

**VOIDAANKO PERINNÖLLISESTI MATALA AEROBINEN
KAPASITEETTI KUMOTA HYVÄN AEROBISEN KAPASITEETIN
OMAAVILTA ROTILTA SAADULLA ULOSTEENSIIRTEELLÄ?**

Arttu Venäläinen

Liikuntalääketieteen pro gradu -tutkielma

Liikuntatieteellinen tiedekunta

Jyväskylän yliopisto

Kevät 2021

TIIVISTELMÄ

Venäläinen, A. 2021. Voidaanko perinnöllisesti matala aerobinen kapasiteetti kumota hyvän aerobisen kapasiteetin omaavilta rotilta saadulla ulosteensiirteellä? Liikuntatieteellinen tiedekunta, Jyväskylän yliopisto, Liikuntalääketieteen pro gradu -tutkielma, 55 s.

Suolistomikrobiston koostumuksen on todettu vaikuttavan laajalti yksilön terveyteen ja olevan vaihtelevissa määrin periytyvä. Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli selvittää ulosteensiirron vaikutuksia LCR- (low-capacity runner, matalan aerobisen kapasiteetin juoksija) ja HCR (high-capacity runner, korkean aerobisen kapasiteetin juoksija) -rottien suolistomikrobiston koostumukseen, vapaaehtoiseen juoksuharjoitteluun, maksimisuorituskykyyn ja aineenvaihduntaa kuvastaviin veriarvoihin.

Tässä tutkimuksessa käytetyt rotat olivat aerobiselta kapasiteetiltaan eroavia 44. sukupolven LCR- ja HCR -rottia, joita edeltävä sukupolvi kuljetettiin Suomeen Toledon yliopistosta Yhdysvalloista lokakuussa 2019. Rotat (n=32) jaettiin yhteensä kahdeksaan ryhmään ja kaikille rotille tehtiin suoliston puhdistus mikrobeista suolihuuhtelun avulla. Neljälle ryhmälle tehtiin lisäksi ulosteensiirto. Suolistomikrobiston koostumusta tarkasteltiin tutkimuksen aikana kolmesti ja neljän ryhmän osalta mitattiin häkissä sijaitsevan juoksupyörän käyttöä. Tutkimuksen päätteeksi jokaisen ryhmän maksimisuorituskykyä mitattiin juoksumatolla. Verinäytteet kerättiin lopetuksen yhteydessä.

Kaikkien rottaryhmien suolistomikrobiston koostumus vaikutti pääjaksotasolla muotoutuvan kohti runsaampaa bakteroidi- pääjakson ja niukempaa firmikuutti -pääjakson osuutta, mutta muutokset eivät olleet merkittäviä. Ainoastaan ulosteensiirron vastaanottaneen HCR-ryhmän firmikuutti -pääjakson osuuden havaittiin laskeneen ($p<0.05$) suolihuuhtelun saaneeseen LCR-ryhmään nähden ulosteensiirron jälkeen. Ulostensiirron vastaanottaneen juoksupyörällisen HCR-ryhmän LDL-kolesterolin määrän todettiin lisäksi olleen alhaisempi suolihuuhtelun saaneeseen LCR- ($p<0.001$) ja juoksupyörälliseen LCR -ryhmään ($p<0.05$) nähden. Kokonaisjuoksumatkaa tarkastellessa ulosteensiirron vastaanottanut juoksupyörällinen HCR-ryhmä juoksi tutkimuksen viimeisellä viikolla enemmän kuin ulosteensiirron vastaanottanut juoksupyörällinen LCR-ryhmä ($p<0.05$). Kaikkien HCR-ryhmien maksimisuorituskyky, lukuun ottamatta ainoastaan suolihuuhtelun vastaanottanutta ryhmää, todettiin suolihuuhtelun saanutta LCR-ryhmää paremmaksi ($p<0.05$).

Tämän pro gradu -tutkielman tulosten pohjalta voidaan todeta suolihuuhtelun ja LCR-rotilta saadun ulosteensiirteen vähentävän mahdollisesti HCR-rottien suolistomikrobiston sisältämän firmikuutti -pääjakson osuutta. Suolihuuhtelun ja ulosteensiirron avulla voidaan lisäksi mahdollisesti vähentää LCR -rottien seerumin LDL-kolesterolin määrää HCR-ryhmiin nähden. Ulostensiirron ei puolestaan voida tämän tutkielman tulosten perusteella katsoa vaikuttavan HCR- tai LCR -rottien maksimisuorituskykyyn tai vapaaehtoiseen juoksuharjoitteluun. Johtopäätökset kaipaavat kuitenkin tuekseen suuremman otannan sekä kontrolliryhmät. Laajempaa aineistoa ollaan keräämässä tämän pro gradu -tutkielman kirjoitushetkellä.

Asiasanat: suolistomikrobisto, ulosteensiirto, rotta, kolesteroli, suorituskyky, kehonkoostumus

ABSTRACT

Venäläinen, A. 2021. Could an inherited low aerobic capacity be reversed by a fecal microbiota transplant from rats with high aerobic capacity? Faculty of Sport and Health Sciences, University of Jyväskylä, Master's thesis of Sports and Exercise Medicine, 55 pp.

The composition of gastrointestinal microbiota has been shown to have a wide impact on health of individuals and recognized to be hereditary at a certain level. The purpose of this master's thesis was to study the impact of a fecal microbiota transplantation on LCR- (low-capacity runner) and HCR (high-capacity runner) rats' gastrointestinal microbiota composition, running distance, physical performance, and metabolism-related serum variables.

This study examined 44th generation LCR- and HCR rats that have different aerobic capacity. The previous generation was transported to Finland from the University of Toledo (the United States of America) in October 2019. Rats (n=32) were divided into eight groups and their bowels were cleansed from microbes. Four groups were treated with a fecal microbiota transplant (FMT). The composition of the gastrointestinal microbiota of the rats was examined three times during the five-week study and voluntary running distance was measured from four groups which had running wheels in their cages. At the end of the study each group was tested for the maximum running capacity -test on the treadmill. Blood samples were collected at the time of sacrificing of the animals.

In all groups the composition of the gastrointestinal microbiota seemed to take shape towards the more abundant level of Bacteroidetes phylum and less abundant level of Firmicutes phylum although the shifts were not significant. Only the FMT-treated HCR-group was found to have decreased level of Firmicutes -phylum ($p < 0.05$) after the bowel cleansing and FMT when compared to the LCR-group which underwent bowel cleansing only. The FMT-treated HCR-group with a running wheel also had a significantly lower LDL-cholesterol levels compared to the bowel cleansing -treated LCR-group ($p < 0.001$) and LCR-group with a running wheel cage ($p < 0.05$). When looking at the results of total running distance, the FMT -treated HCR-group ran significantly more ($p < 0.05$) compared to the FMT-treated LCR-group with a running wheel cage. With the exception of bowel cleansing only -group, all HCR-groups had also significantly ($p < 0.05$) better physical performance compared to the LCR-group that underwent bowel cleansing only.

Based on the results of this study it can be stated that bowel cleansing and fecal microbiota transplantation from LCR-rats could possibly decrease the abundance of the firmicutes -phylum in the gastrointestinal microbiota of HCR-rats. Bowel cleansing and fecal microbiota transplantation could also possibly decrease the amount of LDL-cholesterol serum levels in LCR rats compared to HCR rats. However, based on the results of this study it cannot be stated that fecal microbiota transplantation would affect the physical performance or running distance of LCR- or HCR -rats. To support these conclusions a larger sample size and control groups are needed. More data is being collected while writing this master's thesis.

Key words: gastrointestinal microbiota, fecal microbiota transplant, rat, cholesterol, physical performance, body composition

KÄYTETYT LYHENTEET

BCAA	branch-chained amino acid, haaraketjuinen aminohappo
BCoAT	butyryl-CoA-transferase, butyryyli-CoA-transferaasi
BMI	body mass index, painoindeksi
CTRL	control group, kontrolliryhmä
FFAR2	free fatty acid receptor 2, vapaa rasvahapporeseptori 2
FGF19	fibroblast growth factor 19, fibroblastikasvutekijä 19
FMT	fecal microbial transplantation, ulosteensiirto
FXR	farnesoid X receptor, farnesoidi X -reseptori
GLP-1	glucagon-like peptide 1, glukagonin kaltainen peptide 1
Gpbar1	G-protein-coupled bile acid receptor, G-proteiinikytkentäinen sappihapporeseptori
HCR	high-capacity runner
HDL	high-density lipoprotein, korkean tiheyden lipoproteiini
HF	high-functioning
LCR	low-capacity runner
LF	low-functioning
LDL	low-density lipoprotein, matalan tiheyden lipoproteiini
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysakkaridi
mmdA	methylmalonyl-CoA-decarboxylase, metyyylimalonyyli-CoA-dekarboksylaasi
NGS	next generation sequencing, uuden sukupolven sekvensointitekniologia
OTU	operational taxonomic unit, toiminnallinen taksonominen yksikkö
PBS	phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu fysiologinen suolaliuos
PCR	polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
PEG	polyethylene glycol, polyetyleeniglykoli / suolihuuhtelun jälkeinen mittausajankohta
POST	post of, loppumittausajankohta
PRE	previous to, alkumittausajankohta
PXR	pregnane X receptor, pregnaani X -reseptori
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, kvantitatiivinen PCR
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribosomaalinen ribonukleinihappo
RW	running wheel, juoksupyörä
SCFA	short chain fatty acid, lyhyketjuinen rasvahappo
VDR	vitamin D receptor, D-vitamiinireseptori

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

1 JOHDANTO.....	1
2 TEORIA.....	3
2.1 Suolistomikrobisto.....	3
2.1.1 Suolistomikrobiston kehittyminen.....	5
2.1.2 Perimän vaikutus suolistomikrobistoon.....	7
2.1.3 Mikrobien tutkiminen.....	7
2.1.4 Suolistomikrobisto ja lihavuus.....	8
2.1.5 Suolistomikrobisto ja fyysinen aktiivisuus.....	12
2.1.6 Liikunnan vaikutukset suolistomikrobistoon.....	13
2.2 Ulostensiirto.....	14
2.2.1 Ulostensiirron vaikutus suolistomikrobiston koostumukseen.....	14
2.2.2 Ulostensiirron vaikutus fyysiseen suorituskyykyyn.....	14
2.2.3 Ulostensiirron vaikutus seerumin rasva-, sokeri- ja insuliiniarvoihin.....	15
2.3 Tutkimuksessa käytetty rottamalli.....	15
2.3.1 LCR- ja HCR -rottapopulaatioiden jalostus.....	16
2.3.2 LCR- ja HCR -rottapopulaatioiden erot.....	16
3 METODIT.....	18
3.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimuskysymykset.....	18
3.2 Tutkimusmenetelmät.....	18
3.2.1 Koe-eläimet.....	18
3.2.2 Suoliston puhdistaminen ja ulostensiirto.....	20

3.2.3	Suolistomikrobiston koostumuksen selvittäminen	21
3.2.4	Maksimisuorituskyvyn mittaaminen	22
3.2.5	Veriarvojen mittaaminen	22
3.2.6	Tilastolliset menetelmät.....	23
4	TULOKSET.....	25
4.1	Suolistomikrobiston koostumus	25
4.2	Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu	29
4.3	Maksimisuorituskykytesti.....	30
4.4	Veriarvot.....	31
4.5	Kehonkoostumukselliset muuttujat	33
4.6	Ravinnon kulutus	35
5	POHDINTA.....	37
5.1	Ulosteensiirron vaikutus suolistomikrobiston koostumukseen	37
5.2	Ulosteensiirron vaikutus suorituskykyyn ja juoksumotivaatioon.....	38
5.3	Ulosteensiirron vaikutus veriarvoihin	40
5.4	Ulosteensiirron vaikutus kehonkoostumukseen	41
5.5	Ravinnonkulutus tutkimuksen eri vaiheissa	42
5.6	Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys.....	42
5.6.1	Tutkimuksen validiteetti ja reliabiliteetti.....	42
5.6.2	Tutkimuksen eettisyys	44
5.7	Johtopäätökset ja ehdotus jatkotutkimuksista.....	45
	LÄHTEET	46

1 JOHDANTO

Suolistomikrobiston koostumuksen on todettu olevan yhteydessä laajaan sairauksien kirjoon ja esimerkiksi lihaviin tai tyypin 2 diabetesta sairastavien henkilöiden suolistomikrobiston koostumuksen onkin havaittu poikkeavan terveestä väestöstä (Valdes ym. 2018; Rinninella ym. 2019). Fyysisen aktiivisuuden ja suolistomikrobiston koostumuksen välinen yhteys on samaan tapaan tunnistettu; fyysisesti aktiivisilla henkilöillä tavataan usein ylipainoisia tai lihaviin henkilöihin verrattuna monimuotoisempi suolistomikrobiston koostumus ja vähemmän patogeenisiä, eli tauteja aiheuttavia mikrobeja (Batsson ym. 2018; Kern ym. 2020). Suolistomikrobiston koostumuksen ja lihavuuden välisen yhteyden taustalla arvioidaan olevan useita eri mekanismeja, jotka säätelevät muun muassa yksilön energia-aineenvaihduntaa, vastustuskykyä ja suoliston epiteelikerroksen toimintaa, insuliiniresistenssiä ja sappinestemetaboliaa (Lee ym. 2020). Kaksostutkimusten avulla suolistomikrobiston koostumuksen on havaittu lisäksi olevan tietyissä määrin periytyvä, sekä hyvässä että pahassa (Beaumont ym. 2016; Lim ym. 2017).

