

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

Petra Johansson

Psykologian Pro Gradu -tutkielma

Psykologian laitos

Jyväskylän yliopisto

Toukokuu 2014

Työn ohjaajat: Miriam Nokia

ja Heikki Kainulainen

TIIVISTELMÄ

Petra Johansson (2014). Aerobisen juoksuharjoittelun ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelun vaikutukset hippokampuksen neurogeneesiin ja vaskularisaatioon rotilla. Psykologian laitos, Jyväskylän yliopisto, Pro gradu -tutkielma, 30 s.

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. Kuitenkin hippokampuksen neurogeneesiä ja vaskularisaatiota on tutkittu lähinnä vain aerobisella juoksuharjoittelulla. Tämän vuoksi tässä tutkimuksessa tutkittiin sekä aerobisen juoksuharjoittelun että korkean intensiteetin intervalliharjoittelun (HIIT) vaikutuksia neurogeneesiin. Tutkimuksessa oli 44 HRT -kannan rottia, jotka jaettiin neljään ryhmään. Ryhmät olivat juoksupyöräharjoitteluryhmä eli aerobinen juoksuharjoittelu (RW), HIIT ja kaksi eri kontrolliryhmää (C ja SedC). Ennen intervention alkua C-, RW- ja HIIT -ryhmiltä testattiin maksimaalinen juoksukapasiteetti juokсутestillä. Interventio kesti 7 viikkoa. Intervention ajan RW -rotilla oli vapaa pääsy juoksupyörille vuorokauden ympäri. HIIT -rotat harjoittelivat kolmesti viikossa korkean intensiteetin intervalliharjoittelua. HIIT -rotille määritettiin viikoittain maksimaalinen juoksukapasiteetti. Intervention jälkeen myös C- ja RW -rotilta määritettiin uudelleen maksimaalinen juoksukapasiteetti. SedC -ryhmän rotat eivät juosseet ollenkaan kokeen aikana. Intervention jälkeen rotat lopetettiin ja rottien aivot otettiin talteen. SedC-, HIIT- ja RW -ryhmien aivot viipaloitiin hippokampuksen alueelta. Viipaleista analysoitiin neurogeneesiä Doublecortin -värjäyksellä ja vaskularisaatiota RECA-1 -värjäyksellä. Aerobisen juoksuharjoittelun todettiin lisäävän neurogeneesiä selvästi verrattuna SedC- ja HIIT -ryhmiin, ero oli erittäin merkitsevä. Tutkimus antoi myös viitteitä siitä, että HIIT voi lisätä neurogeneesiä kontrolliin verrattuna. Vaskularisaatioissa ei saatu näkyviin eroja ryhmien välillä. Lisäksi paremman fyysisen suorituskyvyn ja juoksussa kehittymisen todettiin olevan positiivisesti yhteydessä neurogeneesin kasvuun. Johtopäätöksenä voidaan todeta hippokampuksen neurogeneesin kasvavan huomattavasti aerobisen harjoittelun seurauksena. Tutkimuksen mukaan aerobisen harjoittelu HIIT:n verrattuna on paljon tehokkaampi harjoittelumuoto stimuloimaan neurogeneesiä. Vaikka juoksuharjoittelulla pystytään vaikuttamaan neurogeneesin määrään vielä keski-ikässä, niin vaskularisaatioon aerobisella harjoittelulla ja HIIT:lla ei ole enää vaikutusta keski-ikäisillä rotilla.

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

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ	1
SISÄLTÖ	2
1 JOHDANTO	3
2 MENETELMÄT	6
2.1 Koe-eläimet ja olosuhteet	6
2.2 Koeasetelma	7
2.3 Näytteistys.....	8
2.3.1 Verisuonien värjäys – RECA-1.	8
2.3.2 Uusien hermosolujen värjäys – Doublecortin	9
2.3.3 Hermosolujen värjäys – Kresyylivioletti	10
2.4 Aineiston analysointi	10
2.5 Tilastolliset menetelmät	11
3 TULOKSET	12
3.1 Juoksuharjoittelun tulos	12
3.2 Neurogeneesi.....	13
3.3 Vaskularisaatio.....	15
3.4 Korrelaatioiden tarkastelu	17
4 POHDINTA	20
4.1 Neurogeneesi.....	20
4.2 Vaskularisaatio.....	24
4.3 Korrelaatioiden tarkastelu.....	25
4.4 Johtopäätökset.....	26
LÄHTEET.....	27

1 JOHDANTO

Normaalin ikääntymisen ja hermoston rappeumasairauksien on todettu vaikuttavan aivoihin heikentämällä kognitiivista suoriutumista (Vivar, Potter, & van Praag, 2012). Kognitiivisen kyvykkyyden laskun takana voi olla vähentynyt neurogeneesi oppimisen ja muistin kannalta oleellisella aivoalueella, hippokampuksessa (van Praag, Shubert, Zhao, & Gage, 2005). Neurogeneesi tarkoittaa uusien hermosolujen muodostumista. Liikunta voi viivästyttää kognitiivisen kyvyn laskua ikääntyessä ja vähentää riskiä hermoston rappeumasairauksille (van Praag ym. 2005). Useissa eläintutkimuksissa on osoitettu juoksuharjoittelun lisäävän hippokampuksen pykäläpoimun (dentate gyrus) neurogeneesiä eri-ikäisillä eläimillä samaan aikaan kasvanneen oppimiskyvyn kanssa (Clark ym. 2008; van Praag, Christie, Sejnowski, & Gage, 1999a; van Praag ym. 2005). Näissä tutkimuksissa on todettu, että pykäläpoimun neurogeneesi todennäköisesti välittää liikunnan positiivisia vaikutuksia oppimiskykyyn. Myös ihmistutkimuksilla on päädytty tulokseen, että liikunta edistää oppimista ja muistitoimintoja (Chaddock ym. 2010; Erikson ym. 2011). Yksilön maksimaalisen suorituskyvyn tasoa kuvaavan VO_2max :n eli maksimaalisen hapenottokyvyn on todettu olevan positiivisesti yhteydessä hippokampuksen kokoon ja kognitiiviseen kyvykkyyteen niin nuorilla (Chaddock ym. 2010) kuin vanhemmilla henkilöillä (Erikson ym. 2011). Ihmisillä hippokampuksen koon on arvioitu olevan yhteydessä neurogeneesin lisääntymiseen hippokampuksessa (Erikson ym. 2011). Vanhuudessa hippokampuksen koko yleensä pienenee, mutta Erikson ym. (2011) osoittivat, että liikunta voi tästäkin huolimatta kasvattaa hippokampuksen kokoa.

