malli muistijäljen syntymisestä ja on siten liitetty oppimiseen ja muistiin (Vivar ym. 2012). Van Praag ym. (1999a) tutkimuksessa mitattiin myös hippokampuksen CA1 aluetta, jossa ei nähty eroja juoksu- ja kontrolliryhmän välillä. Tämä osoittaa, että pykäläpoimun neurogeneesi edistää pykäläpoimun LPT:ta ja täten myös oppimista. Clark ym. (2008) tutkivat juoksuharjoittelun yhteyttä uusien hermosolujen aktiivisuuden c-Fos –värjäyksen avulla. Juoksuharjoittelu lisäsi c-Fos positiivisten hermosolujen määrää pykäläpoimussa viisinkertaisesti kontrolliin nähden. Juoksuharjoittelu voi siis lisätä solujen aktiivisuutta ja näin ollen vaikuttaa oppimiskykyyn ja muistiin.

Hermosolujen aktiivisuuden ja synapsien muovautuvuuden takana voivat olla morfologiset muutokset hermosoluissa (Vivar ym. 2012). Eadie ym. (2005) tutkivat yksittäisiä jyväsoluja ja huomasivat, että vapaaehtoisen juoksuharjoittelun seurauksena rottien solujen rakenne pykäläpoimussa oli erilainen kuin kontrolliryhmällä. Hermosolujen dendriittien pituus, monimutkaisuus ja hermosolujen okaiden määrä olivat suurempia urheilun seurauksena hippokampuksen pykläpoimussa. Kuvassa 5 on esitelty kontrolliryhmän rotan sekä juoksuharjoitelleen rotan jyväsolun dendriitin rakenne. Liikunnan on todettu lisäävän myös dendriittien monimutkaisuutta kaikissa hippokampuksen jyväsoluvyöhykkeissä ja pitkäkestoisen harjoittelun on todettu vaikuttavan myönteisesti hermosolujen rakenteeseen pykäläpoimun lisäksi myös parahippokampuksen ja CA1 alueen pyramidisoluissa (Vivar ym. 2012).



KUVA 5. Rotan pykäläpoimun jyväsolun dendriitin rakenne (A) kontrollieläimellä sekä (B) juoksuharjoitelleella eläimellä. Juoksuharjoittelu lisää dendriitin monimutkaisuutta. Asteikko-viiva = 10 μm . (Eadie ym. 2005.)

Van Praag ym. (2005) vertasivat nuorien ja vanhojen hiirien uusien hermosolujen rakennetta juoksuharjoittelun jälkeen. Uusien hermosolujen dendriittien pituus, hermon haarautumiskohtien määrä ja dendriittien okaiden määrä eivät eronneet nuorilla ja vanhoilla hiirillä toisistaan. Tästä voidaan päätellä, että juoksun seurauksena kasvaneet uudet hermosolut ovat morfologialtaan samanlaisia iästä riippumatta. Solujen kypsyminen täydelliseen muotoonsa voi olla kuitenkin hitaampaa iäkkäillä hiirillä ja kypsyminen saattaa olla epätäydellisempää, kuin nuorilla hiirillä. (van Praag ym. 2005.)

4.4 Juoksuharjoittelun vaikutus hippokampuksen verisuonistoon

Van Praag:in ym. (2005) tutkimuksessa 45 päivän juoksupyöräharjoittelu ei vaikuttanut verisuonten määrään pykäläpoimussa nuorilla aikuisilla (3 kk) eikä vanhoilla (19 kk) hiirillä. Kuitenkin nuorilla hiirillä verisuonen ympärystymitta ja verisuonipinta-ala olivat suuremmat juoksupyöräharjoittelun seurauksena. Samaa ei huomattu vanhoilla hiirillä. Creer:in ym. (2010) tutkimuksessa juoksuharjoittelu paransi aikuisten hiirten (3 kk)

angiogeneesiä eli verisuonien uudismuodostusta pykäläpoimun neurogeenisellä alueella, mutta vanhoilla hiirillä (22 kk) ei nähty samanlaista muutosta. Näin ollen liikunta voi parantaa dentate gyruksen vaskularisaatiota nuorilla aikuisilla hiirillä, mutta ei vanhoilla hiirillä (van Praag ym. 2005 ja Creer ym 2010). Verisuonten muovautuvuuden puute vanhoilla hiirillä voi johtua alentuneista verisuonten kasvutekijätasoista. (van Praag ym. 2005.)

Clark ym. 2009 tutkimuksessa 50 päivän vapaaehtoinen juoksuharjoittelu juoksupyörässä lisäsi C57BL/6J uroshiirten verisuonipinta-alaa pykäläpoimun jyväsolumuodostumisen alueella sekä stiatumin alueella, mutta ei koko hippokampuksen alueella. Pykäläpoimussa muutos oli suurempi (16 %) kuin stiatumissa (7 %). Angiogeneesin ilmeneminen neurogeneesille tyypillisessä paikassa, pykäläpoimussa, liikunnan seurauksena ei ole yllättävää, koska uusien hermosolujen muodostuminen tarvitsee aineenvaihduntaa tuekseen. Voi myös olla, että angiogeneesi lisää liikuntaan liittyvää hermojen aktivaatiota pykäläpoimussa. Toisella hiirilajilla, B6D2F1/J:llä, liikunta ei lisännyt verisuonipinta-alaa pykäläpoimussa. (Clark ym. 2009.)

Pereira ym. (2006) osoittivat magneettikuvauksen (magnetic resonance imaging, MRI) avulla, että juoksuharjoittelu lisää hiirten aivoverenkierron tilavuutta pykäläpoimussa, mutta ei muissa hippokampuksen osa-alueissa. Samassa tutkimuksessa aivoverenkierron tilavuus oli positiivisessa yhteydessä hiirten pykäläpoimun neurogeneesiin. Tutkimuksessa mitattiin myös ihmisillä tapahtuvia muutoksia aivoverenkierron tilavuudessa sekä kognitiivisessa kyvykkyydessä kolmen kuukauden liikuntaintervention jälkeen. Liikunta lisäsi myös ihmisillä pelkästään pykäläpoimun aivoverenkiertoa. Lisäksi liikunnan jälkeinen aivoverenkierron tilavuus oli positiivisessa yhteydessä kognitiiviseen kyvykkyyteen. Pereira ym. tutkimus osoitti, että MRI:lla mitattua aivoverenkierron tilavuutta pykäläpoimussa voidaan pitää neurogeneesin mittarina *in vivo* tutkimuksissa.

4.5 Liikunta sekä hermo- ja verisuonikasvutekijät aivoissa

4.5.1 Aivoperäinen hermokasvutekijä (BDNF)

Monet hermo- ja verisuonikasvutekijät, jotka vastaavat hermoston ja verisuoniston säilymisestä ja kehittymisestä, ovat tärkeitä liikunnan aikaansaamien hyötyjen näkymisessä aivotasolla. Aivoperäisen hermokasvutekijän, BDNF:n (brain-derived neurotrophic factor), tiedetään olevan tärkeässä roolissa oppimisessa, neurogeneesissä sekä synapsien muotoutumisessa aikuisten nisäkkäiden aivoissa. Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että liikunta lisää BDNF:n määrää aivoissa, etenkin hippokampuksessa. Jo alle viikon kestävä liikunta on todettu lisäävän BDNF:n mRNA-tasoa hippokampuksessa. (Vivar ym. 2012.) Myös BDNF-proteiinitasojen on todettu kasvaneen juoksuharjoittelun seurauksena. Esimerkiksi Rhodes'in ym. (2003) tutkimuksessa juoksupyöräharjoittelu 40 päivän ajan lisäsi BDNF-proteiinitasoa noin 46 % hippokampuksessa kahdella eri hiirikannalla verrattuna kontrolliryhmiin. Hippokampuksen BDNF-geenien sekä proteiinien ilmenemisen on todettu olevan suurempaa koko aikana, kun liikuntaa harrastetaan (Berchtold ym. 2005).

Liikunnan hyötyjen on todettu säilyvän myös liikunnan lopettamisen jälkeen. Berchtold ym. (2010) tutkimuksessa 3 viikon vapaaehtoisen juoksuharjoittelun jälkeen nuorilta hiiriltä mitattiin BDNF-kasvutekijän tasoa hippokampuksessa heti juoksuharjoittelujakson päätyttyä sekä viikon välein tämän jälkeen. BDNF-tasot olivat urheilun jälkeen 186 % kontrollihiirten tasosta ja säilyivät kontrollitasoa korkeammalla kaksi viikkoa urheilujakson päätyttyä. Lisäksi BDNF-taso oli positiivisessa yhteydessä kognitiiviseen kyvykkyyteen. Tutkimuksessa arvioitiin, että BDNF-tason säilyminen korkeammalla tasolla voi johtaa parantuneisiin suorituksiin kognitiivisissa tehtävissä, vaikka urheilu olisi jo loppunut. Näin ollen BDNF voi olla yksi tekijä, joka säilyttää urheilusta saatavia hyötyjä kognitiiviseen kyvykkyyteen, kun urheilu on jo loppunut.

Farmer ym. (2004) huomasivat, että liikunnan aikaansaama BDNF:n tason nousu ei kasvanut yleisesti hippokampuksen eri osissa, vaan BDNF:n mRNA-taso oli nimenomaan kasvanut hippokampuksen pykäläpoimussa. Eri tutkimuksissa on arvioitu, että BDNF:n mRNA- ja proteiinitasojen kasvu hippokampuksessa voi lisätä pitkäaikaista

potentiaatiota sekä neurogeneesiä pykäläpoimussa liikunnan seurauksena (Farmer ym. 2004 ja van Praag ym. 1999a).

Liikunnalla on saatu aikaan BDNF-tason nousua myös iäkkäämmillä jyrsijöillä. Wu:n ym. (2008) tutkimuksessa viisi viikkoa kestänyt juoksumattoharjoittelu palautti keski-ikäisten hiirten BDNF-tason ja tämän BDNF:n reseptorin määrän hippokampuksen pykäläpoimussa nuorempien hiirten tasolle. Myös vapaaehtoisella juoksuharjoittelulla on saatu vastaavia tuloksia. Marlatt'in ym. (2012) keski-ikäisillä hiirillä tehdyssä tutkimuksessa 6 kuukauden vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisäsi BDNF-tasoa pykäläpoimussa. BDNF-tason nousu oli yhteydessä parantuneeseen neurogeneesiin sekä kognitiiviseen suorituskyykyyn. Näin ollen säännöllinen liikunta, joka on aloitettu keski-ikässä, voi edistää aivojen toimintakykyä ja ehkäistä ikääntymiseen liittyvää kognitiivisen kyvyn laskea.

4.5.2 Fibroblasti-kasvutekijä-2 (FGF-2) ja Hermokasvutekijä (NGF)

Liikunnan on todettu lisäävän fibroblasti-kasvutekijä-2:den, FGF-2:n (fibroblast growth factor 2), mRNA-tasoa. Gómez-Pinilla:n ym. (1997) tutkimuksessa neljä yötä kestäneen vapaaehtoisen juoksuharjoittelun jälkeen FGF-2 mRNA-taso oli korkeampi verrattuna kontrolliin hippokampuksessa, mutta ei muilla mitatuilla aivoalueilla. FGF-2 on yhdistetty aikuisten nisäkkäiden neurogeneesiin pykäläpoimussa sekä uusien jyväsolujen dendriittien monimutkaisuuteen (Vivar ym. 2012).

