

**SUOLISTON MIKROBISTON KOOSTUMUKSEN EROT JA YHTEYS  
VISKERAALISEN RASVAKUDOKSEN GEENIEN ILMENTYMISEEN HCR- JA  
LCR- ROTILLA**

Tiina Hongisto

Liikuntalääketieteen pro gradu -tutkielma

Terveystieteiden laitos

Jyväskylän yliopisto

Kevät 2016

## TIIVISTELMÄ

Hongisto, T. 2016. Suoliston mikrobiston koostumuksen erot ja yhteys viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymiseen HCR - ja LCR -rotilla. Terveystieteiden laitos, Jyväskylän yliopisto, Liikuntalääketieteen pro gradu -tutkielma, 62s, 4 liitettä.

Suoliston mikrobistolla on osoitettu olevan merkittäviä vaikutuksia isäntäeliönsä terveyteen kuten lihavuuden kehittymiseen. Elimistön rasvan määrän vaihtelun on puolestaan havaittu vaikuttavan suoliston mikrobiston koostumukseen. Sekä synnynnäisen että hankitun aerobisen kapasiteetin yhteyttä suolistomikrobistoon ei ole juuri tutkittu. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää suoliston mikrobiston koostumuksen ja viskeraalisen rasvakudoksen tulehdukseen ja rasva-aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentymisen eroja synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltä poikkeavilla rotilla. Lisäksi tarkoituksena on selvittää suoliston mikrobiston koostumuksen yhteyttä viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymiseen.

Tutkimuksessa käytettiin kahta synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltä eroavaa rottakantaa, joita olivat HCR - (High Capacity Runner) ja LCR (Low Capacity Runner) -rotat. Nämä rottakannat on kehitetty Michiganin yliopistossa synnynnäisen aerobisen kapasiteetin ja erilaisten terveystekijöiden yhteyden tutkimiseen. Tässä tutkimuksessa käytetyt kahdeksan HCR -rottaa ja kymmenen LCR -rottaa olivat alkuperäisten rottien jälkeläisiä 36. polvessa. Rotilta kerättiin näytteet suolistosta ja viskeraalisesta rasvakudoksesta. Suoliston mikrobiston koostumusta analysoitiin 16S rRNA geenin tunnistukseen perustuvalla sekvensoinnilla (Illumina MiSeq). Data-analyysi suoritettiin Qiime - ja Kraken -ohjelmilla. Viskeraalisesta rasvakudoksesta tutkittiin puolestaan seitsemän geenin ilmentymisen eroja qPCR-menetelmällä.

Qiime -analyysi luokitteli suoliston mikrobiston pääjaksoihin, heimoihin ja sukuihin, ja Kraken -analyysi lisäksi lajeihin. Rottakantojen välillä tilastollisesti merkitsevästi eroavat pääjaksot (1kpl), heimot (3kpl) ja suvut (3kpl) olivat erilaisia Qiime - ja Kraken -analyysien perusteella. Lisäksi Kraken -analyysi löysi kolme tilastollisesti merkitsevästi eroavaa lajia. Seitsemästä geenistä neljän ilmentymisessä oli tilastollisesti merkitsevästi eroa siten, että tulehdukseen liittyvät geenit *IL1B* ja *CD45* ilmentyivät enemmän HCR -rotilla ja tulehdukseen liittyvä geeni *TLR5* ja rasva-aineenvaihduntaan liittyvä geeni *AdipoQ* ilmentyivät enemmän LCR -rotilla. Rottakantojen välillä tilastollisesti merkitsevästi eroavien mikrobiryhmien ja tutkittujen geenien väliltä löytyi yhteyksiä.

Vaikka aikaisemmat tutkimukset ovat havainneet LCR -rotilla metabolisen oireyhtymän merkkejä, näitä ei havaittu tässä tutkimuksessa, mikä saattaa johtua rottien nuoresta iästä. Useat tässä tutkimuksessa havaitut tilastollisesti merkitsevästi eroavat mikrobiryhmät on yhdistetty aiemmissa tutkimuksissa lihavuuteen. Kaikkia näitä lihavuuteen yhdistettyjä mikrobiryhmiä havaittiin enemmän LCR -rotilla. Tällaisia mikrobiryhmiä olivat esimerkiksi *Actinobacteria* - pääjakso ja *Phascolarctobacterium* -suku. Merkittävää oli, että HCR -rotilla kahden tulehdukseen liittyvän geenin ilmentyminen oli korkeampaa kuin LCR -rotilla. Geneilla *TLR5* ja *AdipoQ*, jotka ilmentyivät enemmän LCR -rotilla, havaittiin olevan positiivinen yhteys niihin mikrobiryhmiin, joita löytyi tilastollisesti merkitsevästi enemmän juuri LCR - rotilta. HCR -rotilla havainnot olivat samanlaisia eli geenien *IL1B* ja *CD45* ilmentymisen ja HCR - rotilta tilastollisesti merkitsevästi runsaammin löytyneiden mikrobiryhmien välillä havaittiin positiivista yhteyttä.

Asiasanat: suoliston mikrobisto, aerobinen kapasiteetti, rasvakudos, rotta

## ABSTRACT

Hongisto, T. 2016. Differences in gut microbiota composition of the LCR and the HCR rats and association with the expression of genes in adipose tissue. Department of Health Science, University of Jyväskylä, Master's thesis in Sports and Exercise Medicine, 62 pages, 4 appendices.

The gut microbiota has significant effects on the health of the host organism, for example, on the development of obesity. In turn, changes on the body fat content influence the composition of gut microbiota. How innate or the acquired aerobic capacity affects the gut microbiota is scarcely studied. The purpose of this study was to examine differences in gut microbiota composition and expression of visceral adipose tissue genes between rats with different intrinsic aerobic capacity and the connection of the gut microbiota composition to the expression of visceral adipose tissue genes.

This study used two rat strains, HCR (High Capacity Runner) and LCR (Low Capacity Runner) rats, which have different innate aerobic capacity. These rat strains have been developed by the University of Michigan to study the connection of innate aerobic capacity with different health factors. Eight HCR and 10 LCR rats used in this study are the generation 36 of the original rats. The intestinal contents and visceral adipose tissue samples were collected from the rats. The composition of the gut microbiota was analyzed by sequencing (Illumina MiSeq) which is based on identification of 16S rRNA gene. Data analysis was performed by Qiime and Kraken programs. From the visceral adipose tissue samples, the expression differences of seven genes were studied using qPCR.

The Qiime program classifies the gut microbiota in phyla, class and genus, in addition to this the Kraken program classifies also in species. Statistically significant phyla, classes and genera were different between the Qiime and the Kraken programs. Three species differed significantly between the rat strains. Four of the seven genes differed significantly between the rat strains so that two genes associated with inflammation, *IL1B* and *CD45*, were expressed more in HCR rats and *TLR5*, also a gene associated with inflammation and lipid-metabolism related *AdipoQ* gene, manifested more in LCR rats. Correlations between all the statistically significant microbe groups and examined genes were obtained.

Although previous studies have found that LCR rats have some signs of metabolic syndrome, those were not observed in this study, probably due to young age of rats. A number of statistically significantly different groups of microbes observed in this study have been linked to obesity in previous studies. All of these obesity linked groups of microbes were found more in LCR rats. Such, for example, were phylum *Actinobacteria* and genus *Phascolarctobacterium*. Furthermore, two genes related to inflammation manifested more in HCR rats than in LCR rats. There was a positive correlation between genes that manifested more in LCR rats, and microorganisms that were found more in LCR rats. The findings in HCR rats were similar so that a positive correlation was found between genes that manifested more in HCR rats, and microorganisms that were found more in HCR rats.

Key words: gut microbiota, aerobic capacity, adipose tissue, rat

## KÄYTETYT LYHENTEET

AdipoQ	adiponektiini
ACTB	beta-aktiini
AMPK	adenosiinimonofosfaatista riippuvainen proteiinkinaasi
Apo A1	apolipoproteiini A1
BMI	body mass index, kehon painoindeksi
cDNA	complementary DNA, komplementaarinen DNA
CD45	lymphocyte common antigen
DNA	deoksiribonukleiinihappo
FASN	fatty acid synthase
FFA	free fatty acids, vapaat rasvahapot
FIAF	fasting-induced adipose factor
GPCR	G protein-coupled receptors, G-proteiinikytkentäiset reseptorit
HDL	high-density lipoprotein
HCR	high capacity runner
IL-1 $\beta$	interleukiini-1 beta
IL-6	interleukiini-6
LCR	low capacity runner
LDL	low-density lipoprotein
LPL	lipoproteiini lipaasi
LPS	lipopolysakkaridi
NGS	next-generation sequencing, uuden sukupolven sekvensointitekniologia
ob/ob	obese mouse
OTU	operatiivinen taksonominen yksikkö
PCR	polymeraasi ketjureaktio
Primer	nukleotideista koostuva yksijuosteinen DNA-alue
qPCR	kvantitatiivinen RT-PCR
RNA	ribonukleiinihappo
RT-PCR	käänteinen transkriptaasi-PCR
SCD1	stearoyl-CoA desaturase-1
SCFA	short chain fatty acids, lyhytketjuiset rasvahapot
Templaatti	näytteestä monistettavaa DNA:ta
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha, tuumorinekroositekijä alfa
TLR4	toll-like-receptor 4
TLR5	toll-like-receptor 5
VO <sub>2max</sub>	maksimaalinen hapenottookyky
16s rDNA	geeni prokaryooteilla eli alkeistumallisilla (esim. bakteereilla), joka koodaa ribosomaalisen RNA:n pienempää alayksikköä

# SISÄLLYS

## TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO.....	1
2 SUOLISTON MIKROBISTO .....	2
2.1 Mikrobiston muotoutuminen .....	4
2.2 Mikrobieen analysointi .....	6
2.3 Suoliston mikrobisto ja rasvakudos .....	8
2.3.1 Suoliston mikrobiston ja rasvakudoksen välinen yhteys.....	8
2.3.2 Suoliston mikrobiston vaikutus rasvakudokseen .....	9
2.4 Suoliston mikrobisto ja synnynnäinen aerobinen kapasiteetti .....	11
3 AEROBINEN KAPASITEETTI .....	13
3.1 Aerobisen kapasiteetin periytyminen.....	14
3.2 Aerobisen kapasiteetin ja harjoittelun vaikutukset rasvakudokseen.....	14
4 ROTTAMALLI TUTKIMUKSESSA.....	15
4.1 LCR - ja HCR -rottakantojen valintaprosessi .....	16
4.2 LCR - ja HCR -rottakantojen erot.....	17
5 TUTKIMUSKYSYMYKSET JA -HYPOTEESIT .....	17
6 TUTKIMUSMENETELMÄT .....	19
6.1 Koe-eläimet ja näytteiden keruu .....	19
6.2. Suoliston mikrobiston koostumuksen analysointi .....	20
6.3 Viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen analysointi .....	21
6.3.1 RNA:n eristäminen, cDNA synteesi ja kvantitatiivinen Real-Time PCR.....	22
6.4 Tilastolliset analyysit .....	24
7 TULOKSET .....	25
7.1 Paino, glukoosi ja veren rasva-arvot.....	25
7.2 Suoliston mikrobiston koostumuksen erot.....	29

7.2.1 Qiime.....	29
7.2.2 Kraken .....	31
7.2.3 Suoliston mikrobiston ja veren rasva-arvojen yhteys .....	34
7.3 Erot viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä.....	37
7.4 Suoliston mikrobiston ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteys ...	37
7.4.1 Qiime.....	38
7.4.2 Kraken .....	40
8 POHDINTA.....	42
8.1 Paino, glukoosi ja veren rasva-arvot.....	42
8.2 Erot suoliston mikrobiston koostumuksessa.....	44
8.3 Erot viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä.....	48
8.4 Suoliston mikrobiston ja rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteys.....	49
8.5 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys .....	51
8.6 Jatkotutkimusaiheita .....	53
LÄHTEET .....	56
LIITE 1. Loput Qiime -analyysin taksonomiatulokset.	
LIITE 2. Loput Kraken -analyysin taksonomiatulokset.	
LIITE 3. Loput tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot geenien ja Qiime -analyysin mikrobiryhmien välillä.	
LIITE 4. Loput tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot geenien ja Kraken -analyysin mikrobiryhmien välillä.	

## 1 JOHDANTO

“Bad digestion is the root of all evil”

– Hippocrates in 400 B.C.

Suoliston terveydellä on suuri merkitys yksilön koko terveyteen. Erityisesti suoliston mikrobiston tasapainoisen koostumuksen on osoitettu olevan tärkeä tekijä monien sairauksien kehittämisessä (Nicholson ym. 2012). Epätasapainoiseksi muuttuneella suoliston mikrobistolla on yhteys niin metabolisten sairauksien (Cani & Delzenne 2009; Nicholson ym. 2012) kuin keskushermostoon liittyvien sairauksien ja tilojen syntymiseen, jälkimmäiseen niin sanotun aivo-suolisto -akselin (eng. gut-brain axis) kautta (Carabotti ym. 2015). On jopa esitetty, että suoliston koostumus voisi olla eräänlainen uusi biomarkkeri, jota tutkimalla saataisiin tietoa yksilön terveydentilasta (Tremaroli & Bäckhed 2012).

Suoliston mikrobisto on monimutkaisessa vuorovaikutuksessa perimän, elintapojen ja ympäristötekijöiden kanssa (Nicholson ym. 2012). Esimerkiksi elimistön rasvakudoksen määrän vaihtelu aiheuttaa muutoksia suoliston mikrobistossa (Ley ym. 2005; Ley ym. 2006), mutta toisaalta myös suoliston mikrobiston koostumuksella on rooli elimistön rasvan kerääntymisessä (Turnbaugh ym. 2006). Kaksi suurinta mikrobien pääjaksoa suolistossa ovat *Bakteroidetes* ja *Firmikuutit* (Sekirov ym. 2010), joista vähentynyt *Bakteroidetes* -pääjakson määrä ja kasvanut *Firmikuutti* -pääjakson määrä on yhdistetty lihavuuteen (Ley ym. 2005; Ley ym. 2006). Poikkeaviakin tuloksia on löydetty (Larsen ym. 2010; Schwiertz ym. 2010), joten suoliston mikrobiston koostumuksen tutkimuksessa ollaan siirtymässä yksittäisten mikrobisukujen ja -lajien lihavuuteen liittyvän yhteyden analysointiin (Lambert ym. 2015; Nguyen ym. 2015). Ravitsemuksellisten tekijöiden yhteyttä suoliston mikrobiston kuntoon on tutkittu enemmän. Toisaalta viime aikoina on kiinnostuttu myös fyysisen aktiivisuuden mahdollisista vaikutuksista suoliston mikrobiston koostumukseen, sillä fyysisellä aktiivisuudella on osoitettu olevan hyödyllisiä vaikutuksia lähes jokaiseen terveyden osa-alueeseen (Cani & Delzenne 2009; Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014).

Tämän tutkielman tarkoituksena on selvittää suoliston mikrobiston koostumuksen ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen eroja synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavilla rotilla sekä suoliston mikrobiston ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteyttä toisiinsa. Tämä tutkimus kuuluu osana Suomen Akatemian rahoittamaa ”Active, Fit and Smart (AFIS)” -tutkimusta, jossa ovat mukana Jyväskylän yliopiston Psykologian ja Liikuntabiologian laitos sekä LIKES -tutkimuskeskus. Suuri kiitos kuuluu Satu Pekkalalle (Jyväskylän yliopisto) pro gradutyöni erinomaisesta ohjauksesta.

## 2 SUOLISTON MIKROBISTO

Kaikki eliöt elävät symbioosissa mikro-organismien kanssa. Näihin mikro-organismeihin lukeutuu niin arkkeja, bakteereita, viruksia kuin yksisoluisia aiotumaisia ja niitä löytyy niin iholta, virtsa- ja sukuelimistä, suolistosta, hengitysteistä (Sekirov ym. 2010) kuin ympärillämme olevasta mikrobipilvestä (Meadow ym. 2015). Tätä mikro-organismien kokonaisuutta isäntäeliössä kutsutaan yleisesti mikrobistoksi, mikroflooraksi tai normaaliflooraksi, mutta koska bakteereiden ja isäntäeliön suhdetta on tutkittu eniten, tarkoitetaan mikrobistolla yleensä bakteereita (Sekirov ym. 2010). Aikuisen ihmisen suolistossa elää noin  $10^{14}$  bakteerisolua yli 1000 erilaisesta lajiryhmästä ja geenejä tällä mikrobistolla on 100 kertaa enemmän kuin geenejä ihmisen genomissa (Cani & Delzenne 2007; Hur & Lee 2015). Suoliston mikrobistossa elää sekä anaerobisia, fakultatiivisia anaerobisia että aerobisia bakteereita. Anaerobiset bakteerit suosivat hapettomia ja aerobiset bakteerit hapellisia oloja, fakultatiiviset anaerobiset bakteerit puolestaan selviytyvät molemmissa olosuhteissa (Sekirov ym. 2010).

Suurimman osan suoliston mikrobikannasta muodostavat kaksi pääjaksoa, joita ovat *Bakteroidetes* (~20–25 %) ja *Firmikuutit* (~60–65 %) (Sekirov ym. 2010; Hur & Lee 2015; Rosenbaum ym. 2015), *Proteobakteerien* (~5–10 %) ja *Aktinobakteerien* (~3 %) ollessa vähemmistönä (Sekirov ym. 2010; Rosenbaum ym. 2015; taulukko 1.). Taulukossa 2. on esitetty bakteerien taksonominen luokittelu käyttäen esimerkkinä *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) -bakteeria. Suurin osa suoliston mikrobistosta elää paksusuolella (70 %), mutta riippuen lajista niitä elää muuallakin suolistossa, ja myös suoliston eri epiteelikerroksissa (Sekirov ym. 2010; kuva 1.). Suurimmista pääjaksoista *Bakteroidetes* ja



*Proteobakteerit* kuuluvat gram-negatiivisiin mikrobeihin, kun taas *Aktinobakteerit* gram-positiivisiin. *Firmikuuteista* suurin osa kuuluu puolestaan gram-positiivisiin mikrobeihin (Vrieze ym. 2010).

TAULUKKO 1. Suurimmat mikrobien pääjaksot ihmisen suolistossa sekä esimerkki mikrobisuku tai -laji (muokattu Rosenbaum ym. 2015).

Pääjakso	% mikrobistosta	Suku tai laji
<i>Firmikuutit</i>	~60–65%	<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Lactobacilli</i> <i>Roseburia</i> <i>Ruminococcus</i>
<i>Bakteroidetes</i>	~20–25%	<i>Alistipes</i> <i>Bacteroides</i>  <i>Parabacteroides</i> <i>Prophyromonas</i> <i>Prevotella</i>
<i>Proteobakteerit</i>	~5–10%	<i>E. coli</i>
<i>Aktinobakteerit</i>	~3%	<i>Bifidobacterium colinsella</i>

Suolistossa elävällä mikrobistolla on useita tärkeitä tehtäviä, jotka vaihtelevat mikrobilajista riippuen. Edellä mainittu toiminnallinen monimuotoisuus on kuitenkin pienempää kuin taksonominen monimuotoisuus (Rosenbaum ym. 2015). Suoliston mikrobisto puolustaa elimistöä sinne tunkeutuneita patogeenejä vastaan, osallistuu suolistoa kerrostavan

mikrovilluksen kehittymiseen ja useiden vitamiinien, kuten K- ja B-vitamiinien imeytymiseen. Lisäksi se tuottaa pienimolekyylisiä yhdisteitä kuten lyhytketjuisia rasvahappoja (Short-chain fatty acids, SCFAs) ja sappihappoja sekä fermentoi sulamattomia polysakkarideja, kuten tärkkelystä, oligosakkarideja ja inuliinia (Cani & Delzenne 2007; Nicholson ym. 2012).

TAULUKKO 2. Esimerkki bakteerien taksonomisesta luokittelusta (NCBI taksonomy-Encyclopedia of life, hakusana *Lactobacillus acidophilus*).

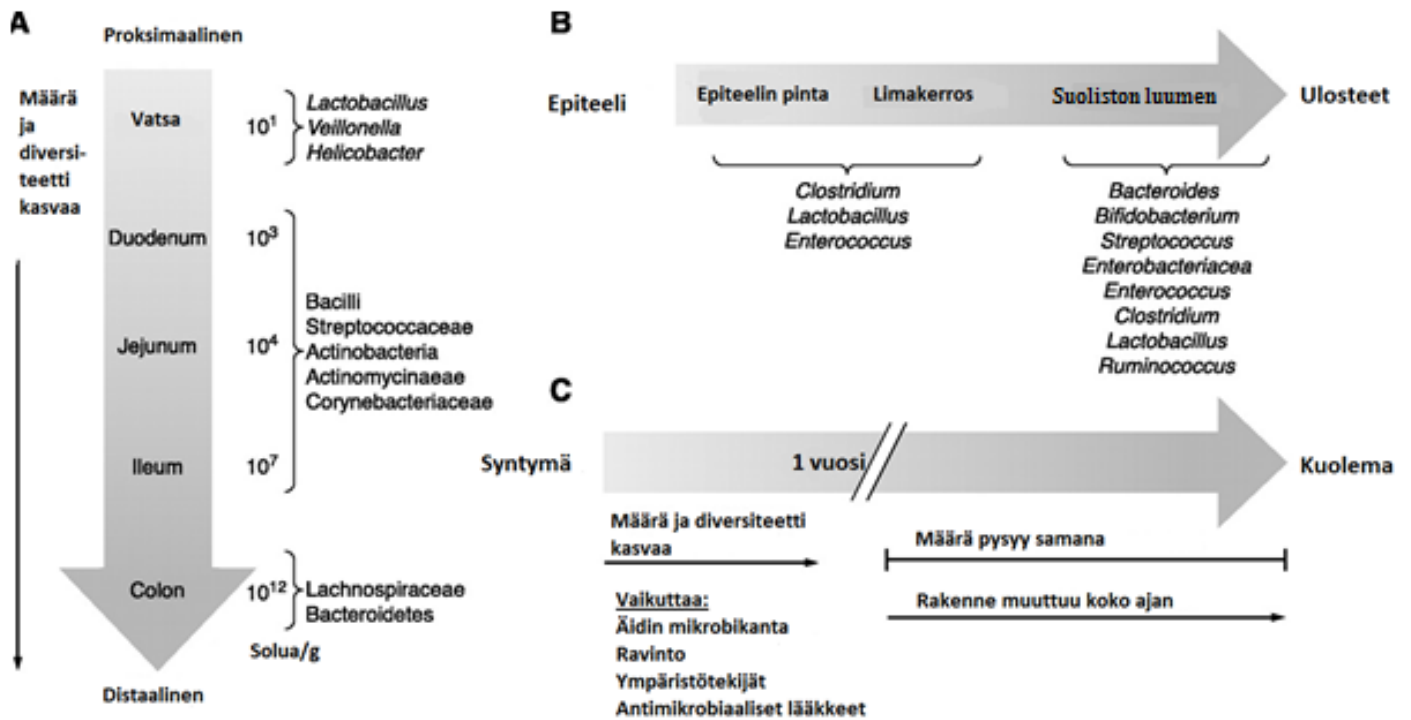
<b>Eliökunta</b>	<b><i>Bakteerit</i></b>
<b>Pääjakso</b>	<i>Firmikuutit</i>
<b>Luokka</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Lahko</b>	<i>Lactobacillales</i>
<b>Heimo</b>	<i>Lactobacillaceae</i>
<b>Suku</b>	<i>Lactobacillus</i>
<b>Laji</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

## 2.1 Mikrobiston muotoutuminen

Ensimmäisen mikrobiston lapsi saa äidiltään synnytyksessä, joten äidin mikrobiston koostumus vaikuttaa siten paljon lapsen mikrobiston laatuun ja määrään, mutta myös perintö- ja ympäristötekijöillä on oma roolinsa (Nicholson ym. 2012; kuva 1.). On havaittu, että esimerkiksi synnytystapa (alatiesynnytys vai keisarileikkaus) ja ruokintamuoto (rinta- vai pulloruokinta) vaikuttavat kehittyvän lapsen suoliston mikrobiston rakenteeseen. Vastasyntyneellä on suolistossaan enemmän *Bakteroidetes* -pääjakson mikrobeja kuin *Firmikuutti* -pääjakson. Vastasyntyneellä mikrobiston koostumus on myös enemmän aerobisia bakteereita suosiva, mutta se muuttuu nopeasti muutaman ensimmäisen elinviikon aikana anaerobisia bakteereita suosivaksi. Mikrobisto alkaa muokata lapsen immuunisysteemiä ja immuunisysteemi puolestaan vaikuttaa mikrobikannan rakenteeseen (Sekirov ym. 2010).

Suoliston mikrobiston monimuotoisuus kasvaa iän myötä ja se on hyvin monimutkaisessa ja dynaamisessa vuorovaikutuksessa muun muassa ruokavalion, elintapojen sekä lääkkeiden käytön, kuten antibioottien nauttimisen kanssa. Tämän vuoksi jokaisella on hieman erilainen mikrobikanta suolistossaan. Nämä kaikki ympäristö- ja elintapatekijät voivat vaikuttaa myös siihen, että suoliston mikrobisto muuttuu dysbioottiseksi eli epätasapainoiseksi (Nicholson ym. 2012; kuva 1.). Useat katsaukset esittelevät tutkimuksia, jotka osoittavat, että epäsuotuisaksi muuttuneella suoliston mikrobistolla on yhteys moniin sairauksiin, kuten autismiin (Reddy & Saier 2015), Parkinsonin tautiin (Scheperjans ym. 2015), tulehduksellisiin suolistosairauksiin (Hold ym. 2014), sydän- ja verisuonisairauksiin (Tang & Hazen 2014) sekä metabolisiin sairauksiin, kuten lihavuuteen ja insuliiniresistenssiin (Cani & Delzenne 2009; Nicholson ym. 2012). Niin sanottu aivo-suoliston -akseli muodostaa kaksisuuntaisen yhteyden suoliston ja aivojen välillä. Tätä kautta aivot ja suolisto ovat yhteydessä muun muassa neuraalisesti ja endokriinisesti. Suoliston mikrobiston tuottamat yhdisteen kulkeutuvat tätä kautta ja vaikuttavat siten esimerkiksi yllä mainittujen autismin ja Parkinsonin taudin kehittymiseen ja jopa mielialaan (Carabotti ym. 2015).

Probiootit ja prebiootit ovat ravitsemukseen liittyviä keinoja vakauttaa suoliston mikrobistoa, ja joidenkin eläintutkimusten mukaan ne ovat keino vähentää useiden sairauksien riskiä, kuten lihavuuden kehittymistä (Cani & Delzenne 2009). Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestön (FAO) ja Maailman terveysjärjestön (WHO) määritelmän mukaan probiootti tarkoittaa elävää mikrobia, joka nautittaessa riittävinä määrinä tuottaa terveyshyötyjä käyttäjälleen (FAO & WHO 2006). Tämä tapahtuu vaikuttamalla muiden mikrobien kasvuun, suoliston limakalvoon ja immuunitoimintaan. Muun muassa eläintutkimuksissa on havaittu *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus paracasei* ja *Lactobacillus gasseri* BNR17 -bakteereilla olevan terapeuttisia vaikutuksia lihavuuden hoidossa. Prebiootit ovat puolestaan sulamattomia ravinnonosia, esimerkiksi inuliinia sekä frukto- ja oligosakkarideja, joita isäntäeliölle hyödylliset probiootit käyttävät ravinnokseen (Kotzampassi ym. 2014).