Juoksun vaikutuksia neurogeneesiin on tutkittu vain aerobisella tasolla eli kohtalaisella rasituksella, noin 65-85 % VO_2max :stä, tehdyllä juoksuharjoittelulla (Clark ym. 2009; Rhodes ym. 2003; Uda, Ishido, Kami, & Masuhara, 2006; van Praag ym. 1999a; van Praag ym. 2005; Wu ym. 2008). Näissä tutkimuksissa aerobinen harjoitus on toteutettu joko vapaaehtoisena juoksuharjoitteluna juoksupyörissä (Clark ym. 2009; Rhodes ym. 2003; van Praag ym. 1999a; van Praag ym. 2005) tai juoksumatolla tehdyllä harjoituksella (Uda ym. 2006; Wu ym. 2008). Riippumatta aerobisen juoksuharjoittelun toteutusmuodosta, juoksun on todettu lisäävän jyrsijöiden neurogeneesiä iästä ja sukupuolesta riippumatta (Clark ym. 2009; Rhodes ym. 2003; Uda ym. 2006; van Praag ym. 1999a; van Praag ym. 2005; Wu ym. 2008). Juoksijoiden uusien hermosolujen on todettu myös kypsyvän ja säilyvän paremmin kuin liikkumatomilla eläimillä (mm. Uda ym. 2006; van Praag ym. 1999a; Wu ym. 2008).

Vaikka neurogeneesi lisääntyy harjoittelun seurauksena iästä riippumatta, juoksun vaikutus neurogeneesiin on suurempi nuorilla kuin vanhoilla eläimillä (van Praag ym 2005). 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). On myös huomioitava, että todennäköisesti liikunnalla voidaan kasvattaa neurogeneesiä tiettyyn tasoon saakka lähes suoraviivaisesti, jonka jälkeen neurogeneesin määrä tasaantuu (Rhodes ym. 2003).

Juoksuharjoittelulla aikaan saadut uudet hermosolut muodostuvat rakenteeltaan samanlaisiksi nuorilla ja vanhoilla jyrsijöillä (van Praag ym. 2005). Solujen kypsyminen täydelliseen muotoonsa voi olla kuitenkin hitaampaa iäkkäillä hiirillä, ja kypsyminen saattaa olla epätäydellisempää verrattuna nuoriin hiiriin (van Praag ym. 2005). Neurogeneesin ohella juoksuharjoittelu voi lisätä pykäläpoimun hermosolujen aktiivisuutta (Clark ym. 2008; van Praag ym. 1999a). Hermosolujen aktiivisuuden ja synapsien muovautuvuuden takana voivat olla morfologiset muutokset hermosoluissa (Vivar ym. 2012). Juoksuharjoittelun seurauksena muun muassa pykäläpoimun jyväsolujen dendriittien pituus ja monimutkaisuus sekä hermosolujen okaiden määrä saattavat kasvaa (Eadie, Redila, & Christie, 2005).

Uudet hermosolut muodostuvat usein verisuonien läheisyyteen, joten myös vaskularisaatiolla eli verisuonituksella on vaikutusta neurogeneesiin (Ahlskog, Geda, Graff-Radford, & Petersen, 2011). Juoksuharjoittelun on todettu kasvattavan pykäläpoimun verisuonipinta-alaa (Clark ym. 2009; Creer ym. 2010; van Praag ym. 2005), verisuonien läpimittaa (van Praag ym. 2005) sekä verenkierron tilavuutta (Pereira ym. 2006). Angiogeneesin ilmeneminen eli uusien verisuonien kasvu ja verenkierron tehostuminen neurogeneesille tyypillisessä paikassa, pykäläpoimussa, liikunnan seurauksena ei ole yllättävää, koska uusien hermosolujen muodostuminen tarvitsee aineenvaihduntaa tuekseen (Clark ym. 2009). Voi myös olla, että verenkierron parantuminen lisää liikuntaan liittyvää hermosolujen aktivaatiota pykäläpoimussa (Clark ym. 2009). Vanhoilla hiirillä ei tiedetä esiintyvän verisuonistossa muutoksia pykäläpoimussa juoksuharjoittelun seurauksena (Creer ym. 2010; van Praag ym. 2005). Verisuonten muovautuvuuden puute juoksuharjoittelun jälkeen vanhoilla hiirillä voi johtua iän myötä alentuneista verisuonten kasvutekijätasoista (van Praag ym. 2005).

Monet hermo- ja verisuonikasvutekijät, jotka vastaavat hermoston ja verisuoniston kehittymisestä sekä säilymisestä, ovat tärkeitä liikunnan aikaansaamien hyötyjen näkymisessä aivotasolla (Vivar ym. 2012). Hermokasvutekijöistä juoksuharjoittelu lisää muun muassa aivoperäisen hermokasvutekijän (BDNF), fibroblasti-kasvutekijän (FGF-2) sekä hermokasvutekijän (NGF) ilmenemistä hippokampuksessa (Berchtold ym. 2005, Farmer ym. 2004, Gómez-Pinilla, Dao, & So, 1997; Neeper, Gómez-Pinilla, Choi, & Cotman, 1996). Verisuonikasvutekijöistä verisuonten endoteelin kasvutekijä (VEGF) sekä insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) vaikuttavat juoksuharjoittelulla aikaansaatuisten verisuonistomuutosten ilmenemiseen hippokampuksessa (Fabel ym. 2003; Lopez-Lopez, LeRoith, & Torres-Aleman, 2004.). VEGF ja IGF-1 on lisäksi yhdistetty hippokampuksen neurogeneesiin (Trejo, Lorens-Martin, & Torres-Aleman, 2008; Vivar ym. 2012).

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 sekä aivojen toimintaan (Ahlskog ym. 2011). Aiemmissä tutkimuksissa, joissa on tutkittu juoksuharjoittelun vaikutuksia hippokampuksen neurogeneesiin ja verisuonistoon, on käytetty aerobista juoksuharjoittelua harjoittelumuotona. Anaerobisen harjoittelun eli korkean intensiteetin harjoittelun, jossa suoritustaso ylittää 85 % VO_2max :stä, vaikutuksia hippokampuksen neurogeneesiin tai vaskularisaatioon ei ole vielä tutkittu. Myöskään korkean intensiteetin intervaliharjoittelun (high intensity interval training, HIIT) vaikutuksia hippokampukseen tai oppimiskykyyn ei ole tutkittu. HIIT:ssa anaerobinen ja aerobinen harjoittelu vaihtelevat.