Myös hermokasvutekijän, NGF:n (nerve growth factor), mRNA-pitoisuuden on todettu lisääntyvän liikunnan jälkeen. Neeper ym. (1996) tutkimuksessa jo parin yön vapaaehtoisen juoksuharjoittelun jälkeen NGF mRNA-pitoisuus oli noussut kontrollia suuremmaksi hippokampuksen pykäläpoimussa. NGF on liitetty parantuneeseen neurogeneesiin (Vivar ym. 2012).

4.5.3 Verisuonten endoteelikasvutekijä (VEGF) ja Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1)

Hermosolujen on todettu kasvavan lähelle paikallista verisuonistoa hippokampuksessa. VEGF on angiogeneesiä edistävä kasvutekijä, joka on myös yhdistetty hermosolujen muodostumiseen. (Vivar ym. 2012) Fabel ym. (2003) osoittivat, että VEGF osallistuu juoksuharjoittelulla aikaansaadun neurogeneesin ilmenemiseen. Heidän tutkimukseensa hiiret, joilta VEGF:n toiminta oli estetty, eivät eronneet kontrolliryhmästä hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesin tasossa juoksuharjoittelun jälkeen, vaikka normaalitilanteessa juoksun kuuluisi lisätä neurogeneesiä.

VEGF:n lisäksi insuliinin kaltainen kasvutekijä 1, IGF-1, osallistuu verisuonten muodostumiseen aivoissa. Vähäinen IGF-1 pitoisuus seerumissa ehkäisee normaalia aivoissa tapahtuvaa angiogeneesiä. IGF-1:n lisäinjektointi eläimeen taas kasvattaa aivojen verisuoniston tiheyttä. Liikunta lisää normaalissa tapauksessa aivojen vaskularisaatiota. Näin ei kuitenkaan tapahdu eläimillä, joilla on alhainen seerumin IGF-1 pitoisuus. IGF-1 toimii siis välittävänä tekijänä muutoksille aivojen vaskularisaatiossa aikuisen nisäkkään aivoissa. (Lopez-Lopez ym. 2004.)

IGF-1 näyttää olevan välittävänä tekijänä myös liikunnan ja parantuneen hippokampuksen neurogeneesin sekä parantuneen kognitiivisen kyvykkyyden välillä. Geenimutanteilla hiirillä, joilla seerumin IGF-1 pitoisuus on pieni, on huomattu olevan vähentynyttä aikuisiän hippokampuksen neurogeneesiä sekä puutteita spatiaalisessa muistissa. Liikunnasta ei ollut hyötyä näiden hiirien kohdalla, vaikka liikunnan on muutoin todettu parantavan neurogeneesiä ja spatiaalista muistia. (Trejo ym. 2008)

5 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESEIT

Kuten kirjallisuudesta on tullut ilmi, liikunnalla on merkittävä vaikutus hippokampuksen toimintaan ja rakenteeseen ja tätä kautta oppimiseen ja muistiin. On kuitenkin vielä epäselvää, johtuvatko liikunnan edut tietyn kynnyksen ylityksestä vai onko liikunnan kestolla ja intensiteetillä vaikutusta kognitiivisiin kykyihin ja aivojen toimintaan (Ahlskog ym. 2011). Vielä ei ole myöskään täysin selvää, minkä ikäisenä liikunnan edut ehtyvät aivojen vaskularisaation osalta ja lisääkö kaiken tyyppinen juoksuharjoittelu neurogeneesiä sekä vaskularisaatiota. Tässä tutkimuksessa keskitytään tutkimaan kahden erityyppisen juoksuharjoittelun, aerobisen harjoittelun ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelun (HIIT), vaikutuksia hippokampuksen neurogeneesiin sekä vaskularisaatioon rotilla.

Tutkimuksella pyritään vastaamaan seuraaviin tutkimuskysymyksiin:

1. Lisääkö vapaaehtoinen juoksuharjoittelu noin 10 kuukauden ikäisten rottien neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa?
2. Lisääkö HIIT noin 10 kuukauden ikäisten rottien neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa?
3. Vaikuttaako vapaaehtoinen juoksuharjoittelu noin 10 kuukauden ikäisten rottien vaskularisaatioon hippokampuksen pykäläpoimussa?
4. Vaikuttaako HIIT noin 10 kuukauden ikäisten rottien vaskularisaatioon hippokampuksen pykäläpoimussa?
5. Onko hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesissä eroa harjoittelumuodosta riippuen?
6. Onko hippokampuksen pykäläpoimun vaskularisaatiossa eroa harjoittelumuodosta riippuen?
7. Onko pykäläpoimun neurogeneesin ja juoksukyvyn välillä yhteyttä?
8. Onko pykäläpoimun neurogeneesin ja juoksijana kehittymisen välillä yhteyttä?
9. Onko pykäläpoimun vaskularisaation ja juoksukyvyn välillä yhteyttä?
10. Onko pykäläpoimun vaskularisaation ja juoksijana kehittymisen välillä yhteyttä?

Aiempiin tutkimuksiin pohjautuen tehtiin seuraavanlaiset hypoteesit:

1. Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisää neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa 10 kuukauden ikäisillä rotilla, koska aiemmissakin tutkimuksissa on huomattu neurogeneesin lisääntyneen jyrksijöillä iästä riippumatta vapaaehtoisen juoksuharjoittelun seurauksena (mm. van Praag 2005 ja Clark ym. 2008).
2. HIIT lisää neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa 10 kuukauden ikäisillä rotilla. HIIT:n on todettu olevan tehokas VO₂max:n lisääjä (Helgerud ym. 2007) ja toisaalta VO₂max on yhdistetty muutoksiin hippokampuksessa (mm. Erikson ym. 2011). Lisäksi muissakin tutkimuksissa, joissa juoksuharjoitus on suoritettu juoksumatolla, juoksu on lisännyt neurogeneesiä (Uda ym 2006 ja Wu ym. 2008)
3. Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisää vaskularisaatiota hippokampuksen pykäläpoimussa 10 kuukauden ikäisillä rotilla. Aiemmissa tutkimuksissa nuorilla aikuisilla (3 kk) jyrksijöillä on saatu aikaan verisuonituksessa myönteisiä muutoksia juoksuharjoittelun seurauksena, mutta vanhoilla (yli 19 kk) ei (van Praag ym. 2005 ja Creer ym 2010). Tässä tutkimuksessa oletetaan, että ikä ei vaikuttaisi juoksuharjoittelun ja neurogeneesin suhteeseen vielä keski-ikäisillä rotilla.
4. HIIT lisää vaskularisaatiota hippokampuksen pykäläpoimussa 10 kuukauden ikäisillä rotilla. HIIT:n osalta aiempia tutkimuksia ei ole, mutta tässä tutkimuksessa oletetaan, että myös HIIT vaikuttaa myönteisesti vaskularisaatioon aerobisen juoksuharjoittelun tavoin.
5. Todennäköisesti juoksuharjoittelumuodolla on merkitystä siihen, millaisia muutoksia hippokampuksen neurogeneesissä voidaan nähdä. Aivojen osalta HIIT -harjoittelua ja vapaaehtoista juoksuharjoittelua ei ole vielä vertailtu aiemmissa tutkimuksissa, joten hypoteesia harjoittelumuotojen vaikuttavuuseroista hippokampuksen rakenteeseen tai toimintaan ei voida tehdä.
6. Todennäköisesti juoksuharjoittelumuodolla on merkitystä myös hippokampuksen vaskularisaatiota tarkasteltaessa, mutta tähänkään ei voida tehdä aiemman tutkimustiedon puutteen vuoksi hypoteesia.
7. – 10. Juoksukehitys ja juoksukyky ovat todennäköisesti positiivisessa yhteydessä ainakin pykäläpoimun neurogeneesiin, todennäköisesti myös vaskularisaatioon. Aiemmissa tutkimuksissa juoksuharjoittelun määrän on todettu olevan yhteydessä neurogeneesiin (Rhodes ym. 2003) ja fyysisen suorituskyvyn yhteydessä hippokampuksen kokoon (Chaddock ym. 2010 ja Erikson ym. 2011.).

juoksivat 5 minuuttia 50–60 % tasolla maksimikapasiteetistaan. Tämän jälkeen rotat juoksivat kolme peräkkäistä intervallisarjaa. Yksi sarja koostui kolmen minuutin juoksusta 85–90 % tasolla ja kahden minuutin juoksusta 50 % tasolla maksimikapasiteetista. Juoksumaton kulma oli koko harjoituksen ajan 10 astetta ylöspäin.

HIIT-rotilta määritettiin maksimaalinen juoksukapasiteetti ja maksimaalinen hapenotto-kyky ($VO_2\max$) kerran viikossa hengityskammiossa tehdyn maksimaalisen juoksutestin avulla. Maksimaaliseen suorituskykyyn pohjautuen pystyttiin määrittämään kullekin rotalle omat viikoittaiset juoksunopeudet HIIT-harjoitusten ajalle, sillä harjoitusten teho määriteltiin prosentteina maksimaalisesta juoksukapasiteetista. Myös RW- ja C-rotille tehtiin maksimikapasiteetin määrittävät juoksumattotestit ennen intervention alkua ja sen päätyttyä. Juoksumattotesti tehtiin kolmena peräkkäisenä päivänä ennen interventioita C-, RW- ja HIIT-rotille, sekä kolmena peräkkäisenä päivänä intervention jälkeen C- ja RW-rotille. Paras tulos näistä kolmesta jäi voimaan. Yksi juoksumattotesti kolmesta tehtiin hengityskammiossa $VO_2\max$:in määrittämiseksi. HIIT rotat tekivät ensimmäistä kertaa lukuun ottamatta juoksutestin kerran viikossa eli vain kerran myös intervention päätyttyä. Juoksumattotestiä ennen rotat lämmittelivät viiden minuutin ajan nopeudella 8-9 m/min. Testi alkoi 10 m/min juoksunopeudella, jonka jälkeen juoksunopeutta nostettiin joka toinen minuutti 2,4 m/min. SedC-rotat eivät tehneet juoksumattotestiä ollenkaan kokeen aikana.

Kokeen aikana rotille tehtiin myös muita testejä (mm. glukoositoleranssikoe, käyttäytymiskokeita ja DEXA-mittaus) ja otettiin erilaisia näytteitä (mm. verinäytteet). Näitä testejä ja näytteitä ei kuitenkaan hyödynnetä tässä tutkimuksessa, joten niitä ei käsitellä tässä enempää. Rotilta seurattiin viikoittain painoa ja ruokailua koko kokeen ajan. Kaikki rotat lopetettiin intervention jälkeen. Lopetuksen ja edellisen juoksuharjoittelun (HIIT-harjoittelun tai juoksumattotestin) välillä oli 48 tuntia. RW-rottien juoksupyörät lukittiin edellisen päivän aikana ennen lopetusta. Rotat nukutettiin hiilidioksidihappiseoksella (40/60 %) ennen lopetusta ja lopetukseen käytettiin sydämen punktiota. Intervention lopussa rotat olivat noin 10–12 kuukauden ikäisiä.