KUVA 1. Paikallinen ja ajallinen suoliston mikrobiston koostumuksen vaihtelu. A. Mikrobiston sijoittuminen eri suoliston osiin, B. Mikrobiston sijoittuminen eri suoliston kerroksiin ja C. Mikrobiston kehittyminen syntymästä kuolemaan (muokattu Sekirov ym. 2010). Duodenum= pohjukais-suoli, jejunum= tyhjäsuoli, ileum= sykkyräsuoli, colon= paksusuoli, proksimaalinen= lähempänä keskustaa (vartaloa) sijaitseva, distaalinen= kauempana keskustaa (vartaloa) sijaitseva, epiteeli= pintakudos, lumen= suoliston sisätila.

## 2.2 Mikrobien analysointi

Perinteisin mikrobien analysointimenetelmä on ollut niiden kasvattaminen maljalla laboratorio-olosuhteissa, Gram-värjääminen ja biokemialliset testit. Edellä mainituilla tavoilla voidaan tutkia mikrobien morfologisia ja biokemiallisia piirteitä sekä lajitella niitä taksonomisesti. Kasvattaminen maljalla vaatii sen, että tutkittavaa mikrobia on ylipäättään mahdollista kasvattaa keinotekoisesti (*in vitro*), mutta tämä ei kaikkien mikrobien kohdalla ole mahdollista. Lisäksi kasvattaminen on aikaa vievää ja työlästä (Sousa & Pereira 2013).

Kehittyneempiä mikrobien analysointitapoja ovat erilaiset molekyylibiologiset menetelmät, kuten immunologisiin ja nukleenihiappoihin perustuvat tekniikat. Maljalla kasvatukseen ja

mikroskooppitutkimuksiin verrattuna nämä menetelmät ovat nopeampia ja tarkempia. Immunologiset tekniikat voidaan jakaa serologisiin ja vasta-aineisiin perustuviin menetelmiin, joiden avulla on mahdollista tunnistaa taudinaiheuttajamikrobeja. Nukleenhappoihin eli DNA:han ja RNA:han, perustuvat tekniikat tulivat puolestaan mahdollisiksi polymeerasiketjureaktiomenetelmän (PCR) myötä. Mikrobien DNA:n tutkimiseen perustuviin menetelmiin kuuluvat niin PCR -menetelmä kuin DNA -mikrosirut (microarray) ja RNA:n tutkimiseen perustuviin menetelmiin puolestaan käänteinen (reverse) transkriptaasi-PCR (RT-PCR) (Sousa & Pereira 2013).

PCR -menetelmä koostuu kolmen vaiheen sykleistä, johon tarvitaan monistettavaa DNA:ta (templaatti) ja DNA-polymeerasientsyymiä kuten esimerkiksi Taq-polymeerasia, joka kestää hyvinkin korkeita lämpötiloja. Lisäksi tarvitaan DNA-molekyylin neljää erilaista nukleotidia (A, T, C ja G) sekä näistä nukleotideista koostuvia, yksijuosteisia DNA-alukkeita (primer). Ensimmäisessä vaiheessa, lämpötilassa +95 celsiusastetta (°C) näyte denaturoituu, joka saa aikaan sen, että kaksijuosteisen DNA:n vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Toisessa vaiheessa, lämpötilan laskiessa n. +55 °C -asteeseen alukkeet kiinnittyvät monistettavaan kohde-DNA:han. Viimeisessä eli kolmannessa vaiheessa lämpötila nousee jälleen, +72 °C:een. Tämä saa aikaan sen, että DNA -polymeerasi alkaa kiinnittää nukleotideja alukkeen perään templaatin mallin mukaan 5` → 3` suuntaan. Reaktiossa syntetisoituu kopio molemmista DNA-juosteista ja tätä reaktiota voidaan toistaa PCR:llä periaatteessa loputtomasti (Kirakosyan ym. 2011, 38–40). Real-Time PCR (ts. kvantitatiivinen RT-PCR, qPCR) eroaa tavallisesta PCR:stä siinä, että sen avulla voidaan seurata PCR:n edistymistä reaaliajassa. Käänteisessä transkriptaasi-PCR menetelmässä (RT-PCR) RNA käännetään cDNA:ksi, eli yksijuosteiseksi komplementaariseksi DNA:ksi. Tässä reaktiossa DNA - polymeerasientsyymillä käytetään retroviruksista eristettyä käänteiskopioija entsyymiä (reverse transkriptaasi) (Pandey ym. 2011, 188).

Viime vuosina sekvensointitekniologia on kehittynyt merkittävästi. Sekvensointitekniologialla tarkoitetaan menetelmiä, joihin kuuluu näytteen valmistelu, sekvensointi, kuvantaminen ja data-analyysi. Uusin sekvensointitekniologia, niin sanottu uuden sukupolven sekvensointitekniologia (eng. ”Next Generation Sequencing”, NGS) on mahdollistanut muun muassa sen, että satoja lajeja voidaan tunnistaa yhdestä näytteestä ja koko mikrobin genomi

voidaan sekvensoida. Esimerkkejä NGS -teknologiasta ovat Sanger, Roche ja Illumina (esimerkiksi HiSeq ja MiSeq -menetelmät). Myös metagenomiikan tutkiminen on helpottunut. Metagenomiikalla tarkoitetaan tietyn joukon, esimerkiksi koko ihmisen suoliston mikrobiston, geenien tutkimista kerrallaan (Metzke 2010). Uusilla sekvensointimenetelmillä saadaan valtava määrä dataa, joten sen analysoinnin helpottamiseksi on luotu ohjelmia, jotka suorittavat tämän tehtävän (Kuczynski ym. 2011). Tällaisia ovat esimerkiksi Qiime - ja Kraken -analyysit, jotka on valmistettu juuri mikrobien DNA ja RNA sekvenssidatan analysointiin ja tulkitsemiseen. Sana ”Qiime” tulee sanoista “Quantitative Insights Into Microbial Ecology”. Ne luovat grafiikkaa ja tilastoja, jotka sisältävät tietoa muun muassa taksonomiasta, fylogeniikasta ja operatiivisista taksonomisista yksiköistä (OTU, operatiivinen taksonominen yksikkö). (Kuczynski ym. 2011; Davis ym. 2013). Fylogeniassa eli lajien kehityslinjan tutkimuksessa OTU on usein käytetty toiminnallinen määritelmä lajille tai ryhmälle lajeja, joista on saatavilla pelkästään DNA sekvenssidataa. OTU:ja käytetään yleisesti mikrobien diversiteetin yksikkönä (Blaxter ym. 2005).

## **2.3 Suoliston mikrobisto ja rasvakudos**

Lihavuus on suuri maailmanlaajuinen kansanterveydellinen ongelma ja se lisää merkittävästi sairastavuutta ja kuolleisuutta sekä vähentää elämänlaatua. Siihen liittyy useita metabolisia sairauksia kuten insuliiniresistenssi, tyypin 2 diabetes, rasvamaksa, ateroskleroosi, korkea verenpaine ja terveydelle epäedulliset veren rasva-arvot. Lihavuus on useimmiten tulosta liiallisen energiansaannin ja vähentyneen fyysisen aktiivisuuden yhteisvaikutuksesta. Geenit, ympäristötekijät ja rasvakudoksen tulehdustila liittyvät myös lihavuuden kehittymiseen (Kotzampassi ym. 2014). Viime aikoina on myös havaittu, että suolistossa elävällä mikrobistolla on tärkeä rooli isäntäeliön aineenvaihdunnassa ja rasvan kerääntymisessä (Cani & Delzenne 2007) ja siten lihavuuden ja metabolisen oireyhtymän kehittymisessä (Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014).

### **2.3.1 Suoliston mikrobiston ja rasvakudoksen välinen yhteys**

Sekä ihmis- että jyrsijätutkimuksissa on saatu selville, että lihaviin ja laihojen yksilöiden suoliston koostumus eroaa toisistaan. Tutkittaessa geneettisesti lihavia *ob/ob* (obese mouse)

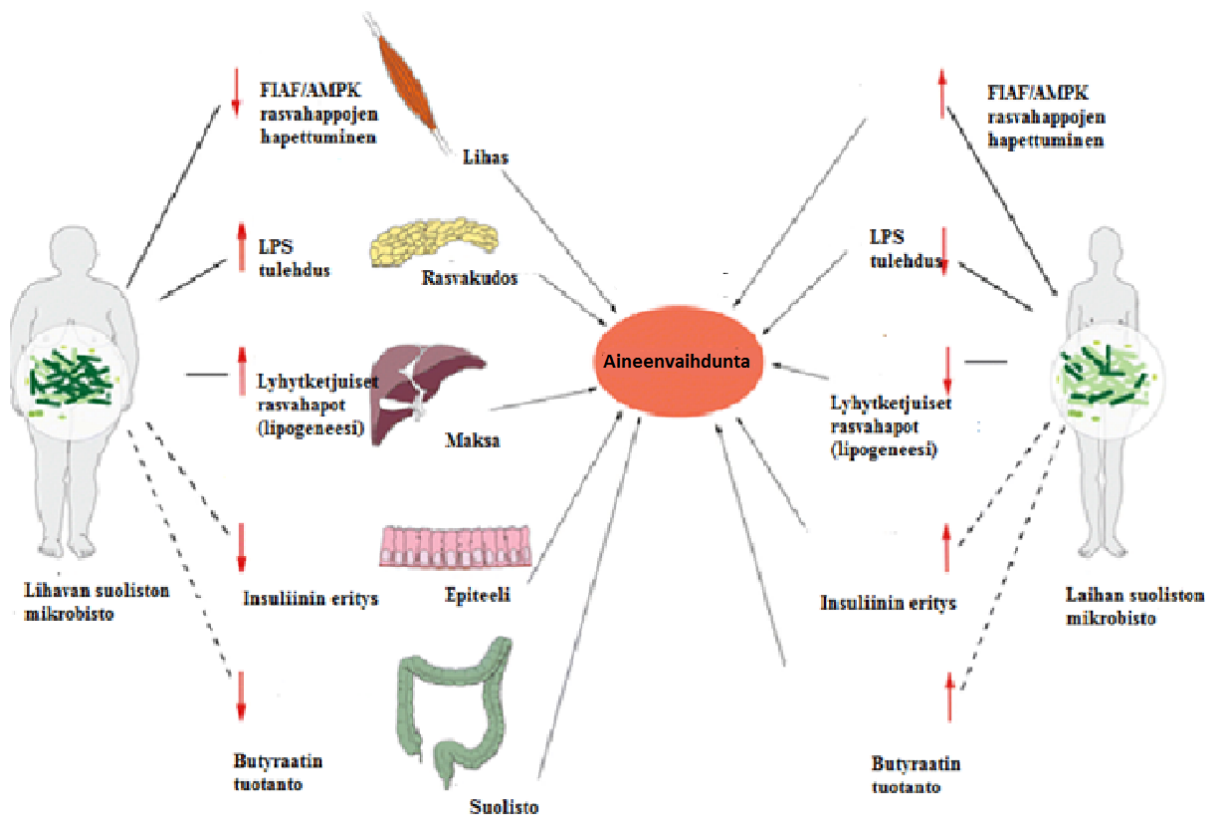
hiiriä ja vertailtaessa näiden mikrobiston koostumusta laihoihin hiiriyksilöihin havaittiin, että lihavilla yksilöillä oli vähentynyt *Bakteroidetes* -pääjakson mikrobisto ja suurentunut *Firmikuutti* -pääjakson mikrobisto (Ley ym. 2005). Lisäksi koko mikrobiston monimuotoisuus oli alhaisempi lihavilla yksilöillä (Rosenbaum ym. 2015). Samanlaisia muutoksia havaittiin vertailtaessa lihavien ja laihojen ihmisten suoliston mikrobistoa (Ley ym. 2006), mutta myös päinvastaisia tuloksia on saatu ihmistutkimuksissa (Larsen ym. 2010; Schwartz ym. 2010). Suomalaisessa tutkimuksessa havaittiin, että sellaiset lapset jotka olivat ylipainoisia 7 -vuotiaana, oli enemmän *Firmikuutti* -pääjakson mikrobeja suolistossaan. Sama tutkimusryhmä havaitsi, että normaalipainoisilla lapsilla oli suurempi määrä suvun *Bifidobacterium spp.* -mikrobeja ylipainoisiin lapsiin verrattuna (Kalliomäki ym. 2008). Tämä suolistomikrobi on yhdistetty puolestaan moniin terveyshyötyihin (Kotzampassi ym. 2014).

Yksilön laihtuessa tai painon pudotessa *Bakteroidetes* -pääjakson mikrobien määrä alkaa sen sijaan kasvaa. Tämä osoittaa, että lihavuus ja laihduttaminen vaikuttavat mikrobiston koostumukseen (Ley ym. 2005; Ley ym. 2006), mutta suunta voi olla myös toisin päin eli suoliston mikrobiston koostumus vaikuttaa rasvan kerääntymiseen. Tämä on osoitettu tutkimuksissa, joissa on siirretty mikrobistoa ihmisten ja eläinten kesken. Kun lihavien *ob/ob* -hiirien mikrobistoa siirrettiin laihoille hiirille, joilta puuttui kokonaan suoliston mikrobikanta (gnotobioottisia hiiriä), kasvoi laihojen hiirien rasvamassa ja ne keräsivät enemmän energiaa ravinnosta kuin hiiret, joille oli siirretty mikrobistoa laihoilta hiiriltä (Turnbaugh ym. 2006). Samanlaisia tuloksia on saatu siirrettäessä leptiini-deficient -hiiriltä (*Lep<sup>ob</sup>*) mikrobistoa gnotobioottisille hiirille sekä siirrettäessä lihavan ihmiskaksosparin suoliston mikrobistoa gnotobioottisille hiirille kuin siirrettäessä laihan ihmiskaksosparin suoliston mikrobistoa (Ridaura ym. 2013).

### **2.3.2 Suoliston mikrobiston vaikutus rasvakudokseen**

Suoliston mikrobiston koostumus on hyvin monimuotoinen, minkä vuoksi toiminnallisia yhteyksiä suoliston mikrobiston ja rasvan kerääntymisen välillä ei vielä tunneta kovin hyvin. Joitakin ehdotuksia mahdollisista yhteyksistä on kuitenkin esitetty (Vrieze ym. 2010; kuva 2.). Esimerkiksi suoliston mikrobiston on havaittu aiheuttavan lipoproteiini lipaasin (LPL) inhibiittorin (eng. "fasting-induced adipose factor", FIAF) ilmentymisen vähentymistä

suolistossa, mikä lisää LPL:n aktiivisuutta. LPL lisää puolestaan solujen rasvahappojen ottoa ja triglyseridien kertymistä lihas- ja rasvakudokseen (Vrieze ym. 2010; Kotzampassi ym. 2014; kuva 2.).



KUVA 2. Suoliston mikrobiston ja rasvan kerääntymisen välinen yhteys (Muokattu Vrieze ym. 2010).

On myös ehdotettu, että suoliston mikrobiston fermentoidessa sulamattomia polysakkarideja, kuten selluloosaa, ksylaaneja, resistenttiä tärkkelystä ja inuliinia, se tuottaa samalla yhdisteitä esimerkiksi lyhytketjuisia rasvahappoja, butyraattia, asetaattia ja propionaattia (Rosenbaum ym. 2015; Vrieze ym. 2010; kuva 2.). Näitä rasvahappoja tuottavia mikrobeja löytyy sekä *Bakteroidetes* - että *Firmikuutti* -pääjaksoista (Rosenbaum ym. 2015). Näiden lyhytketjuisten rasvahappojen määrä ja laatu riippuvat käytettyjen hiilihydraattien määrästä ja laadusta sekä suoliston mikrobiston koostumuksesta (Tremaroli & Bäckhed 2012). Lihavuudessa suoliston mikrobisto koostuu mikrobeista, jotka keräävät enemmän energiaa ravinnosta fermentoidessaan sulamattomia polysakkarideja ja samalla tuottavat enemmän lyhytketjuisia rasvahappoja (Kotzampassi ym. 2014). Näillä rasvahapoilla on rooli isännän aineenvaihdunnassa esimerkiksi vaikuttamalla suoraan suoliston toimintaan tai vaikuttamalla



maksaan, aivoihin, rasva- tai lihaskudokseen (Tremaroli & Bäckhed 2012). Suolistossa ne toimivat esimerkiksi energialähteenä ja säätelevät osaltaan suoliston liikkuvuutta, tulehdustilaa, hormoni- ja immuunitoimintaa, haavojen paranemista sekä laajentavat verisuonia. (Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014). Butyraatin rooli suolistossa on merkittävin ja sen on esimerkiksi havaittu säätelevän suolistoa suojaavan musiinin synteesiä ja vähentävän bakteerien kulkeutumista suoliston epiteelin läpi, parantamalla samalla suoliston kerrosten yhtenäisyyttä sekä vähentävän seerumin greliinin pitoisuutta, joka on ruokahalua ja mahan tyhjenemistä edistävä peptidihormoni. Greliinin on osoitettu vaikuttavan glukoosi- ja rasva-aineenvaihduntaan ja lisäävän kehon rasvan määrää (Queipo-Ortun˜o ym. 2013).

Suoliston mikrobiston ja lihavuuden yhdistäväksi tekijäksi on myös esitetty tulehdusta (kuva 2.), koska lihavuuteen ja tyyppin 2 diabetekseen liittyy laaja-alainen rasvakudoksen tulehdustila. Suoliston mikrobiston gram-negatiiviset bakteerit tuottavat jatkuvasti lipopolysakkarideja (LPS), jotka ovat tulehdusta aiheuttavia endotoksiineja (Vrieze ym. 2010; Tremaroli & Bäckhed 2012; kuva 2). Kun hiiriä pidettiin runsasrasvaisella ruokavaliolla, niiden plasman LPS -pitoisuus, rasvamassa ja tulehdustaso kasvoivat sekä insuliiniherkkyys ja glukoosinsieto vähenivät. LPS:n tunnistavan reseptorin puuttuessa hiiriltä puuttuivat metaboliset sairaudet, jotka saatiin aikaan runsasrasvaisella ruokavaliolla (Cani & Delzenne 2009). Suoliston mikrobiston tuottamat lipopolysakkaridit tarttuvat Toll-like reseptori 4: ään (TLR4) ja laukaisevat proinflammatoristen sytokiini kaskadin, joka on krooniseen systeemiseen tulehdustilaan johtava tekijä (Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014). Lisäksi suoliston mikrobisto voi vaikuttaa isännän aineenvaihduntaan adenosiinimonofosfaatista riippuvaisen proteiinikinaasin (AMPK) kautta (kuva 2.). Tämä entsyymi kontrolloi solujen energiatilaa ja stimuloi rasvahappojen beta-oksidaatiota. Suoliston mikrobiston havaittiin vähentävän AMPK:n kautta tapahtuvaa rasvahappojen hapettumista maksassa ja luurankolihaksessa (Vrieze ym. 2010; Kotzampassi ym. 2014).

## **2.4 Suoliston mikrobisto ja synnynnäinen aerobinen kapasiteetti**

Synnynnäisen aerobisen kapasiteetin yhteyttä suoliston mikrobistoon ei ole juuri tutkittu aikaisemmin. Useampia tutkimuksia on tehty fyysisien aktiivisuuden ja suoliston mikrobiston

yhteydestä, mutta tämäkin tutkimussuuntaus on vielä varsin uusi. Cox-York ym. (2015) tutkivat LCR- (low capacity runner) ja HCR (high capacity runner) -rotilla synnyntäisen aerobisen kapasiteetin ja munasarjojen poiston yhteyttä suoliston mikrobistoon. Jyrsijöiden munasarjojen poisto toimii mallina ihmisten menopaussin tutkimuksissa. Menopausi naisilla ja munasarjan poisto rotilla on yhdistetty vähentyneeseen fyysiseen aktiivisuuteen ja aerobiseen kuntoon sekä suurempaan rasvakudoksen määrään ja aineenvaihdunnallisten sairauksien puhkeamiseen. Suoliston mikrobistolla on yhteys myös estrogeeni aineenvaihduntaan, mikä saattaa yhdistää yhtenä tekijänä suoliston mikrobiston metabolisiin sairauksiin (Cox-York ym. 2015). Cox-York ym. (2015) havaitsivat munasarjojen poiston jälkeen, että HCR -rottien rasvakudoksen määrän kasvu ja triglyseridien kerääntyminen maksaan oli huomattavasti alhaisempaa kuin LCR -rotilla, johtuen ilmeisesti paremman synnyntäisen aerobisen kapasiteetin suojaavasta vaikutuksesta. Mikrobiston diversiteetti ja *Bakteroidetes* -pääjakson määrä kasvoi sekä *Firmikuutti* -pääjakson määrä väheni LCR -rotilla munasarjojen poiston jälkeen, mutta tätä ei havaittu HCR -rotilla. Lisäksi ennen munasarjojen poistoa plasman lyhytketjuisten rasvahappojen pitoisuudet olivat suurempia HCR -rotilla LCR -rotiin verrattuna. Munasarjojen poiston jälkeen pitoisuudet laskivat molemmilla rottaryhmillä. Tulokset antavat viitteitä siitä, että synnyntäisesti hyvä aerobinen kapasiteetti suojelee menopaussin aiheuttamilta aineenvaihdunnallisten sairauksien riskeiltä (Cox-York ym. 2015).

Samankaltaisia tuloksia on saatu Liun ym. (2015) tutkimuksessa fyysisen aktiivisuuden yhteydestä suoliston mikrobistoon LCR- ja HCR -rotilla, joiden munasarjat on poistettu. Tutkimuksessa rotat jaettiin neljään ryhmään aerobisen kapasiteetin (HCR/LCR) ja liikunnallisen aktiivisuuden (liikuntaa/ei liikuntaa) mukaan. Tulosten mukaan *Firmikuutti* -pääjakson määrä väheni LCR -rottien liikuntaryhmässä, mutta kasvoi HCR -rottien liikuntaryhmässä. Tuloksissa oli myös merkittävää se, että LCR -rottien suoliston mikrobiston monimuotoisuus oli suurempi kuin HCR -rottien (Liu ym. 2015). Petriz ym. (2014) ja Lambert ym. (2015) ovat saaneet hieman toisenlaisia tuloksia fyysisen aktiivisuuden ja suoliston mikrobiston yhteydestä. Petriz ym. (2014) tutkivat liikunnan vaikutusta ylipainoisten, normaalipainoisten ja spontaanisti korkeaverenpaineisten rottien suoliston mikrobiston monimuotoisuuteen havaitsivat, että kaikkien kolmen ryhmän suoliston mikrobiston monimuotoisuus rikastui liikuntaintervention aikana, eniten kuitenkin ylipainoisilla ja korkeaverenpaineisilla rotilla. *Bakteroidetes*- pääjakson bakteerien määrä

vähenee ja *Firmikuutti* -pääjakson bakteerien määrä kasvoi liikuntainterventiossa. Lambert ym. (2015) tekemän tutkimuksen tulokset diabetesta sairastavilla ja terveillä hiirillä olivat samanlaisia. Liikuntainterventio jälkeen *Firmikuuttien* määrä kasvoi ja *Bakteroidetes* -pääjakson bakteerien määrä vähenee sekä diabeteshiirillä että tavallisilla hiirillä liikkumattomiin hiiriin verrattuna (Lambert ym. 2015). Poikkeavat tulokset *Bakteroidetes: Firmikuutti* -pääjaksojen suhteessa saattavat johtua isäntälajista, ympäristötekijöistä ja geneettisistä tekijöistä sekä liikunnantyyppistä (Liu ym. 2015).

Siitä miten liikunta vaikuttaa suoliston mikrobiston koostumukseen, ei ole vielä varmaa tutkittua tietoa. Liikunta saattaa aiheuttaa muutoksia suoliston ravinteidenkuljetusajassa, mikä vaikuttaa ravinteiden sulatukseen ja absorptioon. Tällöin mikrobiston substraattien saatavuus ja käytettävyys muuttuu ja mikrobistossa tapahtuu muutoksia (Liu ym. 2015). Lisäksi liikunta saattaa vaikuttaa suoliston immuunitoimintaan ja endogeenisten aineiden, kuten musiinin, määrään. Nämä tekijät saattavat aiheuttaa muutoksia suoliston mikrobistossa ja lyhytketjuisten rasvahappojen tuotannossa (Matsumoto ym 2008). Lisäksi liikunta saattaa lisätä rasvahappojen hapettumista ja käyttöä sekä vähentää tulehdusta mikrobiston kautta (Lambert ym. 2015).

### **3 AEROBINEN KAPASITEETTI**

Aerobisella kapasiteetilla tarkoitetaan sydän-, verenkierto- ja hengityselimistön suorituskykyä sekä hermolihasjärjestelmän toiminnan tasoa. Kudostasolla lihasten lihassolutyypillä ja lihasten aerobisella aineenvaihdunnalla, kuten mitokondrioiden määrällä ja koolla sekä aerobisen aineenvaihdunnan entsyymituotannolla, on suuri merkitys aerobisen kapasiteetin kehittymiseen (McArdle ym. 2015, 236–237). Maksimaalisella aerobisella kapasiteetillä tarkoitetaan elimistön kykyä käyttää maksimaalinen määrä happea suorituksen aikana (maksimaalinen hapenottokyky  $VO_{2max}$ ). Maksimaalisella hapenottokyvyn testillä voidaan selvittää maksimaalisen aerobisen kapasiteetin tasoa. Testin tulos ilmoitetaan yleensä absoluuttisena tilavuutena minuutissa (l/min) tai suhteutettuna kehon painoon (ml/min/kg) (McArdle ym. 2015, 236–238). Hyvä aerobinen kapasiteetti laskee riskiä sydän- ja verenkiertoelimistön sairauksiin, korkeaan verenpaineeseen, diabetekseen ja muihin sairauksiin (Koch & Britton 2005; Rankinen & Bouchard 2005, 45).

### **3.1 Aerobisen kapasiteetin periytyminen**

Monet fyysiseen suorituskyykyyn liittyvät ominaisuudet ovat osin perintötekijöiden määräämiä (McArdle ym. 2015, 240.). Tällainen ominaisuus on myös aerobinen kapasiteetti, joka voidaan jakaa synnynnäiseen aerobisen kapasiteetin tasoon ja adaptoituvaan, harjoittelulla aikaansaatuun, aerobisen kapasiteetin tasoon. Synnynnäisen aerobisen kapasiteetin taso on ainoastaan perintötekijöiden säätelemää, mutta adaptoituvan aerobisen kapasiteetin tasoon vaikuttavat sekä geeniperimä että harjoittelu (Koch & Britton 2001). Näin ollen jokaisen yksilön kunto paranee aerobisella harjoittelulla ja jokainen yksilö saa terveyshyötyjä aerobisesta harjoittelusta, mutta perintötekijöiden vuoksi harjoitusvasteissa on nähtävissä paljon vaihtelua yksilöiden välillä (McArdle ym. 2015, 240.).

Perinnöllisyys selittää  $VO_{2max}$ :sta noin 20–30% ja maksimisykkeestä noin 50 %. Muita maksimaalisen aerobisen kapasiteetin tasoon vaikuttavia tekijöitä ovat liikunnan tyyppi, harjoittelutaso, sukupuoli, henkilön koko ja ruumiinrakenne sekä ikä (McArdle ym. 2015, 238–240).