Tässä tutkimuksessa pyritään selvittämään aerobisen harjoittelun vaikutuksia hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiin ja verisuonistoon rotilla. Aerobisen juoksuharjoittelun on todettu kasvattavan niin neurogeneesiä kuin verisuoniston tiheyttä pykäläpoimussa (mm. Clark ym. 2009; van Praag ym. 2005). Täten myös tässä tutkimuksessa oletetaan, että aerobinen harjoittelu lisää neurogeneesiä sekä vaskularisaatiota. Lisäksi tutkimuksessa pyritään selvittämään HIIT:n vaikutuksia hippokampuksen pykäläpoimun neurogeneesiin ja verisuonistoon rotilla. Koska VO_2max :n on todettu olevan yhteydessä hippokampuksen kokoon ja oppimiskykyyn, niin oletettavasti juoksuharjoittelu, joka edistää VO_2max :n kasvua, lisää myös neurogeneesiä. HIIT:n on todettu edistävän VO_2max :n paranemista enemmän kuin aerobisen harjoittelun tai anaerobisen harjoittelun (Helgerud ym. 2007). Lisäksi anaerobisen harjoittelun on todettu akuutisti, heti suorituksen jälkeen, johtavan parempiin tuloksiin kogni-

tiivisissä tehtävissä sekä korkeampaan seerumin BDNF -tasoon verrattuna henkilöihin, jotka lepäsivät, tai jotka suorittivat aerobisen harjoituksen ennen kognitiivisia tehtäviä (Winter ym. 2007). Täten aerobisen harjoittelun ohella myös HIIT:n oletetaan kasvattavan neurogeneesiä ja verisuoniston tiheyttä pykäläpoimussa. Tutkimuksessa pyritään myös vertailemaan aerobisen harjoittelun ja HIIT:n tuloksia toisiinsa. Aiemman tutkimustiedon puutteen vuoksi on vaikea sanoa, kuinka harjoittelumuotojen neurogeneesin ja vaskularisaation tulokset suhteutuvat toisiinsa. Tutkimuksessa arvioidaan lisäksi juoksukehityksen ja juoksusuorituksen yhteyksiä hippokampuksen neurogeneesiin ja verisuonitukseen. Juoksukehitys ja juoksusuoritus ovat todennäköisesti positiivisessa yhteydessä ainakin pykäläpoimun neurogeneesiin, todennäköisesti myös vaskularisaatioon. Aiemmissa tutkimuksissa juoksun määrän on todettu olevan yhteydessä neurogeneesiin (Rhodes ym. 2003) ja fyysisen suorituskyvyn hippokampuksen kokoon (Chaddock ym. 2010; Erikson ym. 2011.).

2 MENETELMÄT

2.1 Koe-eläimet ja olosuhteet

Tutkimukseen myönnettiin koe-eläinlupa kansalliselta eläinlupavirastolta. Koe-eläiminä käytettiin 44 HRT-kannan (high responders for aerobic training) uros-rottaa, joiden fenotyyppiä ei ollut selvitetty. Tämän tutkimuksen rotat ovat osa suurempaa tutkimusta, jossa oli myös LRT-kannan (low responders for aerobic training) rottia. Kaikki rotat saapuivat Yhdysvalloista Suomeen 6–8 kuukauden ikäisinä. Rotat totuttelivat aluksi muutaman kuukauden uuteen ympäristöön ennen varsinaisen tutkimusjakson alkua. Rotat elivät yksin häkeissä, joissa oli tarjolla pesäntekomateriaalia, vettä ja ruokaa. Osa rotista oli häkeissä, joissa oli juoksupyörä. Juoksupyörällisten häkkien koko oli 480 x 265 x 210 mm ja juoksupyörättömien häkkien 595 x 380 x 200 mm. Ruokana oli normaalia rotan ruokaa (R36, Labfor/Lactamin, Kimstad, Ruotsi), jonka energia-pitoisuus oli 300,93 kcal / 100 g (1260 kJ / 100 g). Juomavesi vaihdettiin kolmen päivän välein ja vesipullot viikon välein. Häkkien olosuhteet oli vakioitu niin, että lämpötila oli 21 ± 2 °C ja kosteus 50 ± 10 %. Rotat elivät valorytmillä 12:12 (klo 8–20 valot päällä, klo 20–8 valot pois päältä).

2.2 Koeasetelma

Ennen kokeen alkua rotat jaettiin satunnaisesti neljään eri ryhmään. Ryhmät olivat aerobinen juoksuharjoittelu- eli juoksupyöräharjoittelu -ryhmä (running wheel, RW, n = 12), korkean intensiteetin intervalliharjoittelu -ryhmä (high intensity interval training, HIIT, n = 13) sekä kaksi eri kontrolliryhmää: kontrolliryhmä, joka ei juossut ollenkaan kokeen aikana (sedentary control, SedC, n = 8) ja kontrolliryhmä, joka juoksi vain ennen ja jälkeen intervention tehdyt juokсутестit (control, C, n = 11). Interventio kesti 7 viikkoa. RW -rotilla oli häkeissään jatkuvasti vapaassa käytössään juoksupyörä, joka oli kytketty tietokoneeseen. Näin RW -rottien juoksumatkaa pystyttiin seuraamaan tietokonevälitteisesti vuorokauden ympäri viikon jokaisena päivänä. HIIT -rotat harjoittelivat kolmesti viikossa korkean intensiteetin intervalliharjoittelua. Harjoituksen aluksi rotat 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 hapenottokyky ($VO_2\max$) kerran viikossa hengityskammiossa tehdyn maksimaalisen juokсутестin avulla. Maksimaaliseen suorituskyykyyn 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 interventiota 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 juokсутестin kerran viikossa eli vain kerran myös intervention päättyessä. Juoksumattotestiä ennen rotat lämmitelivät 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 hiilidioksidi-happiseoksella (40/60 %) ennen lopetusta ja lopetukseen käytettiin sydämen punktiota. Intervention lopussa rotat olivat noin 10–12 kuukauden ikäisiä.

2.3 Näytteistys

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 varastoititiin 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.

2.3.1 Verisuonien värjäys – RECA-1.

Verisuonien värjäys tehtiin vapaasti kelluville näytteille RECA-1 primäärivasta-aineella. 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 % vetyperoksidi-liuoksella 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) primäärivasta-aineeseen: 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) sekundaarivasta-aineeseen: 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). Sekundaarivasta-aine pestiin pois 0,5 M TBS-T liuoksella (3 x 5 minuuttia) ja näytteet siirrettiin kahdeksi tunniksi Streptavidin (1:1000) tertiäärivasta-aineeseen: 1 x 0,5 M TBS-T + Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate (RPN1231, GE Healthcare/VWR). Tertiäärivasta-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.

2.3.2 Uusien hermosolujen värjäys – Doublecortin

Uusien verisuonien värjäys tehtiin vapaasti kelluvilla näytteillä Doublecortin primäärivasta-aineella. Doublecortin -värjäysprotokolla oli samanlainen, kuin RECA-1 -värjäys, lukuun ottamatta seuraavia poikkeuksia. Doublecortin -värjäyksessä primäärivasta-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 peroksidaasi-plokkausta. Seerumin häirinnän estämistä ei tehty doublecortin -värjäyksessä. Näytteet pestiin (3 x 5 min) TBS-T liuoksessa ennen primäärivasta-aineeseen laittoa.