6.3 Aineiston keräys

Rottien aivot kerättiin talteen ja eroteltiin kolmeen osaan: vasempaan ja oikeaan aivopuoliskoon sekä pikkuaivoihin. Aivojen osat siirrettiin 4 % paraformaldehydiin 48 tunniksi. Rottien aivoista leikattiin satunnaisesti joko oikea tai vasen aivopuolisko hippokampuksen alueelta 40 µm viipaleiksi vibratomilla (LEICA VT 1000 S automaattinen vibratomi). Viipaleita kerättiin 12 kymmenen viipaleen sarjaa. Kymmenen sarjaa kerättiin eppendorf-putkiin ja kaksi sarjaa lasille. Näin jokaisessa eppendorf-putkessa tai lasissa oli kattava 10 viipaleen edustus koko hippokampuksen alueelta. Eppendorf-putket oli täytetty jäänestoaineella (sakkaroosi 150 g + 200 ml 0,1 M fosfaattipuskuri + 150 ml etyleeniglykoli, pH 7,6). Näytteiden keräyksen jälkeen näyteputket varastoitiin pakkaseen. Aivoaineisto kerättiin kaikilta muilta rotilta, paitsi ryhmältä C. Tämä siksi, koska aivomittareihin ei haluttu kontrolliryhmälle minkäänlaisia juoksuvasteita. C ryhmä juoksi maksimaalisen juokсутestin ennen ja jälkeen intervention toisinkuin SedC, joka ei juossut ollenkaan kokeen aikana.

6.3.1 Verisuonien värjäys – RECA-1.

Verisuonien värjäys tehtiin vapaasti kelluville näytteille RECA-1 primäärivastaaineella. Näytteet siirrettiin 0,1 M PBS-liuokseen (Phosphate Buffered Saline, pH 7,6) jäänestoaineesta ja järjestettiin värjäyskelkkoihin. Jäänestoaine pestiin pois 0,1 M PBS-liuoksella (3 x 15 minuuttia). Tämän jälkeen viipaleista estettiin peroksidaasien ilmenemistä 1 % vetyperoksidiliuoksella puolen tunnin ajan. Seerumin häirintä estettiin 3 % normal goat serum (ab7481, Abcam tai Goat Serum PAA Lot.no 803509-7023) 0,1 M PBS -liuoksella. Tämän jälkeen viipaleet siirrettiin RECA-1 (1:2000) primäärivastaaineeseen: 1 x 0,5M TBS-T (Tris-buffered saline with Triton X-100) + 0,01 x normal goat serum + 0,0005 x mouse anti-rat RECA-1 (ST-MCA970R, AbDSerotec). Näytteet olivat primäärivasta-aineen ajan pimeässä yön yli, vähintään 18 tuntia.

Aamulla primäärivasta-aine pestiin pois 0,5 M TBS-T liuoksella (3 x 5 minuuttia) ja näytteet siirrettiin kahdeksi tunniksi goat anti-mouse biotin (1:500) sekundaarivastaaineeseen: 1 x 0,5 M TBS-T + 0,002 x goat anti-mouse IgG Antibody (Abcam: goat polyclonal secondary antibody to mouse IgG1-heavy chain, Biotin, pre-absorbe). Se-

kundaarivasta-aine pestiin pois 0,5 M TBS-T liuoksella (3 x 5 minuuttia) ja näytteet siirrettiin kahdeksi tunniksi Streptavidin (1:1000) tertiäarivasta-aineeseen: 1 x 0,5 M TBS-T + Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (RPN1231, GE Healthcare/VWR). Tertiäarivasta-aine pestiin pois 0,5 M TBS-T liuoksella (3 x 5 minuuttia). Tämän jälkeen näytteet siirrettiin DAB-liuokseen: 1 x tris buffer (pH 7,6) + 0,05 x (30 % H₂O₂) + DAB (D5905-50TAB, Sigma). Näytteet olivat DAB-liuoksessa niin kauan, kunnes suurimmat verisuonet pystyttiin erottamaan leikkeistä silmämääräisesti. DAB pestiin pois 3 x 1 minuutin pesuilla 0,1 M fosfaattipuskuriliuoksessa (pH 7,6). Tämän jälkeen näytteet siirrettiin lasille gelatiinissa ja laitettiin kuivauskaappiin (+ 37 °C) kuivumaan vähintään vuorokauden ajaksi.

6.3.2 Uusien hermosolujen värjäys – Doublecortin

Uusien verisuonien värjäys tehtiin vapaasti kelluvilla näytteillä Doublecortin primääri-vasta-aineella. Doublecortin-värjäysprotokolla oli samanlainen, kuin RECA-1 värjäys, lukuun ottamatta seuraavia poikkeuksia. Doublecortin-värjäyksessä primääri-vasta-aineena oli 1:250 doublecortin antibody sc-0866 (Santa Cruz Biotechnology) ja sekundaarivasta-aineena oli 1:500 Biotinylated Rabbit Anti-Goat IgG Antibody (BA-5000, Vector Labs/Mediq). Doublecortin-värjäyksessä jäänestoaineen pois pesun jälkeen näytteitä keitettiin sitruunahappoliuoksessa (pH 6) 80 °C:ssa 30 minuuttia, jonka jälkeen näytteitä jäähdytettiin fosfaattipuskuriliuoksessa 15 minuuttia ennen peroksidaasiplokkausta. Seerumin plokkaus vaihetta ei tehty doublecortin-värjäyksessä. Näytteet pestiin (3 x 5 min) TBS-T liuoksessa ennen primääri-vasta-aineeseen laittoa.

Koska doublecortin -värjäyksessä ei tehty seerumin estämistä, värjättiin jokaisesta ryhmästä (RW, HIIT ja SedC) kontrollivärjäys ilman primääri-vasta-ainetta, muun protokollan ollessa täysin samanlainen. Näin haluttiin varmistaa, etteivät epäspesifit alueet, eli muut alueet kuin uudet hermosolut, värjäydy värjäysprotokollan muiden vaiheiden tuloksena hippokampusissa.

6.3.3 Hermosolujen värjäys – Kresyylivioletti

Aivokudoksen rakenteen selvittämiseksi leikkeet värjättiin RECA-1 ja Doublecortin-värjäysten jälkeen kresyylivioletilla, joka värjää solurungot. Lasilla olevia kuivattuja näytteitä kasteltiin ensin tislatussa vedessä (dH₂O) noin kolmen minuutin ajan. Tämän jälkeen näytteet siirrettiin 0,1 % kresyyliviolettiliuokseen, jossa näytteet olivat niin kauan, että violetti väri oli tarttunut hyvin leikkeisiin. Enimmät värit huuhdottiin tislatussa vedessä ennen kuin näytteet kuljetettiin nousevan alkoholisarjan (70 %, 95 % ja 100 % etanolia) läpi värjäyksen haalistamiseksi haluttuun tummuusasteeseen. Kahteen ja puoleen desilitraan 70 % alkoholia oli lisätty 4 tippaa etikkahappoa värinpoiston tehostamiseksi. Alkoholisarjan päätteeksi näytteet siirrettiin ksyleeniin viideksi minuutiksi ja toiseksi viideksi minuutiksi uuteen, puhtaaseen ksyleeniin ennen kuin näytteet peitettiin liiman (Depex) avulla peitinlasin alle.

6.4 Aineiston analysointi

Rottien hippokampus oli sen verran pieni, että kymmenen värjätyyn leikkeen sijaan 9 leikettä riitti kattamaan koko hippokampuksen. Doublecortin-vasta-aineella värjäytyistä kudosleikkeistä laskettiin hippokampuksen pykäläpoimun alueelta kaikki uudet hermosolut käyttäen apuna valomikroskooppia. Jotkut leikkeet olivat repaleisia pykäläpoimun alueelta. Näistä leikkeistä arvioitiin hävikin osuus koko leikkeen osuudesta ja laskettiin puuttuvan osan solut kertomalla näytteestä löydetyt solut hävikin osuudella. Näin koko näytteen solumäärä laskettiin kaavalla: näytteestä lasketut solut + näytteestä lasketut solut x hävikki desimaaleina. Joistain aivoista ei saatu kaikkia näytettä analysoitavaksi, koska näytteet olivat jäätyneet, revenneet pahoin tai muuten vaurioituneet. Näiden puuttuvien leikkeiden solumäärä arvioitiin muiden saman ryhmän (HIIT, RW tai SedC) saman leikkeen keskiarvona. Arvio tehtiin näin koska pykäläpoimun solumäärä vaihteli sen mukaan, missä kohdin hippokampusta (dorsaalissa vai ventraalisessa osassa) näyte sijaitti. Kun kaikki solut oli laskettu, kerrottiin kunkin rotan näytteistä laskettu solumäärä kahdellatoista, jotta saatiin koko hippokampuksen uusien solujen määrä arvioitua. Kun yhden hippokampuksen solumäärä oli arvioitu, kerrottiin tämä luku vielä kahdella, jotta tiedettäisiin yhteismäärä molempien aivopuoliskojen hippokampusten uusista soluista dentate gyruksen alueelta.

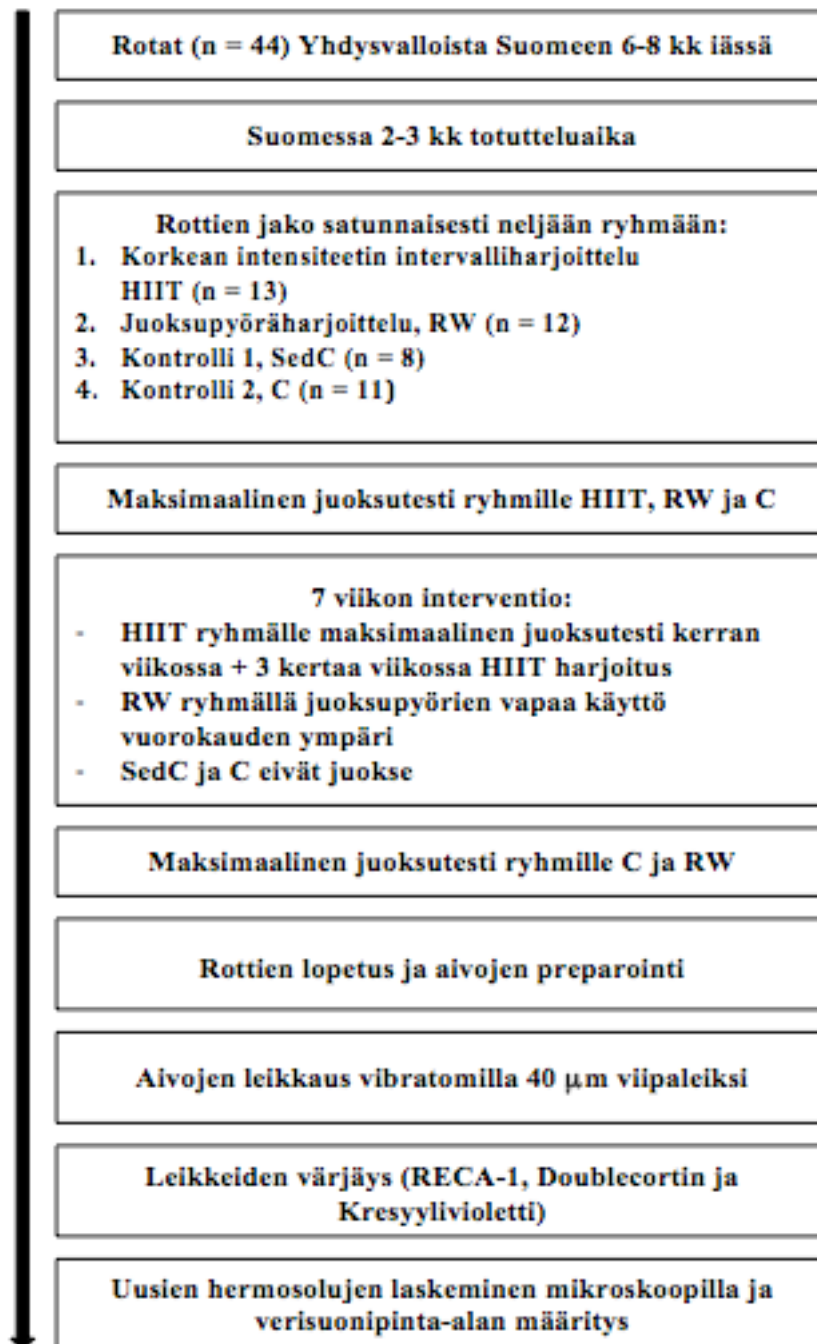
Vaskularisaatiota arvioitiin laskemalla verisuonten mielivaltaisia yksiköitä (arbitrary units) hippokampuksen pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta. Tässä tutkimuksessa mielivaltaisilla yksiköillä tarkoitetaan verisuonialueita pykäläpoimun neurogeenisellä alueella suhteessa pykäläpoimun alueelta otettujen kuvien pinta-aloihin. Vaskularisaatiota arvioitiin vain dorsaalista hippokampuksesta, koska aikaresurssien vuoksi ei ollut mahdollista analysoida koko pykäläpoimun aluetta ja dorsaalinen hippokampus erosi uusien hermosolujen määrässä enemmän, kuin ventraalinen osa (yksisuuntainen varianssianalyysi). Vaskularisaation arvioimiseksi aivoleikkeistä otettiin kuvia pykäläpoimun dorsaalista osasta eli neljästä viimeisestä leikkeestä. Kuvista laskettiin ImageJ-ohjelmaa käyttäen verisuonien mielivaltaiset yksiköt pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta eli alueelta, jossa uusien solujen muodostumista tapahtuu. Tutkimuksen kulku on kokonaisuudessaan esitetty kuviossa 1.