### **3.2 Aerobisen kapasiteetin ja harjoittelun vaikutukset rasvakudokseen**

Fyysinen aktiivisuus ja hyvä aerobinen kunto vähentävät kuolleisuutta ja riskiä sydän- ja verisuoni- sekä aineenvaihduntasairauksiin. Yhteys näyttää selittyvän kehon koostumuksen ja edellä mainittujen sairauksien riskitekijöiden, kuten veren rasva-arvojen suotuisilla muutoksilla aktiivisilla ja hyväkuntoisilla vähemmän liikkuviin ja huonokuntoisimpiin verrattuna (Leskinen ym. 2010).

Aerobinen harjoittelu tuottaa sekä akuutteja että kroonisia vaikutuksia rasvakudokseen. Harjoittelu vaikuttaa adipokiinien eli rasvakudoksen hormonien pitoisuuteen riippuen harjoittelun intensiteetistä ja kestosta sekä mittaustavasta. Adipokiineilla, kuten leptiinillä, tuumorinekroositekijä alfalla (TNF- $\alpha$ ), adiponektiinillä ja interleukiini-6:lla (IL-6), on sekä paikallisia että systeemisiä tehtäviä elimistössä. Paikallisesti ne säätelevät rasvasolujen

lipolyysiä ja erilaistumista sekä triasyyliglyserolien synteesiä (Stanford ym. 2015). Lipolyysissä triglyseridit eli varastorasvat hajoavat vapaiksi rasvahapoiksi ja glyseroliksi, minkä jälkeen rasvahapot kulkeutuvat energianlähteeksi esimerkiksi luurankolihakseen (Thompson ym. 2012). Systemisesti adipokiinit vaikuttavat aivojen ruokahalun ja energiatason säätelyyn muun muassa immuunitoiminnan ja insuliiniherkkyyden kautta (Carey 2005, 303). Esimerkiksi lisääntyneellä adiponektiini pitoisuudella on insuliiniherkkyyttä parantava vaikutus (Stanford ym. 2015).

Pitkäaikainen aerobinen harjoittelu lisää energiankulutusta ja energiansaannin pysyessä pitkään matalampana kuin energiankulutus rasvamassan määrä alkaa vähentyä. Lisäksi aerobinen harjoittelu, kenties rasvamassan vähentymisen ansiosta, lievittää rasvakudoksen tulehdustilaa, lisää sen herkkyyttä kiertäville hormoneille sekä vaikuttaa adipokiinien ilmentymiseen ja erittymiseen (Thompson ym. 2012). Leptiinipitoisuus korreloi rasvan määrän kanssa, joten rasvan määrän vähentyessä myös leptiinipitoisuus vähenee (Carey 2005, 303). Lisäksi aerobinen harjoittelu lisää mitokondrioiden biogeneesiin liittyvien geenien ilmentymistä, ja rasvakudoksen mitokondrioiden aktiivisuutta (Stanford ym. 2015). Fyysiseltä aktiivisuudeltaan eroavilla kaksosilla havaitaan myös rasvakudoksen, tiettyjen rasva-aineenvaihduntaan ja aminohappoaineenvaihduntaan liittyvien, geenien ilmentymisessä eroja (Leskinen ym. 2010; Campbell ym. 2013).

#### **4 ROTTAMALLI TUTKIMUKSESSA**

Monien sairauksien perinnöllisyyttä on haastavaa tutkia, sillä niiden syntyyn vaikuttavat sekä geneettiset että ympäristötekijät (Koch & Britton 2001). Tutkimustyöhön kasvatetun koe-eläinrotan (*Rattus norvegicus*) avulla voidaan tutkia monitekijäisten ominaisuuksien syntyä luomalla keinotekoisesti risteytettyjä rottakantoja, jotka ilmentävät haluttua fenotyyppiä, esimerkiksi tiettyä sairautta. Tällaisilla rottamalleilla on tutkittu muun muassa erilaisia sairauksia, kuten korkeaa verenpainetta, diabetesta ja syöpiä (James & Lindpaintner 1997). Lisäksi kasvattamalla koe-eläimiä laboratorio-olosuhteissa voidaan säädellä ympäristöolosuhteita (Koch & Britton 2001).

Yleisesti aerobisen kapasiteetin tai liikuntaharjoittelun ja terveystekijöiden yhteyksiä on tutkittu HCR- ja LCR -rottakantojen vastakkainasettelulla. Näitä tutkimuksia on toteutettu perimän ja terveystekijöiden tarkasteluun sekä perimän, liikunnallisen harjoittelun ja terveystekijöiden tarkasteluun. Seuraavassa kappaleessa esitellään ainoastaan tässä pro gradu työssä käytettyjen rottakantojen valintaprosessi.

#### **4.1 LCR ja HCR – rottakantojen valintaprosessi**

Koch & Britton (2001) kehittivät rottamallin, jossa keinotekoisesti valikoimalla rottia matalan ja korkean aerobisen kapasiteetin avulla kahteen kantaan saataisiin esiin synnyntäisen aerobisen kapasiteetin vaikutuksia terveyteen ja sairastumisriskiin. Vuonna 1996 he aloittivat laajan valikoimisprosessin geneettisesti heterogeenisillä N:NIH (National Institutes of Health) rotilla käyttäen maksimaalista juoksumattotestiä. Kaikki rotat perustajapopulaatiosta (naaraita 96, uroksia 96) edustivat eri sukuja, jotta geneettinen vaihtelevuus olisi mahdollisimman laaja. Rotat suorittivat viisi maksimaalista aerobisen kapasiteetin testiä juoksumatolla viitenä eri päivänä. Jokainen juoksumattotesti aloitettiin nopeudella 10 metriä minuutissa ja nopeutta lisättiin aina metri minuutissa joka kahden minuutin välein. Kaltevuus koko testin ajan oli 15°. Aerobisen kapasiteetin mittana käytettiin juostua matkaa metreissä uupumukseen asti. Tulokseksi valittiin paras juoksumatka viidestä testistä. Tällä pyrittiin minimoimaan ympäristötekijöiden vaikutus. Perustajapopulaation jäsenten keskimääräinen tulos oli  $355 \pm 11$  metriä, naaraiden suoritusten ( $380 \pm 15$  m) ollessa parempia kuin urosten ( $327 \pm 16$  m) (Koch & Britton 2001).

Perustajapopulaatiosta valikoitiin tämän maksimaalisen juoksumattotestin avulla molemmista sukupuolista aerobiselta kapasiteetiltaan 13 huonointa (LCR, low capacity runner) ja 13 parasta (HCR, high capacity runner) yksilöä. Sekä LCR -rottien että HCR -rottien annettiin pariutua satunnaisesti keskenään tuottamaan ensimmäisen sukupolven LCR- ja HCR -rottakannat. Seuraavalle sukupolvelle suoritettiin samanlainen maksimaalinen juoksupyörätesti, jonka perusteella valittiin yksi koiras ja yksi naaras jokaisesta 13 perheestä jatkamaan LCR- tai HCR -rottakantoja. Seuraavissa rottakannoissa LCR -rottia risteytettiin keskenään ja HCR -rottia keskenään (Koch & Britton 2005).

## 4.2 LCR – ja HCR – rottakantojen erot

Koch & Britton (2005) testasivat eroja sydän- ja verisuonielimistön toiminnassa, hiilihydraattiaineenvaihdunnassa ja mitokondrioiden proteiineissa sekä sairauksien riskitekijöissä kantojen välillä. Kuuden sukupolven jälkeen LCR- ja HCR -rotat erosivat aerobiselta kapasiteetiltaan 171 %. LCR -rottien suoritus oli tällöin  $310 \pm 8$ m ja HCR -rottien  $839 \pm 21$ m (Koch & Britton 2001) Yhdentoista sukupolven jälkeen LCR- ja HCR -rotat erosivat aerobiselta kapasiteetiltaan jo 347 %. Tämän sukupolven LCR -rottien uupumukseen asti juostu matka oli  $191 \pm 70$ m ja  $VO_{2max}$  -arvo  $43 \pm 2$  ml/min/kg kun taas HCR -rottien uupumukseen asti juostu matka oli  $853 \pm 315$ m ja  $VO_{2max}$  -arvo  $68 \pm 3$  ml/min/kg. LCR -rottien verenpaine oli korkeampi kuin HCR -rottien lisäen sydän- ja verisuonisairauksien riskiä (Koch & Britton 2005).

Rottien kehonpainot korreloivat maksimaalisen juoksumattotestin tulosten kanssa, sillä LCR -rottien kehopaino kasvoi ja HCR -rottien väheni jokaisen sukupolven ajan (Koch & Britton 2001). Yhdennentoista sukupolven LCR -urosrotat painoivat 39 % enemmän kuin HCR -urosrotat, LCR -naarasrotat puolestaan painoivat 24 % enemmän kuin HCR -naarasrotat. LCR -rotilla havaittiin myös kohonneet veren glukoosi- ja insuliinipitoisuudet verrattuna HCR -rottiin, osoittaen että LCR -rotat olivat insuliiniresistentimpiä kuin HCR -rotat. Testattaessa kuuden mitokondrioiden biogeneesin ja toiminnan kannalta tärkeän proteiinin pitoisuuksia havaittiin, että ne olivat selvästi alhaisemmat LCR -rotilla HCR -rottiin verrattuna (Koch & Britton 2005).

## 5 TUTKIMUSKYSYMYKSET JA -HYPOTEESIT

Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin suoliston mikrobiston koostumuksen ja viskeraalisen rasvakudoksen tulehdukseen ja rasva-aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentymisen eroja synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetilta poikkeavilla rotilla. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää suoliston mikrobiston koostumuksen yhteyttä viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymiseen. Tämän pohjalta muodostettiin kolme tutkimuskysymystä

## **1. Onko suoliston mikrobiston koostumuksessa eroja synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavilla rotilla?**

**Tutkimushypoteesi:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavien rottien suoliston mikrobistossa on eroja.

Yksi aikaisempi tutkimus synnynnäisen aerobisen kapasiteetin yhteydestä suoliston mikrobistoon on havainnut eroja LCR - ja HCR -rottien välillä (Cox-York ym. 2015). Hieman useammat tutkimukset ovat puolestaan havainneet, että liikuntaharjoittelulla on yhteys suoliston mikrobiston koostumukseen rotilla (Peritz ym. 2014; Lambert ym. 2015; Liu ym. 2015). Synnynnäisen aerobisen kapasiteetin yhteyttä suoliston mikrobiston koostumukseen ei ole siis juuri tutkittu, mutta edellisten tutkimusten perusteella suoliston mikrobistossa saattaisi olla eroja synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan eroavilla rotilla. Lisäksi rottatutkimuksin on havaittu, että synnynnäisellä aerobisella kapasiteetilla olisi huomattava merkitys terveydelle ja sairauksien kehittymiselle (Koch & Britton 2005). Suoliston mikrobisto vaikuttaa myös terveyteen ja sairastumisriskiin (Cani & Delzenne 2009; Nicholson ym. 2012), joten näiden kahden tekijän väliltä voisi löytyä yhteyttä.

**H0:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavilla rotilla ei ole eroja suoliston mikrobiston koostumuksessa.

**H1:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavilla rotilla on eroja suoliston mikrobiston koostumuksessa.

## **2. Onko synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavien rottien viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä eroja?**

**Tutkimushypoteesi:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavien rottien viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä on eroja.

Aerobisella harjoittelulla on monia vaikutuksia rasvakudokseen (Carey 2005, 303; Thompson ym. 2012; Stanford ym. 2015) ja monet näistä vaikutuksista voivat selittyä muuttuneella geenien ilmentymisellä (Leskinen ym. 2010; Campbell ym. 2013). Lisäksi LCR -rotat ovat olleet lihavampia kuin HCR -rotat (Koch & Britton 2001) ja



lihavuudessa tiettyjen geenien ilmentyminen on muuttunut (Nadler ym. 2000; Baranova ym. 2005).

**H0:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavien rottien viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä ei ole eroja.

**H1:** Synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavien rottien viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä on eroja.

### **3. Onko viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymistasojen ja suoliston mikrobiston välillä yhteys synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetilta poikkeavilla rotilla?**

**H0:** Geenien ilmentymistasoilla ja suoliston mikrobiston välillä ei ole yhteyttä.

**H1:** Geenien ilmentymistasoilla ja suoliston mikrobiston välillä on yhteys.

## **6 TUTKIMUSMENETELMÄT**

### **6.1 Koe-eläimet ja näytteiden keruu**

Tässä tutkimuksessa käytetyt urospuoliset rotat olivat noin 8 viikon ikäisiä (HCR 8,0 viikkoa, LCR 7,8vko) geneettisesti heterogeenisten N:NIH -rottien jälkeläisiä 36. sukupolvessa (eläinkoeluvan numero ESAVI/7647/04.10.07/2014). Ne koostuivat kahdesta aerobiselta kapasiteetiltaan eroavasta rottalinjasta, LCR - (low capacity runner) ja HCR - (high capacity runner) -rotista. Näiden rottien aerobista kapasiteettia ei ollut testattu, mutta rottien vanhempien (sukupolvi 35) aerobinen kapasiteetti oli testattu ja niiden aerobinen kapasiteetti erosi selvästi kantojen välillä: 35. sukupolvessa naaras HCR -rottien paras juostu matka oli keskimäärin 2410 metriä ja uros HCR -rottien 1974m, kun taas naaras LCR -rottien paras juostu matka oli 213 metriä ja uros LCR -rottien 191m. Rotat tuotiin Suomeen Michiganin yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan laboratorion. Rottia säilytettiin pareittain häkeissä Jyväskylän yliopiston koe-eläintiloissa, jossa valo-pimeärytmi oli 12:12 tuntia, ilman kosteus rottien tiloissa noin 75 % ja lämpötila 20 celsiusastetta (°C). Rotilla oli häkeissään vettä ja ruokaa.

Alun perin koko AFIS -tutkimuksessa oli mukana yhteensä 42 rottaa. Tähän tutkimukseen valikoitui satunnaisesti 21 rottaa. Muutamalla rottayksilöllä havaittiin kuitenkin häiriökäyttäytymistä, joten ne poistettiin tutkimuksesta. Joidenkin yksilöiden kohdalta puuttui myös mittauksia, joten lopullinen rottayksilömäärä oli 18, johon kuului kahdeksan HCR- ja 10 LCR- rottaa. HCR -rotat olivat vieroituspainoltaan keskimäärin 70 grammaa (61,8–77,9g) ja LCR -rotat 67g (64,4–68,7g). Jokaiselle rotalle luotiin tunnistusta varten ID -koodi.

Rottien lopetus sekä näytteiden otto suoritettiin huhtikuussa 2015. Paksusuolesta kerättiin ulostenäytteet, jotka säilöttiin -70 °C:een. Näytteet lähetettiin Turun yliopiston Lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian osastolle suoliston mikrobiston sekvenssianalyysiin. Lisäksi rotilta kerättiin viskeraalista rasvakudosta sekä suoritettiin sydäimestä glukoosimittaus ja verinäytteen otto. Verinäytteestä mitattiin seuraavien veren rasva-arvojen pitoisuuksia: kolesteroli, glyseroli, HDL ja LDL sekä vapaat rasvahapot (FFA) ja triglyseridit.

## **6.2. Suoliston mikrobiston koostumuksen analysointi**

Ulostusnäytteet käsiteltiin Turun yliopiston Lääketieteellisen mikrobiologian ja immunologian osastolla. Näytteet punnittiin -helmiputkiin (MOBIO) ja homogenisoitiin PowerLyzer™ 24 Bench Top Bead-Based -homogenisaattorilla (MOBIO). Tämän jälkeen näytteistä eristettiin bakteeriston DNA käyttäen GXT stool extraction kittiä ja Geno Xtract-automaattilaitetta (Hain Lifescience, Nehren Germany). DNA-pitoisuus mitattiin fluorimetrisesti Qubit 2.0 dsDNA HS assay kit -laitteella (Life Technologies) ja säilöttiin -80 °C: een (Toivonen ym. 2014).

Illumina MiSeq sekvensointia varten kirjastot valmistettiin PCR:lla käyttäen dual-indeksoituja alukkeita, jotka sisältävät adapterialueen ja erityiset indeksit. Bakteerien 16S rRNA geenin V4-V5 alueita monistettiin KAPA HiFi reagenssia (KAPA Biosystems) (Rintala, A. ym. julkaisematon). Käytetyt alukesekvenssit on esitetty taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Kirjastojen valmistuksessa käytetyt alukesekvenssit (Rintala, A. ym. julkaisematon).

Forward	Reverse
5' AATGATACGGCGACCACCGGATCTAC i5TATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGC GGTAA-3'	5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATi7 AGTCAGTCAGGCCCGTCAATTCMTT TRAGT-3'

i5 ja i7= kahdeksan nukleotidin indeksi sekvenssejä, joilla tunnistetaan sekvenssit alkuperäisestä DNA näytteestä

PCR-tuotteet puhdistettiin Agencourt AMPure XP Magnetic beads -menetelmällä (Beckman Coulter, Inc.) käyttäen DynaMag™-96 magnetic plate -laitetta (Life Technologies). PCR-tuotteen pituus ja DNA:n yhtenäisyys tarkistettiin TapeStation -laitteella (Agilent Technologies Inc.) ja puhtaasta tuotteesta mitattiin DNA-pitoisuus Qubit 2.0 fluorometrillä (Life Technologies) (Rintala, A. ym. julkaisematon).

Tämän jälkeen näytteet sekvensoitiin valmistajan ohjeiden (Illumina MiSeq) mukaisesti. Saadun raakadatan laatu tarkistettiin FastQC -ohjelmalla (v.0.10.1), jonka jälkeen suoritettiin data-analyysi Qiime -ohjelmalla (v.1.9.1) Turun yliopiston Biotekniikan keskuksessa bioinformaatikon toimesta (Rintala, A. ym. julkaisematon). Lisäksi Turun yliopiston Biotekniikan keskuksessa suoritettiin data-analyysi Kraken -ohjelmalla bioinformaatikon toimesta.

### 6.3 Viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen analysointi

Gradun tekijä suoritti viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen erojen analysoimisen Jyväskylässä terveystieteiden laboratoriossa. HCR- ja LCR- rottakantojen välillä tarkasteltiin viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen eroja seitsemän tulehdukseen ja rasva-aineenvaihduntaan liittyvän geenin kohdalla. Näistä geeneistä *TLR4*, *TLR5*, *IL1B* ja *CD45* olivat tulehdukseen liittyviä genejä ja *SCD1*, *FASN* ja *AdipoQ* rasva-

aineenvaihduntaan liittyviä genejä. Nämä geenit oli valittu, koska niiden ja suoliston mikrobiston välillä oli havaittu yhteys (Cani ym. 2009; Shaw ym. 2012; Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014; Pekkala ym. 2015; Taira ym. 2015). Lisäksi mukana oli housekeeping geeni *ACTB* (beta-aktiini), johon muiden geenien arvot normalisoitiin. *ACTB* on yleisesti käytetty housekeeping geeni, joka ilmentyy solussa aina, solun sisäisistä olosuhteiden muutoksista huolimatta (De Jonge ym. 2007).

### 6.3.1 RNA:n eristäminen, cDNA synteesi ja kvantitatiivinen Real-Time PCR

Totaali-RNA:n eristys näytteestä tehtiin käyttäen TRIzol®- reagenssi menetelmää (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ensin 100 milligrammaa (mg) pulverisoitua kudosta homogenisoitiin yhdessä millilitrassa (ml) TRI -reagenssia käyttäen Qiagen Tissuelyser -laitetta 2 minuuttia, 20 hertsissä (Hz). Näyteputkiin lisättiin 200 mikrolitraa (µl) kloroformia per yksi millilitra TRI®-reagenssia, jonka jälkeen näytteitä ravisteltiin käsin 15 sekunnin ajan ja annettiin inkuboitua huoneen lämmössä 2-3 minuuttia. Näytteet sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 12,000 (12,000 × g) 15 minuutin ajan 4 °C:n lämpötilassa. Tämän jälkeen erottuva nestefaasi voitiin poistaa näyteputkesta pipetoimalla. Seuraavaksi nestefaasiin lisättiin 500 µl 100 % isopropanolia ja annettiin inkuboitua 10 minuuttia huoneen lämmössä. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin 12,000 × g 10 minuutin ajan 4 °C:ssa. Yläliuos (supernatantti) poistettiin näyteputkesta ja jäljelle jäävä RNA pelletti pestiin 1 ml:ssa 75 % etanolia ja vorteksoitiin lyhyesti. Näytteet sentrifugoitiin 7500 × g 5 minuuttia 4 °C:ssa ja etanoli poistettiin. RNA pellettiä kuivattiin 5-10 minuuttia, jonka jälkeen se suspensoitiin 30 µl:aan RNAasi -vapaata vettä ja ravistettiin voimakkaasti. RNA -pitoisuus määritettiin spektrofotometrillä absorbanssissa (optical density, OD) 260 nanometriä (nm). RNA:n ollessa puhdas OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> -suhde oli välillä 1.8–2.0.

Käänteistä cDNA synteesiä varten totaali-RNA:lle (1 µl) suoritettiin käänteistranskriptio käyttäen High-capacity cDNA synthesis kittiä (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA synteessin liuos ja qPCR:n reaktioliuos on esitetty taulukossa 4. cDNA synteisiin käytettiin automatisoitua Eppendorf -lämpösyklilaitetta seuraavissa oloissa: 10 min +25 °C:ssa, 120 min +37 °C:ssa, 5 min +85 °C:ssa, ∞ +4 °C:ssa. Lopuksi cDNA varastoitettiin -20 °C:een myöhempää käyttöä varten.

TAULUKKO 4. Vasemmalla liuos cDNA synteesiin. Oikealla liuos Real-Time PCR reaktioon.

Reaktio liuos cDNA synteesissä		qPCR:n reaktion liuos	
10xRT puskuria	2,0 µl	iQ SYBR	12,5 µl
100 mM dNTP mix	0,8 µl	10 µM Fwd primeria	1,25 µl
10 x Primeria	2,0 µl	10 µM Rev primeria	1,25 µl
RT entsyymiä	1,0 µl	H <sub>2</sub> O	5,0 µl
H <sub>2</sub> O	4,2 µl		

RT puskuri= reaktiopuskuri; dNTP= deoksinukleosiditriposfaattit; RT entsyymi= käänteiskopioijaentsyymi; Fwd= forward; Rev= reverse

qPCR -analyysiä varten qPCR:n reaktioliuosta pipetoitiin 20 µl per kaivo ja lisättiin 5 µl cDNA laimennosta. Real-time PCR -analyysi suoritettiin käyttäen suunniteltuja alukkeita (iQ SYBR supermix) ja CFX96™ Real-time PCR -tunnistusjärjestelmää (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Geenien alukesekvenssit on esitetty taulukossa 5. ja kiinnittymislämpötilat taulukossa 6. Kukin näyte analysoitiin kahtena kappaleena, ja PCR -syklin parametrit olivat seuraavat: +95 °C:ssa 10 minuuttia, 40 sykliä +95 °C:ssa 10 sekuntia, +53–61 °C:ssa (geenistä riippuen) 30 s ja +72 °C:ssa 30 s ja lopuksi 5 s +65 °C:ssa. Suhteelliset ilmentymistasot kullekin geenille laskettiin standardikäyrän avulla ja ilmentyminen normalisoitiin beta-aktiiniin (*ACTB*).

TAULUKKO 5. Alukesekvenssit geneittäin.

rTLR5 fwd new	CCGAGGTTGTAACCTTACCCAG
rTLR5 rev new	GTCAAGCGAGCATACTGGGTC
rACTB fwd	GGCACCACACTTTCTACAAT
rACTB rev	AGGTCTCAAACATGATCTGG

rAdipoQ fwd	AATCCTGCCAGTCATGAAG
rAdipoQ rev	CATCTCCTGGGTCACCCTTA
rCD45 fwd	CCGTTGTACACCAGAGATGA
rCD45 rev	TCCCAAATCAGTCTGCAC
rIL1B fwd	CAACAAAAATGCCTCGTGC
rIL1B rev	TGCTGATGTACCAGTTGGG
rTLR4 fwd	GAGACCAGGAAGCTTGAATCCCTGC
rTLR4 rev	TGTCTCCACAGCCACCAGATTCTC

TAULUKKO 6. Kiinnittymislämpötilat ( $T_m$ ).

Geeni	Kiinnittymislämpötilat ( $T_m$ ) C°
<i>ACTB, TLR4, IL1B, SCD1, FASN</i>	60
<i>CD45</i>	53
<i>ADIPOQ</i>	55
<i>TLR5</i>	61

## 6.4 Tilastolliset analyysit

Tilastoanalyysiä varten käytettiin IBM SPSS Statistics 22 -ohjelmaa (22.0, IBM Analytics, United States). Muuttujiin tutustuttiin kuvailevien tunnuslukujen avulla ja niiden normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilk -testillä. Nollahypoteesina testissä oli ”muuttuja noudattaa normaalijakaumaa”. Merkitsevyys arvo alle 0,05 tarkoitti sitä, että muuttuja ei noudattanut normaalijakaumaa eli nollahypoteesi hylättiin (Metsämuuronen 2005, 593–594). Osa tutkimuksen muuttujista noudatti ja osa ei noudattanut normaalijakaumaa. Lisäksi koska aineisto oli pieni, päädyttiin aineiston tilastollisessa analysoinnissa käyttämään parametrittomia testejä. Tilastollisen merkitsevyyden rajaksi asetettiin  $p \leq 0,05$  (Metsämuuronen 2005, 415). HCR - ja LCR -rottien välillä vertailtiin niin vieroitus- ja

kuolinpainoa, kuolinikää ja seerumien glukoosipitoisuutta sekä veren rasva-arvoja käyttäen parametritonta Mann-Whitneyn U-testiä. Lisäksi samaa parametritonta testiä käytettiin vertailtaessa suoliston mikrobistokoostumuksen ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen tilastollisen merkitsevyyden eroja HCR - ja LCR -rottakantojen välillä. Mann-Whitney U -testillä testattiin muuttujien mediaanien eroja kahden ryhmän välillä. Aineisto asetettiin suuruusjärjestykseen tutkittavan muuttujan suhteen ja havainnoille annettiin järjestysnumero. Ryhmien välillä ei ollut eroa, jos järjestykseen asetetut havainnot olivat jakautuneet tasaisesti. Jos havainnot olivat järjestyneet epätasaisesti, ryhmien välillä oli eroja. Toisin sanoen U-arvo kuvasi suuruusjärjestykseen ryhmitellyssä aineistossa, kuinka monta kertaa A -ryhmän havainto edelsi B -ryhmän havaintoa (Metsämuuronen 2005, 360–362).

Spearmanin järjestykskorrelaatiokertoimen avulla tutkittiin veren rasva-arvojen yhteyttä sekä viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymiseen, että suoliston mikrobistoon sekä yhteyttä suoliston mikrobiston ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen välillä. Viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteyttä testattiin Spearmanin järjestykskorrelaatiolla erikseen sekä Qiime -analyysin, että Kraken -analyysin suoliston mikrobituloksiin. Spearmanin sopi korrelaatioiden tutkimiseen aineiston ollessa pieni. Siinä aineisto jaettiin muuttujien mukaan suuruusjärjestykseen ja muuttujille annettiin järjestysluvut (1, 2, ..., N), kuten tehtiin Mann-Whitney U -testin kohdallakin. Järjestyslukujen erotus laskettiin tämän jälkeen havaintopareittain (Metsämuuronen 2005, 1091–1094).

## **7 TULOKSET**

### **7.1 Paino, glukoosi ja veren rasva-arvot**

HCR -rottia oli tutkimuksessa kahdeksan yksilöä ja LCR -rottia 10 yksilöä. HCR - ja LCR -rotat olivat saman ikäisiä. LCR -rotat olivat vieroituspainoltaan hiukan HCR -rottia kevyempiä, mutta kuolinpainoltaan LCR -rotat olivat HCR -rottia hiukan painavampia. Erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Myös veren glukoosi arvo oli korkeampi LCR -rotilla HCR -rotiin verrattuna, mutta ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi (taulukko 7).