Koska doublecortin -värjäyksessä ei tehty seerumin häirinnän estämistä, värjättiin jokaisesta ryhmästä (RW, HIIT ja SedC) kontrollivärjäys ilman primäärivasta-ainetta, muun protokollan ollessa täysin samanlainen. Näin haluttiin varmistaa, etteivät epäspesifiset alueet,

eli muut alueet kuin uudet hermosolut, värjäydy värjäysprotokollan muiden vaiheiden tuloksena hippokampuksessa.

2.3.3 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. Suurin osa väristä 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.

2.4 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 sijaitsi. 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 kah-

della, jotta tiedettäisiin yhteismäärä molempien aivopuoliskojen hippokampusten uusista soluista pykäläpoimun alueelta.

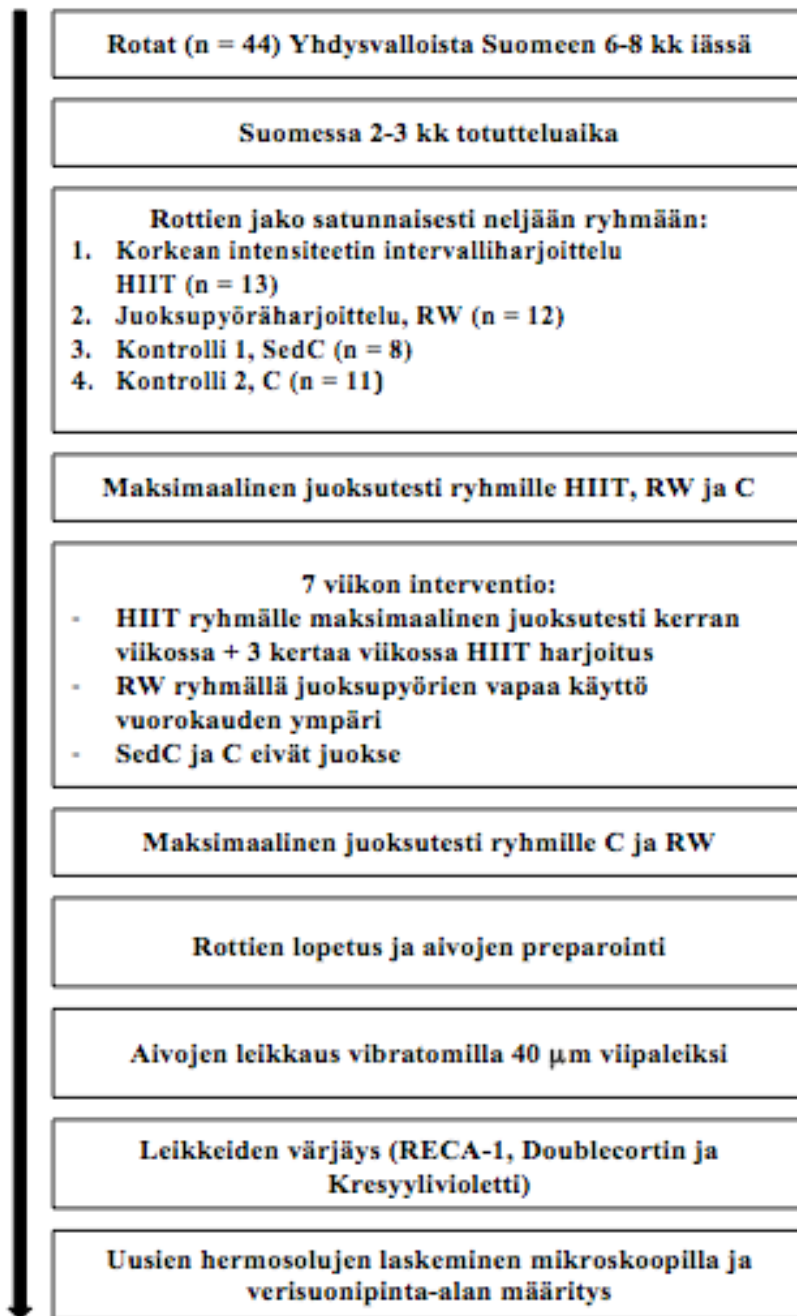
Vaskularisaatiota arvioitiin laskemalla verisuonten mielivaltaisia yksiköitä (arbitrary units) hippokampuksen pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta. Tässä tutkimuksessa mielivaltaisilla yksiköillä tarkoitetaan verisuonialueita pykäläpoimun neurogeenisellä alueella suhteessa pykäläpoimun alueelta otettujen kuvien pinta-aloihin. Vaskularisaatiota arvioitiin vain dorsaaliosasta 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 dorsaaliosasta 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.

2.5 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.



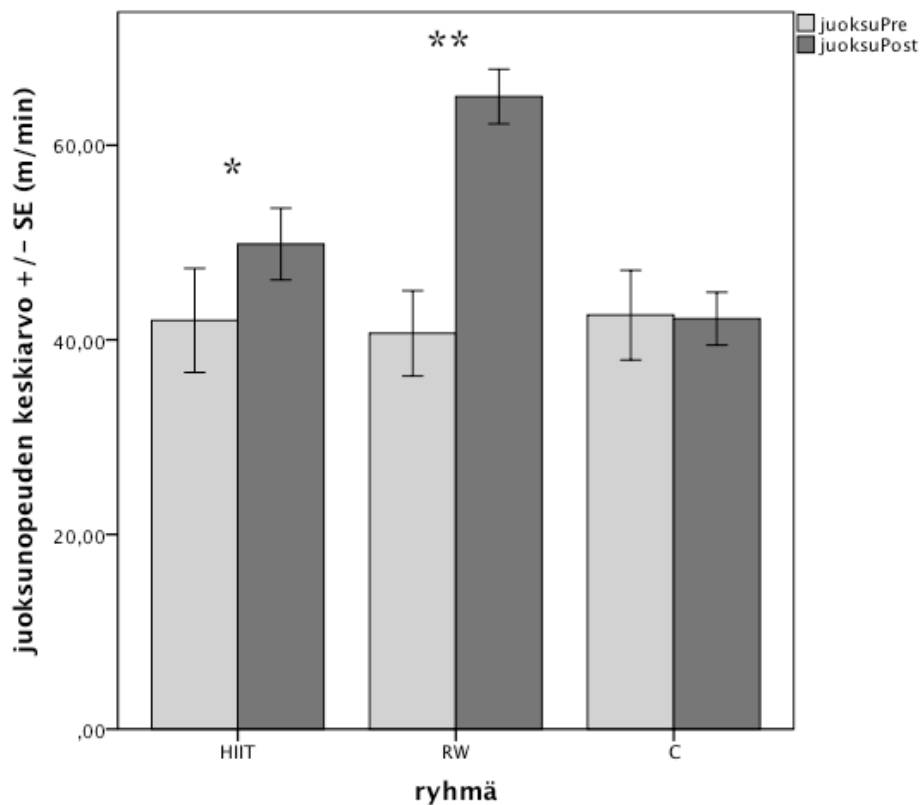
KUVIO 1. Tutkimuksen kulku alusta loppuun. Nuoli osoittaa kulkusuunnan.