Ulostensiirtoa käytetään Suomessa toistaiseksi ainoastaan *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttaman antibioottiripulin hoidossa (Lahtinen ym. 2019), mutta menetelmän on havaittu saavan aikaan suotuisia tai tavoiteltuja vaikutuksia myös tutkimuksissa, joissa on tarkasteltu siirteiden vaikutusta muun muassa suolistomikrobiston koostumukseen, fyysiseen suorituskykyyn ja aineenvaihduntaa kuvastaviin muuttujiin (Vrieze ym. 2012; Li ym. 2016; Staley ym. 2018; Mintz ym. 2018; Fieldin ym. 2019; Zhang ym. 2019). Kaikkia ulosteensiirron taustalla olevia toiminta- ja vaikutusmekanismeja ei kuitenkaan vielä täysin ymmärretä (Xiao ym. 2020), jonka vuoksi aihepiiri kaipaa lisätutkimusta. Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena on selvittää ulosteensiirron vaikutuksia LCR- (low-capacity runner, matalan aerobisen kapasiteetin juoksija) ja HCR (high-capacity runner, korkean aerobisen kapasiteetin juoksija) -rottien suolistomikrobiston koostumukseen, maksimisuorituskykyyn, vapaaehtoiseen juoksuharjoitteluun ja aineenvaihduntaa kuvastaviin veriarvoihin. Aerobiselta kapasiteetiltaan perinnöllisesti eroavien LCR- ja HCR -rottien avulla on aiemmin tutkittu muun muassa aerobisen kestävyyskunnan sekä sydän- ja verisuonitautien, rasvamaksan, unihäiriöiden, sekä

stressinsietokyvyn välisiä yhteyksiä. Tutkimustulosten perusteella juoksukapasiteetilla onkin todettu olevan vahva yhteys yksilön terveyteen (Myers ym. 2002; Koch ym. 2012), jonka vuoksi perinnölliseltä aerobiselta kapasiteetiltaan eroavat rotat soveltuvat hyvin tämän tutkimuksen tarkastelun kohteeksi.

Tässä kohtaa haluan kiittää Satu Pekkala ja Sanna Lensua (Jyväskylän yliopisto) pro gradu -tutkielmani erinomaisesta ohjauksesta ja kaikesta saamastani tuesta.

2 TEORIA

2.1 Suolistomikrobisto

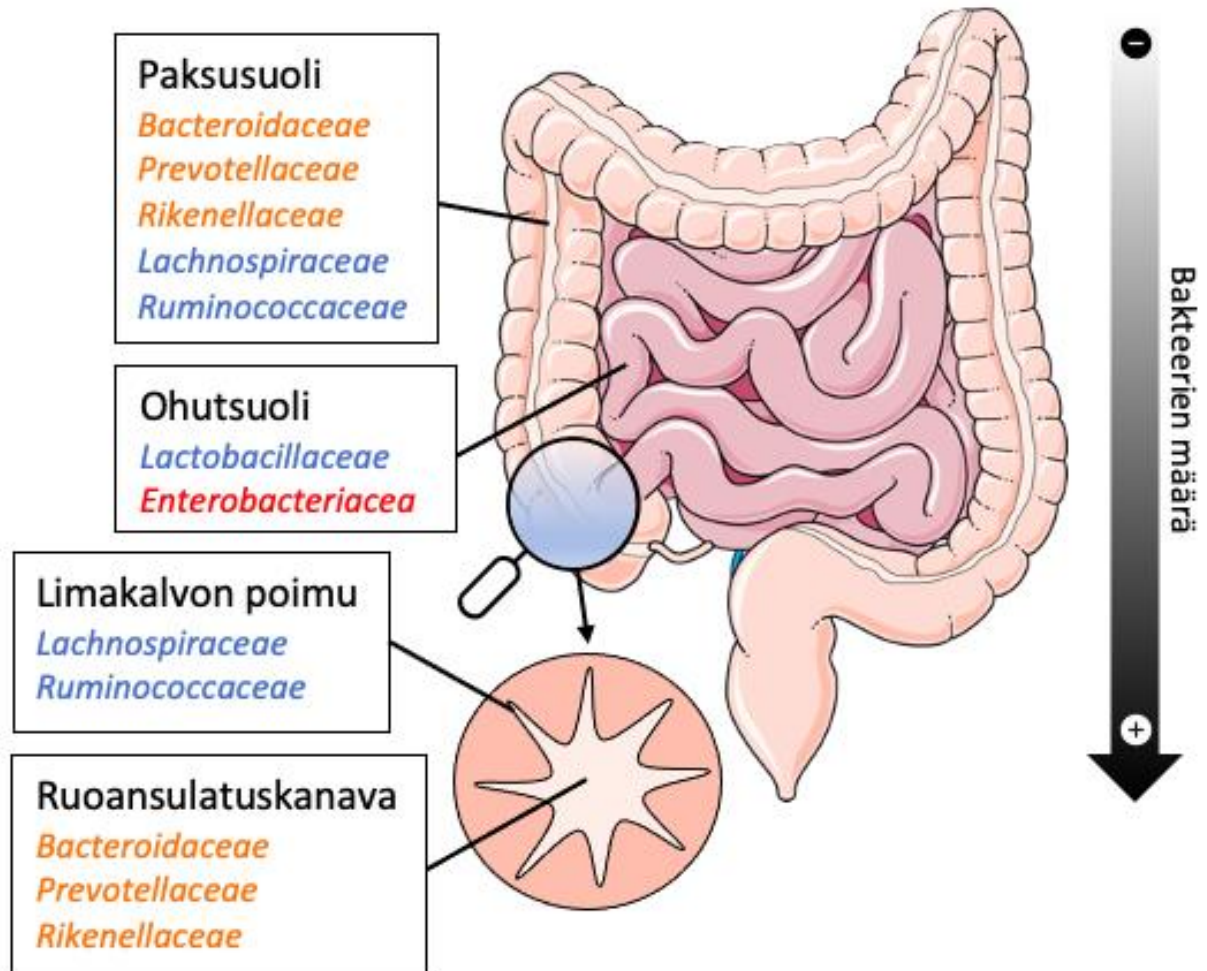
Ihmisen ja eläinten ihoa sekä limakalvoja, suolisto mukaan lukien, asuttaa vähintäänkin yhtä suuri joukko mikrobeja kuin ihmisessä on soluja (Sender ym. 2016). Suolistomme mikrobisto koostuu runsaasta määrästä erilaisia bakteereja, bakteriofageja, arkeoneja, viruksia sekä eukaryootteja. Nämä edellä mainitut mikro-organismit muodostavat kullekin yksilölle ominaisen ja yksilöllisen mikrobiston (Sekirov ym. 2010). Ruoansulatuskanavan sisältämien bakteerien kokonaismäärän on arvioitu ylittävän jopa 10^{14} (Thursby & Juge 2017) ja erilaisten bakteerilajien määrän arvioitu vaihtelevan välillä 100 – 1000 (Adak & Khan 2019). Suolistoa asuttavien bakteerien kokonaismäärä voi siis olla lähes kymmenkertainen koko ihmiskehon solumäärään nähden (Thursby & Juge 2017). Viruksia sen sijaan tavataan suolistossa jopa kymmenkertaisesti bakteerien määrään nähden (Mukhopadhyaya ym. 2019).

Bakteerien määrä vaihtelee ruoansulatuskanavan osasta riippuen siten, että vatsalaukussa määrä on noin 10^1 ja kasvaa paksusuolta lähestyttäessä noin 10^{12} bakteerisolunäytegrammaa kohden (Sekirov ym. 2010). Eri sukujen bakteerit myös jakautuvat tyypillisesti ruoansulatuskanavan eri osiin (Sekirov ym. 2010; Donaldson ym. 2015). Muun muassa ohutsuolen ja paksusuolen pituus sekä muut fysiologiset ominaisuudet, kemiallinen koostumus ja ravintoainekoostumus vaikuttavat tiettyjen bakteerien esiintyvyyteen kussakin ruoansulatuskanavan osassa (Donaldson ym. 2015). Suoliston bakteereista noin kaksi kolmasosaa on hapettomissa oloissa kasvavia anaerobisia bakteereja. Kolmasosan suoliston bakteerikannasta puolestaan muodostavat sekä hapellisissa, että hapettomissa oloissa kasvavat fakultatiiviset anaerobiset bakteerit ja hapellisissa olosuhteissa kasvavat aerobiset bakteerit (Sekirov ym. 2010). Puhtaasti anaerobisten bakteerien dominanssista huolimatta ohutsuolessa tavataan kuitenkin eniten juuri fakultatiivisia anaerobisia bakteereja (Ruan ym. 2020).

Vallitseva bakteeripääjakso:

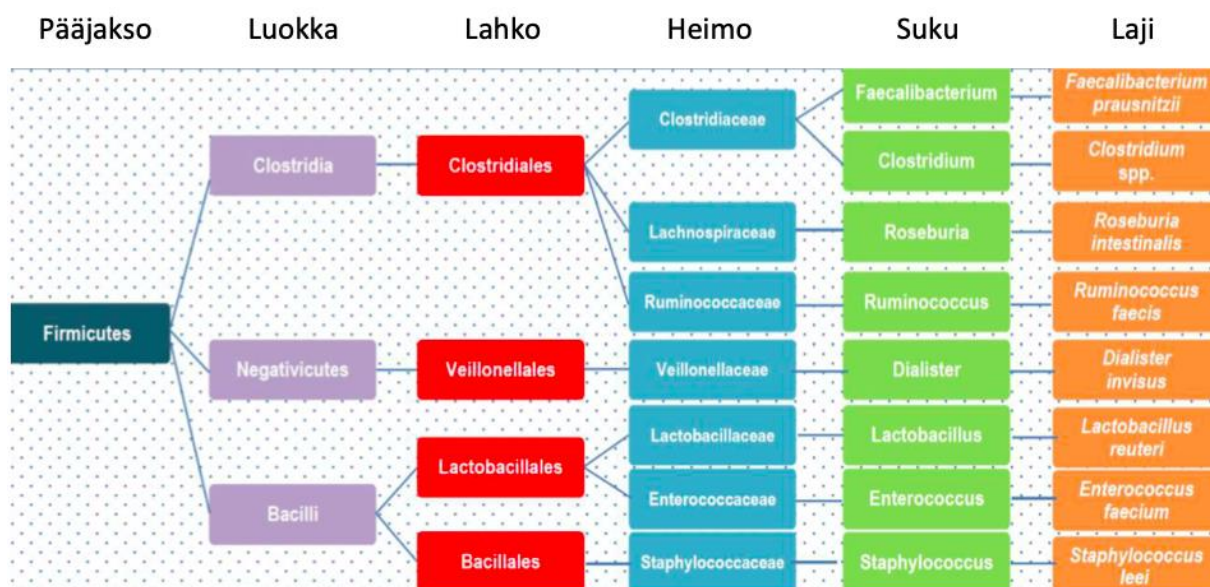
Bakteroidi Firmikuutti Aktinobakteeri Proteobakteeri Verrukomikrobi

Vallitseva bakteerisuku:



KUVIO 1. Suoliston bakteerien jakautuminen suoliston osan mukaan. (Muokattu Servier Medical Art by Servier. Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

Bakteerit, kuten muutkin eliöt, voidaan jakaa pääjaksoista polveutuen luokkiin, lahkoihin, heimoihin, sukuihin ja viimeisimpänä lajeihin. Bakteroidi- sekä firmikuutti -pääjaksot muodostavat yli 90 % ihmisen suolistomikrobiston koostumuksesta ja jäljelle jäävä kymmenesosa koostuu lähinnä aktinobakteeri-, proteobakteeri-, fusobakteeri- ja verrukomikrobi -pääjaksoista. Firmikuutti -pääjakso koostuu noin 95 % osin *Clostridium* -suvun bakteereista ja bakteroidi -pääjakso *Bacteroides* sekä *Prevotella* -suvun bakteereista (Rinninella ym. 2019).