TAULUKKO 7. Vieroitus- ja kuolinpaino, kuolinikä sekä glukoosi.

	HCR keskiarvo (95 % CI) N=8	LCR keskiarvo (95 % CI) N=10	p-arvo
Vieroituspaino (g)	69,6 (61,8–77,9)	66,7 (64,4–68,7)	,354
Kuolinpaino (g)	182,9 (169,3–195,6)	183,4 (170,2–197,6)	,929
Kuolinikä (vko)	8,0 (7,9–8,1)	7,8 (7,7–7,9)	,173
Glukoosi (mmol/L)	8,03 (7,4–8,6)	8,6 (7,9–9,4)	,534

Arvot testattu Mann Whitney U testillä,  $p \leq 0,05$ . g= gramma, vko= viikko, mmol/L= millimoolia litrassa.

Veren rasva-arvoista mitattiin kokonaiskolesteroli, glyseroli, HDL - ja LDL -arvot sekä vapaat rasvahapot (FFA) ja triglyseridit. Kokonaiskolesteroli sekä HDL - ja LDL -arvot olivat tilastollisesti merkitsevästi korkeampia LCR -rotilla, FFA ja triglyseridit olivat tilastollisesti merkitsevästi korkeampia puolestaan HCR -rotilla (taulukko 8).

Veren rasva-arvoissa havaittiin rasvahapoissa yksi selvästi poikkeava tulos (outlier), joka poistettiin analyyseistä. Positiivista korrelaatiota löytyi kokonaiskolesterolin ja geenien *TLR4* ( $p=0,046$ ) ja *TLR5* ( $p=0,012$ ) ilmentymisen välillä ja negatiivista korrelaatiota kokonaiskolesterolin ja geenien *IL1B* ( $p=0,037$ ) ja *CD45* ( $p=0,049$ ) ilmentymisen välillä. Glyseroli korreloi puolestaan positiivisesti geenien *IL1B* ( $p=0,017$ ) ja *CD45* ( $p=0,033$ ) ilmentymisen kanssa ja negatiivisesti geenin *AdipoQ* ilmentymisen kanssa ( $p=0,007$ ). Sekä HDL että LDL korreloivat positiivisesti geenien *TLR4* ( $p=0,023$  ja  $p=0,019$ ), *AdipoQ* ( $p=0,041$  ja  $p=0,007$ ) ja *TLR5* ( $p=0,004$  ja  $p<0,000$ ) ilmentymisen kanssa sekä negatiivisesti



geenin *CD45* (p=0,018 ja p=0,023) ilmentymisen kanssa. Positiivista yhteyttä löytyi geenien *IL1B* (p=0,013) ja *CD45* (p=0,006) ilmentymisen ja FFA -arvojen välillä ja negatiivista yhteyttä geenien *AdipoQ* (p=0,009) ja *TLR5* (p=0,001) ilmentymisen ja FFA -arvojen välillä. Lisäksi triglyseridit -arvot korreloivat negatiivisesti geenien *AdipoQ* (p=0,014) ja *TLR5* (p=0,048) ilmentymisen kanssa (taulukko 9).

TAULUKKO 8. Sydäimestä mitatut veren rasva-arvot.

	HCR keskiarvo (95 % CI) N=8	LCR keskiarvo (95 % CI) N=10	p-arvo
<b>Kolesteroli (mmol/L)</b>	2,1 (1,8-2,4)	2,8 (2,5–3,02)	,016*
<b>Glyseroli (µmol/L)</b>	156,2 (149,6–163,7)	139,1 (122,02–156,3)	,076
<b>HDL (mmol/L)</b>	1,7 (1,4- 1,9)	2,3 (2,1–2,4)	,007*
<b>LDL (mmol/L)</b>	0,3 (0,2-0,3)	0,6 (0,5-0,7)	,001**
<b>FFA (µmol/L)</b>	589,4 (364,8–845,7)	145,2 (122,6–171,2)	,001**
<b>Triglyseridi (mmol/L)</b>	1,1 (0,8-1,3)	0,7 (0,6-0,8)	,033*

Arvot testattu Mann Whitney U testillä, \*p≤0,05= tilastollisesti merkitsevä, \*\*p≤0,001= tilastollisesti erittäin merkitsevä. Mmol/L= millimoolia litrassa, µmol/L= mikromoolia litrassa.

TAULUKKO 9. Korrelaatiomatriisi tulehdukseen ja rasva-aineenvaihduntaan liittyvien viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen ja veren rasva-arvojen yhteydestä. Tummennettuna tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot.

	Kolesteroli		Glyseroli		HDL		LDL		FFA		Triglyseridi	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
<i>TLR5</i>	,577	<b>,012</b>	-	,117	,647	<b>,004</b>	,761	<b>,000</b>	-	<b>,001</b>	-,472	<b>,048</b>
			,383						705			
<i>IL1B</i>	-	<b>,037</b>	,588	<b>,017</b>	-	<b>,012</b>	-	<b>,019</b>	,606	<b>,013</b>	,447	,083
	524				611		579					
<i>CD45</i>	-	<b>,049</b>	,535	<b>,033</b>	-	<b>,018</b>	-	<b>,023</b>	,650	<b>,006</b>	,365	,165
	500				581		565					
<i>TLR4</i>	,476	<b>,046</b>	,228	,362	,533	<b>,023</b>	,547	<b>,019</b>	,000	1,000	-	,839
											,052	
<i>AdipoQ</i>	,401	,099	-	<b>,007</b>	,485	<b>,041</b>	,614	<b>,007</b>	-	<b>,009</b>	-	<b>,014</b>
			612						593		569	
<i>SCD1</i>	,201	,423	-	,265	,216	,390	,240	,336	-	,119	-	,073
			,278						,381		,432	
<i>FASN</i>	-	,881	,098	,708	-	,775	-	,314	,292	,256	,159	,541
	,039				,075		,260					

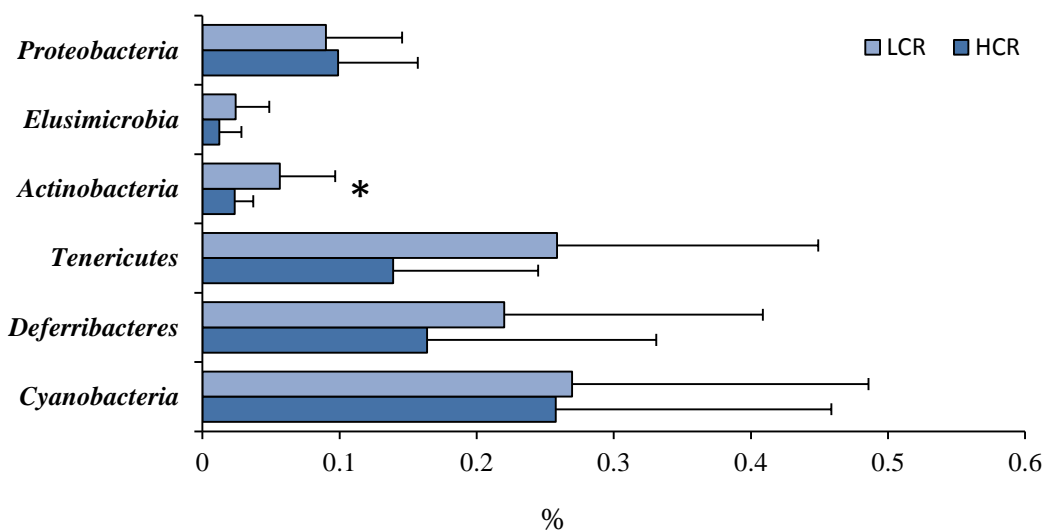
p≤0,05, rho= Spearmanin järjestyskorrelaation.

## 7.2 Suoliston mikrobiston koostumuksen erot

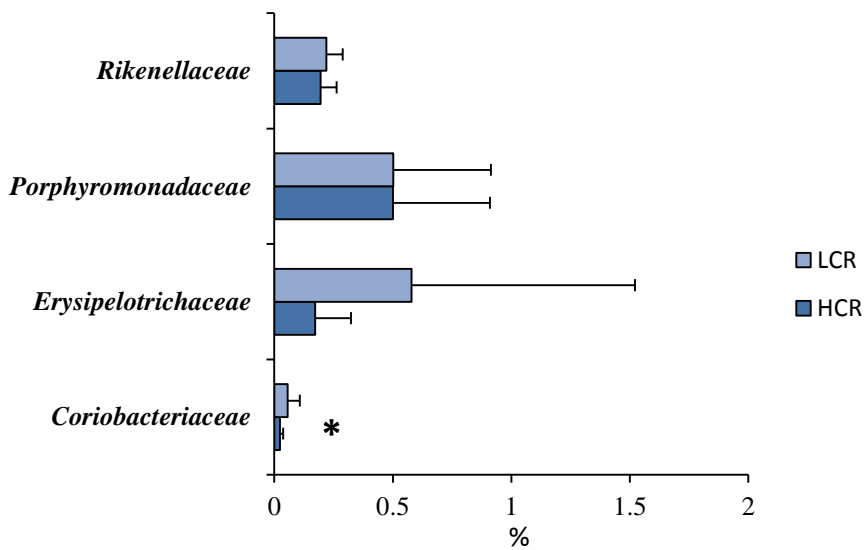
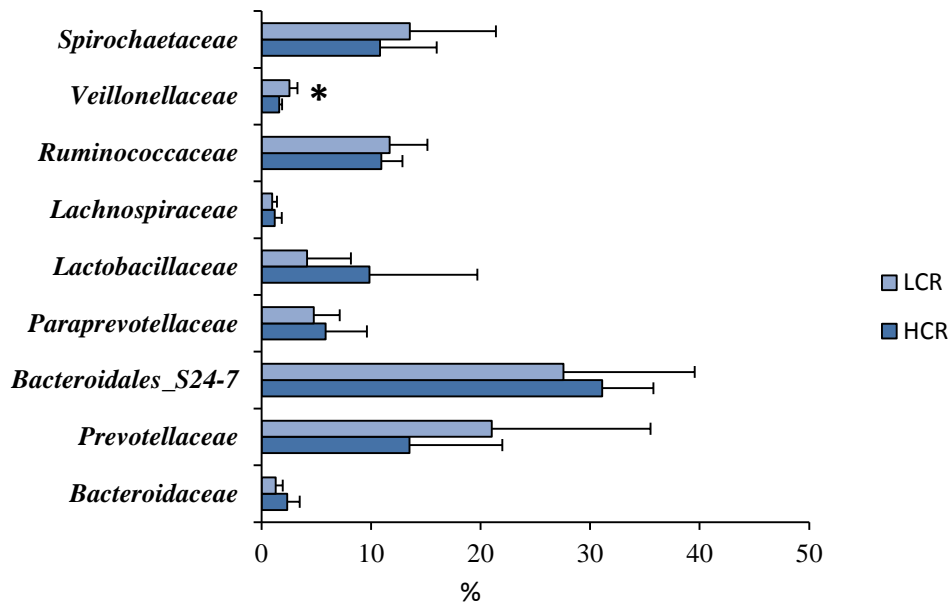
Suoliston mikrobiston koostumus analysoitiin kahdeksalta HCR - ja kymmeneltä LCR -rotan suolistonäytteestä. Analyysiin käytettiin kahta eri bioinformatiikan työkalua Qiimeä ja Krakenia. Arvot on annettu prosentteina OTU:ista eli operationaalisista taksonomisista yksiköistä. Lisäksi tutkittiin tilastollisesti merkitsevien suoliston mikrobiryhmien yhteyttä mitattuihin veren rasva-arvoihin.

### 7.2.1 Qiime

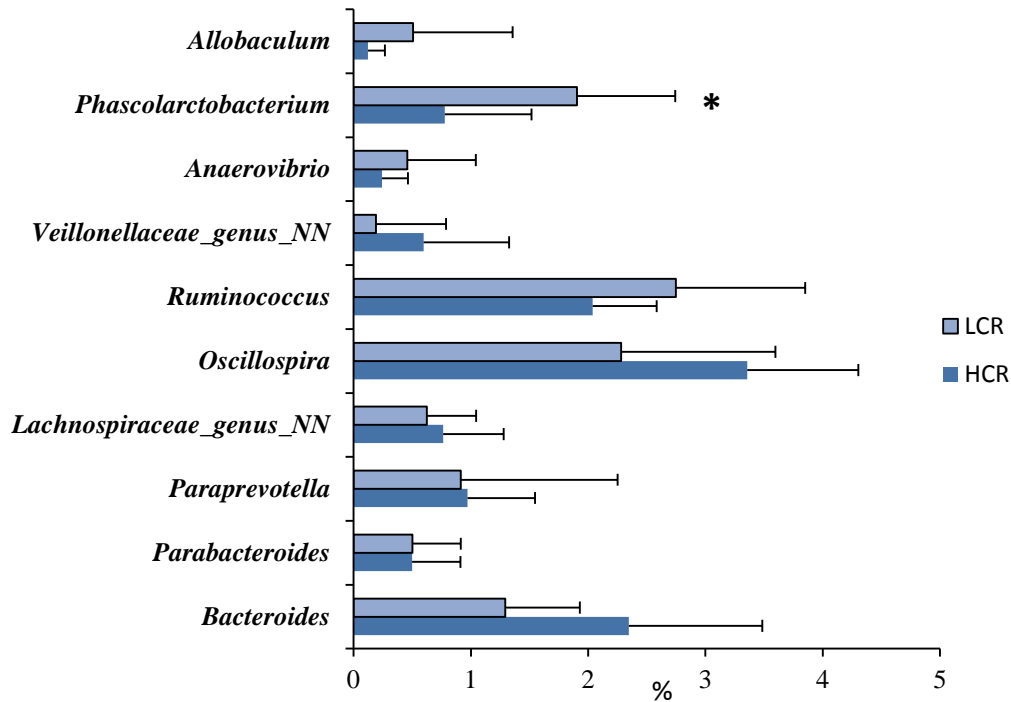
Sekä HCR - että LCR -rottakanoilla oli eniten *Bakteroidetes* -pääjakson bakteereita. Seuraavaksi runsaslukuisimpia pääjaksoja olivat *Firmikuutit* ja kolmanneksi *Spirokeetat* (Liite 1). *Bakteroidetes* -pääjakson bakteereita löytyi hiukan enemmän LCR -rotilta, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä HCR -rottiin verrattuna. Tilastollisesti merkitsevä ero ( $p \leq 0,05$ ) löytyi ainoastaan *Actinobacteria* -pääjakson ( $p=0,041$ ) kohdalla (kuva 3). Tilastollisesti merkitsevä ero HCR- ja LCR -rottien välillä löytyi myös alemmilla taksonomisilla tasoilla eli mikrobiheimojen *Veillonellacea* ( $p=0,007$ ) ja *Coriobacteriacea* ( $p=0,041$ ) (kuva 4) sekä mikrobisuvun *Phascolarctobacterium* ( $p=0,011$ ) (kuva 5) kohdalla HCR- ja LCR -rottien välillä.



KUVA 3. Erot pääjaksoissa Qiime -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista



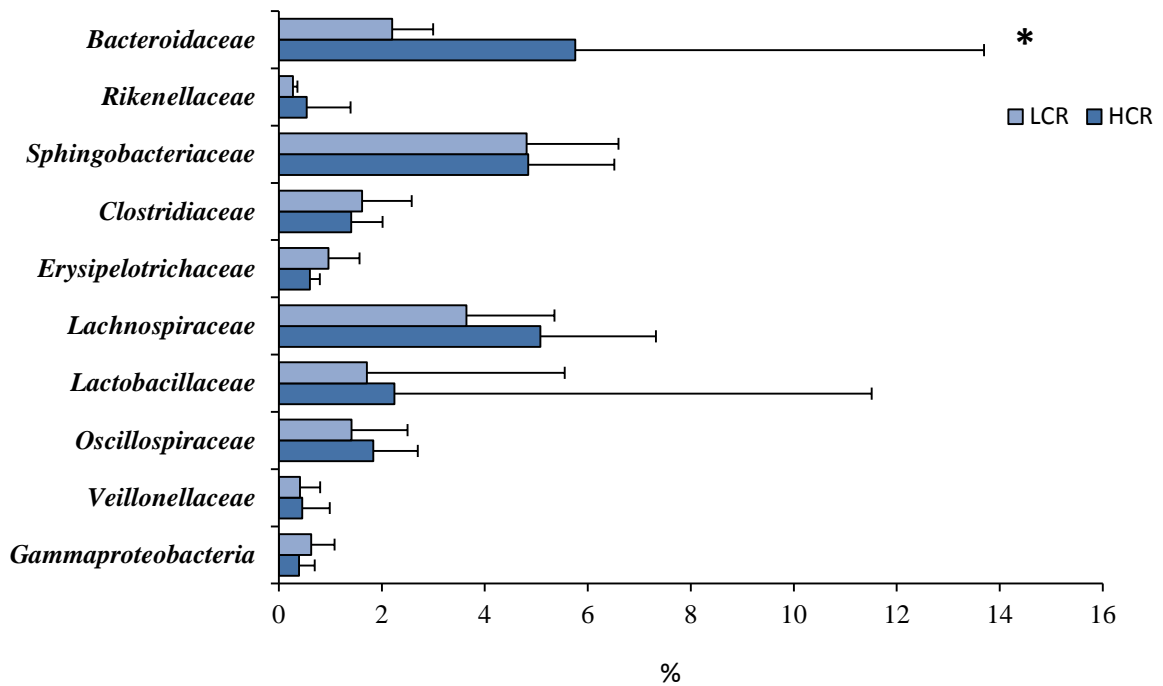
KUVA 4. Erot mikrobiheimoissa Qiime -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista.



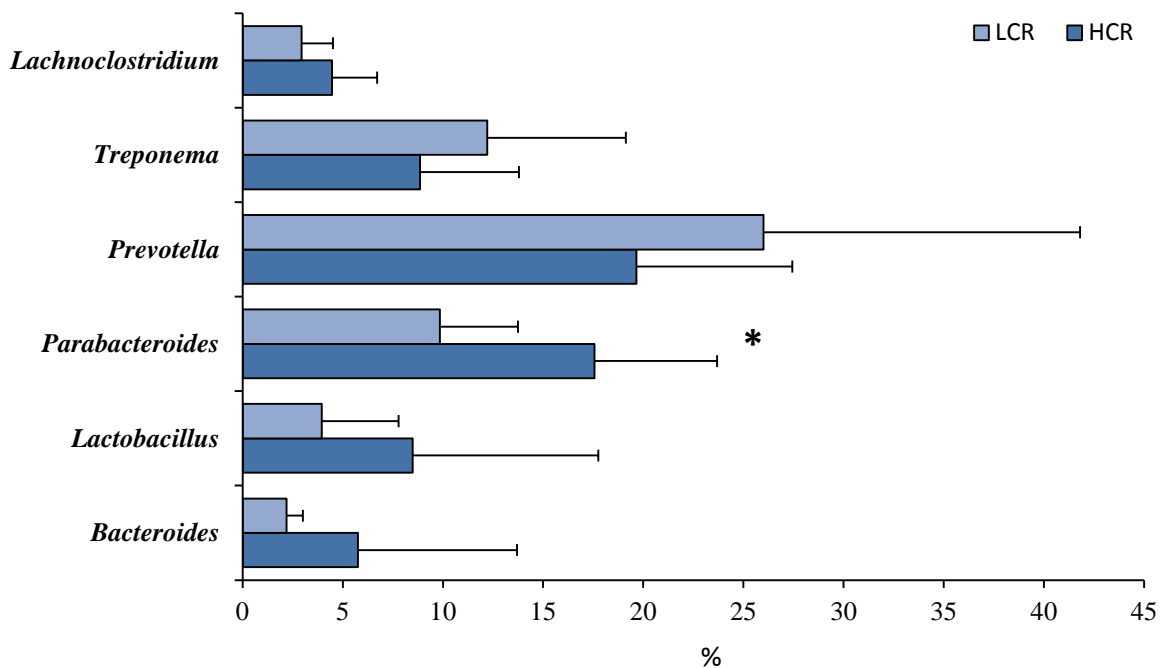
KUVA 5. Erot mikrobisuvuissa Qiime -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista.

## 7.2.2 Kraken

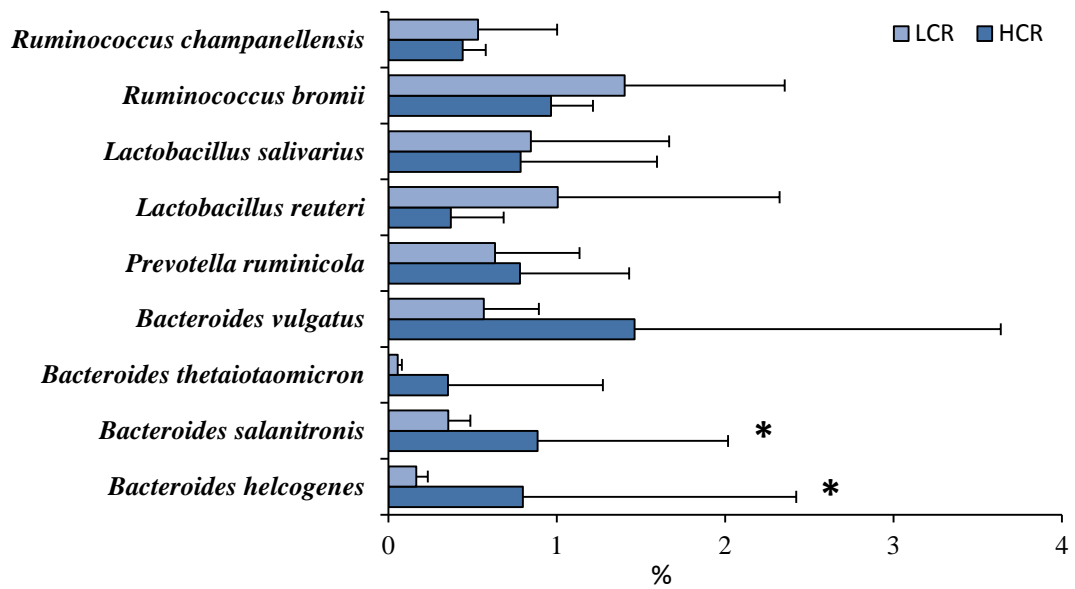
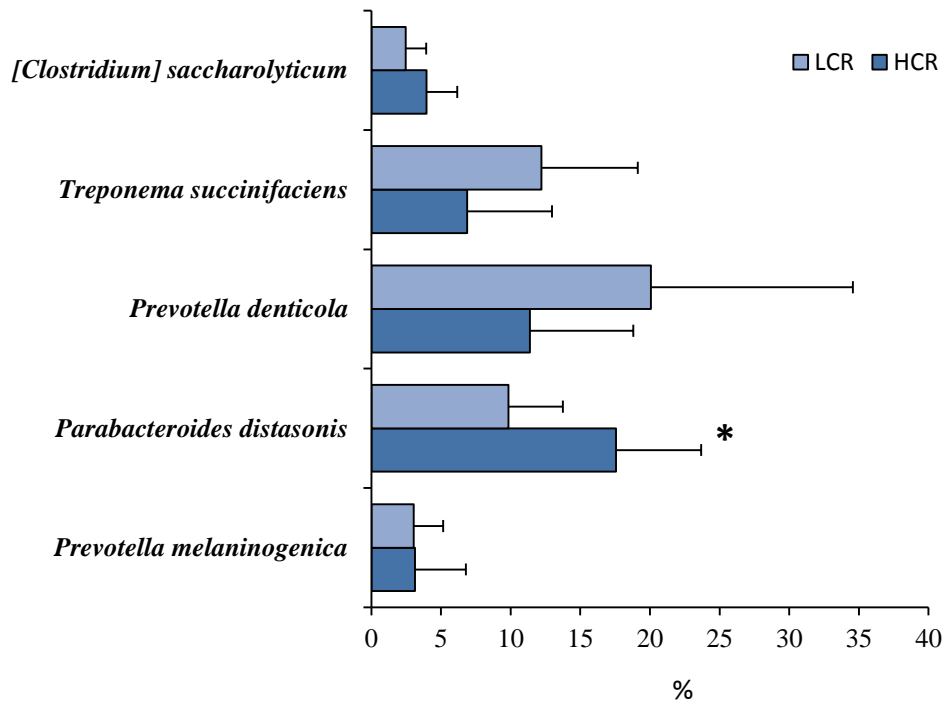
Kraken -analyysissä tarkasteltiin eroja rottakantojen välillä yhdeksän mikrobipääjakson, 16 mikrobiheimon, 12 mikrobisuvun sekä 14 mikrobilajin kohdalla. Kahta mikrobiheimoa 16:sta ei löytynyt yhdeltäkään rotalta, joten lopullisessa analyysissä oli mukana 14 mikrobiheimoa. Myös Kraken -analyysissä runsaslukuisin pääjakso oli *Bakteroidetes* ja seuraavaksi runsaslukuisimmat *Firmikuutit* ja *Spirokeetat* (Liite 2). *Bakteroidetes* -pääjakson bakteereita löytyi hiukan enemmän HCR -rotilta, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevää. Itse asiassa tilastollisesti merkitsevää eroa ei löytynyt yhdenkään mikrobipääjakson kohdalla. *Bacteroidaceae* -heimon ( $p=0,028$ ) (kuva 6), *Parabacteroides* ( $p=0,005$ ) ja *Bacteroides* ( $p=0,028$ ) -sukujen (kuva 7) sekä *Bacteroides helcogens* ( $p=0,011$ ), *Bacteroides salanitronis* ( $p=0,037$ ) ja *Parabacteroides distasonis* ( $p=0,005$ ) -lajien kohdalla löytyi tilastollisesti merkitsevää eroa ( $p<0.05$ ) tutkittujen rottakannan välillä (kuva 8). Kraken -analyysissä löytyneitä tilastollisesti merkitseviä taksonomisia ryhmiä oli enemmän HCR -rotilla.



KUVA 6. Erot heimotasolla Kraken -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista.



KUVA 7. Erot mikrobisuvuissa Kraken -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista.