3 TULOKSET

3.1 Juoksuharjoittelun tulos

Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu paransi rottien suoriutumista maksimaalisessa juoksutestissä 60 % (Wilcoxonin testi, $p = .002$) ja korkean intensiteetin intervalliharjoittelu paransi suoriu-

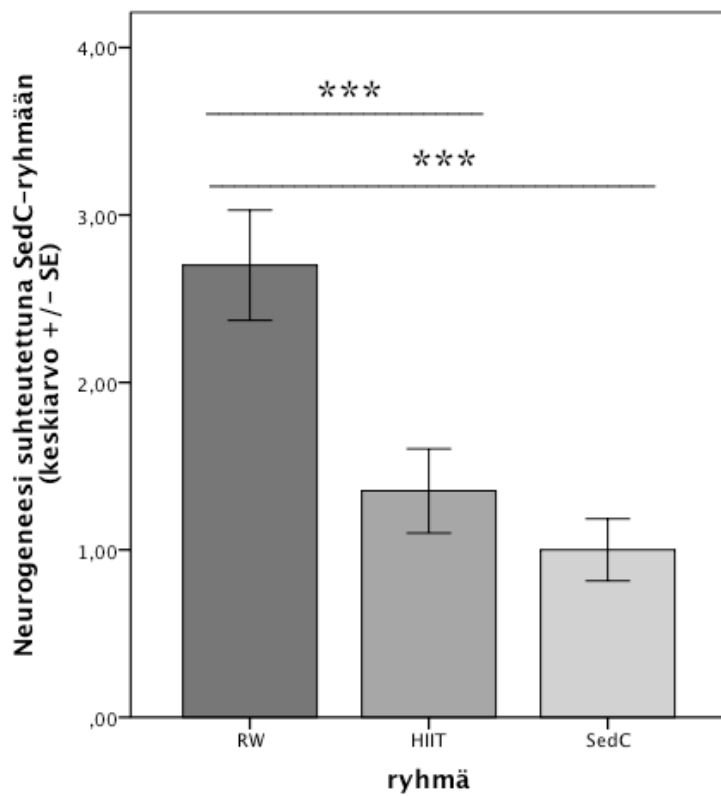
tumista 25 % (Wilcoxonin testi, $p = .04$). Kontrolliryhmällä juoksusuoritus ei muuttunut intervention aikana (Wilcoxonin testi, $p = .65$). Juoksuharjoittelun tulokset on esitetty kuviossa 2.



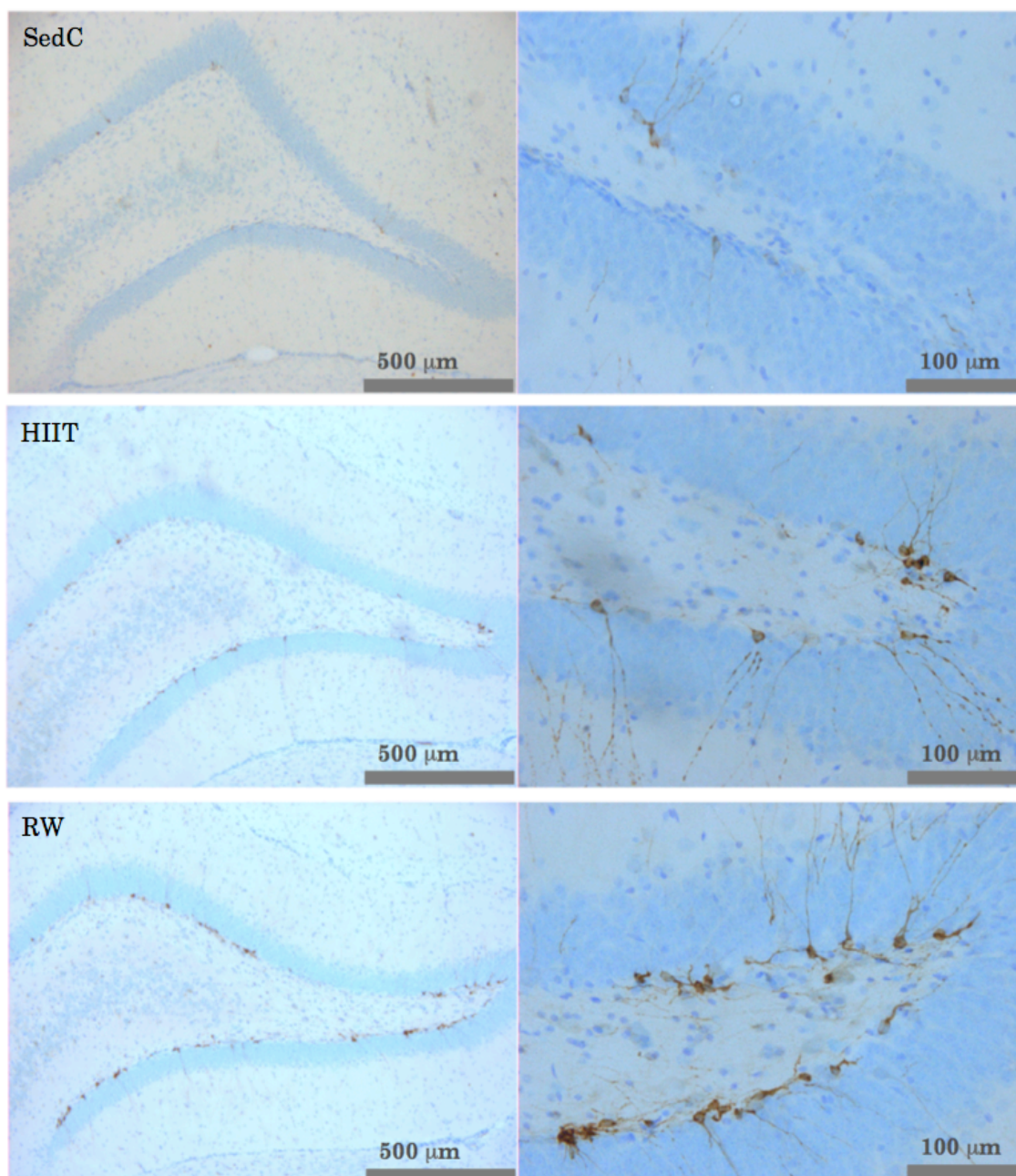
KUVIO 2. Juoksuharjoittelun tulos mitattuna maksimaalisena juoksunopeutena. Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu paransi suoriutumista maksimaalisessa juoksutestissä 60 % ja HIIT harjoittelu 25 %. Kontrolliryhmällä ei tapahtunut muutosta juoksuharjoittelussa ennen ja jälkeen intervention tehdyissä mittauksissa.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

3.2 Neurogeneesi

Neurogeneesissä huomattiin eroja ryhmien välillä (yksisuuntainen varianssianalyysi: $F(2, 24) = 40.7$, $p < .001$). Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu lisäsi neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpöimussa 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 1.