6.5 Tilastolliset menetelmät

Juoksuharjoittelun tulosta määrittäessä ryhmien normaalijakautuneisuutta testattiin Kolmogorov-Smirnov -testillä. Koska kaikki ryhmät eivät olleet normaalisti jakautuneita, käytettiin Wilcoxonin testiä määrittämään eroa maksimaalisessa juoksusuorituksessa ennen ja jälkeen intervention.

Neurogeneesin ja vaskularisaation määrittämisessä ryhmien normaalijakautuneisuutta testattiin Kolmogorov-Smirnov -testillä, jonka jälkeen varianssien yhtäsuuruus testattiin Levenen testillä. Koska ryhmät olivat normaalisti jakautuneita ja varianssit olivat yhtä suuria, käytettiin tilastollisena menetelmänä yksisuuntaista varianssianalyysiä. Parivertailuissa käytettiin LSD -testiä.

Intervention jälkeen tehdyn juoksutestin sekä juoksutestituloksen muutoksen (juoksutulos intervention jälkeen – juoksutulos interventiota ennen) yhteyksiä neurogeneesiin ja verisuonipinta-alaan tutkittiin Pearsonin korrelaatiokertoimen testauksella. Myös neurogeneesin ja vaskularisaation yhteyttä toisiinsa testattiin tällä menetelmällä.

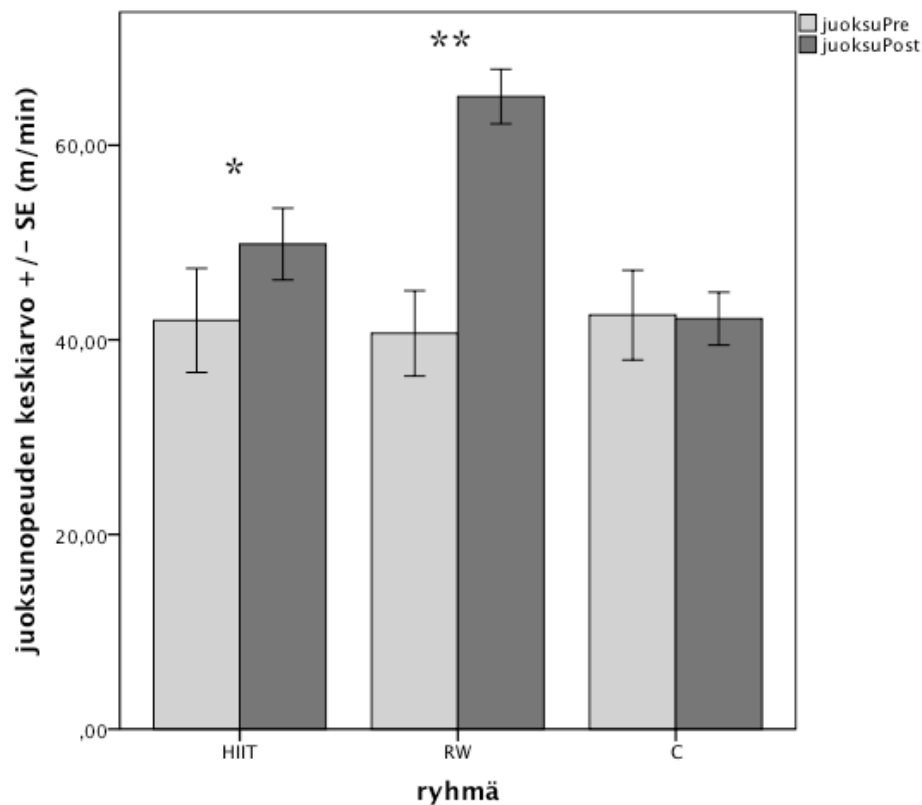


KUVIO 1. Tutkimuksen kulku alusta loppuun. Nuoli osoittaa kulkusuunnan.

7 TULOKSET

7.1 Juoksuharjoittelun tulos

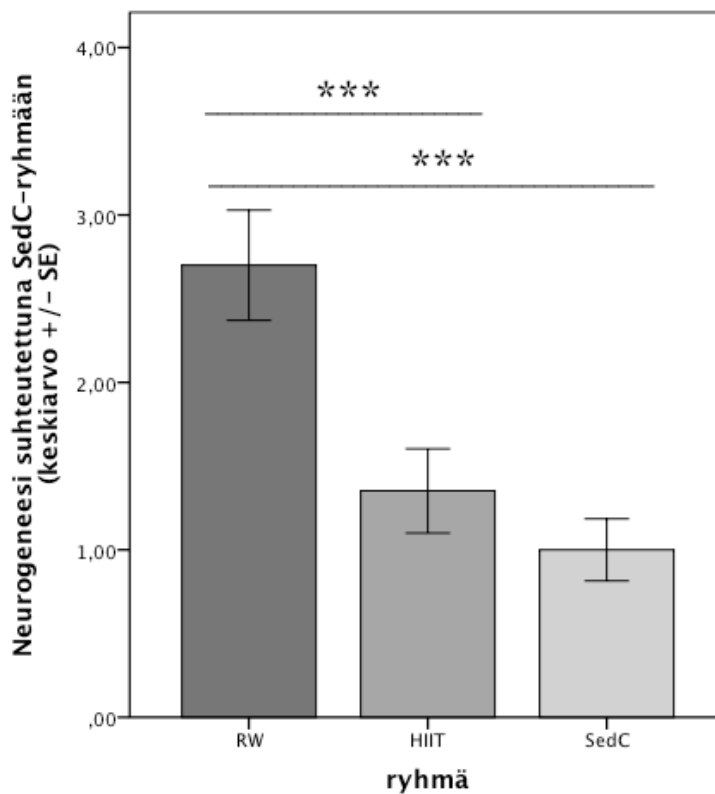
Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu paransi rottien suoriutumista maksimaalisessa juoksu-
testissä 60 % (Wilcoxonin testi, $p = .002$) ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelu
paransi suoriutumista 25 % (Wilcoxonin testi, $p = .04$). Kontrolliryhmällä juoksu-suori-
tus ei muuttunut intervention aikana (Wilcoxonin testi, $p = .65$). Juoksuharjoittelun tu-
loksia on esitetty kuviossa 2.



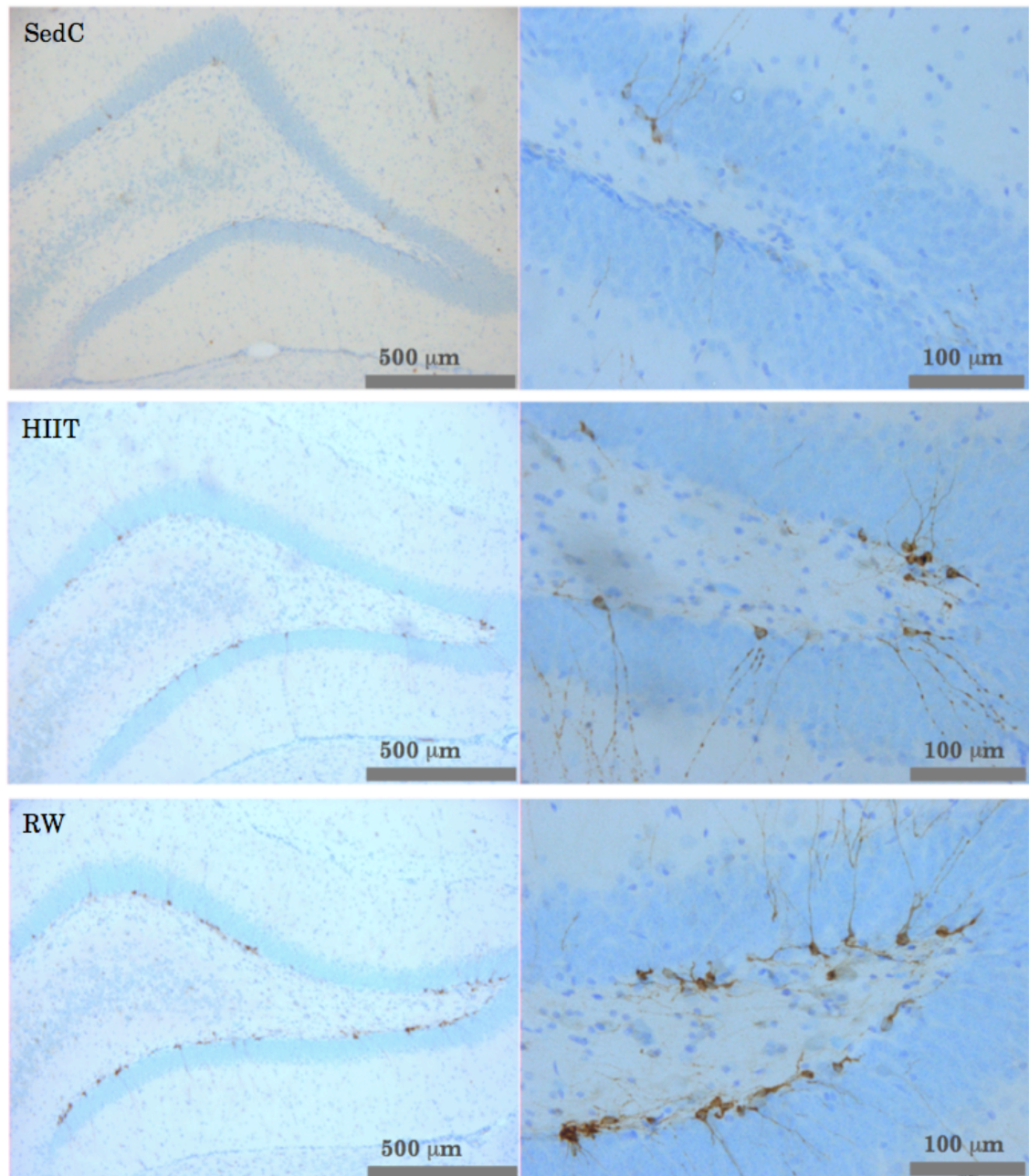
KUVIO 2. Juoksuharjoittelun tulos mitattuna maksimaalisena juoksunopeutena. Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu paransi suoriutumista maksimaalisessa juoksu-
testissä 60 % ja HIIT 25 %. Kontrolliryhmällä ei tapahtunut muutosta juoksuharjoittelussa ennen ja jälkeen intervention
tehdyissä mittauksissa. (* $p < .05$ ** $p < .001$)

7.2 Neurogeneesi

Neurogeneesissä huomattiin eroja ryhmien välillä (yksisuuntainen varianssianalyysi: $F(2, 24) = 40.7, p < .001$). Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisäsi neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa 2,7 -kertaisesti SedC -ryhmään nähden (parivertailuna LSD, $p < .001$) ja kaksinkertaisesti HIIT ryhmään nähden (parivertailuna LSD, $p < .001$). Neurogeneesissä nähtiin myös suuntaa antava, ei tilastollisesti merkitsevä tulos siitä, että HIIT harjoittelu lisää neurogeneesiä 35 % SedC ryhmään nähden (parivertailuna LSD, $p = .089$). Neurogeneesin tulokset on esitetty kuviossa 3. Tuloksia on havainnollistettu kuvassa 6.