KUVIO 2. Esimerkki taksonomisesta luokittelusta (Muokattu Rinninella ym. 2019. Creative Commons Attribution 4.0 International License).

Taksonomisen luokittelun ohella suoliston bakteerit voidaan mahdollisesti jakaa myös koostumuksensa ja tehtävänsä mukaisesti joukkoihin, eli enterotyyppeihin. Enterotyyppijaottelun mukaisesti ensimmäinen ryhmä sisältää enimmäkseen *Bacteroides* -suvun bakteereita, jotka suorittavat sakkarylyttisiä ja proteolyyttisiä toimintoja, eli pilkkovat hiilihydraatteja ja proteiineja. Toinen enterotyyppiryhmä sisältää enimmäkseen musiinin hajottamiseen osallistuvia *Prevotella* -suvun bakteereita ja kolmas enterotyyppiryhmä musiinia pilkkovia sekä sokereita kuljettavia *Ruminococcus* -suvun bakteereita (Arumugam ym. 2011). Musiini on yleisnimitys glykoproteiineihin kuuluville hiilihydraateista ja aminohapoista koostuville valkuaisaineille, joiden tehtävänä on muun muassa suojata sekä voidella niiden alla olevaa epiteelikudosta (Bansil ym. 1995).

2.1.1 Suolistomikrobiston kehittyminen

Ensimmäiset mikrobit voidaan havaita jo raskausvaiheessa kohdun kudoksissa, mutta runsaamman kehityksen voidaan katsoa alkavan vasta syntymästä (Rodriquez ym. 2015; Thursby & Juge 2017). Syntymähetkellä suolistomikrobiston kehitykseen vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa enneaikaisuus tai täysiaikaisuus, sekä synnytystapa (Thursby & Juge 2017;

Rinninella ym. 2019). Ennenaikaisesti synnyttäessä mikrobiston koostumukseen voivat vaikuttaa lapsen elimistön kehittyneisyys tai kehittymättömyys, antibioottien käyttö sekä sairaalassaoloajan pituus (Arboleya ym. 2012). Ennenaikaisesti syntyneillä lapsilla on todettu olevan suhteellisesti runsaampi fakultatiivisten anaerobisten bakteerien osuus puhtaasti anaerobisiin bakteereihin nähden, kun vertailun kohteena ovat olleet täysiaikaisena syntyneet lapset (Arboleya ym. 2012). Alateitse syntyessä lapsi kohtaa ensimmäisenä äidin emättimen laktobasillipitoisen ympäristön, kun taas sektiolalla syntyessä bakteroidikannan muodostumisen on havaittu olevan viivästynyttä ja fakultatiivisten anaerobisten bakteerien osuuden runsaampi alateitse syntyneisiin verrattuna (Thursby & Juge 2017). Sektiolla syntyessä lapsen suolisto perii mikrobeja lähinnä iholta ja sairaalan pinnoilta (Rinninella ym. 2019). Syntymästä lähtien mikrobiston koostumus kehittyy sekä monipuolistuu ja noin 2,5 - 3 vuoden iässä se muistuttaa jo koostumukseltaan sekä toiminnaltaan aikuisen ihmisen suolistomikrobistoa (Thursby & Juge 2017; Rinninella ym. 2019). Tässä iässä ja sen jälkeenkin tärkein suolistomikrobiston koostumusta muokkaava tekijä on ravinto. Lisäksi mikrobiston koostumusta muokkaavat läpi elämän muun muassa elinympäristö, lääkkeet, sairaudet, fyysinen aktiivisuus sekä ikääntyminen (Thursby & Juge 2017; Rinninella ym. 2019).

Dysbioottinen, eli koostumukseltaan epätasapainoinen mikrobisto voi lisätä tiettyjen sairauksien riskiä tai päinvastaisesti olla seuraus itse sairaudesta (Rinninella ym. 2019). Suolistomikrobiston koostumuksen on huomattu olevan yhteydessä muun muassa tulehduksellisten suolistosairauksien, keliakian (Valdes ym. 2018; Rinninella ym. 2019), ärtyneen paksusuolen oireyhtymän ja paksusuolen syövän riskiin (Rinninella ym. 2019). Edellä mainittujen suolistosairauksien ohella suolistomikrobiston koostumuksen on todettu olevan yhteydessä myös aineenvaihdunnallisiin sairauksiin, kuten lihavuuteen, tyypin 2 diabetekseen (Valdes ym. 2018; Rinninella ym. 2019), tyypin 1 diabetekseen, nivelproliferointiin ja atooppiseen ekseemaan (Valdes ym. 2018). Lisäksi on havaittu yhteyksiä neurologisiin sairauksiin, kuten Alzheimerin ja Parkinsonin tautiin, hepaattiseen enkefalopatiaan, autismikirjon häiriöihin sekä stressiin (Rinninella ym. 2019). Yleisesti ottaen suolistomikrobiston monimuotoisuutta, eli diversiteettiä voidaan pitää hyvän kokonaisuuden tunnusmerkkinä, sillä erinäisiin sairauksiin liittyy usein syystä tai toisesta bakteeriston tavanomaista niukempi diversiteetti (Valdes ym. 2018).

2.1.2 Perimän vaikutus suolistomikrobistoon

Goodrich ym. (2016) havaitsivat laajassa kaksostutkimuksessaan 945 bakteerilajin laajuisesta otoksesta noin 8,8 % osuuden periytyvän yli 20 % todennäköisyydellä. Bakteroidi -pääjakson ei todettu olevan kovinkaan periytyvä, kun taas firmikuutti-, aktinobakteeri-, tenerikuutti- ja euryarchaeota -pääjaksojen nähtiin periytyvän todennäköisemmin. Erityisesti christensenellaceae -heimon bakteereiden periytyvyyden todennäköisyyden havaittiin olevan korkea, jopa 42 % (Goodrich ym. 2016). Lim ym. (2017) puolestaan totesivat kaksostutkimuksessaan jopa 63 % suuruisen osuuden metaboliseen oireyhtymään yhteydessä olevasta suolistomikrobiston koostumuksesta olevan periytyvää. Erityisesti *Methanobrevibacter*- (noin 20,9 % periytyvyys) ja *Lactobacillus* -sukujen (noin 14,8 % periytyvyys) havaittiin periytyvän suhteellisen runsaalla todennäköisyydellä (Lim ym. 2017). Toisaalta metaboliselta oireyhtymältä suojaavaan suolistomikrobiston koostumukseen yhteydessä olevien aktinobakteeri -pääjakson (noin 45,7 % periytyvyys), *Bifidobacterium* -suvun (noin 37,4 % periytyvyys), christensenellaceae -heimon (noin 30,6 % periytyvyys), ja *Odoribacter* -suvun (noin 19,2 % periytyvyys) havaittiin samaan tapaan olevan varsin suurella todennäköisyydellä periytyviä (Lim ym. 2017). Samoin Beaumont ym. (2016) totesivat lihavuuteen ja erityisesti viskeraalisen, eli sisäelinten ympärille kertyvän rasvan määrään yhteydessä olevan suolistomikrobiston koostumuksen olevan varsin suurilta osin periytyvä, mutta toisaalta muistuttivat kausaliteettien olevan epäselviä muuttujien välisestä vahvasta korrelaatiosta huolimatta (Beaumont ym. 2016). Monotsygoottisten, eli samanmunaisten tai identtisten kaksosten suolistomikrobiston koostumuksen on huomattu olevan ditsygoottisiin, eli erimunaisiin kaksosiin nähden hiukan yhtenevämpi (Hailiang ym. 2016).

2.1.3 Mikrobin tutkiminen

Ennen DNA-pohjaisiin menetelmiin siirtymistä mikrobeja tutkittiin pitkään ainoastaan viljelemällä. Viljely asettaa menetelmänä erinäisiä rajoitteita tutkimukselle, eikä valtaosaa lajeista voida kasvattaa laboratorio-olosuhteissa (Hiergeist ym. 2015). DNA-pohjaisten menetelmien käyttöönotto 1980-luvulla mahdollisti muun muassa mikrobin taksonomisen rakenteen tarkastelun sekä metagenomiikan tutkimuksen, eli tietyn yhteisön geenien tutkimisen

(Hiergeist ym. 2015). DNA-menetelmien peruseriaatteena on analysoida suoraan näytteestä eristetty DNA polymeraasiketjureaktiota (polymerase chain reaction, PCR) hyödyntäen (Hiergeist ym. 2015). Suolistomikrobiston tutkimuksessakin suosittu (Vazquez ym. 2017) kvantitatiivinen PCR -menetelmä (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) perustuu jo ennestään tunnettujen mikrobien DNA-sekvensseihin, eli -jaksoihin. DNA-sekvenssin avulla suunniteltujen alukkeiden välistä ja mikrobin DNA:n välistä aluetta voidaan monistaa PCR-menetelmää käyttäen, jolloin näytteen sisältämät mikrobit saadaan monistettua (Kubista ym. 2006). Kvantitatiivisella, toisin sanoen reaaliaikaisella PCR-menetelmällä näytteessä olevan tietyn bakteerin DNA:n määrää voidaan lisäksi seurata reaaliajassa ja selvittää bakteerien määriä (Kralik & Ricchi 2017). Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät (next generation sequencing, NGS) puolestaan perustuvat mikrobin tunnistamiseen 16S rRNA (ribosomaalinen RNA) -sekvenssin avulla julkisia tietokantoja hyödyntäen (Gupta ym. 2019). NGS-menetelmät mahdollistavat parhaimmillaan satojen mikrobien yhtäaikaisen tunnistamisen samasta näytteestä (Poretsky ym. 2014) ja nopeuttavat tunnistamisprosessia siten huomattavasti.

2.1.4 Suolistomikrobisto ja lihavuus

Fu ym. (2015) havaitsivat kohorttitutkimuksessaan suolistomikrobiston koostumuksen olevan yksittäisenä muuttujana yhteydessä 4,5 % osuuteen koehenkilön painoindexistä (body mass index, BMI). Ylipainoisilla henkilöillä on havaittu useissa tutkimuksissa olevan monimuotoisuudeltaan niukempi suolistomikrobisto sekä suhteellisesti runsaampi firmikuuttien osuus bakteroidien osuuteen nähden, kun havaintoja verrataan normaalipainoisiin henkilöihin (Cornejo-Pareja ym. 2019; Lee ym. 2020). Firmikuutti- ja bakteroidi -pääjaksojen ohella on havaittu myös yhteys runsaamman aktinobakteeri -pääjakson (Clarke ym. 2012) ja niukempien *Bifidobacterium*- ja *Ruminococcus* (Turnbaugh ym. 2009a; Santacruz ym. 2009) -sukujen sekä lihavuuden välillä. Lisäksi Christensenellaceae- ja Rikenellaceae -heimojen bakteerien, *Mollicutes* -luokan bakteerien, *Dehalobacterium* -suvun bakteerien ja arkeonien vähäisemmän määrän sekä korkean BMI-indeksin väliltä on löydetty yhteys laajoissa poikittaistutkimuksissa (Goodrich ym. 2014; Fu ym. 2015). Painonpudotuksen yhteydessä on lisäksi huomattu *Bacteroides*-, *Lactobacillus*- sekä *Prevotella* -sukujen suhteellisen osuuden kasvua, kun puolestaan *Bifidobacterium*-, *Clostridium*-, sekä *Eubacterium* -sukujen määrissä on havaittu laskua (Zhou ym. 2008; Turnbaugh ym. 2009b). *Eubacterium rectale-Clostridium*

coccoides -ryhmän bakteereiden osuuden on lisäksi huomattu olevan runsaampi ylipainoisilla tai lihavilla metabolista oireyhtymää sairastavilla naisilla, kun tuloksia verrataan ylipainoisiin tai lihaviin metabolista oireyhtymää sairastamattomiin sekä normaalipainoisiin naisiin (Munukka ym. 2012). Suolistomikrobiston koostumuksen ja lihavuuden välisen yhteyden taustalla arvioidaan olevan useampiakin eri mekanismeja, kuten energia-aineenvaihdunnan erot suolistomikrobiston koostumuksesta riippuen, vastustuskyky ja suoliston epiteelikerroksen toiminta, suolistomikrobiston säätelemä insuliiniresistenssi, sekä sappinestemetabolia (Lee ym. 2020).