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 ($p = .089$). (***) $p < .001$

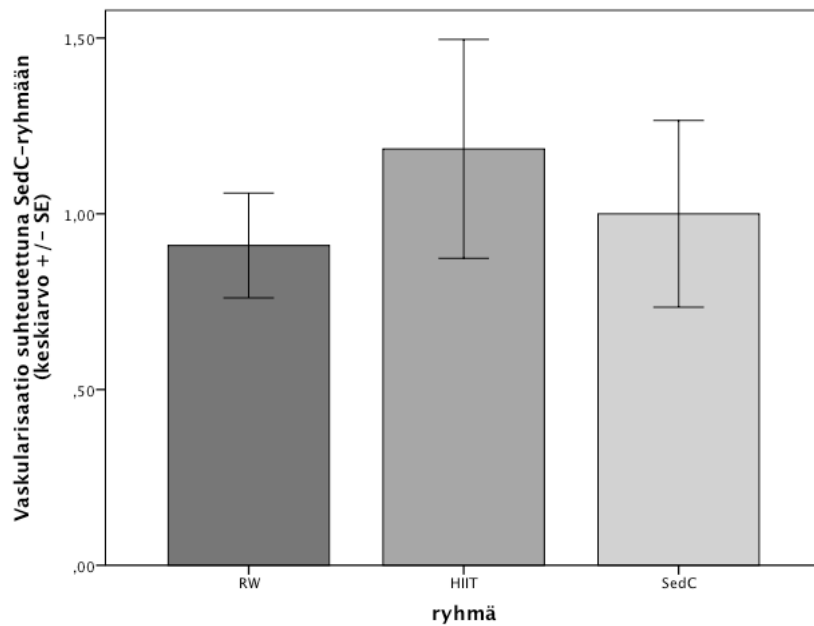


KUVA 1. Neurogeneesi hippokampuksen pykäläpoimussa eri ryhmillä. Uudet hermosolut näkyvät kuvissa ruskealla. Hippokampuksen pykäläpoimun rakenne sinisellä.

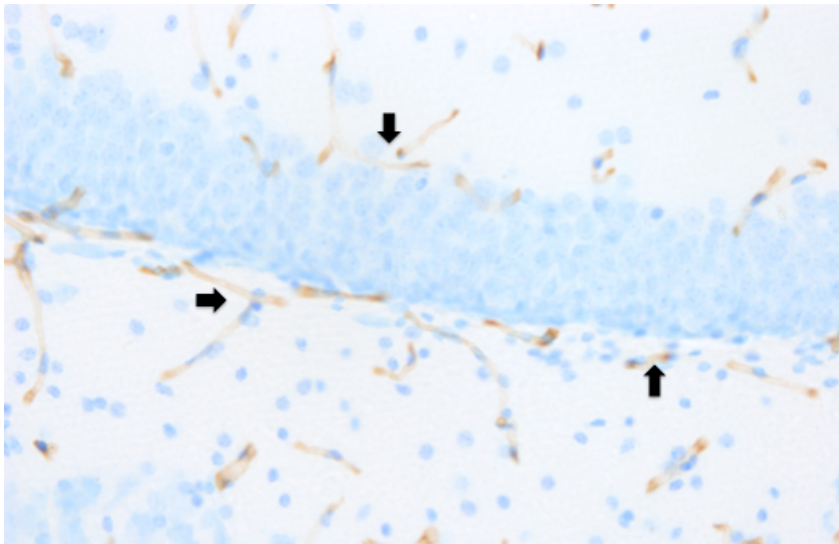
3.3 Vaskularisaatio

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 pykäläpoimussa on esitetty kuvassa 2.



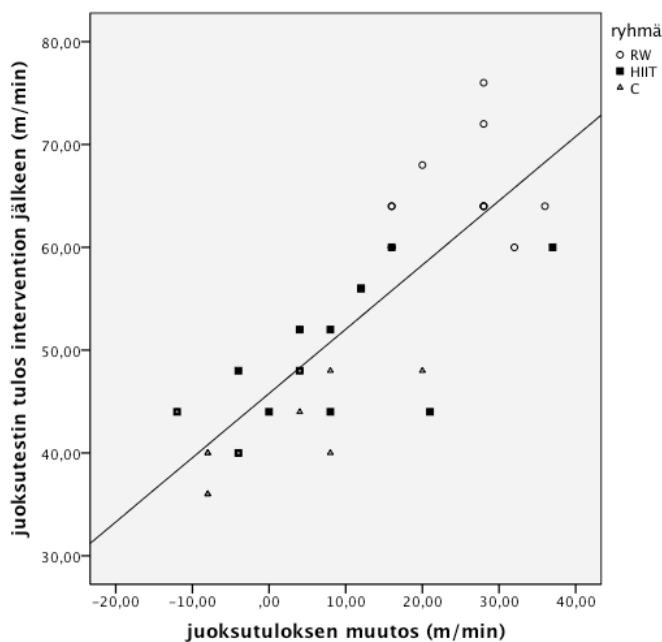
KUVIO 4. Ryhmien välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja hippokampuksen pykäläpoimun dorsaalisen osan vaskularisaatiossa verisuonten mielivaltaisilla yksiköillä määriteltynä.



KUVA 2. Vaskularisaatio hippokampuksen pykäläpoimussa (mikroskooppikuva 40x suurennoksella). Pykäläpoimun rakenne näkyy sinisenä ja verisuonisto ruskealla (nuolet).

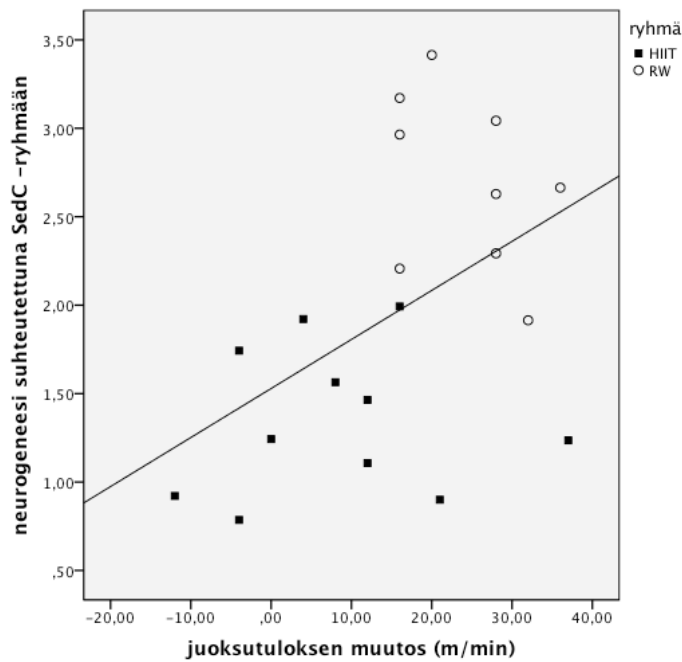
3.4 Korrelaatioiden tarkastelu

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.