KUVIO 3. Neurogeneesi hippokampuksen pykäläpoimussa suhteutettuna kontrolliryhmään (SedC = 1). RW -ryhmällä neurogeneesi oli 2,7-kertainen SedC -ryhmään nähden ja kaksinkertainen HIIT -ryhmään nähden. HIIT -ryhmällä neurogeneesi oli 35 % suurempaa, kuin SedC -ryhmällä, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = .089$). (***) $p < .001$)

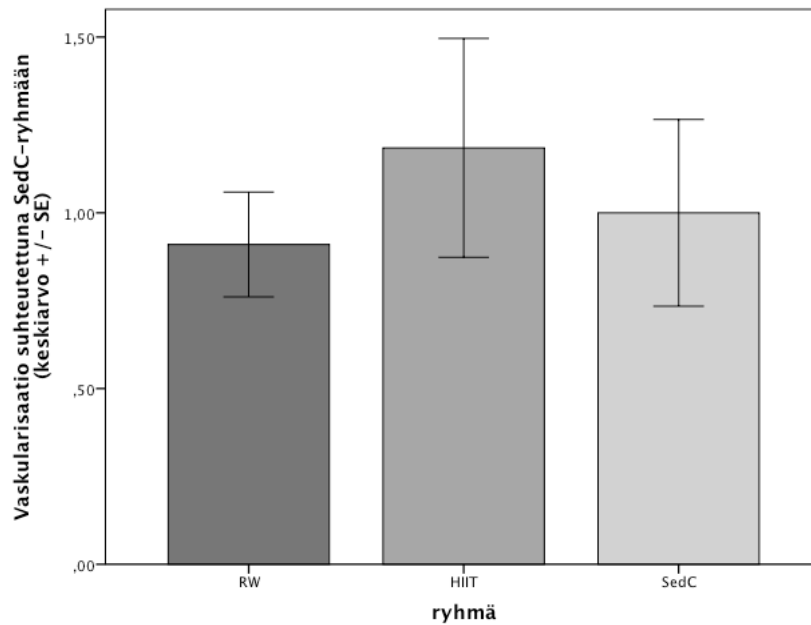


KUVA 6. Neurogeneesi hippokampuksen pykäläpoimussa eri ryhmillä. Uudet hermosolut näkyvät kuvissa ruskealla. Hippokampuksen pykäläpoimun rakenne sinisellä.

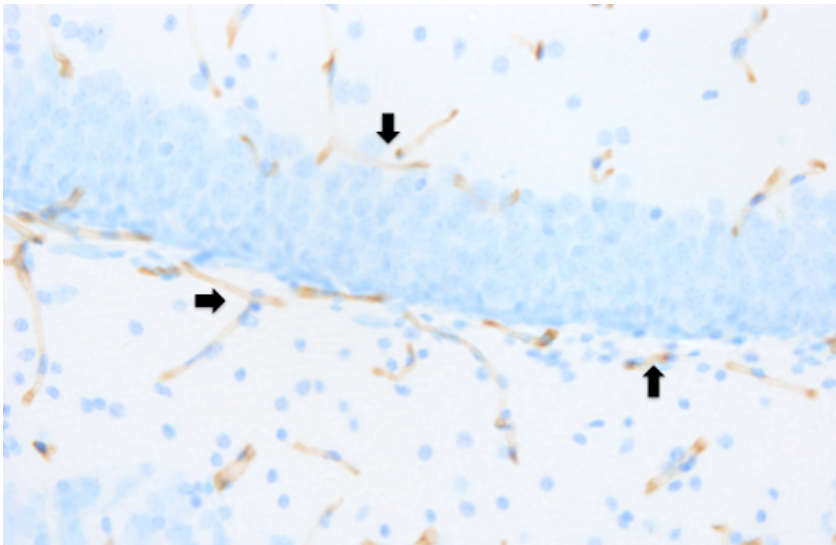
7.3 Vaskularisaatio

Verisuonten mielivaltaisten yksiköiden määrä hippokampuksen pykäläpoimun dorsaaliosassa ei eronnut eri ryhmien kesken (Yksisuuntainen varianssianalyysi: $F(2, 30) = 1.33$, $p = .28$), vaan kaikilla ryhmillä verisuonten mielivaltaisten yksiköiden määrä oli keskimäärin 0,2:n luokkaa. Hajonta oli kuitenkin erittäin suurta eri rotilla vaihdellen

0,06-0,48 välillä. Vaskularisaation tulokset on esitetty kuviossa 4 ja kuva vaskularisaatiosta hippokampuksen pykäläpöimussa on esitetty kuvassa 7.



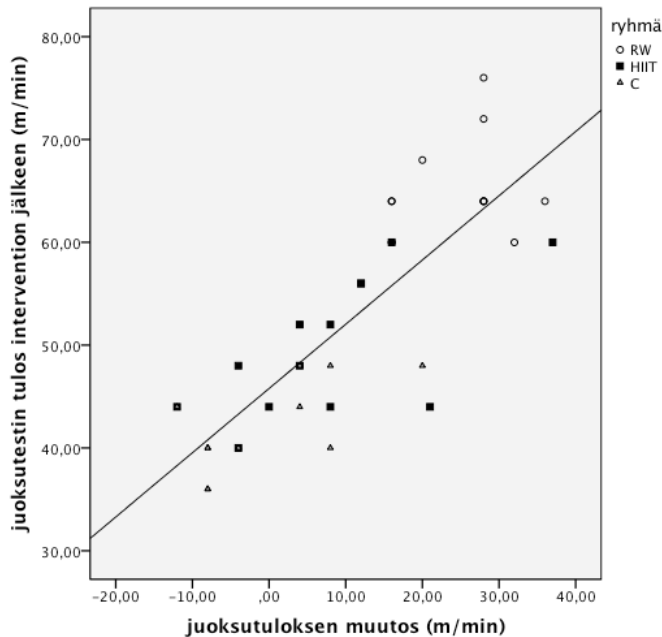
KUVIO 4. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja hippokampuksen pykäläpöimun dorsaalisen osan vaskularisaatiossa verisuonten mielivaltaisilla yksiköillä määriteltynä.



KUVA 7. Vaslarisaatio hippokampuksen pykäläpöimussa (mikroskooppikuva 40 -kertaisella suurennoksella). Pykäläpöimun rakenne näkyy sinisenä ja verisuonisto ruskealla (nuolet).

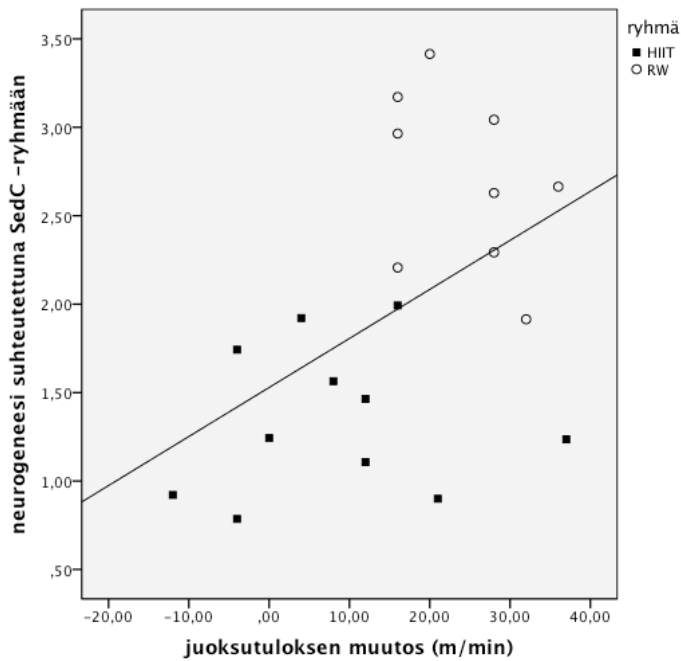
7.4 Korrelaatioiden tarkastelu

Juoksutuloksen muutos korreloi positiivisesti intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = .82$, $p < .001$, $n = 36$). Mitä suuremman muutoksen rotta oli saanut aikaan juoksukehityksessään, sitä parempi tulos juoksutestissä rotalla oli intervention jälkeen. Tulos on esitetty kuviossa 5.

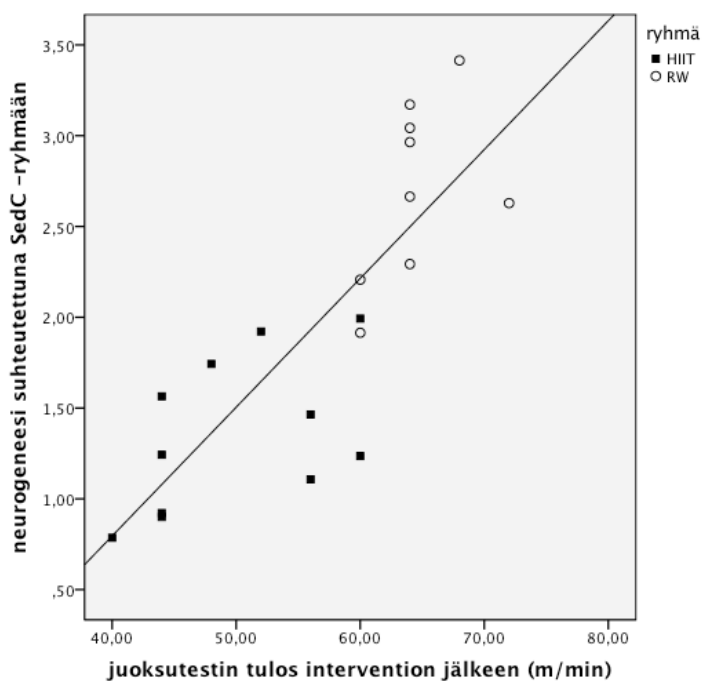


KUVIO 5. Juoksutuloksen muutos korreloi positiivisesti intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa ($r = .82$, $p < .001$).