2.1.4.1 Energia-aineenvaihdunta

Ravinnon sisältämän energian hyödyntämisen on todettu olevan tehokkaampaa runsaamman firmikuutti- ja pienemmän bakteroidimäärän johdosta. Jumpertz ym. (2011) havaitsivat 20 % suuremman firmikuuttien osuuden ja vastaavasti pienemmän bakteroidimäärän olevan yhteydessä noin 150 kilokalorin suuruiseen eroon tutkimushenkilöiden päivittäisessä energiansaannissa, kun tuloksia verrattiin pienemmän firmikuutti- sekä suuremman bakteroidi-osuuden omaaviin verrokkeihin. Suuremman firmikuuttien osuuden ja vastaavasti pienemmän bakteroidien osuuden omaavat koehenkilöt pystyivät siis hyödyntämään suuremman osuuden nauttimansa ravinnon energiansisällöstä pienemmän firmikuuttien ja suuremman bakteroidien osuuden omaaviin verrokkeihinsa nähden (Jumpertz ym. 2011). Ilmiössä on todennäköisesti kyse edellä mainitun kaltaisen suolistomikrobiston koostumuksen kyvystä muokata polysakkarideja hyödynnettävään muotoon, eli monosakkarideiksi sekä lyhytketjuisiksi rasvahapoiksi (short-chain fatty acids, SCFA) (Cornejo-Pareja ym. 2019). Suolistomikrobiston tuottamista lyhytketjuisista rasvahapoista suurin osa on asetaatteja, butyraatteja sekä propionaatteja (Flint ym. 2012).

Fu ym. (2015) totesivat poikittaistutkimuksessaan koehenkilöiden suolistomikrobiston koostumuksen olevan yksittäisenä muuttujana yhteydessä 6 % osuuteen triglyseridien- ja 4 % osuuteen HDL (high density lipoprotein) -kolesterolin määrästä. Havainnot olivat iästä, sukupuolesta sekä perinnöllisistä tekijöistä riippumattomia (Fu ym. 2015). Christensenellaceae -heimon ja tenerikuutti -pääjakson bakteerien runsaamman esiintyvyyden todettiin lisäksi

olevan yhteydessä alhaisempiin veren triglyseridiarvoihin sekä korkeampaan HDL-kolesteroliarvoon (Fu ym. 2015). Krisko ym. (2020) demonstroivat hiirikokeessaan suolistomikrobistolla olevan tärkeä rooli normaalin verensokeritason säilyttämisessä. Suolistomikrobisto näyttäisi osallistuvan verensokerin, eli veren glukoositason säätelyyn tuottaen aminohappoja, jotka puolestaan auttavat tukemaan maksan glukoneogeneesiin, eli glukoosin muodostuksen kannalta suotuisaa sitruunahappokiertoa.

2.1.4.2 Insuliiniresistenssi ja diabetes

Lyhytketjuisten rasvahappojen on huomattu vaikuttavan energia-aineenvaihdunnan ohella myös suoraan insuliiniresistenssiin. Perry ym. (2016) havaitsivat eläinkokeessaan runsasrasvaisen ruokavalion nostavan asetaattipitoisuuksia, jonka puolestaan todettiin aktivoivan parasympaattista hermostoa ja johtavan lisääntyneeseen greliinin sekä insuliinin tuotantoon, kasvattaen lopulta muun muassa insuliiniresistenssiä. Butyraattia tuottavien bakteereiden on puolestaan havaittu laskevan insuliiniresistenssiä lisäämällä glukagonin kaltaisen peptidi 1:n (glucagon-like peptide 1, GLP-1) eritystä suoliston L-soluista, signaloinnin tapahtuessa vapaiden rasvahappojen reseptori 2:n (free fatty acid receptor 2, FFAR2) kautta (Christiansen ym. 2018; Tolhurst ym. 2012). Butyraatin ja propionaatin on lisäksi todettu kiihdyttävän suoliston glukoneogeneesiä (De Vadder ym. 2014). Suoliston glukoneogeneesiin on huomattu ehkäisevän lihavuuteen yhteydessä olevan rasvamaksan syntyä tukien suoli-aivoakselin välityksellä proteiineista ja liukoisista kuiduista hyödynnettävien makroravintoaineiden käyttöä (Vily-Petit ym. 2020).

Bakteroidien runsaan määrän ja lyhytketjuisia rasvahappoja tuottavien bakteerien niukan määrän on huomattu olevan yhteydessä tyyppin 1 diabetekseen lapsilla sekä tyyppin 2 diabetekseen aikuisilla (Vatanen ym. 2018). Eläinkokeissa normaalipainoisille diabetesta sairastaville hiirille syötetyn lyhytketjuisten rasvahappojen sekä butyraatin tuotantoa tehostavan dieetin todettiin suojaavan niitä tyyppin 1 diabetekselta lähes täysin (Mariño ym. 2017). Lisäksi on todettu yhteys seerumin runsaan haaraketjuisten aminohappojen (branch-chained amino acids, BCAA) määrän ja niiden biosynteesiä tukevien bakteerien, *Prevotella copri* sekä *Bacteroides vulgatus* määrän, ja insuliiniresistenssin välillä (Pedersen ym. 2016).

Tyypin 1 -diabeteksen taustalla olevan haiman saarekkeiden tuottamien betasolujen tuhoutumisprosessin on myös havaittu olevan yhteydessä suoliston seinämän lisääntyneeseen läpäisevyyteen ja suolistomikrobiston monimuotoisuuden köyhtymiseen, vaikka tyypin 1 diabetesta ei vielä olisi diagnosoitu (Vatanen ym. 2018).

2.1.4.3 Vastustuskyky

Kroonisen matala-asteisen, eli systeemisen, tulehduksen on todettu olevan yhteydessä muun muassa insuliiniresistenssiin (Shoelson ym. 2006) ja sitä kautta lihavuuteen. *Faecalibacterium prausnitzii* -bakteerin tuottaman butyraatin on havaittu hillitsevän systeemistä tulehdusta (Sokol ym. 2008) ja ylipainoisilla henkilöillä butyraattipitoisuuden onkin huomattu olevan keskimääräisesti alhaisempi normaalipainoisiin verraten (Qin ym. 2012). Gramnegatiivisten bakteerien ulkokalvolla sijaitsevien lipopolysakkaridien on puolestaan havaittu aiheuttavan systeemistä tulehdusta päästessään suolistosta ääreisverenkiertoon (Cani ym. 2008; Cani ym. 2009). Ylipainoisilla henkilöillä edellä mainitun suolistoesteen onkin todettu olevan normaalipainoisiin verrokkeihinsa nähden läpäisevämpi, joka johtaa esimerkiksi lisääntyneeseen plasman lipopolysakkaridi (LPS) -pitoisuuteen (Yang ym. 2014). Lipopolysakkaridit lisäävät matala-asteista tulehdusta, sekä altistavat lihavuudelle ja lisäävät insuliiniresistenssiä (Cani ym. 2007). *Akkermansia muciniphila* -bakteerin on havaittu ylläpitävän suoliston epiteelin toimintaa sijoittamalla mikrobimolekyylejä ympäri suolistoa (Derrien ym. 2004) ja huoltaen epiteelin musiinikerrosta (Everard ym. 2013). Kyseistä bakteeria tavataan niukemmissa määrin ylipainoisilla sekä insuliiniresistenteillä henkilöillä (Everard ym. 2013).

2.1.4.4 Sappinesteen aineenvaihdunta

Suolistomikrobiston on havaittu olevan yhteydessä sappinestemetaboliaan ja päinvastoin (de Aquiar Vallim ym. 2013). On muun muassa todettu, että sappihappojen määrää lisäämällä saadaan tehostettua ruskean rasvan energiankulutusta hiirillä ja siten ehkäistyä lihavuutta sekä insuliiniresistenssiä (Watanabe ym. 2006). Suolistomikrobiston on lisäksi havaittu muokkaavan primäärisiä sappihappoja sekundäärisiksi sappihapoiksi (Ridlon ym. 2006) ja sekundääristen

sappihappojen raportoitu vaikuttavan rasva-aineenvaihduntaan farnesoidi X -reseptorien (farnesoid X receptor, FXR) ja G-proteiinikytkentäisten sappihapporeseptorien (G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1) kautta (de Boer ym. 2018; Jia ym. 2018). Kokonaisuudessaan sappihapot säätelevät ruoansulatusta, rasvojen imeytymistä ja neljän eri reseptorin toimintaa. FXR, pregnaani X- (pregnane X receptor, PXR), D-vitamiini- (vitamin D receptor, VDR), sekä Gpbar1 -reseptorien toiminnan säätelyn on todettu vaikuttavan muun muassa glukoositasapainoon, rasva-aineenvaihduntaan, energiankulutukseen ja elimistön tulehdustasoon (Vallim ym. 2013). Sappihappojen määrä kasvaa aterioinnin seurauksena, jonka on puolestaan havaittu johtavan fibroblastien kasvutekijä 19 (fibroblast growth factor 19, FGF19) määrän lisääntymiseen FXR-reseptorin säätelemänä. FGF19 -määrän kasvun on huomattu lisäävän maksan proteiini-, sekä glykogeenisynteesiä ja sitä kautta vaikuttavan verensokeriin sekä maksan glykogeenitasoon (Kir ym. 2011). FXR-reseptorin toiminta on yhdistetty eri tutkimuksissa vaihtelevasti sekä lihavuuteen (Li ym. 2013; Parseus ym. 2017), että lihavuudelta suojautumiseen (Fang ym. 2015), joten sen osuus lihavuutta säätelevänä tekijänä näyttää vielä toistaiseksi hiukan ristiriitaisena.

2.1.5 Suolistomikrobisto ja fyysinen aktiivisuus

Fyysisen aktiivisuuden määrän on havaittu sekä eläin-, että ihmistutkimuksissa olevan yhteydessä suolistomikrobiston koostumukseen (Pedersini ym. 2020). Fyysisen aktiivisuuden on todettu johtavan suolistomikrobiston runsaampaan monimuotoisuuteen ja vähentävän potentiaalisesti patogeenisten, eli tauteja aiheuttavien, bakteerien määrää (Battson ym. 2018). Clarke ym. (2014) vertailivat rugby-ammattilaisten suolistomikrobiston koostumusta liikunnallisesti passiiviseen kontrolliryhmään ja huomasivat rugby-pelaajien mikrobiston koostumuksen olevan keskimäärin monimuotoisempi, sekä bakteroidi -pääjakson ja *Lactobacillus* -suvun osuuksien olevan määrällisesti alhaisemmat. Durk ym. (2019) havaitsivat samoin korkean maksimaalisen hapenottokyvyn olevan yhteydessä runsaampaan suhteelliseen firmikuuttien osuuteen urheilijoilla. Hyvän hapenottokyvyn omaavien yksilöiden suolistomikrobiston koostumuksen onkin todettu olevan juuri butyraatin tuotannon kannalta suotuisa (Estaki ym. 2016). Passiivisiin verrokkeihin nähden urheilijoiden suolistomikrobiston koostumuksen havaittiin olevan koostumukseltaan monimuotoisempi ja *Akkermansia muciniphila* -bakteerilajin määrän runsaampi (O'Sullivan ym. 2015). Fyysisen aktiivisuuden

todellisen vaikutuksen arviointi on kuitenkin haastavaa, sillä poikkileikkaustutkimuksissa esimerkiksi ravitsemukselliset erot voivat vaikuttaa tuloksiin (Clarke ym. 2014; O’Sullivan ym. 2015).