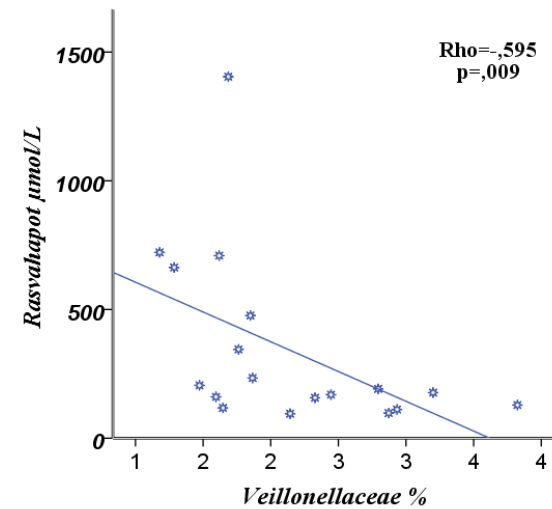
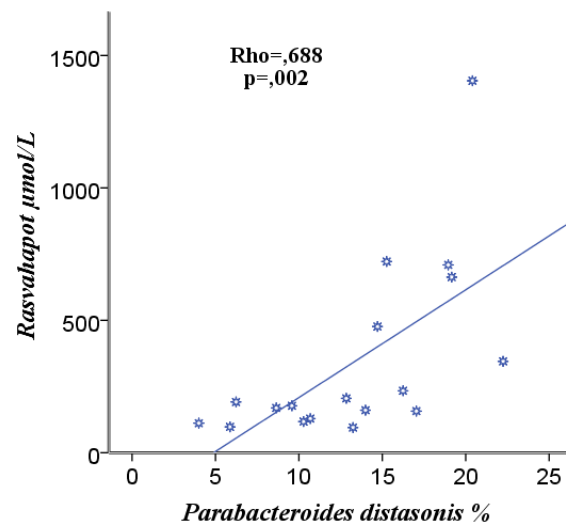
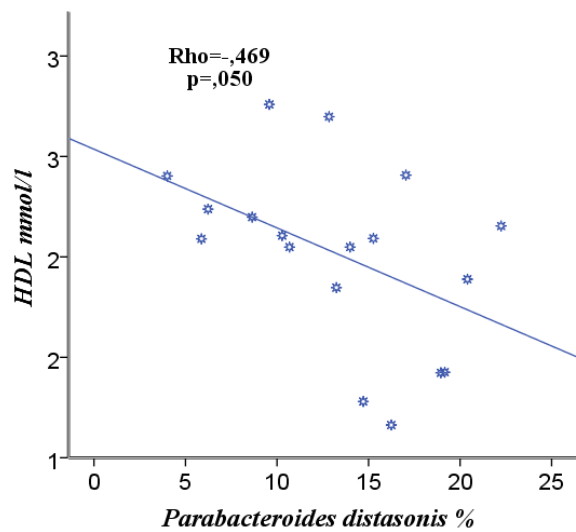
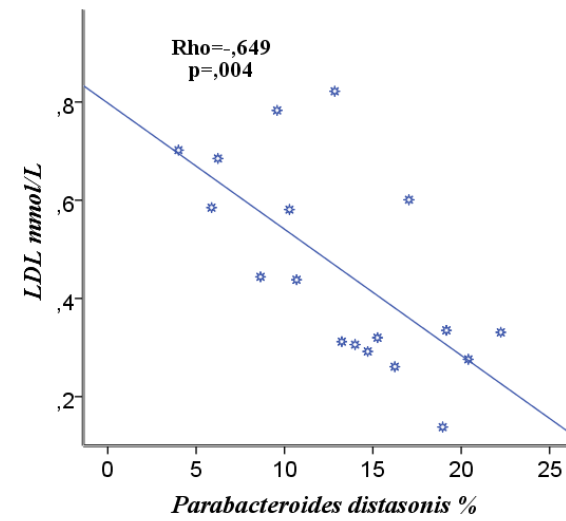
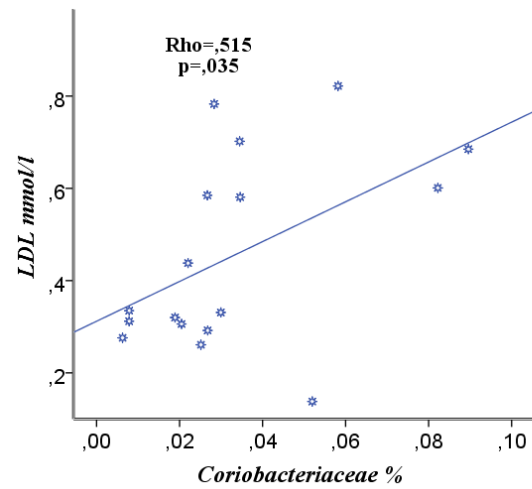
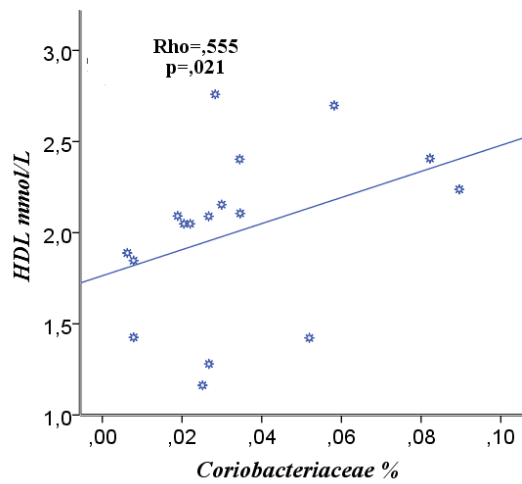


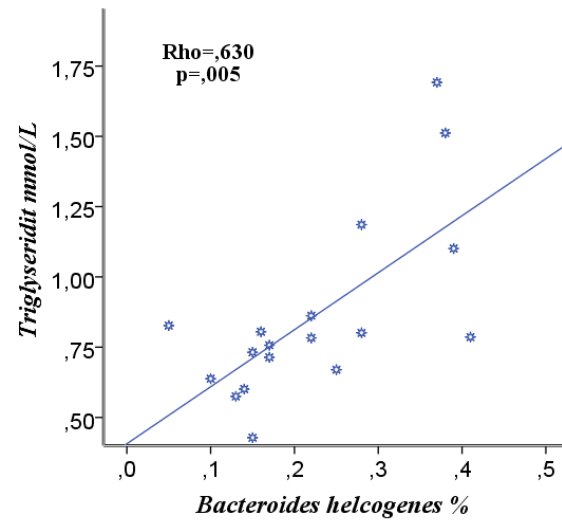
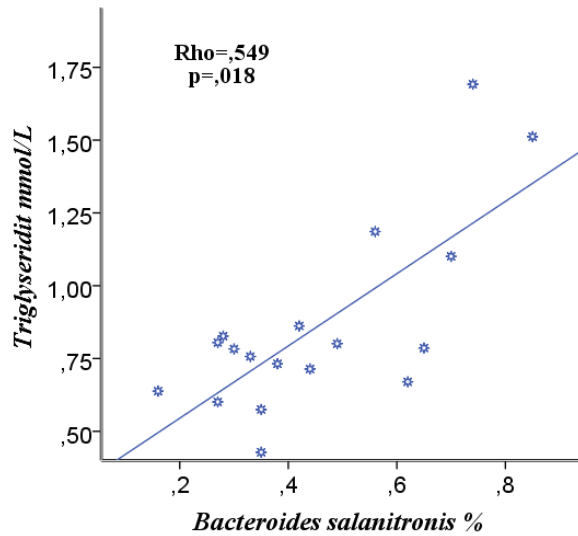
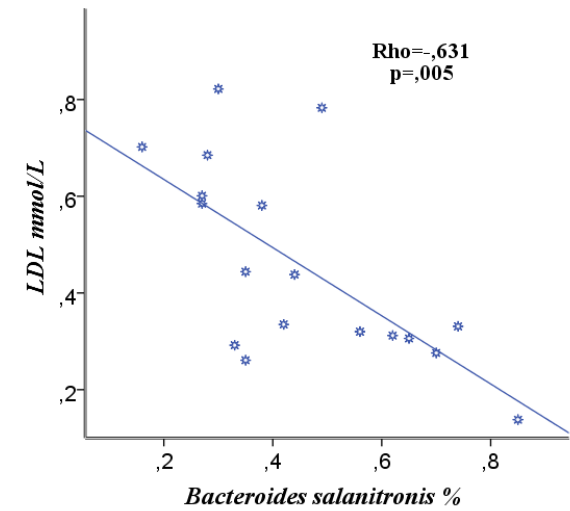
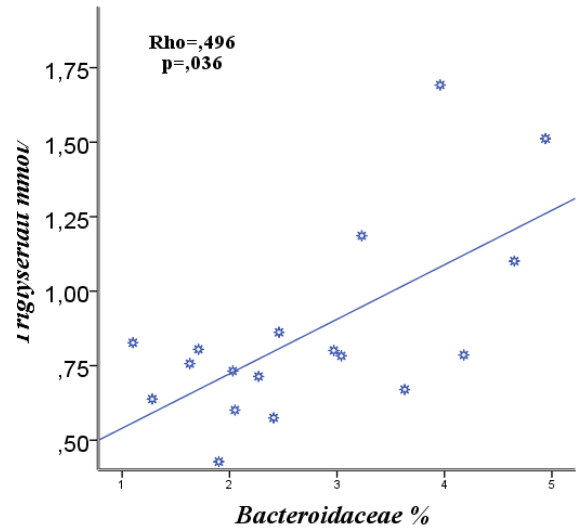
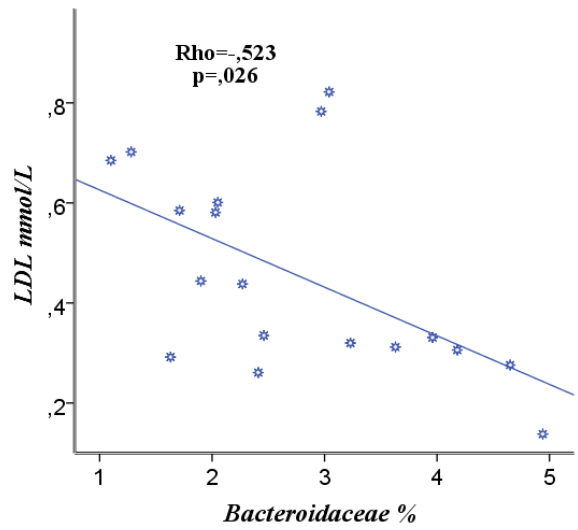
KUVA 8. Erot mikrobilajeissa Kraken -analyysissä, \*  $p \leq 0,05$ . Arvot prosentteina OTU:ista.

### 7.2.3 Suoliston mikrobiston ja veren rasva-arvojen yhteys

Qiime - ja Kraken -analyyseissä saatujen tilastollisesti merkitsevien suoliston bakteeripääjaksojen, -heimojen ja -sukujen ja veren rasva-arvojen väliltä etsittiin yhteyttä Spearmanin järjestyskorrelaation avulla. *Coriobacteriaceae* -heimon kohdalla löytyi yksi selvä poikkeava tulos (outlier), joka poistettiin analyyseistä. *Coriobacteriaceae* -heimo korreloi positiivisesti HDL:n ( $p=0,021$ ) ja LDL:n ( $p=0,035$ ) kanssa. *Parabacteroides distasonis* -laji korreloi puolestaan negatiivisesti HDL:n ( $p=0,050$ ) ja LDL:n ( $p=0,004$ ) kanssa. Lisäksi tämän lajin kohdalla löytyi positiivista korrelaatiota FFA:n ( $p=0,002$ ) kanssa kun taas *Veillonellaceae* -heimo korreloi negatiivisesti FFA:n ( $p=0,009$ ) kanssa. Heimo *Bacteroidaceae* korreloi negatiivisesti LDL:n ( $p=0,026$ ) kanssa ja positiivisesti triglyseridien ( $p=0,036$ ) kanssa. Myös *Bacteroides salanitronis* -laji korreloi negatiivisesti LDL:n ( $p=0,005$ ) ja positiivisesti triglyseridien ( $p=0,018$ ) kanssa. Lisäksi laji *Bacteroides helcogenes* korreloi positiivisesti triglyseridien ( $p=0,005$ ) kanssa (kuva 9).



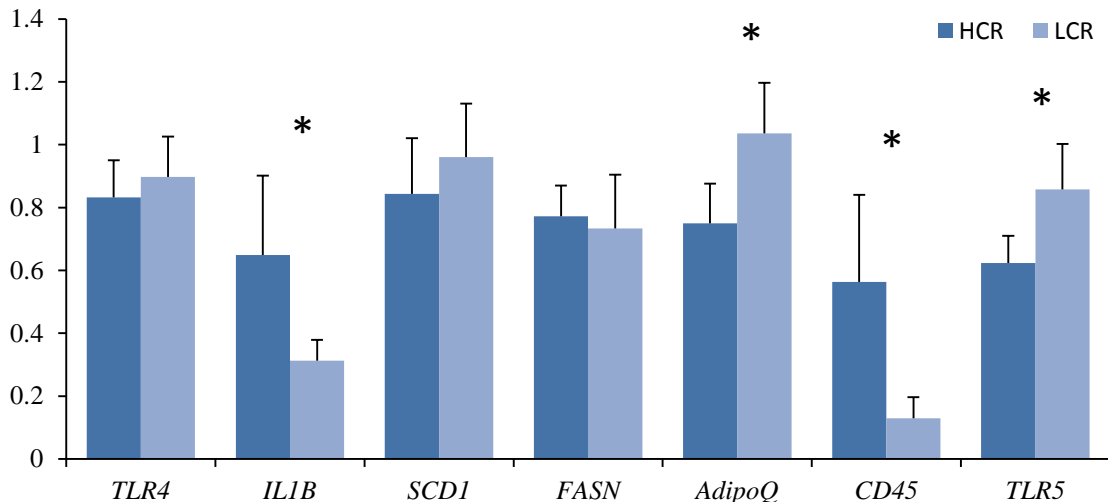




KUVA 9. Tilastollisesti merkitsevien bakteeriryhmien ja veren rasva-arvojen väliset korrelaatiot  $p \leq 0,05$ . Rho= Spearmanin järjestyskorrelaation.

### 7.3 Erot viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä

Erot geenien ilmentymisessä olivat relatiivisia ilmentymisarvoja, jotka oli normalisoitu housekeeping geeniin *ACTB*. Tilastollisesti merkitsevää eroa löytyi neljän viskeraalisen rasvakudoksen geenin ilmentymisessä: *IL1B* ( $p=0,001$ ), *CD45* ( $p=0,001$ ), *AdipoQ* ( $p=0,001$ ) ja *TLR5* ( $p < 0,001$ ). HCR -rotilla kahden tulehdukseen liittyvän geenin, *IL1B*:n ja *CD45*:n, ilmentyminen oli tilastollisesti merkitsevästi suurempaa LCR -rottiin verrattuna, kun taas geenien *AdipoQ* ja *TLR5* kohdalla ilmentyminen oli tilastollisesti merkitsevästi suurempaa LCR -rotilla. Näistä *AdipoQ* on rasva-aineenvaihduntaan ja *TLR5* tulehdukseen liittyvä geeni (kuva 10.).



KUVA 10. Rasvakudoksen geenien ilmentyminen HCR ja LCR -rotilla. \* $p \leq 0.05$ . Y-akseli= relatiivinen ilmentyminen suhteutettuna *ACTB* housekeeping geenin arvoihin.

### 7.4 Suoliston mikrobiston ja viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteys

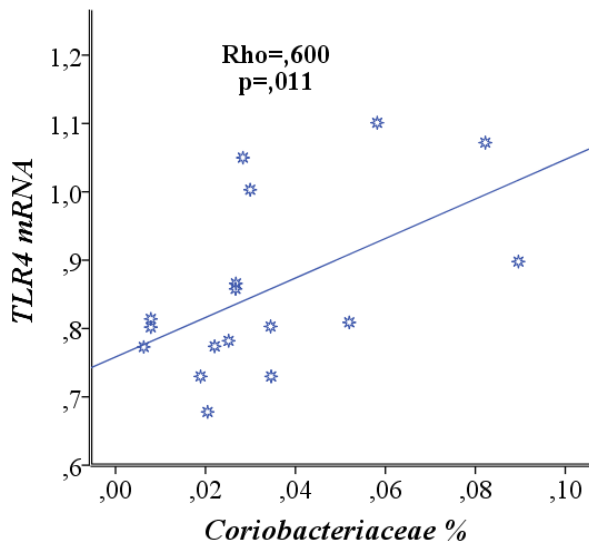
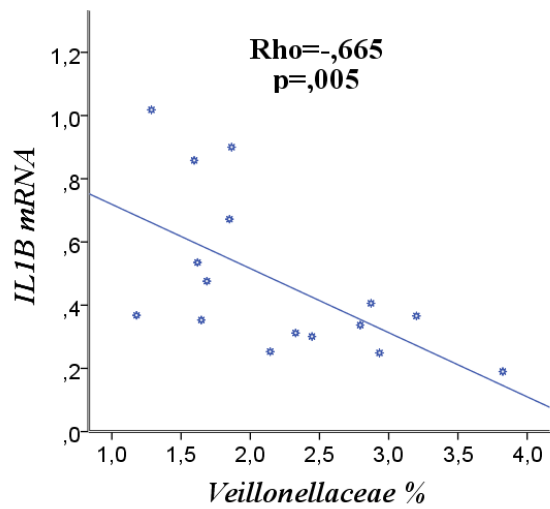
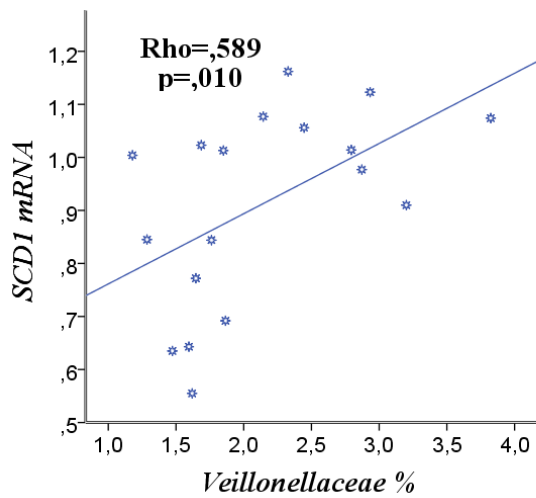
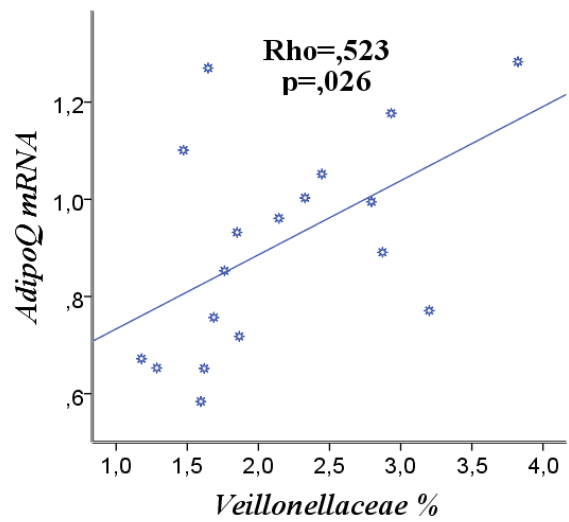
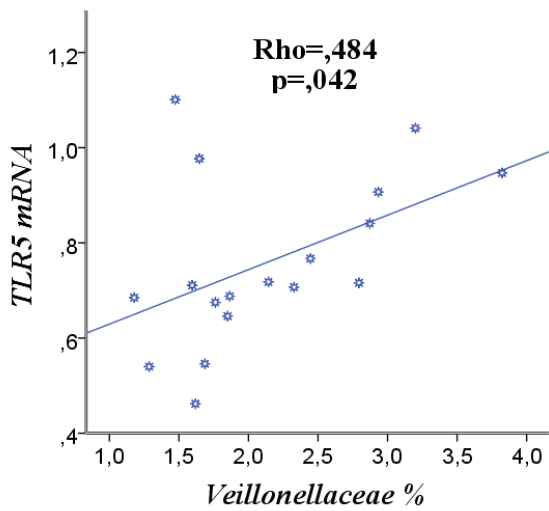
Korrelaatiot laskettiin erikseen sekä Qiime - että Kraken -tuloksille. Seuraavassa tekstiosuudessa tummennettuna ne bakteeriryhmät, joiden kohdalla löytyi tilastollisesti merkitsevää eroa HCR - ja LCR -rottien välillä. Yksi selvästi poikkeavia arvo (outlier) löytyi

*Coriobacteriaceae* ja *Erysipelotrichaceae* -heimojen sekä *Lactobacillus* ja *Faecalitalea* -sukujen kodalla ja ne poistettiin analyyseistä.

#### 7.4.1 Qiime

Kaikkien tutkittujen tulehdukseen liittyvien geenien ilmentymisen kohdalla löytyi tilastollisesti merkitsevää yhteyttä tiettyjen suoliston mikrobiryhmien välillä. Positiivinen yhteys havaittiin geenin *TLR5* ilmentymisen ja heimon *Veillonellaceae* ( $p=0,042$ ) välillä ja negatiivinen yhteys suvun *Lactobacillus* ( $p=0,050$ ) kanssa. *CD45*:n ilmentyminen korreloi puolestaan positiivisesti suvun *Faecalibacterium* ( $p=0,019$ ) kanssa. Negatiivista yhteyttä löytyi *IL1B*:n ilmentymisen ja heimon *Veillonellaceae* ( $p=0,005$ ) välillä. *TLR4*:n ilmentyminen korreloi positiivisesti *Coriobacteriaceae* ( $p=0,011$ ) ja *Erysipelotrichaceae* ( $p=0,020$ ) -heimojen kanssa.

Rasva-aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentymisen kohdalla korrelaatioita löytyi geenien *AdipoQ* ja *SCD1* ilmentymisen ja tiettyjen suoliston mikrobiryhmien välillä. Kuten *TLR4*, myös *AdipoQ*:n ilmentyminen korreloi positiivisesti heimon *Veillonellaceae* ( $p=0,026$ ) kanssa ja negatiivisesti suvun *Bacteroides* ( $p=0,009$ ) kanssa. *SCD1*:n ilmentyminen korreloi myös positiivisesti heimon *Veillonellaceae* ( $p=0,010$ ) sekä heimoon kuuluvan *Veillonellaceae\_genus\_NN* ( $P<0,000$ ) -suvun kanssa. Negatiivista yhteyttä löytyi puolestaan *SCD1*:n ilmentymisen ja suvun *Faecalibacterium* välillä ( $p=0,012$ ). Kuvassa 11 on esitetty tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot tutkittujen viskeraalisen rasvakudoksen geenien ja Qiime -analyysin tilastollisesti merkitsevien suoliston mikrobiryhmien välillä. Loput tilastollisesti merkitsevät yhteydet löytyvät liitteestä 3.

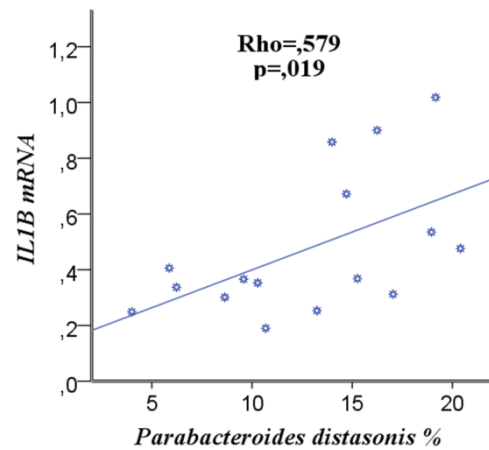
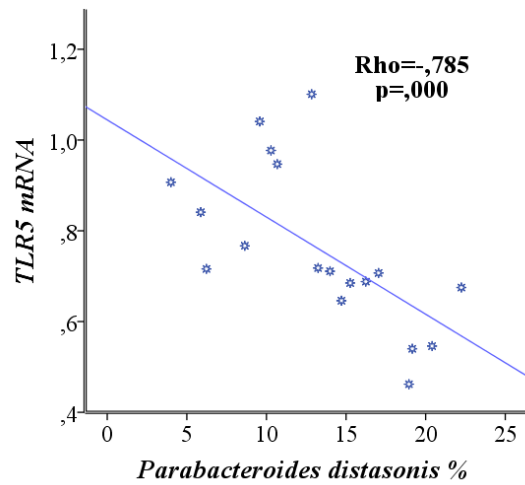
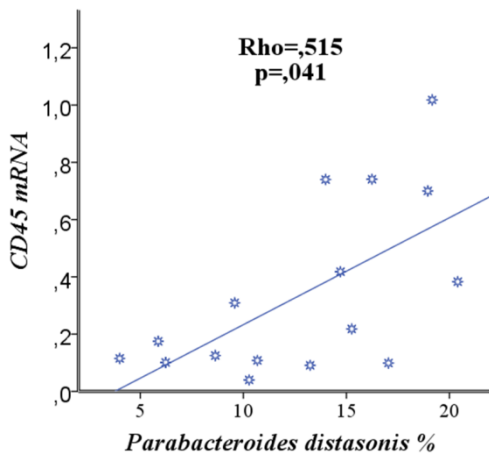
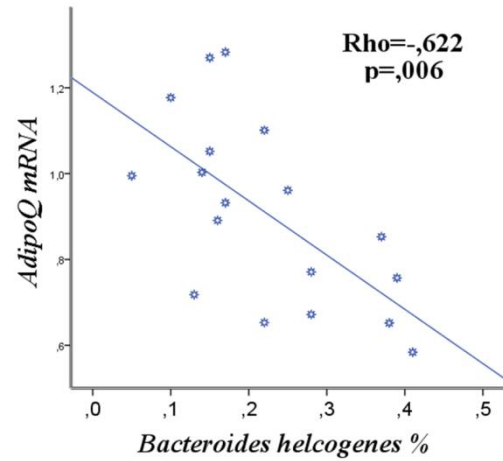
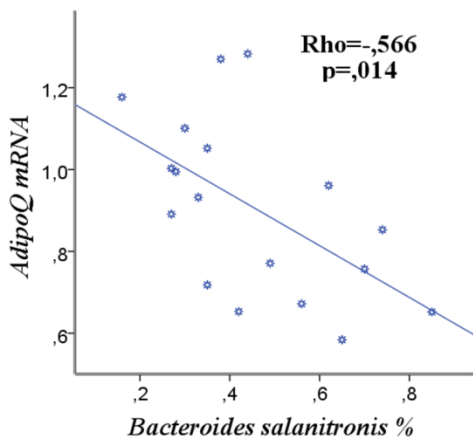
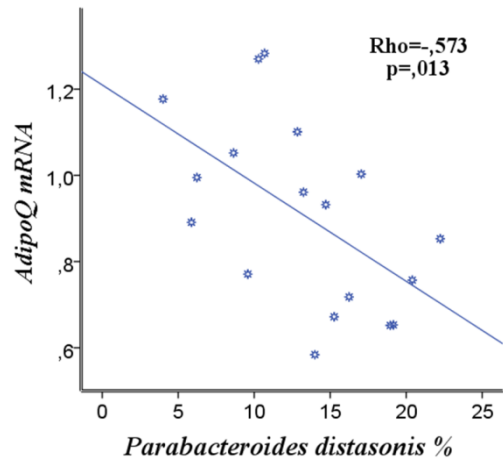
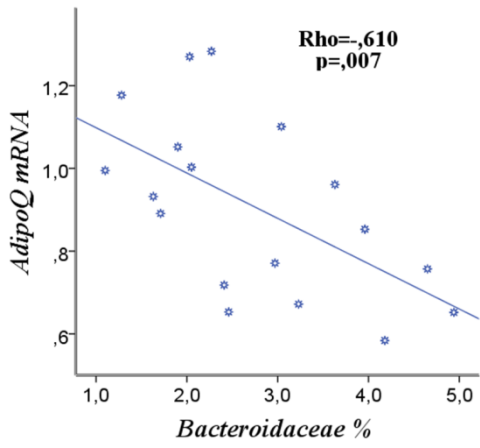


KUVA 11. Korrelaatiot Qiime -analyysin tilastollisesti merkitsevien mikrobiryhmien ja tutkittujen viskeraalisen rasvakudoksen geenien välillä  $p \leq 0,05$ . Rho= Spearmanin järjestyskorrelaation.