Pykäläpoimun neurogeneesi korreloi positiivisesti juoksutuloksen muutoksen kanssa, kun HIIT- ja RW -ryhmiä tarkasteltiin yhdessä (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = .47$, $p = .036$, $n = 20$). Lisäksi pykäläpoimun neurogeneesi korreloi voimakkaan positiivisesti intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = .82$, $p < .001$, $n = 20$), kun HIIT- ja RW -ryhmiä tarkasteltiin yhdessä. Erikseen tarkasteltuna korrelaatioissa ei saatu aikaan tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä. Korrelaatiot on esitetty kuvioissa 6 ja 7.

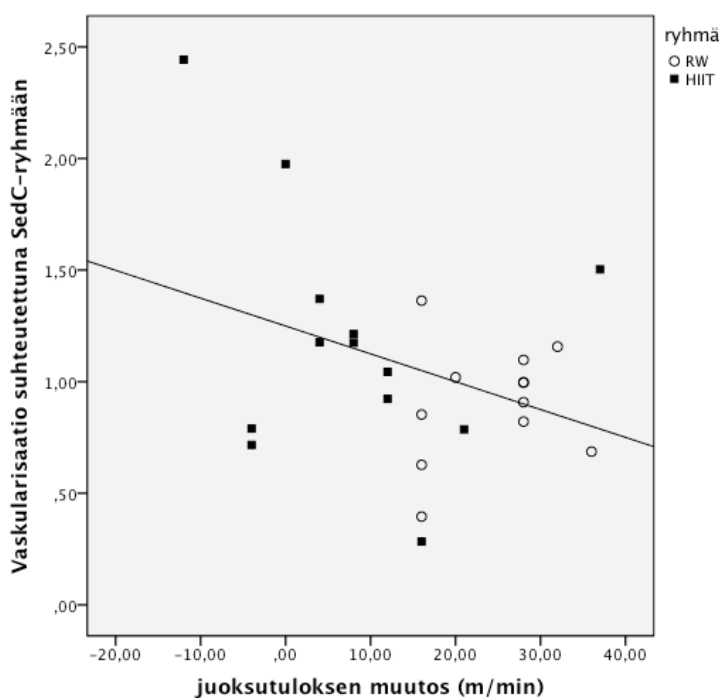


KUVIO 6. Pykäläpoimun neurogeneesi korreloi positiivisesti ($r = .47$) juoksutuloksen (maksimaalinen juoksunopeus, m/min) muutoksen kanssa ($p = .036$, $n = 20$). SedC-ryhmän neurogeneesi = 1.

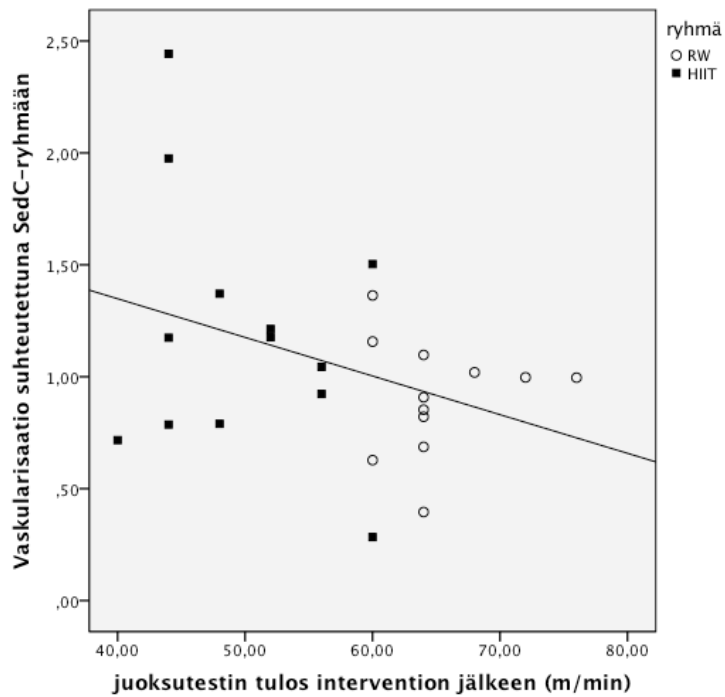


KUVIO 7. Pykäläpoimun neurogeneesi korreloi voimakkaan positiivisesti ($r = .82$) intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa ($p < .001$, $n = 20$). SedC-ryhmän neurogeneesi = 1.

Pykäläpoimun vaskularisaatio ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi juoksutuloksen muutoksen kanssa, kun HIIT ja RW –ryhmiä tarkasteltiin yhdessä (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = - .36$, $p = .077$, $n = 25$). Negatiivinen suuntaa antava korrelaatio kuitenkin saatiin aikaiseksi muuttujien välille, sillä p :n arvo oli pienempi kuin $.10$. Myöskään pykäläpoimun vaskularisaatio ei korreloinut tilastollisesti merkitsevästi intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = - .37$, $p = .073$, $n = 25$), kun HIIT ja RW –ryhmiä tarkasteltiin yhdessä. Täsäkin nähtiin kuitenkin samanlainen suuntaa antava negatiivinen yhteys p :n arvon ollessa pienempi kuin $.10$. Ryhmiä erikseen tarkasteltuna korrelaatioissa ei saatu aikaan tilastollisesti merkitseviä yhteyksiä. Vaskularisaation ja juoksumuuttujien välisten korrelaatioiden tulokset on esitetty kuvioissa 8 ja 9. Neurogeneesin ja vaskularisaation välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = - .26$, $p = .19$, $n = 27$).



KUVIO 8. Juoksutuloksen muutoksen ja hippokampuksen pykäläpoimun vaskularisaation välillä havaittiin negatiivinen suuntaa antava yhteys ($r = - .36$, $p = .077$). SedC-ryhmän vaskularisaatio = 1.



KUVIO 9. Intervention jälkeen tehdyn juokсутестin tuloksen ja hippokampuksen pykäläpöimun vaskularisaation välillä havaittiin negatiivinen suuntaa antava yhteys ($r = - .37$; $p = .073$). SedC-ryhmän vaskularisaatio = 1.

8 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, kuinka aerobinen juoksuharjoittelu ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelu vaikuttavat hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiin ja vaskularisaatioon rotilla. Hypoteesina oli, että aerobinen juoksuharjoittelu sekä HIIT lisäävät neurogeneesiä ja vaskularisaatiota pykäläpoimussa. Aerobisen juoksuharjoittelun todettiin hypoteesin mukaisesti kasvattavan neurogeneesiä tehokkaasti seitsemän viikon intervention jälkeen. Hypoteesista poiketen HIIT-harjoittelulla ei onnistuttu kasvattamaan neurogeneesiä. Lisäksi huomattiin, ettei aerobinen juoksuharjoittelu tai HIIT saanut aikaan vasteita pykäläpoimun vaskularisaatiossa verrattuna SedC-ryhmään, vaikka hypoteesissa näin oletettiin.

8.1 Neurogeneesi

Tässä tutkimuksessa aerobinen juoksuharjoittelu lisäsi neurogeneesiä noin 10 kuukauden ikäisillä rotilla lähes kolminkertaisesti verrattuna SedC -ryhmään ja kaksinkertaisesti verrattuna HIIT:uun. Aiemmissa tutkimuksissa, joissa oli tutkittu juoksun vaikutuksia hippokampukseen, ei oltu tutkittu 10 kuukauden ikäisiä jyrsojia, vaan eläimet ovat olleet joko selvästi vanhempia tai selvästi nuorempia. Lukuun ottamatta hyvin iäkkäitä eläimiä, aiemmat tutkimukset ovat päätyneet tulokseen, että aerobinen juoksuharjoittelu lisää jyrsojien neurogeneesiä pykäläpoimussa (van Praag ym. 1999b, van Praag ym. 2005, Clark ym. 2008, Creer ym. 2010). Täten tämä tutkimus tukee aiempien tutkimusten löydöksiä aerobisen harjoittelun ja hippokampuksen neurogeneesin yhteyksiin liittyen.

HIIT:lla ei saatu aikaan tilastollisesti merkitsevää muutosta neurogeneesiin verrattuna SedC -ryhmään. Suuntaa-antava tulos neurogeneesin lisääntymisestä kontrolliin verrattuna kuitenkin havaittiin. Tässä tutkimuksessa HIIT -ryhmässä oli 13 rottaa, joista 11:sta rotan neurogeneesi pystyttiin määrittämään. SedC -ryhmässä oli kahdeksan rottaa, joista seitsemältä määritettiin neurogeneesi. Ryhmäkoot olivat siis melko pienet. Jos aineisto olisi ollut suurempi, on mahdollista, että HIIT olisi eronnut tilastollisesti

merkitsevästi SedC -ryhmästä. HIIT -ryhmän neurogeneesin tulosta voivat selittää myös monet muut tekijät, joita arvioidaan seuraavaksi.

HIIT -ohjelma oli selvästi tehottomampi lisäämään maksimaalista juoksukapasiteettia verrattuna aerobiseen juoksuharjoitteluun. HIIT lisäsi juoksukapasiteettia vain 25 %, kun aerobisessa harjoittelussa juoksukyvyt olivat kasvaneet samassa ajassa 60 %. Näin ollen myös juoksun vaikutukset aivoihin ovat saattaneet jäädä alhaisemmiksi. Tätä teoriaa tukee myös tämän tutkimuksen tulos siitä, että neurogeneesi korreloi positiivisesti juoksukapasiteetin kanssa sekä juoksukapasiteetin muutosten kanssa. Koska juoksukapasiteetti jäi alhaisemmaksi HIIT -ryhmän rotilla verrattuna RW -ryhmän rottiin, myös neurogeneesin määrä jäi alhaisemmaksi.

Voi olla, että HIIT oli aerobista juoksuharjoittelua tehottomampi juoksukapasiteetin parantamiseen, koska tässä tutkimuksessa ei kontrolloitu ajallisesti harjoittelumääriä HIIT ja RW ryhmien välillä. HIIT -rottien harjoittelu oli kontrolloitu viikoittain maksimitestiin ja kolmeen eri harjoitukseen, joiden kesto oli 20 minuuttia. RW ryhmällä taas oli vapaa pääsy juoksupyörilleen vuorokauden ympäri ja näin ollen RW -rotat kuluttivat harjoitteluun selvästi enemmän aikaa kuin HIIT -rotat. Lisäksi RW -rotat liikkuvat juoksupyörissään päivittäin, kun taas HIIT -ryhmä sai liikuntaa vain neljästi viikossa.

Toinen syy HIIT:n tehottomuuteen voi olla, että HIIT -rottien harjoitteluohjelmaa ei pystytty laatimaan tarpeeksi rankaksi. HIIT -rottien maksimaalinen juoksukapasiteetti määriteltiin viikoittain, minkä perusteella laskettiin HIIT -harjoituksen tasot (50–60 % maksimikapasiteetista ja 85–90 % maksimikapasiteetista), joilla rotat juoksivat harjoituksensa. Vaikka rotat yleisesti pitävät juoksemisesta, niin ne eivät nauttineet maksimaalisesta juoksutuksesta. Näin ollen rotat ovat voineet lopettaa maksimitestin kesken ennen oikeaa maksimaalista tasoaan ja sitä kautta myös HIIT -ohjelman tasot ovat saattaneet jäädä alhaisemmiksi, kuin oli tarkoitus. Jos näin on käynyt, HIIT -harjoitus on saattanut jäädä kokonaan aerobiselle tasolle ja täten tehottomammaksi suorituskyvyn parantamiseen.