2.1.6 Liikunnan vaikutukset suolistomikrobistoon

Fyysisen aktiivisuuden ohella myös erilaisten harjoitusmuotojen sekä -intensiteettien vaikutuksia suolistomikrobiston koostumukseen on tutkittu. Kern ym. (2020) totesivat kuuden kuukauden mittaisessa satunnaistetussa kontrolloidussa tutkimuksessaan fyysisen harjoittelun mahdollisesti kasvattavan suolistomikrobiston monimuotoisuutta. Samassa tutkimuksessa havaittiin lisäksi harjoittelun intensiteetin vaikuttavan muutosten suuruuteen, siten että muutokset olivat runsaimmat ryhmässä, joka harjoitteli suurimmalla intensiteetillä (Kern ym. 2020). Taniguchi ym. (2018) havaitsivat tutkimuksessaan kestävyysharjoittelun vähentävän koehenkilöiden suoliston *Clostridium difficile* bakteerien määrää sekä lisäävän *Oscillospira* -bakteerin määrää. *Oscillospira* -bakteerisuvun määrän kasvun huomattiin samassa tutkimuksessa olevan yhteydessä koehenkilöiden kardiometabolisen kunnon kehittymiseen (Taniguchi ym. 2018). Lachnospiraceae -bakteeriheimo on yksi maksimaaliseen hapenottookykyyn liitetyn butyraatin tuottajista (Estaki ym. 2016) ja *Veillonella* -bakteerisuvun on puolestaan todettu olevan yhteydessä kestävyys suorituskykyyn, koska se fermentoi laktaattia propionaatiksi (Scheiman ym. 2019). Motiani ym. (2020) mukaan sekä intervallityyppinen harjoittelu että keskitehoinen harjoittelu lisäsivät bakteroidien kokonaismäärää ja suhteellista osuutta firmikuutteihin nähden kahden viikon interventiojaksolla. Harjoittelu lisäksi vähensi *Clostridium*- ja *Blautia* -bakteerisukujen määrää (Motiani ym. 2020). Munukka ym. (2018) puolestaan havaitsivat *Akkermansia* -bakteerisuvun määrän kasvaneen, sekä proteobakteerien määrän vähentyneen kuuden viikon kestävyys harjoittelujakson päätteeksi. Kestävyys harjoittelun on lisäksi todettu lisäävän lyhytketjuisten rasvahappojen määrää normaalipainoisilla, mutta ei ylipainoisilla henkilöillä (Allen ym. 2018). Allen ym. (2018) havaitsivat tutkimuksessaan myös butyraatin tuotantoa säätelevän butyryyli-koentsyymi-A-transferaasi (butyryl-CoA-transferase, BCoAT) -geenin ja propionaatin tuotantoa säätelevän metyyylimalonyyli-koentsyymi-A-dekarboksilaasi (methylmalonyl-CoA-decarboxylase, mmdA) -geenin suhteellisten osuuksien kasvaneen harjoitusjakson aikana. Kaikissa tutkimuksissa tilastollisesti merkitsevää vaikutusta

suolistomikrobiston koostumukseen ei kuitenkaan ole löydetty, vaikka harjoitteluvaikutus olisikin näyttänyt olevan suoliston bakteeriston monimuotoisuuden kannalta suotuista (Cronin ym. 2018). Myös Kern ym. (2020) totesivat harjoittelun aiheuttamien muutosten vaikutuksen jäävän todennäköisesti ruokavalion aiheuttamien muutosten varjoon.

2.2 Ulosteensiirto

2.2.1 Ulosteensiirron vaikutus suolistomikrobiston koostumukseen

Ulosteensiirto on Suomessa kliinisessä käytössä toistaiseksi ainoastaan *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttaman uusiutuvan antibioottiripulin hoidossa (Lahtinen ym. 2019). Ulosteensiirron on todettu olevan kyseisessä tapauksessa hyvinkin tehokas ja turvallinen hoitokeino (Cammarota ym. 2017). Ulosteensiirron on havaittu aiheuttavan tilapäisen, mutta varsin pitkäkestoisen siirteen koostumuksen mukaisen muutoksen vastaanottajan suolistomikrobiston koostumuksessa (Li ym. 2016). Ulosteensiirto vaikuttaisi lisäksi lisäävän vastaanottajan suolistomikrobiston monimuotoisuutta siinäkin tapauksessa, kun otetaan huomioon siirteen aiheuttamat suorat vaikutukset suolistomikrobiston koostumukseen (Staley ym. 2018; Mintz ym. 2018). Li ym. (2016) havaitsivat tutkimuksessaan siirteiden vastaanottajien suolistomikrobiston koostumuksissa siirteen aiheuttamia muutoksia vielä kolme kuukautta siirron jälkeen, mutta muutoksia on nähty jopa vuodenkin kohdalla siirrosta (Goloshchapov ym. 2019). Ulosteensiirteiden toimivuuden on lisäksi havaittu riippuvan siirteiden sekä vastaanottavan suolistomikrobiston koostumuksen välisestä yhteensopivuudesta. Yhtä ja ainoaa koostumukseltaan toimivaa siirrettä ei siis näyttäisi olevan, vaan siirteiden aiheuttamat muutokset näyttävät vaihtelevan varsin tapauskohtaisesti (Li ym. 2016). Xiao ym. (2020) kuitenkin huomauttavat, että ulosteensiirron taustalla olevia toiminta- ja vaikutusmekanismeja ei vielä täysin ymmärretä.

2.2.2 Ulosteensiirron vaikutus fyysiseen suorituskykyyn

Ulosteensiirron vaikutuksia fyysiseen suorituskykyyn on toistaiseksi tutkittu varsin niukasti. Ihmistutkimuksia ei aiheesta ole, mutta laboratorioeläimille on siirretty ihmisen ulostetta ja

tutkittu sen vaikutuksia. Fielding ym. (2019) huomasivat tutkimuksessaan hiirten tartuntavoiman parantuneen, mikäli siirre oli peräisin hyvän fyysisen kunnon (high-functioning, HF) omaavalta aikuiselta ihmiseltä. Heikomman fyysisen kunnon (low-functioning, LF) omaavilta ihmisiltä saaduilla siirteillä ei ollut vaikutusta hiirten tartuntavoimaan. Tartuntavoimien vahvistumisesta huolimatta HF-hiirten lihasmassan määrässä ei havaittu muutoksia ulosteensiirron seurauksena (Fielding ym. 2019).

2.2.3 Ulosteeensiirron vaikutus seerumin rasva-, sokeri- ja insuliiniarvoihin

Vrieze ym. (2012) havaitsivat tutkimuksessaan metabolista oireyhtymää sairastavien miesten perifeeraalisen insuliiniherkkyyden parantuneen kuuden viikon kuluttua ulosteensiirrosta. Siirteet kerättiin miespuolisilta luovuttajilta, joiden painoindeksi (body mass index, BMI) oli alle 23 (Vrieze ym. 2012). Saman tutkimusryhmän myöhemmin toteuttamassa jatkotutkimuksessa kuitenkin todettiin muutosten olevan ainoastaan väliaikaisia, eikä 18 viikon kohdalla muutoksia enää nähty (Kootte ym. 2017). Edellä kuvatusta poiketen Yu ym. (2020) eivät havainneet omassa tutkimuksessaan tilastollisesti merkitseviä muutoksia seerumin lipidi-, glukoosi- tai insuliiniarvoissa, kun muuttujia tarkasteltiin 6 ja 12 viikkoa siirrosta. Myöskään muissa muuttujissa, kuten hemoglobiinissa, kehon painossa, kehon koostumuksessa tai lepoenergiankulutuksessa ei huomattu muutoksia (Yu ym. 2020). Zhang ym. (2019) totesivat katsauksessaan ulosteensiirron olevan mahdollisesti yhteydessä lyhytkestoiseen, tilastollisesti merkitsevään perifeeraalisen insuliinisensitiivisyyden parannukseen. Kyseisen katsauksen sisältämien tutkimusten interventoryhmät koostuivat lihavista, metabolista oireyhtymää sairastavista miehistä. Naisia ei tutkittu yhdessäkään sisällytetyssä tutkimuksessa. Paastoverensokerin, maksan insuliinisensitiivisyyden, BMI:n, tai kolesteroliarvojen suhteen muutoksia ei havaittu (Zhang ym. 2019).

2.3 Tutkimuksessa käytetty rottamalli

Aerobiselta kapasiteetiltaan eroavia LCR- (low-capacity runner, matalan aerobisen kapasiteetin juoksija) ja HCR (high-capacity runner, korkean aerobisen kapasiteetin juoksija) -rottia on käytetty erinäisissä koeasetelmissa runsaasti. Kyseisten koe-eläinten avulla on tutkittu muun

muassa aerobisen kestävyyskunnan ja sydän- ja verisuonitautien, insuliiniresistenssin, luurankolihasien rasvahappoaineenvaihdunnan, kammiovärinän, rasvamaksan, unihäiriöiden, sekä stressinsietokyvyn välisiä yhteyksiä (Koch ym. 2012). Yksilön juoksukapasiteetilla on todettu useissa tutkimuksissa olevan vahva yhteys yksilön terveyteen (Koch ym. 2011; Myers ym. 2002).

2.3.1 LCR- ja HCR -rottapopulaatioiden jalostus

Tutkittuaan juoksukestävyyden periytyvyyttä rotilla ensin pienemmässä mittakaavassa (Koch ym. 1998), Koch & Britton (2001) aloittivat LCR- ja HCR-rottapopulaatioiden jalostuksen perintötekijöiltään heterogeenisillä N:NIH (National Institutes of Health) 96 rottanaaraan ja 96 -koiraan joukoilla. Perustajapopulaation jokainen rotta oli peräisin eri vanhemmilta, eli joukko ei sisältänyt sisarusia. Tämän linjauksen avulla varmistettiin rottien geneettinen monimuotoisuus. Rotat totutettiin ensimmäisellä testausviikolla juoksemaan loivaan ylämäkeen (15°) juoksumatolla kevyellä (15 metriä minuutissa, m/min) vauhdilla ja juoksemaan oppimattomat rotat siirrettiin sivuun myöhemmistä kokeista. Toisella testiviikolla jatkoon selviytyneet rotat sijoitettiin jälleen yksitellen juoksumatolle aloittaen 10 m/min -nopeudella ja lisäten vauhtia 1 m/min joka toinen minuutti, kunnes rotta uupui, eikä enää jaksanut juosta. Rotta määriteltiin uupuneeksi sen jäätyä jälkeen juoksumaton vauhdista kolme kertaa, ajautuen maton alkupäässä sijaitsevaan ritilään. Ritilän tarkoituksena oli motivoida rottaa jatkamaan juoksemista antamalla rotalle kevyen sähköiskun (1.2 mA, 3 Hz). Rotat valikoitiin kyseisen kokeen tulosten perusteella 13 pisimpään juoksua jatkaneeseen, sekä 13 vähiten juosseeseen ja paritettiin keskenään (Koch & Britton 2001).

2.3.2 LCR- ja HCR -rottapopulaatioiden erot

Kuudennen HCR-sukupolven rottien juoksukapasiteetti oli keskimääräisesti 839 metriä (42 min, 30 m/min). Perustajapopulaation keskimääräinen tulos kyseisessä testissä oli 355 metriä (22 min, 20 m/min). Kuudennen sukupolven rotilla havaittiin lisäksi sukupuolesta riippuen 16 – 20 % ero kehonpainossa LCR- ja HCR-ryhmien välillä, LCR-rottien ollen painavimpia (Koch & Britton 2001). Yhdennessätoista sukupolvessa ero juoksukapasiteetissa LCR- ja HCR-rottien

välillä oli jo 347 % LCR-rottien juostessa keskimäärin 191 ± 70 metriä ja HCR-rottien juostessa 853 ± 315 metriä. Juoksukapasiteetin lisäksi eroavaisuuksia havaittiin muun muassa sydämen iskutilavuudessa, maksimaalisessa hapenottokyvyssä ja -kulutuksessa, sekä lihasten hapenottokyvyssä (gastrocnemiuksesta eli kaksoiskantalihaksesta mitattuna) HCR-rottien eduksi (Britton & Koch 2005). Yhdennentoista sukupolven rotilla todettiin aiempien eroavaisuuksien ohella eroja verensokeri-, insuliini- ja triglyseridiarvoissa. Kyseisen sukupolven urosrotilla verensokeri oli ilman paastoa mitattuna keskimäärin 75 ± 12 mg/dL (HCR) ja 86 ± 6 mg/dL (LCR). Paastoverensokeri oli puolestaan 92 ± 5 mg/dL (HCR) ja 110 ± 9 mg/dL (LCR). Insuliini 296 ± 172 pM (HCR) ja 684 ± 195 pM (LCR), sekä triglyseridit 25 ± 4 mg/dL (HCR) ja 67 ± 24 mg/dL (LCR) (Britton & Koch 2005).