#### 7.4.2 Kraken

Myös Kraken -analyysillä löytyi tilastollisesti merkitsevä yhteys kaikkien tutkittujen tulehdukseen liittyvien geenien ilmentymisen kohdalla tiettyjen mikrobiryhmien kanssa. Osa mikrobiryhmistä oli samoja kuin Qiime -analyysissä. *TLR5*:n ilmentyminen korreloi negatiivisesti suvun *Lactobacillus* ( $p=0,051$ ) kanssa, kuten Qiime -analyysissäkin. Lisäksi Kraken -analyysin mukaan *TLR5*:n ilmentyminen korreloi negatiivisesti lajin *Parabacteroides distasonis* ( $p<0,000$ ) kanssa. *CD45*:n ilmentyminen korreloi puolestaan positiivisesti lajin *Parabacteroides distasonis* ( $p=0,041$ ) kanssa. Samoin korreloi geenin *IL1B*:n ilmentyminen; *Parabacteroides distasonis* ( $p=0,019$ ). Myös Kraken -analyysin mukaan positiivista yhteyttä löytyi *TLR4*:n ilmentymisen ja *Actinobacteria* ( $p=0,015$ ) -pääjakson ja *Erysipelotrichaceae* ( $p=0,011$ ) -heimon välillä. Lisäksi positiivista yhteyttä löytyi *TLR4*:n ilmentymisen ja suvun *Faecalitalea* ( $p=0,007$ ) sekä lajin *Lactobacillus salivarius* ( $p=0,025$ ) välillä.

Rasva-aineenvaihduntaan liittyvien geenien ilmentymisen kohdalla vain geenin *AdipoQ* ilmentyminen korreloi tiettyjen Kraken -analyysin suoliston mikrobiryhmien kanssa. Geenin *AdipoQ* ilmentyminen korreloi negatiivisesti heimon *Bacteroidaceae* ( $p=0,007$ ) ja suvun *Bacteroides* ( $p=0,007$ ) kanssa. Lisäksi tämän geenin ilmentyminen korreloi negatiivisesti *Bacteroides helcogenes* ( $p=0,006$ ), *Bacteroides salanitronis* ( $p=0,014$ ) ja *Parabacteroides distasonis* ( $p=0,013$ ) -lajien kanssa. Kuvassa 12 on esitetty tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot tutkittujen viskeraalisen rasvakudoksen geenien ja Kraken -analyysin tilastollisesti merkitsevien suoliston mikrobiryhmien välillä. Loput tilastollisesti merkitsevät yhteydet löytyvät liitteestä 4.



KUVA 12. Korrelaatiot Kraken -analyysin tilastollisesti merkitsevien mikrobiryhmien ja tutkittujen viskeraalisen rasvakudoksen geenien välillä  $p \leq 0,05$ . Rho= Spearmanin järjestyskorrelaation.

## 8 POHDINTA

Tässä pro gradu -tutkielmassa käytettiin ainutlaatuista rottakantaa, joka on luotu valikoimalla tarkasti rottia synnynnäisen aerobisen kapasiteetin perusteella kahteen ryhmään. Rottia on risteytetty usean sukupolven ajan, jolloin on kehittynyt kaksi toisistaan täysin eroavaa rottakantaa synnynnäisen aerobisen kapasiteetin osalta. Erot synnynnäisessä aerobisessa kapasiteetissa on varmistettu useassa sukupolvessa. Ihmisellä synnynnäistä aerobista kapasiteettia on hankalempi tutkia, mikä lisää tämän rottakannan ainutlaatuisuutta.

Tässä pro gradussa selvitettiin, löytyykö synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan poikkeavilta rotilla, HCR - ja LCR -rottakannoilta eroja suoliston mikrobiston koostumuksessa. Lisäksi selvitettiin, eroaako seitsemän viskeraalisen rasvakudoksen, tulehdukseen ja rasva-aineenvaihduntaan, liittyvien geenien ilmentyminen näiden kahden rottakannan välillä. Lopuksi tarkasteltiin tutkittujen geenien ilmentymistasojen ja suoliston mikrobiston välistä yhteyttä.

### 8.1 Paino, glukoosi ja veren rasva-arvot

Aikaisemmissa tutkimuksissa LCR -rottien on raportoitu olevan selvästi HCR -rottia painavampia ja vanhemmilla rotilla on myös havaittu eroja monien sairauksien riskitekijöissä, johtuen ilmeisesti siitä, että HCR -rotat ovat olleet synnynnäisesti paremman aerobisen kapasiteetin ansiosta aktiivisempia kuin LCR -rotat (Koch & Britton 2005; Kivelä ym. 2010). Tässä tutkimuksessa käytetyillä rotilla ei kuitenkaan havaittu eroja vieroitusta - tai kuolinpainossa, mikä johtuu luultavasti siitä, että rotat olivat hyvin nuoria kuollessaan. LCR -rottien passiivisuudesta johtuvaa lihomista ei siis vielä ollut ehtinyt tapahtua. LCR -rotat olivat jopa vieroituspainoltaan hiukan HCR -rottia kevyempiä. Tuloksia kuitenkin vääristää



se, että tiedot kolmen LCR -rotan vieroituspainosta puuttuivat. Tässä tutkimuksessa käytetyt rotat olivat täysin terveitä, joten saatuja tuloksia ei voi yhdistää mihinkään tiettyyn sairautentilaan.

Veren rasva-arvoista havaittiin, että kolesteroli sekä HDL- ja LDL -arvot olivat tilastollisesti merkitsevästi korkeampia LCR -rotilla. FFA- ja triglyseridi -arvojen ollessa tilastollisesti merkitsevästi korkeampia puolestaan HCR -rotilla. Aikaisemmat tutkimukset ovat havainneet LCR -rotilla metabolisen oireyhtymän tunnusmerkkejä, kuten korkeampia triglyseridi -arvoja HCR -rotiin verrattuna (Koch & Britton 2005; Kivelä ym. 2010). Tässä tutkimuksessa näitä tunnusmerkkejä ei kuitenkaan havaittu LCR -rotilla, mikä johtui todennäköisesti aikaisemmin mainitusta rottien nuoresta iästä. Rottakantoja seurattaessa vanhemmiksi selkeämpiä eroja metabolisen oireyhtymän tunnusmerkeissä on alkanut näkyä (Koch & Britton 2005; Kivelä ym. 2010). Geeni *AdipoQ* ilmentyy yksinomaan rasvakudoksessa ja koodaa hormonia nimeltä adiponektiini. Tämä hormoni parantaa lihaksen ja maksan insuliiniherkkyyttä, lisää vapaiden rasvahappojen hapettumista eri kudoksissa ja vähentää seerumin FFA:n pitoisuutta sekä glukoosi- ja triasyyliglyserolipitoisuuksia (Greenberg & Obin 2006). Tämä selitti FFA:n ja triasyyliglyserolin negatiivisen yhteyden geenin *AdipoQ* ilmentymisen kanssa ja siten sen, miksi LCR -rotilla havaittiin matalammat triglyseridi- ja FFA -tasot.

LCR -rotilla havaittiin HDL -arvojen olevan tilastollisesti merkitsevästi korkeampi HCR -rotiin verrattuna, ja että geenin *AdipoQ* ilmentymisen ja HDL -arvon välillä vallitsi positiivinen yhteys. Geenin *AdipoQ* koodaaman hormonin adiponektiinin ja HDL -arvon välillä on havaittu vallitsevan positiivinen yhteys, joka on todettu niin diabetesta sairastavilla kuin terveillä henkilöillä, ja yhteys on ollut riippumaton BMI:stä, rasvan jakautumisesta ja insuliiniherkkyydestä (Verge`s ym. 2006). Verge`s ym. (2006) arvelivat, että yhteys selittyy adiponektiinin roolilla apolipoproteiini a1:n (apoAI) kataboliassa, joka on HDL:n tärkein proteiiniosa. Lisääntynyt apoAI:n katabolia tarkoittaa seerumin pienempää HDL -kolesterolipitoisuutta (Verge`s ym. 2006). Tässä tutkimuksessa havaittu positiivinen yhteys puolestaan geenin *TLR5* ilmentymisen ja kolesterolin välillä saattoi selittyä sillä, että kolesterolilla on rooli lipidilauttojen synnyssä, jotka voivat kuljettaa TLR5 -reseptorin aktivoivia mikrobeita (Zhou ym. 2015).

## 8.2 Erot suoliston mikrobiston koostumuksessa

Eroja suoliston mikrobistossa tarkasteltiin HCR- ja LCR -rottien välillä Qiime -ohjelmassa yhdeksän mikrobipääjakson, 13 mikrobiheimon ja 18 mikrobisuvun kohdalla. Kraken -analyysissä puolestaan yhdeksän mikrobipääjakson, 16 mikrobiheimon, 12 mikrobisuvun sekä lisäksi 14 mikrobilajin kohdalla. Kraken -analyysin avulla päästiin siis taksonomisesti alemmalle tasolle kuin Qiime -analyysissä, mikä johtui ilmeisesti siitä, että ohjelmien DNA:n sekvensointi analysointitavat ja tietokannasta löytyvät taksonomiset mikrobiryhmät erosivat toisistaan. Se näkyi myös löytyneissä tilastollisesti merkitsevissä mikrobiryhmissä, jotka olivat erilaiset Qiime - ja Kraken -analyysien välillä.

Pääjaksotasolla havaittiin, että kolme suurinta pääjaksoa olivat samat Qiime - ja Kraken -analyysien mukaan; *Bakteroidetes*, *Firmikuutit* ja *Spiroketat*. *Bakteroidetes* -pääjakson bakteerien määrä oli hyvin samankaltainen rottakantojen välillä, Qiime -analyysin mukaan *Bakteroidetes* -pääjakson bakteereita löytyi hiukan enemmän LCR -rotilta ja Kraken -analyysin mukaan hiukan enemmän HCR -rotilta. *Firmikuutteja* oli molempien ohjelmien mukaan enemmän HCR -rotilla. Ei kuitenkaan tilastollisesti merkitsevästi. Aikaisemmissa tutkimuksissa *Firmikuuttien* määrän on havaittu olevan korkeampi ja *Bakteroidetes* -bakteerien määrä alhaisempi niin geneettisesti lihavilla hiirillä (Ley ym. 2005), ihmisillä (Ley ym. 2006) kuin korkearasvaisella ruokavaliolla aikaansaadussa lihavuudessa rotilla (Možeš ym. 2008). Päinvastaisia tuloksia on myös saatu (Larsen ym. 2010; Schwiertz ym. 2010; Lecomte ym. 2015). Toisaalta fyysisellä aktiivisuudella on havaittu olevan yhteys korkeampaan *Firmikuuttien* määrään sekä ihmisillä (Clarke ym. 2014) että jyrsijöillä (Petritz ym. 2014; Lambert ym. 2015). Tässä pro gradussa käytetyt rotat olivat samanpainoisia ja erosivat pelkästään synnynnäiseltä aerobiselta kapasiteetiltaan, joten vertailua suoraan edellisiin tutkimuksiin ei voi tehdä. Myös fyysisen aktiivisuuden yhteydestä suoliston mikrobiston koostumukseen on saatu toisenlaisia tuloksia hiirillä (Liu ym. 2015). *Firmikuutti: Bakteroidetes* -pääjaksojen suhde ei ole siis yksiselitteinen ja vaihtelee ilmeisesti tutkittavien yksilöiden ja näiden sairaustautien, iän, fyysisen aktiivisuuden ja geeniperimän mukaan sekä näyttöiden oton ja analysoinnin erojen vuoksi. Koska pääjaksotasolla tulokset vaihtelevat suuresti, eivätkä ilmeisesti kokonaan kerro suoliston mikrobistossa tapahtuvista lihavuuteen tai fyysisen aktiivisuuteen liittyvistä muutoksista, on tutkimuksissa siirrytty koko ajan

enemmän eri mikrobi sukujen ja lajien yhteyksien analysointiin (Lambert ym. 2015; Nguyen ym. 2015). Niin ikään tässä pro gradu työssä keskityttiin tarkastelemaan heimoja, lajeja ja sukuja tämän tutkimusongelman selvittämiseksi.

Qiime -analyysillä löytyi tilastollisesti merkitsevää eroa HCR- ja LCR -rottien välillä *Aktinobakteeri* -pääjakson kohdalla siten, että tämän pääjakson mikrobeita löytyi enemmän LCR -rotilta. Lisäksi *Aktinobakteerin* ja veren HDL- ja LDL -arvojen väliltä löytyi positiivista yhteyttä. Turnbaughin ym. (2009) havaitsi lihaviin ja laihojen, sekä mono-, että dizygoottisten, kaksosparien suoliston mikrobistoa vertailtaessa, että *Aktinobakteeri* -pääjakson määrä oli suurempi lihavilla kaksosilla laihoihin kaksosiin verrattuna. Tutkimus osoitti siis geeniperimän yhteyttä suoliston mikrobiston koostumukseen. Lisäksi samaisessa tutkimuksessa havaittiin, että suurin osa lihavuuteen liittyvistä geneistä löytyi juuri *Aktinobakteeri* -pääjaksolta. Turnbaugh ym. (2009) ehdottivatkin, että pääjaksotasolla lihavuudessa olisi vähentynyt *Bakteroidetes* -bakteerien määrä sekä mieluummin lisääntynyt *Aktinobakteerien* kuin lisääntynyt *Firmikuutiin* määrä. Turnbaughin ym. (2009) tutkimus on tehty ihmisillä ja siinä lihavuus on ollut erottava tekijä, joten vertailua tämän pro gradun tuloksiin ei voi suoraan tehdä. Turnbaughin ym. (2009) tutkimus osoitti kuitenkin *Aktinobakteerien* yhteyden lihavuuteen. Näiden havaintojen perusteella *Aktinobakteeri* -pääjaksosta voisi ajatella yhtä lihavuuden biomarkkeria.

LCR -rotilta löytyi Qiime -analyysin mukaan tilastollisesti merkitsevästi enemmän heimojen *Veillonellaceae* ja *Coriobacteriaceae* sekä suvun *Phascolarctobacterium* mikrobeita. Lisäksi heimon *Coriobacteriaceae* ja veren rasva-arvoista HDL- ja LDL -arvojen väliltä löytyi positiivinen yhteys. Aikaisemmissa tutkimuksissa Lahti ym. (2013) havaitsivat positiivista yhteyttä kokonaiskolesterolin ja LDL:n, mutta ei HDL:n, ja heimon *Coriobacteriaceae* välillä. Claus ym. (2011) löysivät puolestaan vahvan positiivisen korrelaation *Aktinobakteeri* -pääjakssoon kuuluvan *Coriobacteriaceae* -heimon ja maksan triglyseridien, glykokeenin ja glukoosin määrien välillä sen jälkeen, kun altistivat hiiret, joilta puuttui kokonaan suoliston mikrobisto, tavallisten hiirien ympäristölle. Lisäksi Zhang ym. (2008) havaitsivat lihavilla ihmisillä enemmän *Coriobacteriaceae* -heimon mikrobeita. Nämä tutkimukset osoittivat edelleen *Actinobacteria* -pääjakson yhteyden rasva-aineenvaihduntaan ja lihavuuteen, koska *Coriobacteriaceae* -heimo kuuluu *Actinobacteria* -pääjakssoon. Lecomte ym. (2015)

havaittivat, että pidettäessä rottia runsasrasvaisella ruokavaliolla muutokset suoliston mikrobistossa korreloivat lihavuuteen liittyviin metabolisiin markkereihin. Erityisesti *Veillonellaceae* ja *Phascolarctobacterium* -mikrobien määrä korreloi positiivisesti tutkittuihin metabolisiin markkereihin, jotka olivat painon muutos, rasvamassa, leptiini, plasman triglyseridipitoisuus, glukoositoleranssi ja insuliiniherkkyys (Lecomte ym. 2015). Näiden tutkimusten tulosten perusteella mikrobiheimoilla *Veillonellaceae* ja *Coriobacteriaceae* sekä mikrobisuvulla *Phascolarctobacterium* on yhteys lihavuuteen.

Sekä heimo *Veillonellaceae* että suku *Phascolarctobacterium* kuuluvat *Firmikuuttien* -pääjaksoon ja ovat niin sanottuja propionaatin/asetaatien tuottajia (Lecomte ym. 2015). Kaikki lyhytketjuiset rasvahapot ovat hyödyllisiä normaalissa määrin (Pekkala ym. 2015). Asetaattia käytetään kolesterolin ja rasvahappojen synteessissä ja sen suuri määrä edistää hyperkolesterolemiaa, hypertriglyseridemiaa ja maksan rasvoittumista kuten Lecomte ym. (2015) havaitsivat myös rotillaan. Suurentuneen propionaatti määrän on puolestaan tutkittu estävän G-proteiinikytkentäisten reseptorien (G protein-coupled receptor GPCR) kautta lipolyysiä ja adiposyyttien erilaistumista johtaen lihavuuden kasvuun. Propionaattia ja asetaattia tuottavien mikrobien määrän kasvaessa butyraattia tuottavien mikrobien määrä vähenee. Butyraatilla on tärkeä rooli suoliston rakenteen ylläpidossa ja toiminnassa. Butyraattia tuottavien mikrobien, kuten *Lactobasilluksen*, määrän väheneminen voi lisätä vuotavaa suolta, millä on rooli esimerkiksi lihavuuteen liittyvän tulehduksen synnyssä (Lecomte ym. 2015). Myös muut tutkimukset ovat havainneet, että lihavilla ja ylipainoisilla yksilöillä yksittäisten lyhytketjuisten rasvahappojen määrät suosivat propionaattia butyraatin kustannuksella (Schwiertz ym. 2010). Voidaankin pohtia, miten aerobinen kapasiteetti, erot suoliston mikrobistossa ja lihavuus ovat yhteydessä toisiinsa. Kaikkien edellä mainittujen mikrobiryhmien kohdalla on havaittu yhteys lihavuuteen ja niitä on löydetty enemmän LCR -rotilla. Synnynnäisesti erilainen aerobinen kapasiteetti voisi aiheuttaa eroja suoliston mikrobistossa ja mikrobisto edelleen yhdessä huonon aerobisen kapasiteetin kanssa voisi vaikuttaa lihavuuden ja metabolisten häiriöiden kehittymiseen.

Kraken -analyysi löysi HCR -rotilta tilastollisesti merkitsevästi enemmän *Bacteroidaceae* -heimon, *Parabacteroides* ja *Bacteroides* -sukujen sekä *Bacteroides helcogens*, *Bacteroides salanitronis* ja *Parabacteroides distasonis* -lajien mikrobeja. Aikaisemmin mainittiin, kuinka

LCR -rotilta löytyi enemmän *Aktinobakteeri* -pääjakson ja tähän pääjaksoon kuuluvan *Coriobacteriaceae* -heimon mikrobeita sekä tilastollisesti merkitsevästi korkeampia HDL- ja LDL -arvoja. Lisäksi näiden taksonomisten mikrobiryhmien ja HDL- ja LDL -arvojen väliltä löytyi positiivista yhteyttä. *Parabacteroides* -suvun ja *Parabacteroides distasonis* -lajin kohdalla tulokset olivat päinvastaisia eli näitä mikrobiryhmiä löytyi enemmän HCR -rotilta ja yhteys HDL - ja LDL -arvoihin oli negatiivinen. Lihavilla ihmisillä on havaittu vähemmän *Bacteroides* -suvun mikrobeita kontrolliryhmään verrattuna (Santacruz ym. 2010; Chiu ym. 2014). Toisaalta Lecomte ym. (2015) on havainnut positiivista korrelaatiota suurentuneella *Bacteroides* -suvun mikrobien määrällä ja painon muutoksella, kun rottia pidettiin runsasrasvaisella ruokavaliolla. *Bacteroides* -suvun mikrobeilla, johon myös lajit *Bacteroides helcogens* ja *Bacteroides salanitronis* kuuluvat, on kyky fermentoida lukuisia erityyppisiä polysakkarideja. Osa mikrobeista on erikoistunut vain tiettyntyyppisten polysakkaridien fermentoimiseen (Pudlo ym. 2015). Mikrobien fermentoinnin yhteydessä muodostuu erilaisia pienimolekyylisiä yhdisteitä kuten aiemmin mainittuja lyhytketjuisia rasvahappoja (Cani & Delzenne 2007; Nicholson ym. 2012). *Bacteroides* -suvun yhteyden lihavuuteen voisi selittää, että fermentoinnin yhteydessä syntyvillä yhdisteillä on mahdollisesti hyödyllisiä vaikutuksia isäntäeliön elimistössä.

Terveiden yksilöiden suolistosta on löytynyt runsaasti *Parabacteroides distasonis* -lajin mikrobeita ja se on yhdistetty parantuneeseen ihmisten suoliston terveyteen (Xu ym. 2007). Toisaalta Chiun ym. (2014) ihmistutkimuksessa lajin *Parabacteroides distasonis* määrä oli positiivisesti yhteydessä lihavuuteen. Nämä kaikki havainnot *Parabacteroides* ja *Bacteroides* -suvuista on tehty, Lecomten ym. (2015) tutkimusta lukuun ottamatta, ihmisillä, joten tulosten ristiriitaisuus saattoi johtua tutkitusta ihmispopulaatiosta, geeniperimästä, elintavoista tai ympäristötekijöistä. Tutkimusten tuloksia vertailtaessa toisiinsa täytyy ottaa huomioon, että eri lajien suoliston mikrobiston koostumuksessa on eroja. Pääjaksotasolla ihmisten ja jyrsijöiden suoliston mikrobiston koostumus on hyvin samankaltainen, mutta esimerkiksi 85 % hiirien suolistosta löytyvistä mikrobisuvuista, ei havaita ihmisen suolistossa (Ley ym. 2005). Ihmisen ja rotan suoliston koostumus on kuitenkin samankaltaisempi kuin ihmisen ja hiiren (Wos-Oxley ym. 2012). Lisäksi tässä pro gradu -tutkielmassa iältään nuorten rottakantojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa painossa, mutta kuten aiemmin on todettu, aikaisemmat tutkimukset ovat raportoineet LCR -rottien olevan huomattavasti

painavampia kuin HCR -rotat (Koch & Britton 2005). Tämän tutkimuksen perusteella syy olisi synnynnäisesti erilainen aerobinen kapasiteetti.

Suoliston mikrobiston koostumuksessa löytyneisiin eroihin rottakantojen välillä eivät ole siis vaikuttaneet muut tekijät kuin synnynnäisen aerobisen kapasiteetin ero, sillä rotat olivat näytteenotto hetkellä nuoria ja rottia on pidetty samanlaisissa ympäristöolosuhteissa; samanlaiset häkit, ympäristön valaistus ja lämpötila, sekä annettu samanlaista ravintoa. Voidaan kuitenkin pohtia kuinka luonnollisia yksilöitä nämä rotat ovat, jotka on jalostettu ääripäihin tietyn ominaisuuden, tässä tapauksessa synnynnäisen aerobisen kapasiteetin, suhteen. Esimerkiksi laboratoriossa kasvatettujen, usein myös geenimuunneltujen ja jalostettujen, hiirien suoliston mikrobiston koostumus ei vastaa luonnossa elävien hiirien suoliston mikrobistoa (Nguyen ym. 2015). Tässä tutkimuksessa käytettiin rottia, mutta tämän saman eron voi olettaa löytyvän myös rottien kohdalla. Laboratoriohiirten saama ravinto, erittäin hygieeninen ympäristö sekä niiden kokema stressi, johtuen esimerkiksi ihmisen käsittelystä ja melusta, on täysin erilaista luonnossa eläviin lajikumppaneihin verrattuna. Näillä tekijöillä on puolestaan vaikutus suoliston mikrobiston koostumukseen (Nguyen ym. 2015). Tämä tutkimus antaa kuitenkin tietoa synnynnäisen aerobisen kapasiteetin yhteydestä suoliston mikrobiston koostumukseen, kun muiden tekijöiden vaikutus on poistettu. Lisäksi se antaa osviittaa mahdollisesta hankitun aerobisen kapasiteetin yhteydestä suolisto mikrobistoon.

### **8.3 Erot viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymisessä**

Seitsemästä tutkitusta viskeraalisen rasvakudoksen geenistä neljän kohdalla havaittiin tilastollisesti merkitsevää eroa ilmentymistasoissa siten, että tulehdukseen liittyvien geenien, *IL1B* ja *CD45*, ilmentyminen oli tilastollisesti merkitsevästi suurempaa HCR -rotilla. Rasva-aineenvaihduntaan liittyvän geenin *AdipoQ* sekä tulehdukseen liittyvän geenin *TLR5* ilmentyminen oli puolestaan tilastollisesti merkitsevästi suurempaa LCR -rotilla.

Mielenkiintoista on, että HCR -rotilla kahden tulehdukseen liittyvän geenin ilmentyminen oli korkeampaa kuin LCR -rotilla, sillä lihavuuteen ja moniin muihin sairauksiin on yhdistetty elimistössä vallitseva krooninen systeeminen tulehdustila (Tremaroli & Bäckhed 2012;

Kotzampassi 2014). Tässä tutkimuksessa kahden rottakannan painoissa ei ollut eroa, mutta aikaisempien tutkimusten perusteella LCR -rotista on tullut lihavampia kuin HCR -rotista (Koch & Britton 2005; Kivelä ym. 2010). Aivan äskettäin on löydetty tulehdussoluja, perforfiiniä sisältäviä dendriittisoluja (perforin-rich dendritic cells), joiden havaittiin taistelevan lihavuutta vastaan. Kun tutkijat loivat hiirikannan, jolta puuttui tämä solutyyppe, kasvoi näiden hiirien paino progressiivisesti ja niille ilmaantui useita metabolisen oireyhtymän piirteitä kuten dyslipidemiaa ja insuliiniherkkyyden heikkenemistä. Tutkimuksen tekijät arvelivatkin, että lihavuus on yhteydessä siihen, että tiettyjä immuunisoluja on ja tiettyjä ei ole (Zlotnikov-Klionsky ym. 2015). Voitaisiin myös epäillä, että ainakin nuorella iällä tietyn tyyppiset tulehdussolut suojelisivat lihavuudelta ja aineenvaihdunnan häiriöiltä.

#### **8.4 Suoliston mikrobiston ja rasvakudoksen geenien ilmentymisen yhteys**

Sekä Qiime - että Kraken -analyysillä löytyneiden kaikkien tilastollisesti merkitsevien suoliston mikrobiryhmien kohdalla havaittiin korrelaatiota yhden tai useamman tutkitun viskeraalisen rasvakudoksen geenin ilmentymisen kanssa. Yleensä ottaen geenit, jotka ilmentyivät enemmän HCR -rotilla korreloivat positiivisesti sellaisten mikrobiryhmien kanssa, joita löytyi enemmän HCR -rotilta ja negatiivisesti sellaisten mikrobiryhmien kanssa, joita löytyi enemmän LCR -rotilta. Geenit, jotka ilmentyivät enemmän puolestaan LCR -rotilla, havaittiin positiivista korrelaatiota sellaisten mikrobiryhmien kohdalla, joita oli enemmän juuri LCR -rotilla ja negatiivista korrelaatiota HCR -rotilta runsaammin löytyneiden mikrobiryhmien kanssa. Epäiltäväksi jää, kertooko tämä jotain tutkittujen geenien ja tilastollisesti merkitsevien mikrobiryhmien yhteydestä rottakantojen väliseen eroon aerobisessa kapasiteetissa. Sekä yhteydestä tulevaisuudessa luultavasti havaittaviin eroihin lihavuudessa sekä metabolisten ja muiden sairauksien riskitekijöissä. Täytyy kuitenkin muistaa, että lihavuus ei kokonaan johdu suoliston mikrobiston koostumuksesta, vaikka suoliston mikrobiston koostumus onkin osaltaan yhteydessä tiettyjen viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymiseen. Lihavuuden riskitekijöiden kehittymiseen vaikuttavat muutkin asiat ja säätelytekijät, joita ei tässä tutkimuksessa tarkasteltu.