Lisäksi täytyy huomioida, että HIIT -ohjelmista on olemassa monia eri versioita, joissa kovatehoinen intervallijakso voi vaihdella 15 sekunnista muutamiin minuutteihin ja aktiivinen palautus samalla tavalla. HIIT -ohjelman rakenne vaikuttaa myös hapenotto-

kyvyn kehittymiseen (Bacon ym. 2013), joten ohjelman rakenteella voidaan ehkä vaikuttaa myös neurogeneesin ilmenemiseen. Toisaalta Helgerud:n ym. (2007) tutkimuksessa ei nähty fyysisen kunnon kehittämisessä eroja 15/15 (anaerobinen juoksu/aktiivinen palautus) sekunnin HIIT -ohjelman ja 4/3 minuutin HIIT -ohjelman välillä, vaan molemmat olivat yhtä tehokkaita. Tässä tutkimuksessa HIIT -rotat juoksivat anaerobisella tasolla kolme minuuttia ja kaksi minuuttia aerobisella tasolla. Vaikka HIIT -ohjelmien kirjo on suuri, Bacon ym. totesivat katsausartikkelissaan 37 artikkelin pohjalta, että 3-5 minuutin intervalli voisi olla paras tapa lisätä harjoittelukapasiteettia. Katsaus oli kuitenkin tehty ihmistutkimusten pohjalta. Evolutionaalisesti ihminen on kehittynyt juoksemaan pitkiä matkoja kestävyystasolla jahdatessaan saalista. Jyrsijät, kuten rotta, ovat taas tottuneet juoksemaan pyrhähdysmäisesti saalistajaa pakoon. (Richter ym. 2014.) Voi siis olla, että tehokkain tapa HIIT -ohjelman toteutukseen ja sen hyötyjen esiin saantiin ei ole samanlainen rotilla ja ihmisillä. HIIT -ohjelmien kirjon vaihtelua olisi hyödyllistä jatkossa tutkia myös neurogeneesiin liittyvissä tutkimuksissa eläimillä. Lisäksi olisi kiinnostavaa teettää samoilla HIIT -ohjelmilla eläintutkimusten lisäksi ihmistutkimus, jossa tutkittaisiin erilaisten HIIT -ohjelmien vaikutuksia neurogeneesiin epäsuorasti esimerkiksi MRI:llä ja hippokampusvälitteisellä oppimisella.

HIIT -ohjelman muodon lisäksi syy HIIT:n tehottomuuteen neurogeneesin lisääjänä voi löytyä stressistä, sillä HIIT -harjoitukset ja viikoittainen maksimijuoksupuotesti ovat saattaneet olla myös stressiä kasvattavia tekijöitä rotille. Aiemmissä tutkimuksissa on huomattu, että stressi vähentää neurogeneesiä hippokampusessa (mm. Malberg & Duman 2003 ja Dagey ym. 2009). Tässä tutkimuksessa HIIT -rottien stressitasoa on saattanut nostaa se, että HIIT -ohjelma ei ollut rotille vapaaehtoinen vaan rotat pakotettiin juoksemaan tiettyä harjoitusohjelmaa. Lisäksi, jos rotat eivät juosseet harjoituksen aikana, niin ne saivat laimeita sähköshokkeja juoksumotivaation kasvattamiseksi. Aiemmissä tutkimuksissa on todettu, että sekä akuutit että krooniset sähköshokit lisäävät stressitasoa ja ehkäisevät neurogeneesiä hippokampusessa (Malberg & Duman 2003 ja Dagey ym. 2009). Juoksupuotesti tehtiin myös päiväsaikaan, mikä saattaa lisätä stressiä rotilla, jotka ovat yöeläimiä ja tottuneet nukkumaan päivisin ja olemaan aktiivisia öisin. Jos HIIT -rotat olivat tutkimuksen aikana stressaantuneita, voi juoksupuotestuksen saama positiivinen vaikutus neurogeneesiin jäädä osin saavuttamatta stressin aiheuttaman neurogeneesin laskun myötä.

Yhteenvetona tämän tutkimuksen perusteella voidaan sanoa, että noin 10 kuukauden ikäisten rottien pykäläpoimun neurogeneesiin pystytään vaikuttamaan paljon tehokkaammin vapaaehtoisella juoksuharjoittelulla, kuin korkean intensiteetin intervalliharjoittelulla. Aerobinen juoksuharjoittelu kasvatti neurogeneesin kaksinkertaiseksi HIIT:uun verrattuna. Jatkotutkimuksissa kannattaa kuitenkin kontrolloida juoksumäärä ja juoksuaika eri ryhmien välillä. Lisäksi on myös syytä huomioida eri ikäryhmät ja harjoittelumuotojen kirjo. Edelleenkin anaerobisesta harjoittelusta ei ole juuri tietoa hippokampuksen toimintaan liittyen ja HIIT:sta on useita eri variaatioita, joiden tehokkuus voi vaihdella paljon. HIIT:n ja muiden pakotettujen juoksuharjoitusten osalta olisi myös tärkeää kartoittaa stressin määrää.

Pelkän juoksuharjoittelun ohella olisi tärkeää myös tutkia erilaisten liikuntamuotojen vaikuttavuutta hippokampuksen neurogeneesiin ja vaskularisaatioon, koska sovellettaessa tutkimustuloksia ihmisiin olisi hyvä, että ihmisillä olisi mahdollisuuksia valita harjoittelumuodoista itselleen mieluisin. Toisaalta olisi myös hyvä tietää, jos joku urheilumuoto lisää neurogeneesiä juoksuharjoittelua enemmän. Aiemmissä tutkimuksissa, jotka ovat tutkineet neurogeneesiä, aerobista juoksuharjoittelua on muun muassa verrattu uintiin (van Praag ym. 1999b) ja vastuksen kanssa tehtyyn juoksuun, jossa vastus oli 30 % rotan painosta (Chul Lee ym. 2013). Van Praag ym. (1999b) osoittivat, että uinti ei lisää neurogeneesiä kontrolliryhmään nähden ja neurogeneesi jää alemmalle tasolle verrattuna juoksuun. Vastusta vastaan tehdyn juoksuharjoittelun on taas todettu lisäävän neurogeneesiä saman verran kuin tavallisen juoksuharjoittelun jopa silloin, kun vastuksen kanssa tehty juoksumatka on ollut vain puolet ilman vastusta tehdystä juoksusta (Chul Lee ym. 2013).

8.2 Vaskularisaatio

Tässä tutkimuksessa aerobisella juoksuharjoittelulla tai HIIT:illa ei pystytty vaikuttamaan vaskularisaation määrään hippokampuksen pykäläpoimun dorsaaliosassa. Tulos oli odotusten vastainen. Aiemmissä tutkimuksissa verisuonipinta-ala on ollut kontrolliryhmää suurempi juoksuharjoittelun seurauksena nuorilla (3 kk) jyrksijöillä, mutta vanhoilla (19-22 kk) verisuonten pinta-alaan ei ole saatu eroja juoksuharjoittelulla

(van Praag ym. 2005 ja Creer ym. 2010). Van Praag ym. (2005) arvioivat, että verisuonten muovautuvuuden puute vanhoilla hiirillä voi johtua alentuneista verisuonten kasvutekijätasoista. Tässä tutkimuksessa hypoteesina oli, että iäkkyyden vaikutus ei näkyisi vielä noin 10 kuukautisilla rotilla. Tutkimus kuitenkin antaa osviittaa siitä, että verisuonten muovautuvuus heikkenee jo keski-ikäisillä jyrsijöillä.

Tässä tutkimuksessa verisuonipinta-ala määritettiin RECA-1 -värjäyksellä ja mikroskooppikuvia käsiteltiin Image-J -ohjelmalla. Voi olla, että RECA-1 ei ollut tarpeeksi tarkka määrittämään verisuonipinta-alaa. Myös Image-J -ohjelman käytössä muodostui hankaluudeksi määrittää tietyt yhteiset kynnsarvot mikroskooppikuvien taustavärien poistoon. Kuvat olivat taustaltaan hyvin eri sävyisiä, joten samoilla kynnsarvoilla eri kuvista määrittyi hieman erikokoisia alueita lopullisiksi verisuonten mielivaltaisiksi yksiköiksi. Lisäksi neurogeenisen alueen pinta-ala koko kuvan pinta-alasta vaihteli jonkin verran. Edellä mainituista syistä määritetyt verisuonten mielivaltaiset yksiköt eivät ehkä anna täysin oikeaa kuvaa vaskularisaation määrästä. Tutkimuksessa vaskularisaation hajonta oli joka tapauksessa niin suurta (vaihteluväli 0,06 – 0,48 %), ettei merkitseviä eroja luultavasti olisi saatu aikaan, vaikka kuvien käsittelyssä ei olisi ollut ongelmia. Hajonnan suuruus vaikuttaa osaltaan myös itsenäisesti siihen, miksi eroja ryhmien välillä ei saatu aikaan.

Tutkimuksessa tutkittiin vain dorsaalisen hippokampuksen pykäläpoimun vaskularisaatiota. Tähän päädyttiin ajan säästämiseksi ja siksi, koska dorsaaliosassa hippokampuksessa nähdyt erot pykäläpoimun neurogeneesissä ryhmien välillä olivat suurempia kuin ventraalisessa hippokampuksessa. Voi kuitenkin olla, että tulos muuttuisi, jos vaskularisaatio määritettäisiin koko pykäläpoimun alueelta. Aiemmissä tutkimuksissa jakoa ventraaliseen ja dorsaaliseen hippokampukseen ei ole tehty, vaan verisuonipinta-ala on määritetty koko pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta (van Praag ym. 2005, Clark ym. 2009 ja Creer ym. 2010).

Vaikka vaskularisaatioon ei saatu eroja kummallakaan juoksuharjoittelu-muodolla, voi olla, että juoksuharjoittelu on vaikuttanut verisuonistoon ja verenkiertoon jollakin muulla tavalla. Esimerkiksi, tässä tutkimuksessa ei tutkittu verisuonten läpimittaa, haaroittumista eikä mutkittelevuutta, vaikka näitä menetelmiä voitaisiin käyttää verisuonten rakenteen määrittämiseen (Tata & Andersson, 2001). Lisäksi juoksuharjoittelun on todet-

tu lisäävän aivoverenkierron tilavuutta pykäläpoimussa MRI -kuvantamisella mitattuna (Pereira ym. 2006). Tässäkin tutkimuksessa juoksuharjoittelulla olisi saatettu saada aikaan muutoksia verisuonten rakenteessa ja toiminnassa, jos mittaustapa olisi ollut erilainen. Jatkossa kannattaakin tutkia juoksuharjoittelumuotojen vaikutuksia eri verisuoniston rakenteellisiin ja toiminnallisiin mittareihin pelkkien verisuonten mielivaltaisten yksiköiden sijasta. Lisäksi verisuonten mielivaltaisten yksiköiden sijaan kannattaisi tutkia suoria verisuonten prosenttiosuuksia hippokampuksen pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta.

8.3 Korrelaatioiden tarkastelu

Tutkimuksessa huomattiin, että juoksukapasiteetti ja juoksussa kehittyminen korreloivat positiivisesti neurogeneesin kanssa. Mitä parempi juoksukapasiteetti tai mitä suurempi muutos juoksukapasiteetissa aiempaan testiin nähden oli, sitä suurempaa oli myös neurogeneesi hippokampuksen pykäläpoimussa. Intervention jälkeinen juoksukapasiteetti kuvasi yhteyttä vahvemmin kuin juoksussa kehittyminen. Toisaalta huomattiin myös, että juoksussa kehittyminen ja intervention jälkeinen juoksukapasiteetti korreloivat voimakkaan positiivisesti keskenään. Eli mitä enemmän rotta kehittyi juoksussa, sitä suurempi juoksukapasiteetti rotalla oli intervention jälkeen. Tulokset olivat odotusten mukaisia. Aiemmissä tutkimuksissa juoksun määrän on todettu olevan yhteydessä neurogeneesiin (Rhodes ym. 2003) ja fyysisen suorituskyvyn hippokampuksen kokoon (Chaddock ym. 2010 ja Erikson ym. 2011).