3 METODIT

3.1 Tutkimuksen tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena on selvittää ulosteensiirron vaikutuksia LCR- (low capacity runner, matalan aerobisen kapasiteetin juoksija) ja HCR (high capacity runner, korkean aerobisen kapasiteetin juoksija) -rottien suolistomikrobiston koostumukseen, vapaaehtoiseen juoksuharjoitteluun, maksimisuorituskykyyn sekä seerumin rasva-, sokeri- ja insuliiniarvoihin. Tutkimuskysymykset ovat seuraavat:

1. Miten LCR-rotilta saatu ulosteensiirre vaikuttaa HCR-rottien, ja HCR-rotilta saatu ulosteensiirre LCR-rottien suolistomikrobiston koostumukseen?
2. Miten LCR-rotilta saatu ulosteensiirre vaikuttaa HCR-rottien, ja HCR-rotilta saatu ulosteensiirre LCR-rottien vapaaehtoisen juoksuharjoittelun määrään?
3. Miten LCR-rotilta saatu ulosteensiirre vaikuttaa HCR-rottien, ja HCR-rotilta saatu ulosteensiirre LCR-rottien maksimisuorituskykyyn?
4. Miten LCR-rotilta saatu ulosteensiirre vaikuttaa HCR-rottien, ja HCR-rotilta saatu ulosteensiirre LCR-rottien aineenvaihduntaa kuvastaviin muuttujiin (seerumin rasva-, sokeri- ja insuliiniarvot)?

3.2 Tutkimusmenetelmät

3.2.1 Koe-eläimet

Tässä tutkimuksessa käytettiin Jyväskylässä syntyneitä 44 sukupolven LCR- ja HCR-rottia (eläinlupa ESAVI/12840/2019 ja ESAVI 166/2020 muutoslupa edelliseen päätökseen liittyen), joita edeltävä 43 sukupolvi kuljetettiin Suomeen Toledon yliopistosta Yhdysvalloista lokakuussa 2019. Tässä tutkimuksessa käytetyt rotat syntyivät Jyväskylässä joulukuun 2019 ja

tammikuun 2020 välisenä aikana ja vieroitettiin emoistaan 28 päivän ikäisinä. HCR- ja LCR -rotat jaettiin molemmat neljään ryhmään, eli yhteensä ryhmiä oli kahdeksan. Ryhmät jaoteltiin seuraavasti; PEG (sedentäärinen kontrolliryhmä, suoliston puhdistus mikrobeista polyetyleeniglykolin (PEG) avulla), PEG+FMT (sedentäärinen kontrolliryhmä, suoliston puhdistus mikrobeista ja ulosteensiirto), PEG+RW (vapaa pääsy juoksupyörään ja suoliston puhdistus mikrobeista) ja PEG+FMT+RW (vapaa pääsy juoksupyörään, suoliston puhdistus mikrobeista ja ulosteensiirto). Rotat asetettiin jokainen omiin häkkeihinsä vieroituksesta alkaen. RW (running wheel) -ryhmän rotilla oli vieroituspäivästä alkaen vapaa pääsy juoksupyörään.

Rotat sijoitettiin Jyväskylän yliopiston laboratorioeläimille varattuihin tiloihin. Rotille varatut huoneet olivat ilmastoitu siten, että lämpötilan vaihteluväli on $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ja suhteellinen ilmankosteus $55 \pm 10\%$. Huoneet valaistiin keinotekoisesti siten, että ne olivat valaistaina kello 8.00 – 20.00 ja pimennettyinä 20.00 – 8.00. Rottien elinolosuhteita tarkkailtiin ympärivuorokautisesti jokaisena viikonpäivänä ja eläintenhoitajat tekivät rutiinitarkastukset päivittäin myös viikonloppuisin ja lomapäivinä. Häkkien pohjat vuorattiin haapalastuilla sekä puusta jalostetulla pesämateriaalilla (Tapvei, Harjumaa, Viro). Jokaisella rotalla oli lisäksi häkissään muoviputki virikkeenä. Rotilla oli ravintona vapaasti nautittavissa oleva määrä ravintopellettejä (R36, Labfor/Lantmännen, Malmö, Ruotsi) koko tutkimuksen ajan. Ravinnon energiasisältö oli $1260\text{ kJ} / 100\text{g}$. Ravinto sisälsi proteiinia $18,5\%$, rasvaa 4% , NFE (nitrogen free extracts) $55,7\%$, kuitua $3,5\%$, tuhkaa $6,3\%$ ja vettä $<12\%$. Pelleteistä hyödynnettävissä oleva energiamäärä oli $2,74\text{ kcal g}^{-1}$, josta $24,9\%$ koostui proteiineista, $10,3\%$ rasvoista ja $64,8\%$ hiilihydraateista. Ravintosisällöstä $2,8\%$ koostui haaraketjuisista aminohapoista (BCAA). Ravinnonkulutus mitattiin vieroituksesta alkaen ja ravintopellettejä lisättiin noin kerran viikossa. Jokaisella rotalla oli ravintopellettien lisäksi vapaasti kulutettavissa oleva määrä juomavettä (Jyväskylän kaupungin vesijohtoverkosto). Vesipullot vaihdettiin puhtaisiin seitsemän päivän välein.

3.2.2 Suoliston puhdistaminen ja ulosteensiirto

Ulosteensiirtoa varten kolme HCR- ja kolme LCR -urosta (syntyneet marraskuussa 2019) lopetettiin hiilidioksidilla (CO₂) ja giljotiinilla tammikuussa 2020. Kunkin rotan umpisuolen sisältämä uloste säilöttiin näyteputkeen (Nunc) PBS (phosphate buffered saline) + 10 % glyseroli -liuokseen laimennettuna. Aluksi kunkin rotan uloste punnittiin ja laimennettiin ensin PBS-glyseroli -liuoksella 1:2 -suhteessa. Tämän jälkeen homogenaattiin lisättiin vielä uudelleen PBS-glyseroli -liuosta 1:4 -suhteen saavuttamiseksi. Liuos jaettiin 2 ml Eppendorf -putkiin, joissa se sentrifugoitiin 4500 x g -nopeudella viiden minuutin ajan. Supernatantti eli umpisuoliperäisen homogenaatin nestemäinen osuus sekoitettiin eri putkista keskenään, jaoteltiin kryoputkiin, ja lopuksi jäädytettiin nestemäisessä työssä. Siirre säilytettiin -80 °C pakastimessa.

Ulosteensiirtoa edeltävästi rottien suolisto puhdistettiin mikrobeista polyetyleeniglykolilla (Pegorion, Orion Pharma, Espoo, Finland). Suolistomikrobiston puhdistus aloitettiin vieroituspäivänä, rottien ollessa noin neljän viikon ikäisiä, kestäen yhteensä viiden päivän ajan. Myös ryhmät, jotka eivät saaneet ulosteensiirrettä, vastaanottivat Pegorion-käsittelyn. Pegorion (425 g/l, Pegorion, Orion Pharma, Espoo, Finland) sekoitettiin 0,1 % Stevia-liuokseen (Stevia Sweet, Hermes Sweeteners, Zurich, Switzerland) ja annosteltiin kullekin rotalle 5 ml painokiloa kohden kerran päivässä ensimmäisen neljän päivän ajan ja kaksi kertaa päivässä viidentenä päivänä. Jokainen rotta punnittiin ennen annostelua. Viidentenä päivänä ensimmäinen Pegorion-annos annettiin rotille noin kello kahdeksalta aamulla, jonka yhteydessä myös ravinto poistettiin saatavilta. Seuraava annos annettiin 3 – 4 tuntia ensimmäisen jälkeen, jonka yhteydessä myös juomavesi poistettiin saatavilta. Ulosteensiirto toteutettiin noin neljä tuntia toisen Pegorion-annoksen jälkeen. Ulosteensiirre annosteltiin FMT-ryhmien rotille 0,350 ml painokiloa kohden. Muille ryhmille annosteltiin PBS + 10 % glyseroli -liuos. Ulosteensiirre lämmitettiin huoneenlämpöön ja sekoitettiin kevyesti ennen annostelua. Ulosteensiirron ja PBS + 10 % glyseroli -liuoksen annostelun jälkeen ravintoa ja vettä oli jälleen vapaasti saatavilla.

3.2.3 Suolistomikrobiston koostumuksen selvittäminen

Ulostenäytteitä kerättiin yhteensä kolmesti. Ensimmäinen näyte kerättiin vieroituksen yhteydessä, rottien ollessa neljän viikon ikäisiä (PRE). Toinen näyte kerättiin suoliston puhdistamisen jälkeen, eli noin viiden viikon iässä, (PEG) ja viimeinen tutkimuksen kaksi viikkoa ulosteensiirron jälkeen (POST), rottien ollessa noin seitsemän viikon ikäisiä. Ulostenäytteet jäädytettiin nestemäisellä tyypellä ja säilöttiin sen jälkeen -80°C lämpötilaan. DNA eristettiin noin 80 mg määrästä ulostetta Stool Extraction Kit -sarjalla ja puoliautomaattisella GenoXtract -eristysmenetelmällä (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Ennen eristystä näytteet homogenoitiin helmillä 1,4 mm keraamisia helmiä sisältävissä näyteputkissa. Mikrobiston koostumuksen selvittämiseksi rRNA -geeniä monistettiin käyttämällä 515F-Y- (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') ja 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') -alukkeita SSU rRNA -geenin V4 -alueeseen tähdäten. Ensimmäinen polymeerasiketjureaktio koostui yhdestä Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix -reagenssiseoksesta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,25 µM -määrästä alukkeita ja noin 20 ng -määrästä templaatti-DNA:ta. Lämpösykli koostui 10 minuutin mittaisesta denaturaatiovaiheesta 95°C -lämpötilassa, 30 syklistä 30 sekuntia 94°C-, 60 sekuntia 52°C- ja 60 sekuntia 72°C -lämpötiloissa, sekä lopuksi 5 minuutista 72°C -lämpötilassa (C1000 ThermalCycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Ion Torrent PGM -sekvensointiadaptoreiden ja viivakoodauksen lisäämiseksi PCR-tuotteen päihin, yksi µl PCR-tuotetta käytettiin templaattina seuraavassa polymeerasiketjureaktiossa, jossa 10 sykliä toteutettiin käyttäen linkkeri- ja fuusioalukkeita (0,05 µM M13_515F-Y, 0,5 µM IonA_IonXpressBarcode_M13 ja 0,5 µM P1_806R) olosuhteiden ollessa muutoin identtiset ensimmäiseen rRNA -monistukseen nähden. PCR-tuotteet puhdistettiin AMPure XP -reagenssilla (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), kvantifioitiin PicoGreen -reagenssilla (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), sekä poolattiin koostumuksen mukaisesti Sekvensointi toteutettiin käyttäen Ion Torrent PGM -palvelinta Ion 318 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific) -piirilevyllä, Hi-Q View OT2 Kit -sarjaa PCR:n emulsioon ja Hi-Q View Sequencing Kit -sarjaa sekvensointireaktioon. 16S rRNA -geenisekvenssit lyhennettiin vähintään 200 emäsparin mittaan ja lajiteltiin toiminnallisiin taksonomisiin yksiköihin (operational taxonomic unit, OTU) 97 % tarkkuudella verraten aineistoa olemassa olevaan SILVA SSU Ref -tietokantaan (v132, 99 %). Aineiston käsittely tehtiin CLC Microbial

Genomics Package (Qiagen, Hilden, Germany) -moduulin avulla. Alle 20 lajin, tai alle 0,05 % suhteellisen osuuden sisältävät toiminnalliset taksonomiset yksiköt rajattiin pois lopullisesta aineistosta.