Geenin *TLR5* ilmentyminen korreloi positiivisesti *Veillonellaceae* -heimon kanssa. Pekkala ym. (2015) on havainnut, että suurentunut rasvakudoksen *TLR5* ilmentyminen on yhteydessä

ihmisillä epätasapainoiseen suolistomikrobiston koostumukseen, lihavuuteen ja metabolisiin muutoksiin. Yksi selitys tälle yhteydelle on, että epätasapainoinen suoliston mikrobisto aiheuttaa suolen vuotamista, jolloin bakteereja pääsee vuotamaan ulos suolistosta. Bakteerien flagellat aktivoivat TLR5 -reseptorin ja bakteerien lipolysakkaridit aktivoivat TLR4 -reseptorin, mikä laukaisee tulehdukseen johtavan ketjun esimerkiksi kinaasien aktivoinnin kautta ja tämä edistää lihavuuden kehittymistä ja metabolisia muutoksia (Pekkala ym. 2015). Synnynnäisesti huonompi aerobinen kapasiteetti voisi olla tässä tapauksessa yhteys epäedullisiin suoliston mikrobiston muutoksiin. *Veillonellaceae* -heimon määrä korreloi positiivisesti moniin metabolisiin markkereihin (Lecomte ym. 2015) ja se kuului LPS -molekyylejä tuottaviin Gram-negatiivisiin mikrobeihin (Yutin & Galperin 2013). Siitä ei ole tutkimustietoa voisivatko juuri *Veillonellaceae* -heimoon kuuluvat mikrobit laukaista TLR5 -reseptorin kautta tulehduksen synnyn, mikä johtaisi lihavuuteen sekä metabolisiin muutoksiin.

LCR -rotilla enemmän ilmentynyt geeni *AdipoQ* korreloi positiivisesti *Aktinobakteeri* -pääjakson ja pääjaksoon kuuluvan *Coriobacteriaceae* -heimon kanssa, joilla on todettu olevan yhteys lihavuuteen (Turnbaugh ym. 2009; Claus ym. 2011). Nämä molemmat kuuluvat gram-positiivisiin mikrobeihin (NCBI taksonomy-Encyclopedia of life, hakusana *Aktinobakteeri* ja *Coriobacteriaceae*). Taira ym. (2015) havaitsivat bakteerien soluseinän vaikuttavan adiponektiinin eritykseen viskeraalisesta rasvakudoksesta. Gram-negatiivisten mikrobien tuottamat LPS-molekyylit estivät adiponektiinin erityksen, kun taas gram-positiivisten mikrobien tuottamat peptidoglykaanit lisäsivät tämän rasvakudoksen hormonin eritystä. Tämä mahdollisesti selitti tässä tutkimuksessa havaitun geenin *AdipoQ* suuremman ilmentymisen LCR -rotilla, koska tällä rottakannalla havaittiin olevan enemmän gram-positiivisia, *Aktinobakteeri* -pääjakson ja *Coriobacteriaceae* -heimon, mikrobeita.

HCR -rotilla enemmän ilmentynyt geeni *IL1B* korreloi negatiivisesti heimon *Veillonellaceae* ja suvun *Phascolarctobacterium* -mikrobien kanssa, joiden määrän aiemmin todettiin korreloivan positiivisesti tiettyihin metabolisiin markkereihin ja jotka olivat runsaasti propionaattia ja asetaattia tuottavia mikrobeita (Lecomte ym. 2015). Lisäksi molemmat HCR -rotilla enemmän ilmentyneet tulehdukseen liittyvät geenit, *CD45* ja *IL1B*, korreloivat positiivisesti *Parabacteroides* -suvun ja *Parabacteroides distasonis* -lajin kanssa. Geeni *IL1B* koodaa sytokiiniä nimeltä interleukiini 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (NCBI Gene). Suoliston mikrobiston ja



tämän sytokiinin yhdistävä tekijä ovat T-auttaja soluihin kuuluvat  $T_H17$  -solut. Nämä solut ovat tärkeitä isäntäeliön immuunipuolustukselle ja autoimmunitetille, ilmentämällä IL-17A, IL-17F ja IL-22 sytokiinejä. Suoliston mikrobisto saa aikaa IL-1 $\beta$ :n tuotannon suoliston makrofageissa. IL-1 $\beta$ :tä tarvitaan puolestaan  $T_H17$  -solujen indusointiin. Jos IL-1 $\beta$  tuotantoa ei ole, on suoliston  $T_H17$  -solujen yleisyys vähentynyt ja edellä mainittujen sytokiinien tuotanto heikentynyt. (Shaw ym. 2012). Mahdollista on, että IL-1 $\beta$ :n tuotannon saisi aikaan tietyt suoliston mikrobit, tutkimustieto tästä aiheesta kuitenkin puuttuu.

## 8.5 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys

Tutkimuksen luotettavuuden ja pätevyyden arvioinnissa on pohdittava tutkimuksen reliabiliteettia ja validiteettia. Reliabiliteetilla tarkoitetaan sitä, ovatko tutkimustulokset toistettavia (Metsämuuronen 2005, 65). Tämä on pyritty varmistamaan tässä tutkimuksessa raportoimalla tutkimuksen- ja työnteon eri vaiheista havainnollisesti ja täsmällisesti. Lisäksi tähän pyrittiin valitsemalla aineiston ja muuttujien avulla sellaiset tilastolliset analyysimenetelmät, jotka tuottaisivat tutkimuskysymyksiin ja -ongelmiin kelvollista tietoa. Toinen arvioitava käsite on tutkimuksen validiteetti eli pätevyys, joka tarkoittaa sitä, että mittarit ja analyysimenetelmät mittaavat juuri sitä tutkittavaa asiaa, mitä on tarkoituskin mitata (Metsämuuronen 2005, 65). Turun yliopiston biotekniikkakeskuksessa suoritettiin suolisto näytteiden mikrobianalysointi, koska siellä on käytössä siihen tarkoitetut ohjelmistot sekä kokeneet bioanalyytikot. Viskeraalisen rasvakudoksen geenien ilmentymistä tutkittiin tutkimusmenetelmät kappaleessa esitetyn protokollan mukaisesti. Tulosten saaminen vaati paljon mittaamista ja pipetoimista, mihin liittyy aina tutkijasta johtuva mittausvirhe.

Tutkimuksen validiteetilla voidaan tarkastella myös sitä, kuinka yleistettäviä tutkimuksen tulokset ovat (Metsämuuronen 2005, 65). Tässä tutkimuksessa yleistettävyyteen vaikutti se, että tämä tutkimus havainnoi suoliston mikrobiston koostumuksen eroista vain näillä rottakannoilla tietyllä hetkellä, eikä sitä voi yleistää koskemaan kaikkia rotia tai eliöitä. Esimerkiksi ihmiset elävät monimutkaisissa muuttuja- ja vuorovaikutusverkostoissa. Lisäksi aiemmin on mainittu laboratoriossa ja luonnossa kasvaneiden jyrsijöiden eroista, mikä sekkin vaikuttaa tulosten yleistettävyyteen. Tässä tutkimuksessa suoliston mikrobiston koostumuksen analyysiin käytettiin kahta ohjelmaa, Qiimeä ja Krakenia. Nämä ohjelmat antoivat erilaisia

tuloksia koskien tilastollisesti merkitseviä mikrobiryhmiä LCR - ja HCR -rottien välillä. Olemassa olevia ohjelmistoja DNA -sekvenssidatan analysointiin on muitakin (Metzker ym. 2010), jotka luultavasti analysoivat myös DNA -sekvenssidataa hieman erilaisin tavoin. Usein tutkimuksissa, joissa on saatu päinvastaisia tuloksia tietyn taksonomisen mikrobiryhmän yhteydestä esimerkiksi lihavuuteen, on käytetty erilaisia metodologisia analyysimenetelmiä. Tämä kertoo, että analyysimenetelmillä on hyvin merkittävä vaikutus saatuihin tuloksiin (Ley 2010). Siksi tämän tutkimuksen yleistettävyyden muihin tutkimuksiin on hankalaa.

Jyrsijöillä voidaan tutkia monia asioita, joita ihmistutkimuksilla ei ole mahdollista tai eettisesti hyväksyttävää. Rottia ja hiiriä käytetään tutkimuksissa paljon niiden pienen koon, korkean lisääntymisnopeuden sekä hyvin tunnetun ja manipuloitavissa olevan anatomian, fysiologian ja geneettisen taustan takia. Lisäksi niitä on kaupallisesti helposti saatavilla. Jyrsijätutkimusten tulosten yleistettävyydessä koskemaan myös ihmisiä, on kuitenkin monia häiritseviä tekijöitä. Ihmisten ja jyrsijöiden suoliston anatomia on hyvin samankaltainen, mutta suuria poikkeavuuksiakin löytyy liittyen erilaiseen ravintoon, ruumin kokoon, metaboliaan ja ruokarytmiin. Ihmistutkimuksissa suoliston näyte otetaan yleensä ulosteesta, kun taas jyrsijöillä umpisuolesta (Nguyen ym. 2015). Suoliston eri osissa mikrobisto on kuitenkin hiukan erilainen (Sekirov ym. 2010). Lisäksi analysointimenetelmissä saattaa olla eroa, sillä ihmistutkimuksissa käytetään sekä koko metagenomin, että 16S rDNA:n sekvensointia, kun taas jyrsijätutkimuksissa enimmäkseen 16s rDNA:n sekvensointia. Eliöiden suoliston mikrobiston koostumuksen tutkimuksien vertailussa on otettava huomioon se, että suoliston mikrobistoon vaikuttaa kyseessä oleva ihmispopulaatio, jyrsijöiden tilat ja kanta, näytteiden käsittely ja edellä mainitut näytteenotto ja -analysointimenetelmät (Nguyen ym. 2015).

Tutkijan on ennen eläinkokeiden aloittamista kirjoitettava koesuunnitelma, jossa on selvitetty muun muassa tutkimuksen tarpeellisuutta, käytettyjä eläinlajeja ja niiden määrää, koetoimenpiteitä sekä mahdollista koe-eläimille aiheutuvaa kipua ja sen kestoa. Lisäksi hakemukseen on sisällytettävä kivunlievitys- ja lopetusmenetelmät. Tämän hakemuksen pohjalta koe-eläintoimikunta myöntää luvan koe-eläin tutkimuksen tekemiseen (Eläinkokeiden etiikka 2000). Tämä tutkimus on suoritettu koe-eläinlupaa noudattaen (eläinkoeluvan numero ESAVI/7647/04.10.07/2014).

## 8.6 Jatkotutkimusaiheita

Synnynnäisen aerobisen kapasiteetin ja fyysisen aktiivisuuden yhteyttä suoliston mikrobiston koostumukseen on tutkittu tähän mennessä vain muutamissa tutkimuksissa. Ihmistutkimuksia fyysisen aktiivisuuden yhteydestä suoliston mikrobiston koostumukseen on tehty vain yksi. Tässä tutkimuksessa Clarke ym. (2014) havaitsivat, että rugby -pelaajilla suoliston mikrobiston koostumus oli monimuotoisempi kuin kummallakaan, matalan BMI:n tai korkean BMI:n, kontrolliryhmällä, jotka olivat fyysisesti inaktiivisia. Positiivinen yhteys urheilijoilla havaittiin myös proteiinin saannin ja mikrobiston monimuotoisuuden välillä (Clarke ym. 2014). Jyväskylän yliopistossa on parhaillaan menossa ihmistutkimus fyysisen aktiivisuuden yhteydestä suoliston mikrobistoon. Jyrsijätutkimuksia aiheesta on tehty useampia, hieman erilaisilla tutkimusasetelmilla (Petritz ym. 2014; Lambert ym. 2015; Liu ym. 2015). Selkeää kuvaa fyysisen aktiivisuuden yhteydestä suoliston mikrobiston koostumukseen ei kuitenkaan ole, sillä tutkimustuloksissa on osittain ristiriitaisuuksia. Vastauksia vaativia kysymyksiä on kuitenkin useita; minkälaista fyysistä aktiivisuutta tarvittaisiin, että sillä olisi vaikutuksia suoliston mikrobiston koostumukseen? Entä kuinka paljon fyysistä aktiivisuutta tarvittaisiin? Olisivatko vaikutukset positiivisia vai negatiivisia?

Ylipäätään suoliston mikrobiston koostumuksen tutkimus on vielä varsin uusi suuntaus, eikä täysin yhtenevää kokonaiskuvaa ole saatu esimerkiksi siitä, minkälainen on terveen ihmisen suoliston mikrobiston koostumus, saati sitten suoliston mikrobiston koostumus lihavuudessa ja erilaisissa sairauksissa. Tämä johtuu jo aiemmin mainitusta monista tutkimusasetelmiin, analyysimenetelmiin ja tutkittavaan populaatioon liittyvistä tekijöistä. Suoliston mikrobiston koostumus on jo hyvin erilainen etnisiä ryhmiä vertailtaessa, johtuen muun muassa geeniperimään, ravitsemukseen ja ympäristöön liittyvistä tekijöistä. Lisäksi etnisten ryhmien sisällä eri yksilöiden välillä on suuriakin eroja suoliston mikrobiston koostumuksessa riippuen muun muassa yksilön iästä, sukupuolesta ja elintavoista (Angelakis ym. 2012; Tremaroli & Bäckhed 2012). Näiden lukuisten tekijöiden takia tulosten yleistettävyyys ihmisillä on vaikeampaa kuin jyrsijöillä.

Yhtenäisempien metodologisten tapojen kehittämistä kaivattaisiin, sillä muun muassa suoliston osa, josta näyte otetaan, näytteenottotapa, näytteen säilytys ja DNA -

sekvenssianalyysi vaihtelevat tutkimuksittain. Standardisoidummat menetit ja mittarit helpottaisivat tulosten yleistettävyyttä ja lisäksi luotettavuutta.

Kaksostutkimukset suoliston mikrobiston koostumuksesta tarjoaisivat uusia ja erittäin mielenkiintoisia tutkimusmahdollisuuksia. Joitakin tällaisia tutkimuksia on tehtykin esimerkiksi Turnbaughin ym. (2009) toimesta, jossa vertailtiin lihavien ja laihojen mono-, ja dizygoottisten kaksosten suoliston mikrobistoa. Lihavuuden lisäksi kaksospareilla voitaisiin tutkia myös muiden metabolisten sairauksien yhteyttä suoliston mikrobiston koostumukseen. Tämä onnistuisi, jos toinen kaksosista olisi lihava tai hänellä olisi jokin muu metabolinen sairaus ja kaksosten suoliston mikrobiston koostumusta vertailtaisiin keskenään. Lisäksi fyysiseltä aktiivisuudeltaan eroavilla kaksospareilla voitaisiin tutkia, kuinka koko eliniän aikainen fyysinen aktiivisuus on yhteydessä suoliston mikrobiston koostumukseen.

Arveluja suoliston mikrobiston koostumuksen ja lihavuuden sekä muiden metabolisten sairauksien välisistä fysiologisista yhteyksistä on esitetty (Cani & Delzenne 2009; Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014), mutta jatkoselvityksiä tarvitaan. Lisäksi fyysisen aktiivisuuden fysiologiset solu- ja molekyyli-tason vaikutusmekanismit suoliston mikrobiston koostumukseen kaipaavat lisätutkimuksia, useita pohdintoja aiheesta on kuitenkin tehty (Matsumoto ym 2008; Lambert ym. 2015; Liu ym. 2015). Tässä tutkimuksessa tutkittiin suoliston mikrobiston koostumuksen yhteyttä viskeraalisen rasvakudokseen. Mielenkiintoista olisi tietää voisiko suoliston mikrobistolla olla yhteyksiä muihin kudoksiin esimerkiksi lihakseen ja sen metaboliaan. Niin sanotun suoliston mikrobisto-lihas -akselin olemassa olosta on esitetty pohdintoja (Bindels & Delzenne 2013). Aivojen ja suoliston mikrobiston välistä yhteyttä on tutkittu ja yhteyksiä siis aivokudokseen on tiedossa. Nämä yhteydet välittyvät kaksisuuntaisen aivo-suoliston -akselin välityksellä (Carabotti ym. 2015). Sekä fyysisellä aktiivisuudella (Penedo & Dahn 2005) että suoliston mikrobistolla (Carabotti ym. 2015) on havaittu yhteys mielialaan. Tutkittavaksi jää onko mahdollista, että yksi fyysisen aktiivisuuden positiivinen vaikutusmekanismi mielialaan välittyisi suoliston mikrobiston kautta.

Ravinnon merkitystä suoliston mikrobiston koostumukseen on tukittu enemmän (Cani & Delzenne 2009; Tremaroli & Bäckhed 2012; Kotzampassi ym. 2014). On myös yhdistetty runsasrasvaisen ruokavalion ja fyysisen aktiivisuuden yhteisvaikutus suoliston mikrobistoon (Evans ym. 2014). Suoliston mikrobiston koostumuksen analysoinnista on ajateltu tulevaisuudessa yhtä terveyden biomarkkeria. Arvellaan, että käsittelemällä suoliston mikrobiston rakennetta erilaisilla terapeuttisilla menetelmillä, voitaisiin vaikuttaa lihavuuden kehittymiseen sekä myös helpottaa painon pudottamista. Tällaisia terapeuttisia käsittelykeinoja ovat esimerkiksi erilaiset probiootti- ja prebioottivalmisteet. Alustavia tutkimuksia ulosteensiirron mahdollisuudesta lihavuuden hoidossa on esitetty. Tässä riskinä kuitenkin on, että samalla siirtyy epätoivottuja ja patogeenisiä mikrobeita (Tremaroli & Bäckhed 2012). Mielenkiintoista olisi saada tietoa juuri fyysisen aktiivisuuden ja sen eri muotojen vaikutuksesta suoliston mikrobiston koostumukseen, sillä tällöin myös fyysistä aktiivisuutta voisi käyttää yhtenä terapeuttisena keinona dysbioottisen suoliston mikrobiston tasapainottamisessa.

## LÄHTEET

- Angelakis, E., Armougom, F., Million, M. & Raoult, D. 2012. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiology* 7, 91–109.
- Baranova, A., Collantes, R., Gowder, S. J., Elariny, H., Schlauch, K., Younoszai, A. ym. 2005. Obesity-related Differential Gene Expression in the Visceral Adipose Tissue. *Obesity Surgery* 15, 758-765.
- Bindels, L. B. & Delzenne, N. M. 2013. Muscle wasting: The gut microbiota as a new therapeutic target? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (10), 2186–2190. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.021
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R. & Abebe, E. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 29, 360 (1462), 1935–1943.
- Campbell, K. L., Foster-Schubert, K. E., Makar, K. W., Kratz, M., Hagman, D., Schur, E. A. & Ulrich, C. M. 2013. Gene expression changes in adipose tissue with diet- and/or exercise-induced weight loss. *Cancer Prevention Research* 6 (3), 217–231. <http://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0212>.
- Cani, P. D. & Delzenne, N. M. 2007. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 10, 729–734.
- Cani, P. D. & Delzenne, N. M. 2009. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design* 15, 1546–1558.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A. & Severia, C. 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology* 28 (2), 203–209.
- Carey, G. B. 2005. Exercise and the adipocyte. Teoksessa F. C. Mooren & K. Völker (toim.) *Molecular and cellular exercise physiology*. Champaign: Human kinetics, 303.
- Chiu, C-M., Huang, W-C., Weng, S-L., Tseng, H-C., Liang, C., Wang, W-C. ym. 2014. Systematic Analysis of the Association between Gut Flora and Obesity through High-Throughput Sequencing and Bioinformatics Approaches. *BioMed Research International*. doi 10.1155/2014/906168.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O’Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A. ym. 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63, 1913–1920. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541.

- Claus, S. P., Ellero, S. L., Berger, B., Krause, L., Bruttin, A., Molina, J. ym. 2011. Colonization-Induced Host-Gut Microbial Metabolic Interaction. *mBio* 2 (2): e00271-10. doi:10.1128/mBio.00271-10.
- Cox-York, K. A., Sheflin, A. M., Foster, M. T., Gentile, C. L., Kahl, A., Koch, L. G. 2015. Ovariectomy results in differential shifts in gut microbiota in low versus high aerobic capacity rats. *Physiological Reports*, 3 (8), e12488. <http://doi.org/10.14814/phy2.12488>.
- Davis, M. P. A., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N. & Enrighta, A. J. 2013. Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods* 1, 63 (1), 41–49.
- De Jonge, H. J. M., Fehrmann, R. S. N., de Bont, E. S. J. M., Hofstra, R. M. W., Gerbens, F., Kamps, W. A. ym. 2007. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS ONE* 2 (9): e898.
- Eläinkokeiden etiikka. 2000. Opetusministeriön työryhmien muistioita 11:2000. Viitattu 2.2.2016.
- Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J. ym. 2014. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS ONE* 9 (3): e92193. doi: 10.1371/journal.pone.0092193.
- FAO & WHO. 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Viitattu 30.01.2016. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>
- Greenberg, A. S. & Obin, M. S. 2006. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism 1–4. *American Society for Nutrition* 83 (2), 461S-465S.
- Hold, G. L., Smith, M., Grange, C., Watt, E. R., El-Omar, E. M. & Mukhopadhyia, I. 2014. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World Journal of Gastroenterology* 20 (5), 1192–1210.
- Hur, K. Y. & Lee, M-S. 2015. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes and Metabolism Journal* 39, 198–203.
- James, M. & Lindpaintner K. 1997. Why map the rat? *Trends in Genetics* 13, 171-173.
- Kalliomäki, M., Collado, M. C., Salminen, S. & Isolauri, E. 2008. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *The American Journal of Clinical Nutrition* 87 (3), 534–538.
- Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Cseke, L. J. & Seymour, E. M. 2011. Polymerase chain reaction methodologies. Teoksessa L. J. Cseke, A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, & M. V. Westfall (toim.). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 3. painos. New York: CRC Press, 38–40.

- Kivelä, R., Silvennoinen, M., Lehti, M., Rinnankoski-Tuikka, R., Purhonen, T., Ketola, T. ym. 2010. Gene expression centroids that link with low intrinsic aerobic exercise capacity and complex disease risk. *The FASEB Journal* 24(11), 4565–4574. <http://doi.org/10.1096/fj.10-157313>.
- Koch, L. G. & Britton, S. L. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics* 5, 45–52.
- Koch, L. G. & Britton, S. L. 2005. Animal models in complex diseases: An initial strategy. *Life* 57 (9), 631–638.
- Kotzampassi, K., Giamarellos-Bourboulis, E. J. & Stavrou, G. 2014. Obesity as a Consequence of Gut Bacteria and Diet Interactions. *ISRN Obesity* 651895. doi: 10.1155/2014/651895.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G. & Knight, R. 2011. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities. *Current Protocols in Bioinformatics* doi: 10.1002/0471250953.bi1007s36.
- Lahti, L., Salonen, A., Kekkonen, R.A., Salojärvi, J., Jalanka-Tuovinen, J., Palva, A., Orešič, M. & de Vos, W. 2013. Associations between the human intestinal microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ* 1:e32 <https://doi.org/10.7717/peerj.32>.
- Lambert, J. E., Myslicki, J. P., Bomhof, M. R., Belke, D. D., Shearer, J. & Reimer, R. A. 2015. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 40, 749–752.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K. ym. 2010. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS ONE*, 5 (2): e9085. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>.
- Lecomte, V., Kaakoush, N. O., Maloney, C. A., Raipuria, M., Huinao, K. D., Mitchell, H. M. & Morris, M. J. 2015. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. *PLoS ONE* 10 (5): e0126931. doi:10.1371/journal.pone.0126931.
- Leskinen, T., Rinnankoski-Tuikka, R., Rintala, M., Seppänen-Laakso, T., Pöllänen, E., Alen, M. ym. 2010. Differences in Muscle and Adipose Tissue Gene Expression and Cardio-Metabolic Risk Factors in the Members of Physical Activity Discordant Twin Pairs. *PLoS ONE* 5 (9): e12609. doi: 10.1371/journal.pone.0012609.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D & Gordon, J. I. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11070–11075.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S. & Gordon, J. I. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444, 1022–1023.



- Ley, R. E. 2010. Obesity and the human microbiome. *Current Opinion in Gastroenterology* 26 (1), 5–11.
- Liu, T-W., Park, Y-M., Holscher, H. D., Padilla, J., Scroggins, R. J., Welly, R. ym. 2015. Physical Activity Differentially Affects the Cecal Microbiota of Ovariectomized Female Rats Selectively Bred for High and Low Aerobic Capacity. *PLoS ONE* 10 (8): e0136150. doi:10.1371/journal.pone.0136150.
- Matsumoto, M., Inoue, R., Tsukahara, T., Ushida, K., Chiji, H., Matsubara, N. & Hara, H. 2008. Voluntary Running Exercise Alters Microbiota Composition and Increases n-Butyrate Concentration in the Rat Cecum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (2), 572–576.
- McArdle, W. D., Katch, F. I. & Katch, V. L. 2015. *Exercise physiology: nutrition, energy, and human performance*. 8. painos. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Meadow, J. F., Altrichte, A. E., Bateman, A. C., Stenson, J., Brown, G. Z., Green, J. L. & Bohannon, B. J. M. 2015. Humans differ in their personal microbial cloud. *PeerJ* 3: e1258;DOI10.7717/peerj.1258.
- Metsämuuronen, J. 2005. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 3. painos, Helsinki: International Methelp.
- Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31-46. doi:10.1038/nrg2626.
- Mozeš, Š., Bujňáková, D., Šefčíková, Z. & Kmeť, V. 2008. Developmental Changes of Gut Microflora and Enzyme Activity in Rat Pups Exposed to Fat-rich Diet. *Obesity* 16, 2610–2615. doi:10.1038/oby.2008.435.
- Nadler, S. T., Stoehr, J. P., Schueler, K. L., Tanimoto, G., Yandell, B. S. & Attie, A. D. 2000. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (21), 11371–11376.
- NCBI Gene, hakusana geenin nimi. Luettu 28.01.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.
- NCBI Taksonomy-Encyclopedia of Life, hakusana *Aktinobakteeri* ja *Coriobacteriaceae*. Luettu 28.01.2016. <http://eol.org/>.
- NCBI Taksonomy-Encyclopedia of Life, hakusana *Lactobacillus acidophilus*. Luettu 28.10.2015. <http://eol.org/>.
- Nguyen, T. L. A., Vieira-Silva, S., Liston, A. & Raes, J. 2015. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms* 8, 1-16 doi:10.1242/dmm.017400.