Tämä tutkimus tukee ajatusta siitä, että juoksemalla hankittu hyvä fyysinen suorituskyky ja fyysisen suorituskyvyn kehittäminen juoksemalla edistävät hippokampuksen toimintaa uusien hermosolujen muodostumisen kautta. Koska tämä tutkimus tehtiin juoksuharjoittelulla, on epäselvää, voiko muun lainen aerobista suorituskykyä lisäävä harjoittelu lisätä neurogeneesiä. Korrelaatiotutkimus ei tutki syy-seuraus yhteyttä, joten ei voida varmasti sanoa, että mikä vain suorituskapasiteettia lisäävä harjoittelu lisää neurogeneesiä. Jatkossa olisi mielenkiintoista tutkia myös muiden aerobista suorituskykyä lisäävien harjoittelumuotojen yhteyttä neurogeneesiin.

Vaskularisaation ja juoksukapasiteetin välillä huomattiin suuntaa antavia tuloksia siitä, että juoksukapasiteetin kasvaessa vaskularisaatio vähenee. Samanlainen suuntaa antava tulos saatiin myös vaskularisaation ja juoksukapasiteetin muutoksen välillä. Eli mitä paremmin rotta oli kehittynyt juoksussa, sitä pienempää vaskularisaatio oli. Nämä tulokset ovat odotusten vastaisia. Todennäköisesti ongelmat vaskularisaation määrittämisessä osaltaan vaikuttavat siihen, että myös näissä korrelaatioissa nähtiin odotusten vastaisia tuloksia. Voi kuitenkin olla, että juoksukapasiteetti tai sen muutokset eivät vaikuta ainakaan positiivisesti vaskularisaatioon, vaikka alustavasti näin oletettiin. Todennäköisesti juoksukapasiteetti ja sen muutokset ovat yhteydessä johonkin muuhun verisuoniston rakenteelliseen tai toiminnalliseen mittariin, kuin verisuonten mielivaltaisten yksiköiden määrään. Esimerkiksi yhteyksiä voisi löytyä verisuonten läpimitaan tai verenvirtauksen määrään. Näitä voitaisiin selvittää jatkotutkimuksissa.

8.4 Johtopäätökset

Aiemmissä tutkimuksissa on osoitettu, että neurogeneesi lisääntyy aerobisen juoksuharjoittelun seurauksena nuorilla ja vanhoilla jyrksijöillä (Clark ym. 2008; Creer ym. 2010; van Praag ym. 1999b; van Praag ym. 2005). Tutkimustietoa keski-ikäisistä jyrksijöistä ei juurikaan ole ollut. Tämä tutkimus osoitti, että aerobinen juoksuharjoittelu lisää myös keski-ikäisten rottien neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpoimussa. Näin ollen juoksuharjoittelun voidaan sanoa lisäävän neurogeneesiä koko elämänkaaren ajan, lukuun ottamatta hyvin iäkkäitä yksilöitä.

Tutkimuksessa HIIT -rottien neurogeneesi jäi selvästi aerobisen juoksuharjoittelun aikaansaamasta neurogeneesin määrästä ja HIIT antoi vain suuntaa-antavan tuloksen mahdollisesta neurogeneesin kasvusta verrattuna SedC -ryhmään. Tulosta voi selittää muun muassa ryhmien pieni koko, HIIT -ohjelman tehottomuus, HIIT -ohjelman intervallijaksojen ja aktiivisen palautuksen kestot, harjoittelun määrän vähyys sekä mahdollinen stressireaktio harjoittelun aikana. Nämä tekijät kannattaa ottaa huomioon ja kontrolloida mahdollisimman tarkasti jatkotutkimuksissa.

Aerobinen juoksuharjoittelu ja HIIT olivat molemmat tehottomia lisäämään vaskularisaation määrää pykäläpoimussa. Voi olla, että keski-ikäisillä rotilla ei tapahdu enää muutoksia verisuonten pinta-alassa, vaan juoksuharjoittelumuodot vaikuttavat verisuoniston rakenteeseen ja toimintaan jollain muulla tavalla tai eivät ollenkaan. Eri juoksuharjoittelumuotojen vaikutuksia pykäläpoimun vaskularisaatioon kannattaa tutkia jatkossa nuoremmilla eläimillä sekä kattavammilla tutkimusmenetelmillä esimerkiksi tutkimalla suoraan verisuonien pinta-alaa ja haaroittumista sekä poikkileikkauksen pitoa.

LÄHTEET

Ahlskog, J. E., Geda, Y. E., Graff-Radford, N. R. & Petersen, R. C. 2011. Physical Exercise as a Preventive or Disease-Modifying Treatment of Dementia and Brain Aging Mayo Clinic Proceedings, 86, 876-884.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T. & O'Keefe, J. 2007. The Hippocampus Book. New York: Oxford university press.

Bacon, A. P., Carter, R. E., Ogle, E. A., Joyner, M. J. 2013. VO2max trainability and high intensity interval training in humans: a meta-analysis. Plos One. 16; 8(9) e73182.

Berchtold, N. C., Castello, N. & Cotman, C. W. 2010. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory Neuroscience.167, 588–597.

Berchtold, N. C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J. P. & Cotman, C. W. 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. Neuroscience 133, 853–861.

Chaddock, L., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Kim, J. S., Voss, M. W., Vanpatter, M., Pontifex, M. B., Raine, L. B., Konkel, A., Hillman, C. H., Cohen, N. J. & Kramer, A. F. 2010. A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in pre-adolescent children. Brain Res 1358, 172–183.

Clark, P. J., Brzezinska, W. J., Puchalski, E. K., Krone, D. A. & Rhodes, J. S. 2009. Functional Analysis of Neurovascular Adaptations to Exercise in the Dentate Gyrus of Young Adult Mice Associated With Cognitive Gain. Hippocampus, 19, 937–950.

Creer, D. J., Romberg, C., Saksida, L. M., van Praag, H. & Bussey, T.J. 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. Proc Natl Acad Sci USA 107, 2367–2372.

Dagyte ,G., Van der Zee, E. A., Postema, F., Luiten, P. G., Boer, J. A. Den, Trentani, A. & Meerlo P. 2009. Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience* 162, 904–913.

Duan, X., Kang, E., Liu, C.Y., Ming, G. & Song, H. 2008. Development of neural stem cell in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 18:108–115.

Eadie, B. D., Redila, V.A. & Christie, B.R. 2005. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol* 486, 39–47.

Erickson, K. I., Voss, M. W., Prakash, R. S., Basak, C., Szabo, A., Chaddock, L., Kim, J. S., Heo, S., Alves, H., White, S. M., Wojcicki, T. R., Mailey, E., Vieira, V. J., Martin, S. A., Pence, B. D., Woods, J. A., McAuley, E. & Kramer, A. F. 2011. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *PNAS*. 108, 3017-3022.

Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J. & Palmer, T. D. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* 18, 2803–2812.

Farmer, J., Zhao, X., van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H. & Christie, B. R. 2004. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neurosci* 124, 71–79.

Gómez-Pinilla, F., Dao, L. & So, V. 1997. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Res* 764, 1–8.

Helgerud, J., Høydal, K., Wang, E., Karlsen, T., Berg, P., Bjerkaas, M., Simonsen, T., Helgesen, C., Hjørth, N., Bach, R. & Hoff, J. 2007. Aerobic high-intensity intervals improve VO₂max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc*. 39, 665-71.

Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F.H. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.

- Kobilo, T., Liu, Q. R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y. & van Praag, H. 2011a. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem* 18, 605–609.
- Kolb, B. & Whishaw, I.Q. 2003. *Fundamentals of human neuropsychology*. New York: Freeman
- Lee, M. C., Inoue, K., Okamoto, M., Liu, Y. F., Matsui, T., Yook, J. S., Soya, H. 2013. Voluntary resistance running induces increased hippocampal neurogenesis in rats comparable to load-free running. *Neurosci Lett*. 14, 6-10.
- Leuner, B. & Gould, E. 2010. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu Rev Psychol*. 61, 111–C3.
- Lopez-Lopez, C., LeRoith, D. & Torres-Aleman, I. 2004. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9833–9838.
- Malberg, J. E., Duman, R. S. 2003. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28, 1562–1571.
- Marlatt, M. W., Potter, M.C., Lucassen, P.J. & van Praag, H. 2012. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female C57Bl/6 J mice. *Dev Neurobiol* doi: 72, 943-952.
- Neeper, S. A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J. & Cotman, C. W. 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res* 726, 49–56.
- Pajonk, F. G., Wobrock, T., Gruber, O., Scherk, H., Berner, D., Kaizl, I., Kierer, A., Müller, S., Oest, M., Meyer, T., Backens, M., Schneider-Axmann, T., Thornton, A. E., Honer, W. G. & Falkai, P. 2010. Hippocampal plasticity in response to exercise in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 133–143.

- Patt, S., Sampolo, S., Theallier-Janko, A., Tschairkin, I. & Cervos-Navarro, J. 1997. Cerebral Angiogenesis Triggered By Severe Chronic Hypoxia Displays Regional Differences. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 801-806.
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., Sloan, R., Gage, F. H., Brown, T.R. & Small, S. A. 2007. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 5638–5643.
- Rhodes, J. S., van Praag, H., Jeffrey, S., Girard, I., Mitchell, G. S., Garland, T Jr. & Gage F.H. 2003. Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. *Behavioral Neuroscience* 117, 1006–1016.
- Richter, S. H., Gass, P., Fuss, J. 2014. Resting Is Rusting: A Critical View on Rodent Wheel-Running Behavior. *Neurosci* 117, 1006–1016.
- Ruhrberg, C. & Bautch, V.L. 2013. Neurovascular development and links to disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70, 1675–1684.
- Tata, D.A. & Anderson, B.J. 2001. A new method for the investigation of capillary structure. *Journal of neuroscience methods*, 113, 199–206.
- Thomas, A. G., Dennis, A., Bandettini, P. A. & Johansen-Berg, H. 2012. The effects of aerobic activity on brain structure. *Front Psychol* 3, 86.
- Trejo, J. L., Llorens-Martin, M. V. & Torres-Aleman, I. 2008. The effects of exercise on spatial learning and anxiety- like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 37, 402–411.
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K. & Masuhara, M. 2006. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res*. 1104, 64-72

van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C. & Gage, F. H. 2005. Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice. *The Journal of Neuroscience*, 25, 8680-8685.

van Praag, H., Christie B. R., Sejnowski, T. J. & Gage, F. H. 1999a. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 13427–13431.

van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. 1999b. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266–270.

Vivar, C., Potter, M. C. & van Praag, H. 2012. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci*. 15, 189-210.

Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F. C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., Krueger, K., Fromme, A., Korsukewitz, C., Floel, A. & Knecht, S. 2007. High impact running improves learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 87, 597–609.

Wu, C. W., Chang, Y. T., Yu, L., Chen, H. I., Jen, C. J., Wu, S. Y., Lo, C. P & Kuo, Y. M. 2008. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol* 105, 1585–1594.