3.2.4 Maksimisuorituskyvyn mittaaminen

Rotat totutettiin ensimmäistä kertaa juoksumatolle mittausta edeltävänä päivänä. Juoksumatolle totuttautuminen kesti noin 15 minuuttia. Maton alapäädyn ritilässä oleva sähköjännite oli suuruudeltaan 0,2 – 1 mA. Juoksumaton nopeus säädettiin totuttautumisen päätteeksi testin aloitusnopeuteen (10 m/min). Maksimijuoksupuutesti toteutettiin kappaleessa 4.1 kuvatulla tavalla, eli samoin kuten rottia jalostaessa. Jokainen rotta suoritti testin kolme kertaa, siten että testipäivien välissä oli aina yksi lepopäivä. Testi aloitettiin nopeudella 10 m/min ja nopeutta kasvatettiin kahden minuutin välein 1 m/min. Juoksumaton alapäädyn ritilässä oleva sähköjännite käännettiin pois päältä silloin, kun rotat (erityisesti HCR) alkoivat näyttää uupumisen merkkejä. HCR-rotat juoksevat useimmiten uupumiseen asti, mikäli nopeus on riittävän suuri. LCR-rottien maksiminopeuden määrittely voi olla haastavampaa, koska juokseminen ei ole monille niistä motivoivaa. Maksimisuorituskyky mitattiin, kun ulosteensiirrosta oli kulunut vähintään neljä viikkoa ja lopetukseen oli aikaa vähintään 70 tuntia. Paras kolmesta maksimisuorituksesta otettiin maksimaalisen aerobisen suorituskyvyn arvoksi.

Vapaaehtoisen juoksuharjoittelun määrää mitattiin rottien häikeissä olevien juoksupyöriin kiinnitettyjen mittauslaitteiden ja tarkoitukseen suunnitellun tietokoneohjelmiston avulla jatkuvalla ympärivuorokautisella seurannalla. Juoksuharjoittelun määrää mitattiin ainoastaan rotilta, jotka kuuluivat RW (running wheel) -ryhmiin.

3.2.5 Veriarvojen mittaaminen

Rotat lopetettiin noin yhdeksän viikon ikäisinä ja näytteet kerättiin kultakin rotalta. Ravintoa ja juomavettä oli saatavilla lopetukseen asti, mutta juoksupyörät suljettiin pois käytöstä lopetuspäivää edeltävänä iltana. Kukin rotta ja jäljellä oleva ravinto punnittiin lopetusta

edeltävästi ja rotta nukutettiin ilman ja hiilidioksidin (CO₂) seoksella (30 % + 70 %). Rotta lopetettiin nukutuksen aikana sydänpuntiolla. Punktoidessa kultakin rotalta kerättiin verinäyte, josta erotettiin seerumi. Seeruminäytteestä analysoitiin insuliinin, glukoosin, triglyseridien, vapaiden rasvahappojen, glyserolin, kokonaiskolesterolin, LDL- (low density lipoprotein, matalan tiheyden lipoproteiini) ja HDL (high density lipoprotein, korkean tiheyden lipoproteiini) -kolesterolien, aspartaatti-aminotransferaasin (AST) ja alaniini-aminotransferaasin (ALT) määrät. Analyysit edellä mainituille veriarvoille suoritettiin laboratoriossa Indiko Plus (Thermo, Vantaa, Finland) -laitteella.

3.2.6 Tilastolliset menetelmät

Tilastollisiin analyyseihin käytettiin tässä pro gradu -tutkielmassa IBM SPSS Statistics 27 (International Business Machines corp.) -ohjelmaa. Analyysit toteutettiin helmi-huhtikuussa 2021. Merkitsevyystasoksi asetettiin $p < 0.05$, joka on Metsämuuronen (2011, 440) mukaan riittävä. P-arvo kuvaa todennäköisyyttä, jonka mukaan tehty päätelmä on virheellinen (Metsämuuronen 2011, 440). P-arvon ollessa alle 0.05, on päätelmä siis virheellinen korkeintaan 5 % todennäköisyydellä.

Ennen kuin tilastoanalyysit voitiin suorittaa, oli aineisto muokattava pro gradu -tutkielman tarkoitukseen ja tutkimuskysymyksiin sopivaksi. Rottien suolistomikrobiston koostumuksen tarkastelua varten aineisto muokattiin ensin Microsoft Excel -muodosta SPSS-muotoon ja aineiston sisältämät bakteerien (pääjaksot, heimot ja suvut) lukumäärää kuvaavat arvot muunnettiin prosentuaalisiksi osuuksiksi kokonaismäärään verraten. Lisäksi laskettiin jokaiselle rotalle eri aikapisteiden (alkumittaus = PRE, suolihuuhtelujen jälkeinen mittaus = PEG, loppumittaus = POST) väliset suolistomikrobiston koostumuksen muutosta kuvaavat fold change -arvot. Fold change -arvot laskettiin kullekin pääjaksolle, heimolle ja suvulle jakamalla jälkimmäisen aikapisteen prosentuaalinen arvo sitä edeltäneen aikapisteen prosentuaalisella arvolla. Juostua kokonaismatkaa, tai veriarvoja käsittelevää dataa ei ollut tarve muokata samoissa määrin, vaan luvut siirrettiin suoraan Excel-muodosta SPSS-ohjelmaan.

Koska suolistomikrobistoaineisto ei ollut normaalisti jakautunut, käytettiin tarkasteluun non-parametrinen Wilcoxonin testiä, joka soveltuu kahden toisistaan riippuvan pienen otoksen

vertailuun (Metsämuuronen 2011, 581). Muuttujien tulee olla välimatka- tai järjestysasteikkollisia, mutta aineiston sallitaan poikkeavan normaalijakaumasta (Metsämuuronen 2011, 581). Suolistomikrobiston koostumuksen muutoksen suuruutta kuvaavia fold change -arvoja, kokonaisjuoksumatkaa ja ravinnon kulutusta tarkasteltiin puolestaan Oneway ANOVA (Analysis of variance) -testillä. Oneway ANOVA on yksisuuntainen varianssianalyysi, joka soveltuu käytettäväksi silloin, kun aineisto on normaalisti jakautunut, otokset toisistaan riippumattomia ja tasaisesti jakautuneita (Metsämuuronen 2011, 784). Yksisuuntaista varianssianalyysia käytetään useamman kuin kahden ryhmän keskiarvojen eroavaisuuksien selvittämiseen (Metsämuuronen 2011, 784). Maksimijuokсутestin tuloksia, veriarvoja, sekä antropometrisiä muuttujia tarkasteltiin Kruskal-Wallis testillä, joka on soveltuva pienille aineistoille (Metsämuuronen 2011, 785). Kruskal-Wallis testillä voidaan tarkastella kolmea tai useampaa toisistaan riippumatonta ryhmää ja vertailla niiden välisiä keskiarvoja sekä jakaumia. Tarkasteltavien muuttujien tulee olla vähintään järjestysasteikkollisia. Kruskal-Wallis testi soveltuu normaalijakaumasta poikkeavilla aineistoilla käytettäväksi, jonka vuoksi se sopi edellä mainitun aineiston tarkasteluun (Metsämuuronen 2011, 785). Kaikkien käytettyjen aineistojen normaalijakaumaa tarkasteltiin vinouden ja huipukkuuden, sekä grafiikoiden avulla (Metsämuuronen 2011, 644-645). Lopuksi tarkasteltiin vielä korrelaatioita tilastollisesti merkitsevien muuttujien kesken Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrointa käyttäen.

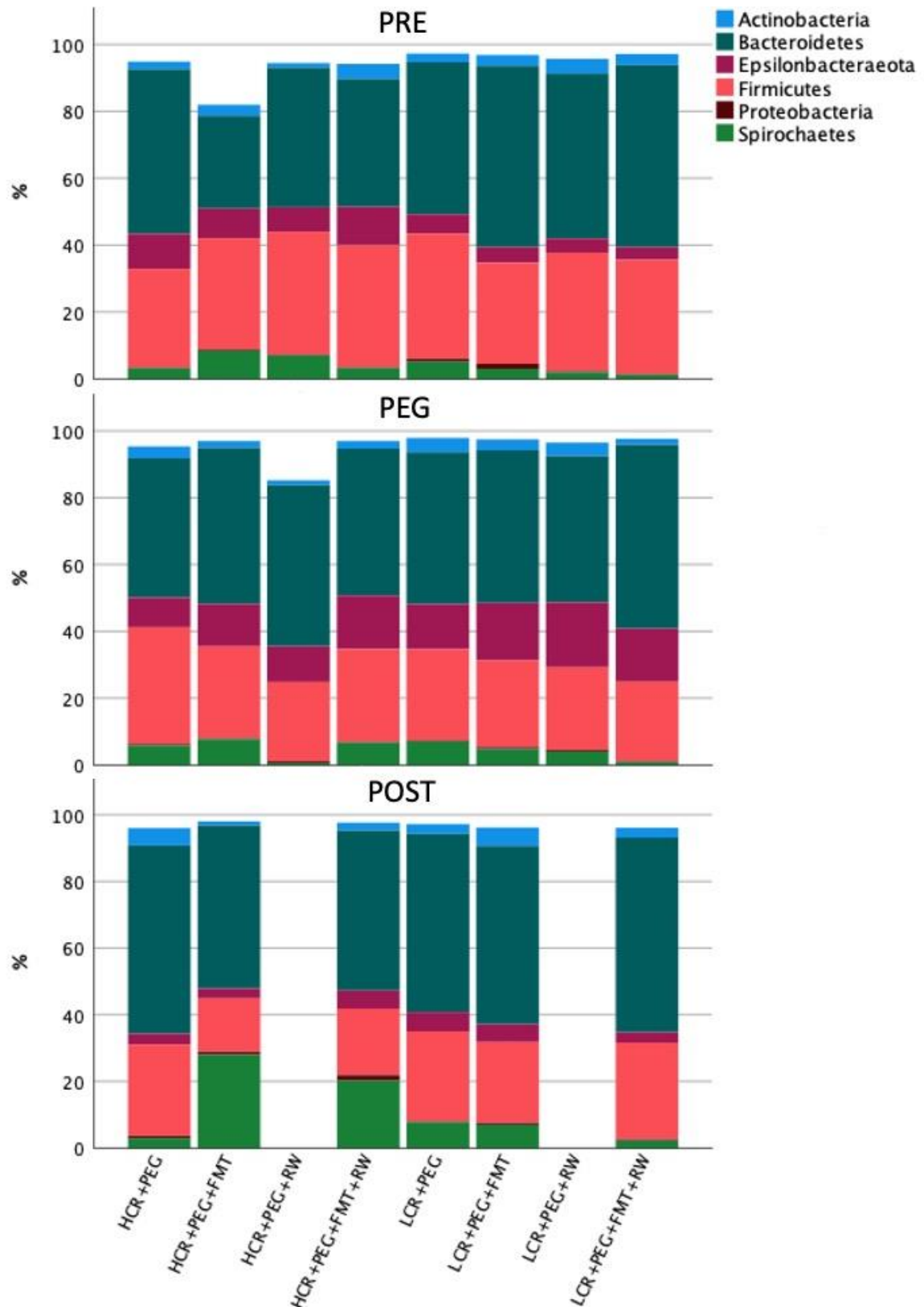
4 TULOKSET

4.1 Suolistomikrobiston koostumus

Suolistomikrobiston koostumusta tarkasteltiin yhteensä kuuden pääjakson, 21 heimon ja 20 suvun osalta. Jokainen muuttuja sisälsi tuloksen PRE (alkumittausajankohta), PEG (suolihuuhtelun jälkeinen mittausajankohta), POST (loppumittausajankohta) -aikapisteiltä. Seuraavassa taulukossa (Taulukko 1) on kuvattu tässä tutkimuksessa tarkastellut suolistomikrobiston koostumusta kuvaavat muuttujat pääjaksoittain, heimoittain ja suvuittain. Pääjaksojen prosentuaaliset osuudet PRE-, PEG- ja POST -aikapisteittäin ja ryhmittäin ovat kuvattuina seuraavalla sivulla kuviossa 3.

TAULUKKO 1. Tutkimuksessa tarkastellut suolistomikrobistomuuttujat pääjaksoittain, heimoittain ja suvuittain.