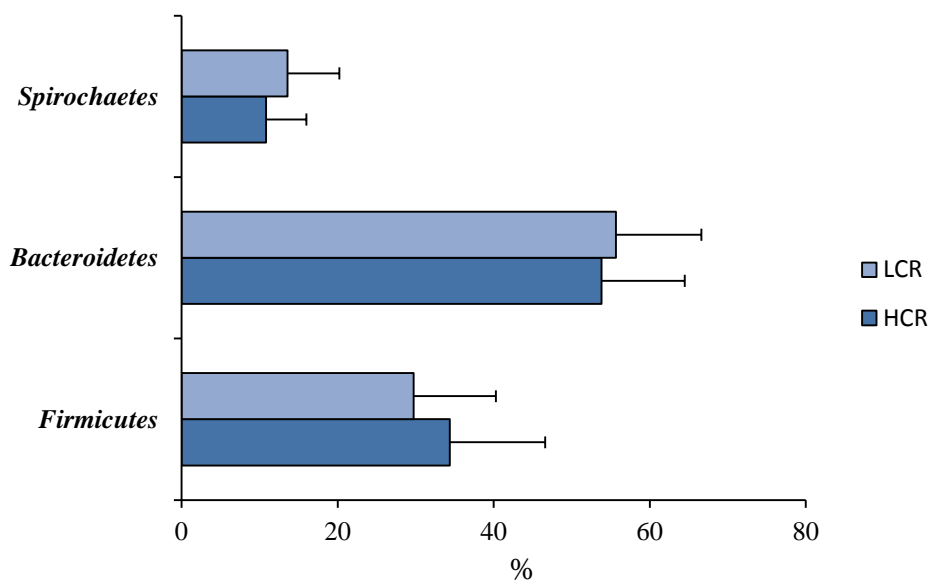
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W. & Pettersson, S. 2012. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. *Science* 336 (6086), 1262–1267.
- Pandey, A. K., Cseke, L. J., Davis, M. R., Kaufman, P. B., Seymour, E. M. & Kirakosyan, A. 2011. Real-time PCR and qRT-PCR methodologies. Teoksessa L. J. Cseke, A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, & M. V. Westfall (toim.). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 3. painos. New York: CRC Press, 188.
- Pekkala, S., Munukka, E., Kong, L., Pöllänen, E., Autio, R., Roos, C. ym. 2015. Toll-like receptor 5 in obesity: the role of gut microbiota and adipose tissue inflammation. *Obesity* 23 (3), 581-90. doi: 10.1002/oby.20993.
- Penedo, F. J. & Dahn, J. R. 2005. Exercise and well-being: a review of mental and physical health benefits associated with physical activity. *Current Opinion in Psychiatry* 18, 189–193.
- Petriz, B. A., Castro, A. P., Almeida, J. A., Gomes, C. P. C., Fernandes, G. R., Kruger, R. H., Pereira, R. W. & Franco, O. L. 2014. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics* 15, 511. doi:10.1186/1471-2164-15-511.
- Pudlo, N. A., Urs, K., Kumar, S. S., German, J. B., Mills, D. A. & Martensa, E. C. 2015. Symbiotic human gut bacteria with variable metabolic priorities for host mucosal glycans. *mBio* 6 (6), e01282-15. doi: 10.1128/mBio.01282-15.
- Queipo-Ortun˜o, M. I., Seoane, L. M., Murri, M., Pardo, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Cardona, F., Casanueva, F. & Tinahones, F. J. 2013. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS ONE* 8 (5): e65465. doi:10.1371/journal.pone.0065465.
- Rankinen, T. & Bouchard, C. 2005. Genes, genetic heterogeneity, and exercise phenotypes. Teoksessa F. C. Mooren & K. Völker (toim.) *Molecular and cellular exercise physiology*. Champaign: Human kinetics, 45.
- Reddy, B. L. & Saier, M. H. 2015. Autism and Our Intestinal Microbiota. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 25, 51–55. doi:10.1159/000375303.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L. ym. 2013. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* 341 (6150). doi: 10.1126/science.1241214.
- Rintala, A., Pietilä, S., Munukka, E., Eerola, E., Pursiheimo, J., Pekkala, S. & Huovinen, P. 2016. Impact of DNA Extraction and 16S Primers on the Results of Gut Microbiota Analysis by Illumina MiSeq Sequencing. Manuscript.

- Rosenbaum, M., Knight, R. & Leibel, R. L. 2015. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 26 (9), 493–501.
- Santacruz, A., Collado, M. C., García-Valdés, L., Segura, M. T., Martín-Lagos, J.A., Anjos, T. ym. 2010. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *The British Journal of Nutrition* 104 (1), 83-92. doi:http://dx.doi.org/10.1017/S0007114510000176.
- Scheperjans, F., Aho, V., B. Pereira, P, A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E. ym. 2015. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and Clinical Phenotype. *Movement Disorders* 30 (3), 350–358.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. & Hardt, P. D. 2010. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity* 18, 190–195. doi: 10.1038/oby.2009.167.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* 90, 859–904.
- Shaw, M. H., Kamada, N., Kim, Y-G. & Núñez, G. 2012. Microbiota-induced IL-1 $\beta$ , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *The journal of experimental medicine* 209 (2), 251–258. doi: 10.1084/jem.20111703.
- Sousa, A. M. & Pereira, M. O. 2013. A prospect of current microbial diagnosis methods. Teoksessa A. Méndez-Vilas (toim.) *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center, 1427–1438.
- Stanford, K. I., Middelbeek, R. J. W. & Goodyear, L. J. 2015. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Being and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 64, 2361–2368. doi: 10.2337/db15-0227.
- Taira, R., Yamaguchi, S., Shimizu, K., Nakamura, K., Ayabe, T. & Taira, T. 2015. Bacterial cell wall components regulate adipokine secretion from visceral adipocytes. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 56, 149-154.
- Tang, W. W. H. & Hazen, S. L. 2014. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation* 124 (10), 4204–4211. doi:10.1172/JCI72331.
- Thompson, D., Karpe, F., Lafontan, M. & Frayn, K. 2012. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. *Physiological Reviews* 92, 157–191. doi:10.1152/physrev.00012.2011.
- Toivonen, R. K., Emani, R., Munukka, E., Rintala, A., Laiho, A., Pietilä, S. & Pursiheimo, J-P. 2014. Fermentable fibres condition colon microbiota and promote diabetogenesis in NOD mice. *Diabetologia* 57, 2183–2192. doi 10.1007/s00125-014-3325-6.

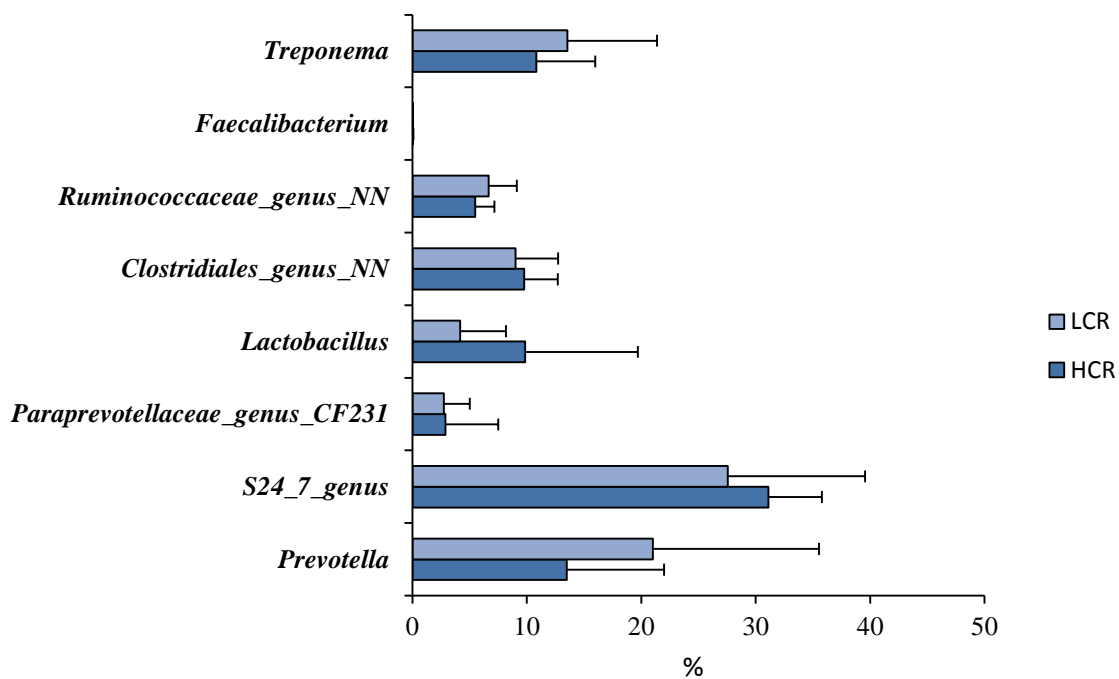
- Tremaroli, V. & Bäckhed, F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489. doi:10.1038/nature11552.
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E. ym. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457 (22). doi:10.1038/nature07540.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. & Gordon, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Vergès, B., Petit, J. M., Duvillard, L., Dautin, G., Florentin, E., Galland, F. & Gamber, P. 2006. Adiponectin Is an Important Determinant of ApoA-I Catabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 1364-1369. doi: 10.1161/01.ATV.0000219611.50066.bd.
- Vrieze, A., Holleman, F., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B. L. & Nieuwdorp, M. 2010. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 53, 606–613. doi 10.1007/s00125-010-1662-7.
- Wos-Oxley, M., Bleich, A., Oxley, A. P. A., Kahl, S., Janus, L. M., Smoczek, A., ym. 2012. Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut Microbes* 3, 234–249.
- Xu, J., Mahowald, M. A., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Martens, E. C. ym. 2007. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol* 5 (7): e156. doi: 10.1371/journal.pbio.0050156.
- Yutin, N. & Galperin, M. Y. 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore-formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology* 15 (10), 2631–2641. doi: 10.1111/1462-2920.12173.
- Zhang, H., Dibaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y. ym. 2008. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *PNAS* 106 (7), 2365-2370, doi: 10.1073/pnas.0812600106.
- Zhou, M., Duan, Q., Li, Y., Yang, Y., Hardwidge, P. R. & Zhu, G. 2015. Membrane cholesterol plays an important role in enteropathogen adhesion and the activation of innate immunity via flagellin–TLR5 signaling. *Archives of Microbiology* 197, 797–803. doi 10.1007/s00203-015-1115-2.
- Zlotnikov-Klionsky, Y., Nathansohn-Levi, B., Shezen, E., Rosen, C., Kagan, S., Bar-On, L. ym. 2015. Perforin-positive dendritic cells exhibit an immuno-regulatory role in metabolic syndrome and autoimmunity. *Immunity* 43, 1–12.

**LIITE 1.** Loput Qiime -analyysin taksonomiatulokset. Kuva 1. pääjaksot ja kuva 2. suvut.

1.

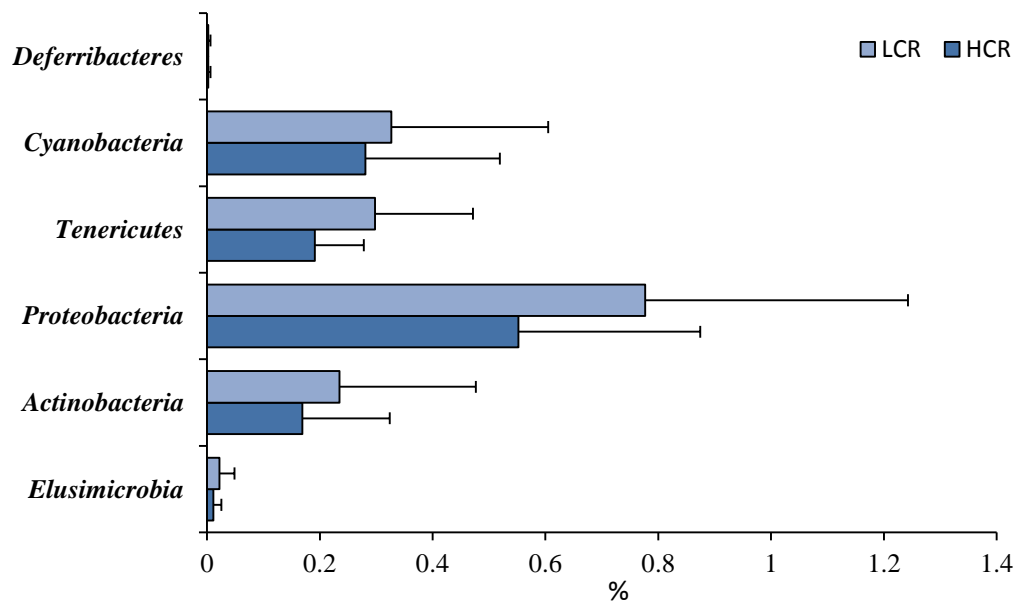
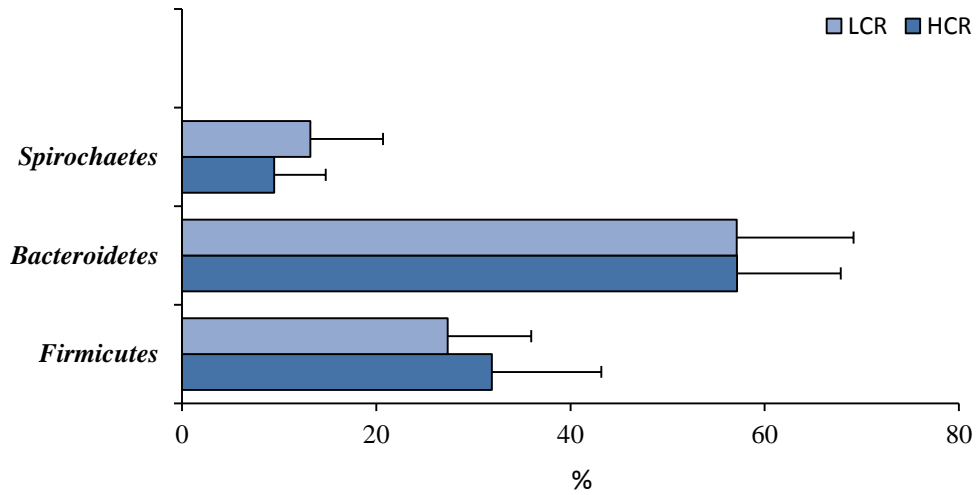


2.

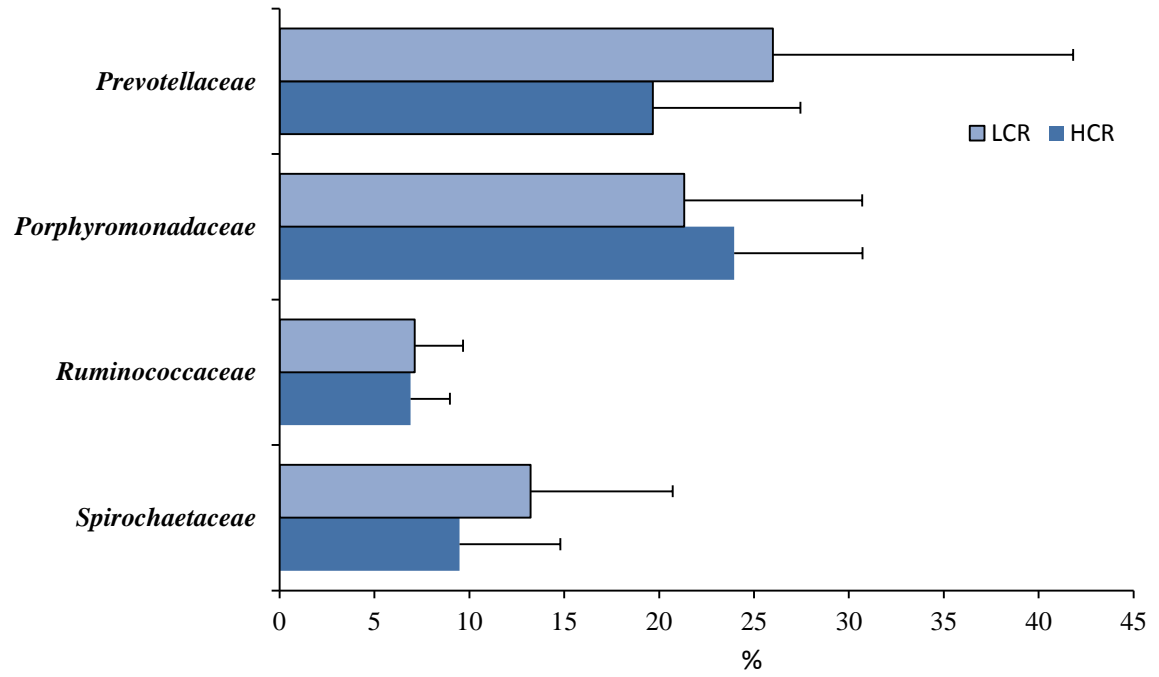


**LIITE 2.** Loput Kraken -analyysin taksonomitulokset. Kuva 1. pääjaksot, kuva 2. heimot ja kuva 3. suvut.

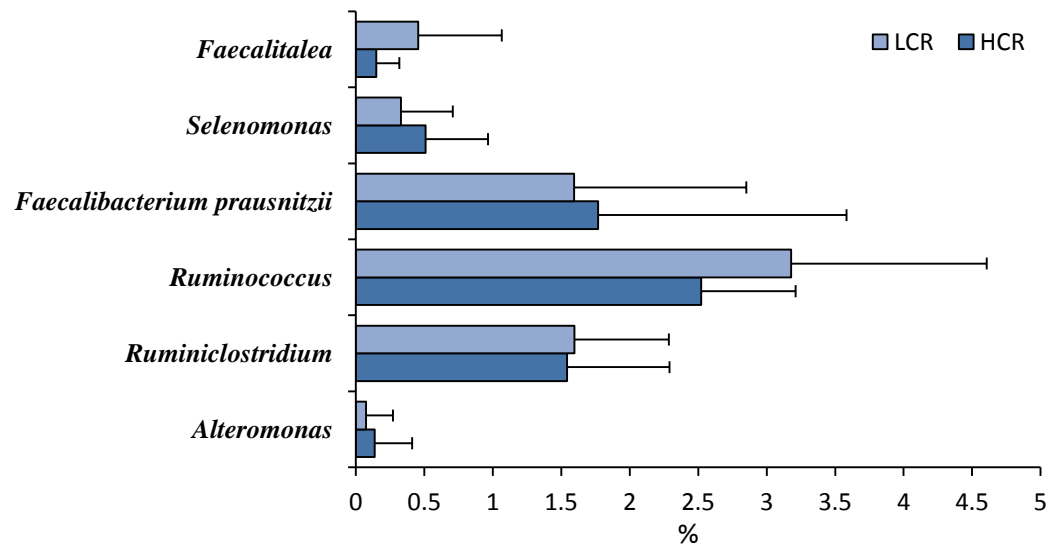
1.



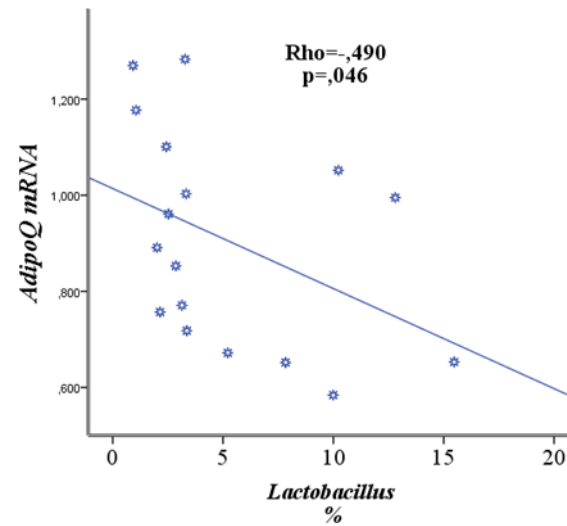
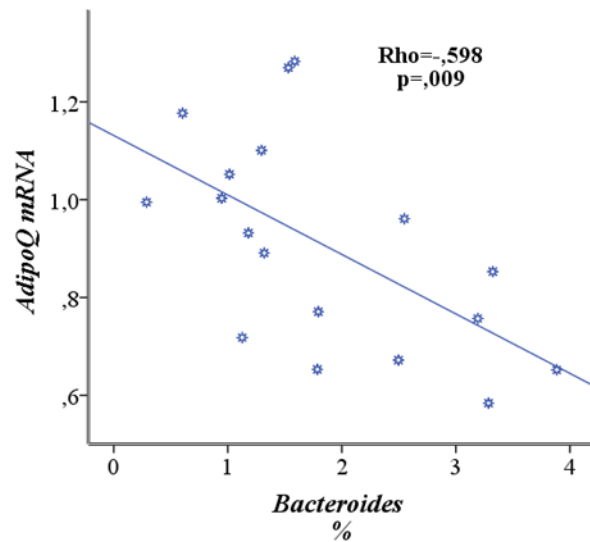
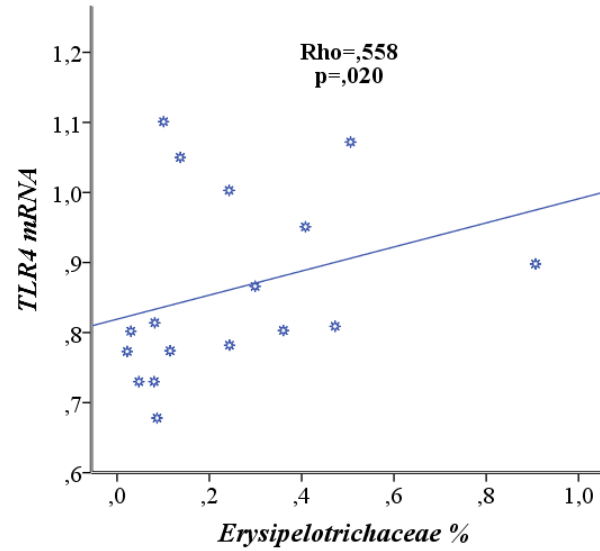
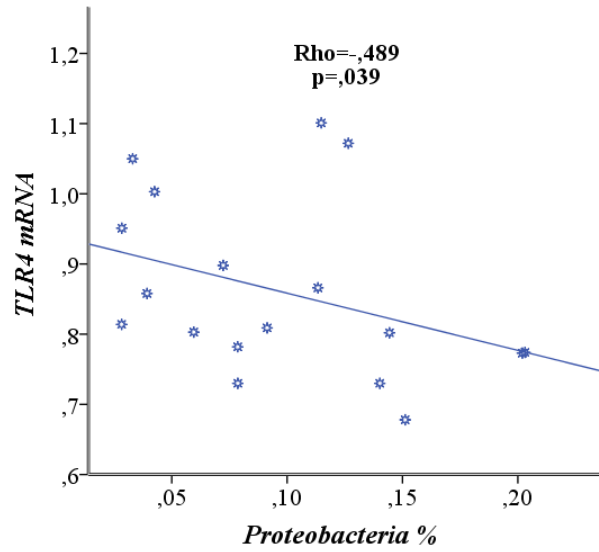
2.



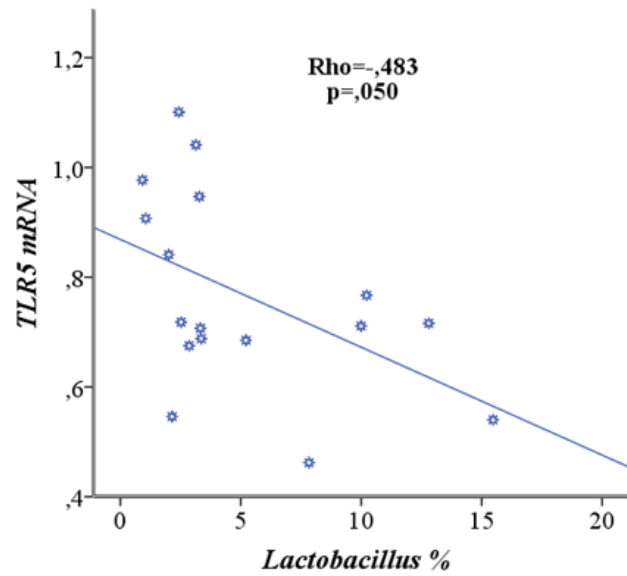
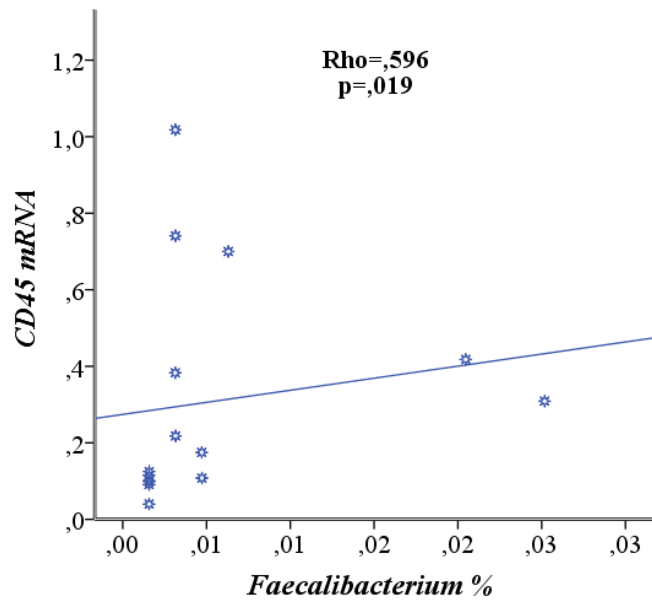
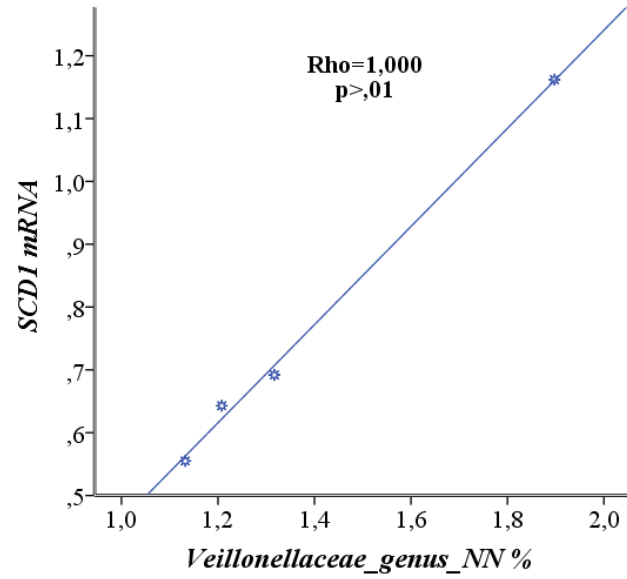
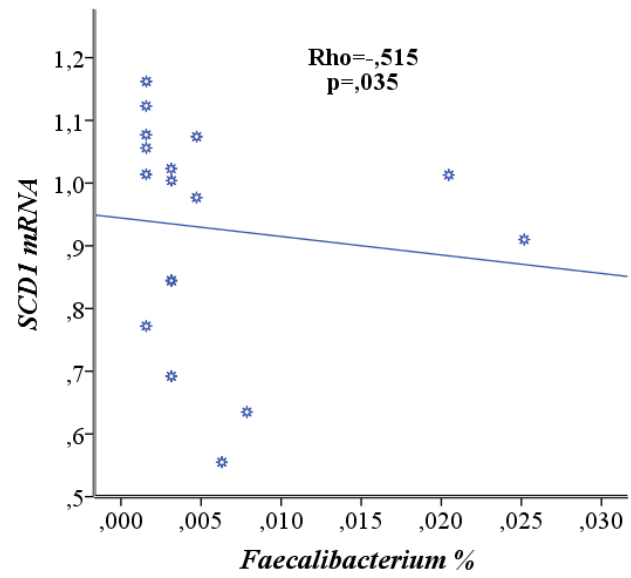
3.



**LIITE 3.** Loput tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot geenien ja Qiime -analyysin mikrobiryhmien välillä. Tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot tutkittujen geenien ja sellaisten mikrobiryhmien välillä, joiden kohdalla ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa HCR - ja LCR - rottien välillä. Rho= Spearmanin järjestyskorrelaation,  $p \leq 0,05$ .







**LIITE 4.** Loput tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot geenien ja Kraken -analyysin mikrobiryhmien välillä. Tilastollisesti merkitsevät korrelaatiot tutkittujen geenien ja sellaisten mikrobiryhmien välillä, joiden kohdalla ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa HCR - ja LCR -rottien välillä. Rho= Spearmanin järjestyskorrelaation,  $p \leq 0,05$ .