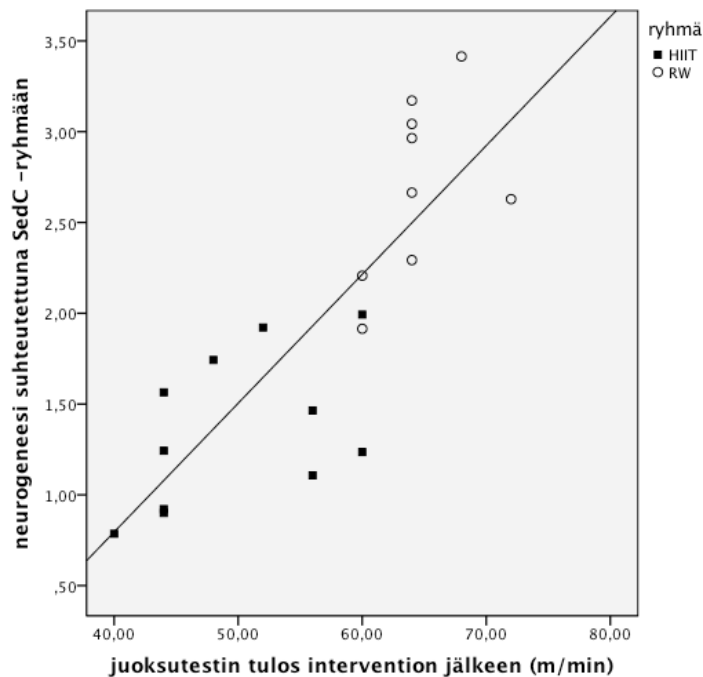


KUVIO 5. Juoksutuloksen muutos korreloi positiivisesti intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa ($r = .82$, $p < .001$).

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.



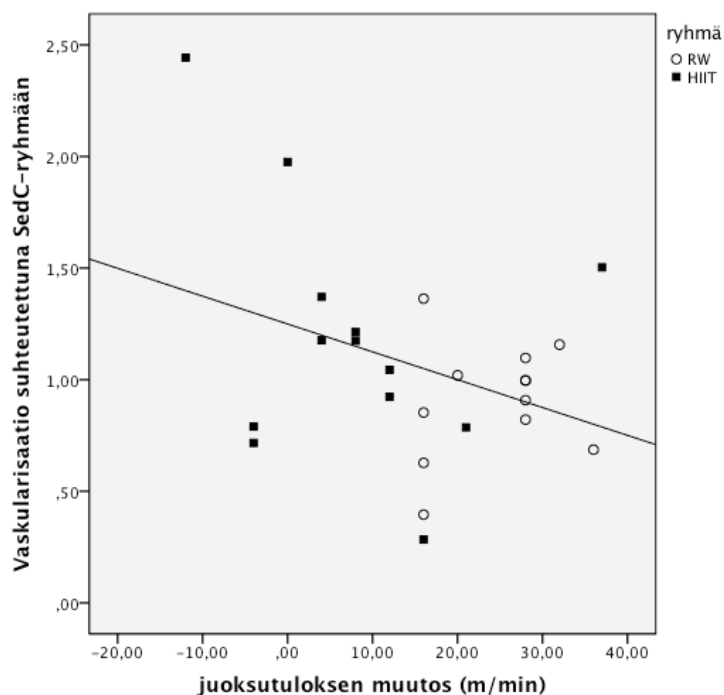
KUVIO 6. Pykäläpoimun neurogeneesi korreloi positiivisesti ($r = .47$) juoksutuloksen (maksimaalinen juoksunopeus, m/min) muutoksen kanssa ($p = .036$, $n = 20$). SedC-ryhmän neurogeneesi = 1.



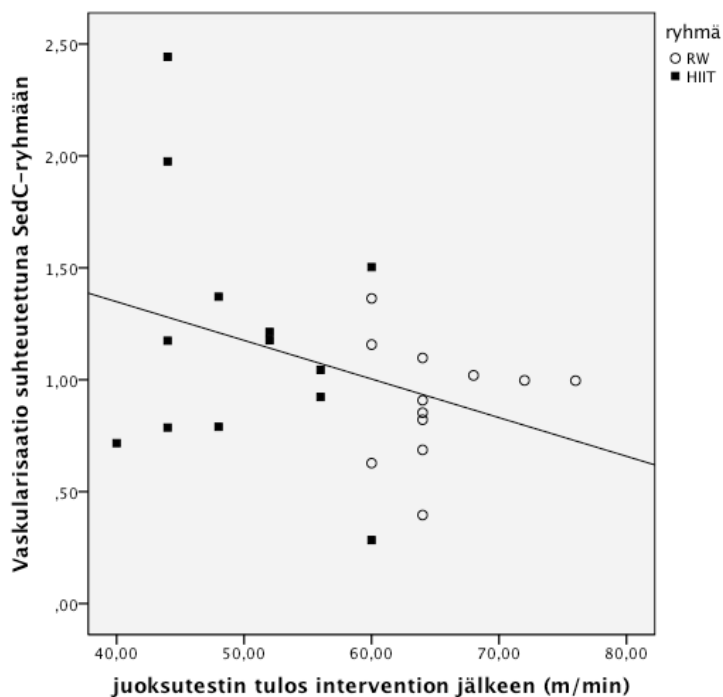
KUVIO 7. Pykäläpoimun neurogeneesi korreloi voimakkaan positiivisesti ($r = .82$) intervention jälkeen tehdyn juoksutestin tuloksen kanssa ($p < .001$, $n = 20$). SedC-ryhmän neurogeneesi = 1.

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 suunta 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 juoksu-
testin tuloksen kanssa (Pearsonin korrelaatiokertoimen testaus, $r = - .37$, $p = .073$, $n = 25$), kun HIIT ja RW –ryhmiä tarkasteltiin yhdessä. Tässäkin nähtiin kuitenkin samanlainen suunta 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. Juokсутuloksen muutoksen ja hippokampuksen pykäläpoimun vaskularisaation välillä havaittiin negatiivinen suunta antava yhteys ($r = - .36$, $p = .077$). SedC-ryhmän vaskularisaatio = 1.



KUVIO 9. Intervention jälkeen tehdyn juokсутestin tuloksen ja hippokampuksen pykäläpoimun vaskularisaation välillä havaittiin negatiivinen suuntaa antava yhteys ($r = -0.37$; $p = 0.073$). SedC-ryhmän vaskularisaatio = 1.

4 POHDINTA

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

4.1 Neurogeneesi

Tässä tutkimuksessa aerobinen juokсуharjoittelu lisäsi neurogeneesiä noin 10 kuukauden ikäisillä rotilla lähes kolminkertaisesti verrattuna SedC -ryhmään ja kaksinkertaisesti verrat-

tuna HIIT:uun. Aiemmissä tutkimuksissa, joissa oli tutkittu juoksun vaikutuksia hippokampukseen, ei oltu tutkittu 10 kuukauden ikäisiä jyrsijöitä, vaan eläimet ovat olleet joko selvästi vanhempia tai selvästi nuorempia. Lukuun ottamatta hyvin iäkkäitä eläimiä, aiemmat tutkimukset ovat päätyneet tulokseen, että aerobinen juoksuharjoittelu lisää jyrsijöiden neurogeneesiä pykäläpoimussa (Clark ym. 2008; Creer ym. 2010; Kempermann, & Gage, 1999b; van Praag ym. 2005). Täten tämä tutkimus tukee aiempien tutkimusten löydöksiä aerobisen harjoittelun ja hippokampuksen neurogeneesin yhteyksistä.

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 juoksuparasiteetti määriteltiin viikoittain, minkä perusteella laskettiin HIIT -harjoituksen tasot (50-60 % maksimiparasiteetista ja 85-90 % maksimiparasiteetista), joilla rotat juoksivat harjoituksensa. Vaikka rotat yleisesti pitävät juoksemisesta, niin ne eivät nauttineet maksimaalisesta juoksuparuksesta. 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 kova-tehoinen intervallijakso voi vaihdella 15 sekunnista muutama minuuttiin ja aktiivinen palautus samalla tavalla. HIIT -ohjelman rakenne vaikuttaa myös hapenottokyvyn kehittymiseen (Bacon, Carter, Ogle & Joyner, 2013), joten ohjelman rakenteella voidaan ehkä vaikuttaa myös neurogeneesin ilmenemiseen. Toisaalta Helgerud:n ym. (2007) tutkimuksessa ei nähty fyysisen kunnan 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 katsausartikkelissään 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 jahdattaessaan saalista (Richter, Gass, & Fuss, 2014). Jyrsijät, kuten rotta, ovat taas tottuneet juoksemaan pyrähdysmäisesti 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 kirjo 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 maksimijuoksuparasti ovat saattaneet olla myös stressiä kasvattavia tekijöitä rotille. Aiemmissä tutkimuksissa on huomattu, että stressi

vähentää neurogeneesiä hippokampuksessa (mm. Dagey ym. 2009; Malberg & Duman 2003). 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 juosset harjoituksen aikana, niin ne saivat laimeita sähkösoikeja juoksumotivaation kasvattamiseksi. Aiemmissa tutkimuksissa on todettu, että sekä akuutit että krooniset sähkösoikit lisäävät stressitasoa ja ehkäisevät neurogeneesiä hippokampuksessa (Dagey ym. 2009; Malberg & Duman 2003). Juoksutus 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 juoksuharjoittelun 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 juoksu aika 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 vaikutavuutta 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. Aiemmissa 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 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).

4.2 Vaskularisaatio

Tässä tutkimuksessa aerobisella juoksuharjoittelulla tai HIIT:lla 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) jyrsijöillä, mutta vanhoilla (19-22 kk) verisuonten pinta-alaan ei ole saatu eroja juoksuharjoittelulla (Creer ym. 2010; van Praag ym. 2005). Van Praag ym. (2005) arvioivat, että verisuonten muovautuvuuden puute vanhoilla hiirillä voi johtua alentuneista verisuonten kasvutekijätasoista. Tässä tutkimuksessa hypoteesinä 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 määritelty koko pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta (Clark ym. 2009; Creer ym. 2010; van Praag ym. 2005).

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 mutkittavuutta, vaikka näitä menetelmiä voitaisiin käyttää verisuonten rakenteen määrittämiseen (Tata & Andersson, 2001). Lisäksi juoksuharjoittelun on todettu lisäävän aivoverenkier-ron tilavuutta pykäläpoimussa MRI -kuvantamisella mitattuna (Pereira ym. 2006). Tässäkin tutkimuksessa juoksuharjoittelulla olisi saatettu saada aikaan muutoksia verisuonten raken- teessa ja toiminnassa, jos mittaustapa olisi ollut erilainen. Jatkossa kannattaakin tutkia juok- suharjoittelumuotojen vaikutuksia eri verisuoniston rakenteellisiin ja toiminnallisiin mittareih- hin pelkkien verisuonten mielivaltaisten yksiköiden sijasta. Lisäksi verisuonten mielivaltais- ten yksiköiden sijaan kannattaisi tutkia suoria verisuonten prosentiosuuksia hippokampuksen pykäläpoimun neurogeeniseltä alueelta.

4.3 Korrelaatioiden tarkastelu

Tutkimuksessa huomattiin, että juoksukapasiteetti ja juoksussa kehittyminen korreloivat posi- tiivisesti neurogeneesin kanssa. Mitä parempi juoksukapasiteetti tai mitä suurempi muutos juoksukapasiteetissa aiempaan testiin nähden oli, sitä suurempaa oli myös neurogeneesi hip- pokampuksen pykäläpoimussa. Intervention jälkeinen juoksukapasiteetti kuvasi yhteyttä vah- vemmin kuin juoksussa kehittyminen. Toisaalta huomattiin myös, että juoksussa kehittymin- nen ja intervention jälkeinen juoksukapasiteetti korreloivat voimakkaan positiivisesti keske- nään. 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 suoritus- kyvyn hippokampuksen kokoon (Chaddock ym. 2010; 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 muunlainen 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 mielenkiin-

toista 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 läpimittaan tai verenvirtauksen määrään. Näitä voitaisiin selvittää jatkotutkimuksissa.

4.4 Johtopäätökset

Aiemmissa tutkimuksissa on osoitettu, että neurogeneesi lisääntyy aerobisen juoksuharjoittelun seurauksena nuorilla ja vanhoilla jyräjillä (Clark ym. 2008; Creer ym. 2010; van Praag ym. 1999b; van Praag ym. 2005). Tutkimustietoa keski-ikäisistä jyräjistä ei juurikaan ole ollut. Tämä tutkimus osoitti, että aerobinen juoksuharjoittelu lisää myös keski-ikäisten rottien neurogeneesiä hippokampuksen pykäläpöimussa. 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 ei ollenkaan. Eri juoksuharjoittelumuotojen vaikutuksia pykäläpoimun vaskularisaatioon kannattaa tutkia jatkossa nuoremmilla eläimillä sekä kattavammilla tutkimusmenetelmillä esimerkiksi tutkimalla suoraan verisuonien pinta-alaa ja haaroittumista sekä poikkileikkauksen pituutta.

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.

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., 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 en-

hances 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.

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., Hjorth, N., Bach, R. & Hoff, J. (2007). Aerobic high-intensity intervals improve VO₂max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc.* 39, 665-71.

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.

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.

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.

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., 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.

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.

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.