Pääjaksot	Heimot	Suvut
Aktinobakteerit	Tunnistamaton heimo	<i>Bifidobacterium</i>
Bakteroidit	Bifidobacteriaceae	<i>Bacteroides</i>
Epsilonbakteerit	Bacteroidales	<i>Muribaculaceae</i>
Firmikuutit	Bacteroidaceae	<i>Prevotella</i>
Proteobakteerit	Muribaculaceae	<i>Prevotellaceae</i> Ga6A1
Spirokeetat	Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae</i> NK3B31
	Rikenellaceae	<i>Prevotellaceae</i> UCG-001
	Tannerellaceae	<i>Prevotellaceae</i> UCG-003
	Helicobacteraceae	<i>Parabacteroides</i>
	Lactobacillaceae	<i>Helicobacter</i>
	Christensenellaceae	<i>Lactobacillus</i>
	Clostridiaceae	<i>Lachnospiraceae</i>
	Lachnospiraceae	<i>Eubacterium ventriosum</i>
	Peptostreptococcaceae	<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136
	Ruminococcaceae	<i>Eubacterium coprostanoligenes</i>
	Erysipelotrichaceae	<i>Ruminococcus</i>
	Acidaminococcaceae	<i>Dubosiella</i>
	Veillonellaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>
	Saccharimonadaceae	<i>Treponema</i>
	Desulfovibrionaceae	<i>Ruminococcaceae</i> NK4A214
	Spirochaetaceae	



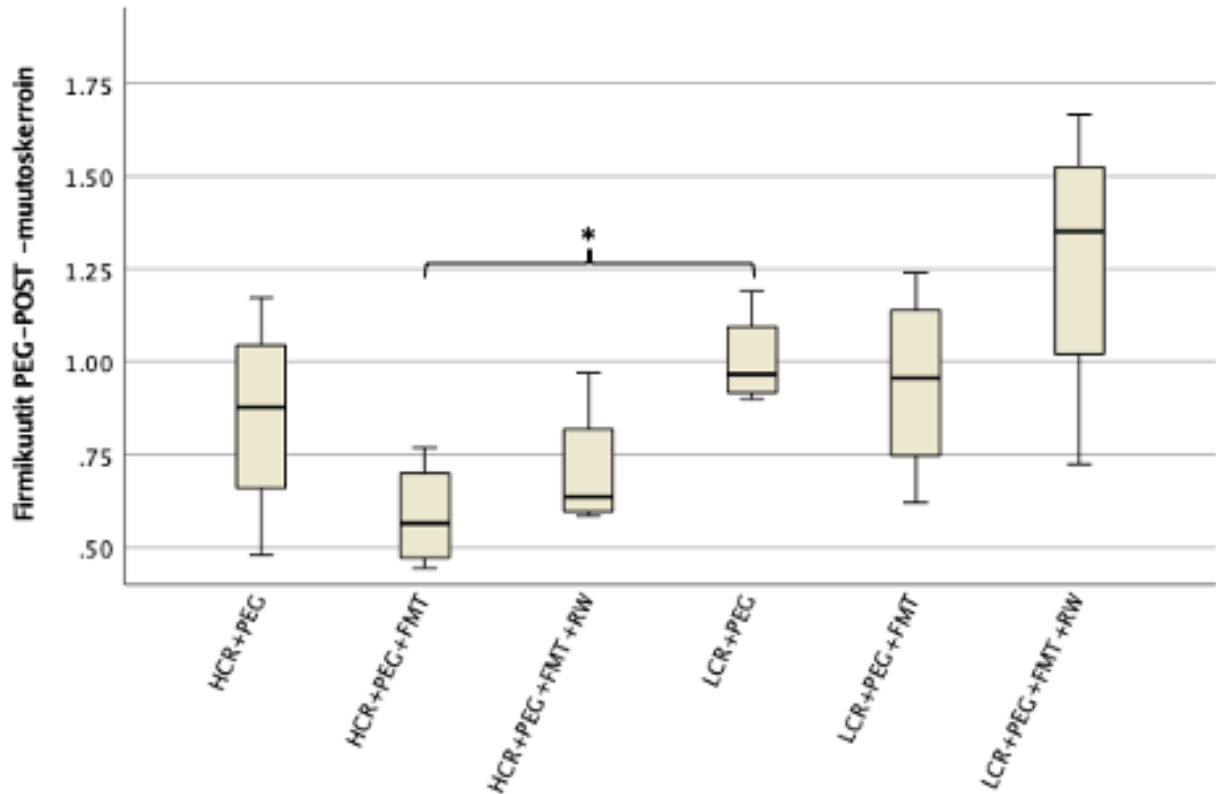
KUVIO 3. Bakteerien pääjaksosten prosentuaaliset osuudet ryhmittäin kolmessa eri mittausajankohdassa, PRE (alkumittausajankohta), PEG (suolihuuhtelun jälkeinen

mittausajankohta), POST (loppumittausajankohta). HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä). Kuvaajaan tyhjäksi jäävä prosenttiosuus sisältää tunnistamattomia bakteereja.

Suolistomikrobiston koostumusta kuvaava aineisto jäi valitettavasti vajaaksi, sillä jokaiselta HCR+PEG+RW ja LCR+PEG+RW -ryhmään kuulvalta rotalta puuttui loppumittausulos (POST) teknisistä syistä johtuen. Eroja ei havaittu pääjaksojen, heimojen tai sukujen kolmen eri aikapisteen prosentuaalisten osuuksien välillä, kun suolistomikrobiston koostumusta tarkasteltiin ryhmittäin ja aikapisteittäin. Pääjaksojen, heimojen ja sukujen prosentuaalisen tarkastelun jälkeen laskettiin vielä firmikuutti- ja bakteroidi -pääjaksojen prosentuaalisten osuuksien väliset suhdeluvut kolmessa eri aikapisteessä jakamalla firmikuutti -pääjakson osuus bakteroidi -pääjakson osuudella ja vertailtiin kyseisten pääjaksojen suhdelukujen muutoksia ryhmittäin. Tilastollisia merkitsevyyksiä ei havaittu, mutta HCR+PEG -ryhmässä suhdeluku laski PEG- ja POST -aikapisteiden välillä arvosta 0.87 arvoon 0.53 ($p=0.068$), HCR+PEG+FMT -ryhmässä PRE- ja POST -aikapisteiden välillä arvosta 2.14 arvoon 0.35 ($p=0.068$) sekä PEG- ja POST -aikapisteiden välillä arvosta 0.60 arvoon 0.35 ($p=0.068$). HCR+PEG+FMT+RW -ryhmässä suhdeluku laski PRE- ja POST -aikapisteiden välillä arvosta 1.12 arvoon 0.41 ($p=0.068$) ja PEG- sekä POST -aikapisteiden välillä arvosta 0.62 arvoon 0.41 ($p=0.068$). LCR -rottaryhmistä ainoastaan LCR+PEG -ryhmän PEG- ja POST -aikapisteiden välisen suhdeluvun muutoksen voitiin katsoa olevan lähellä tilastollista merkitsevyyttä, laskien arvosta 0.60 arvoon 0.51 ($p=0.068$). Suhdeluvun laskiessa firmikuutti -pääjakson prosentuaalinen osuus laskee bakteroidi -pääjakson prosentuaaliseen osuuteen nähden. HCR+PEG+RW- ja LCR+PEG+RW -ryhmien kohdalla suhdelukuja ei valitettavasti voitu laskea puuttuvien arvojen vuoksi.

Myös suolistomikrobiston eri mittausajankohtien välistä muutosta kuvaavien muutoksetointen (fold change) tarkastelusta jouduttiin sulkemaan pois edellä mainitut kaksi ryhmää puuttuvien mittausulosten vuoksi. Jäljelle jäävien ryhmien välisten muutoksetointen tarkastelussa todettiin ainoastaan yksi ero ($p=0.049$) firmikuutti -pääjakson osalta HCR+PEG+FMT- ja

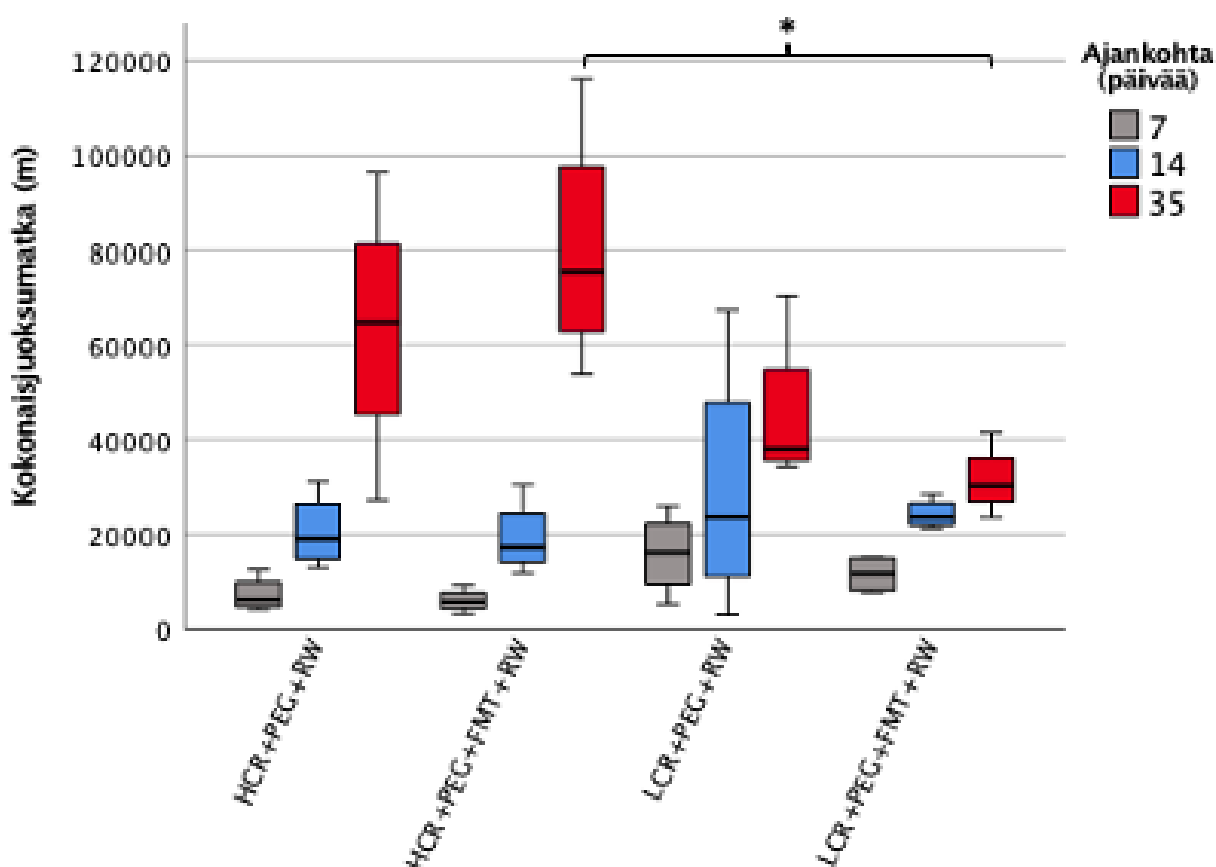
LCR+PEG -ryhmien välillä PEG- ja POST -mittausajankohtien välillä (Kuvio 4). LCR+PEG -ryhmän suolistomikrobiston firmikuuttien osuus pysyi kutakuinkin samana kyseisten mittausajankohtien välillä, kun taas HCR+PEG+FMT -ryhmän suolistomikrobiston firmikuuttien osuus laski noin 40 % verran.



KUVIO 4. PEG (suolihuuhtelun jälkeinen mittausajankohta) ja POST (loppumittausajankohta) -mittausajankohtien väliset muutokset (fold change) keskiarvot ryhmittäin ja 95 % -luottamusvälit keskiarvoille firmikuutti -pääjakson osalta. * = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.05$ -tasolla. Analysoitu ANOVA -testiä käyttäen. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).

4.2 Vapaaehtoinen juoksuharjoittelu

Viiden viikon aikana kerättyä kokonaisjuoksumatkaa mitattiin rotilta, jotka kuuluivat juoksupyörälliseen (RW, running wheel) -ryhmään. Näiden neljän ryhmän välisiä tuloksia vertailtiin kolmessa eri aikapisteessä, 7, 14 ja 35 päivän kohdalla (Kuvio 5). Kyseisten päivien tulokset kuvaavat päivää edeltäneen viikon keskiarvoa. Etenkin HCR-ryhmien juoksumäärät kasvoivat loppua kohden runsaasti. Vapaaehtoisen juoksuharjoittelun suhteen määrällisesti paras ryhmä, eli HCR+PEG+FMT+RW juoksi viiden viikon aikana noin 224 kilometriä, kun taas heikoin ryhmä, LCR+PEG+FMT+RW, noin 153 kilometriä. Edellä mainittujen ulosteensiirron vastaanottaneiden HCR- ja LCR -ryhmien välillä havaittiin ero ($p=0.044$) 35 päivän mittaustuloksissa, mutta ei sitä edeltäneinä mittausajankohtina. Muiden ryhmien välillä eroja ei havaittu.

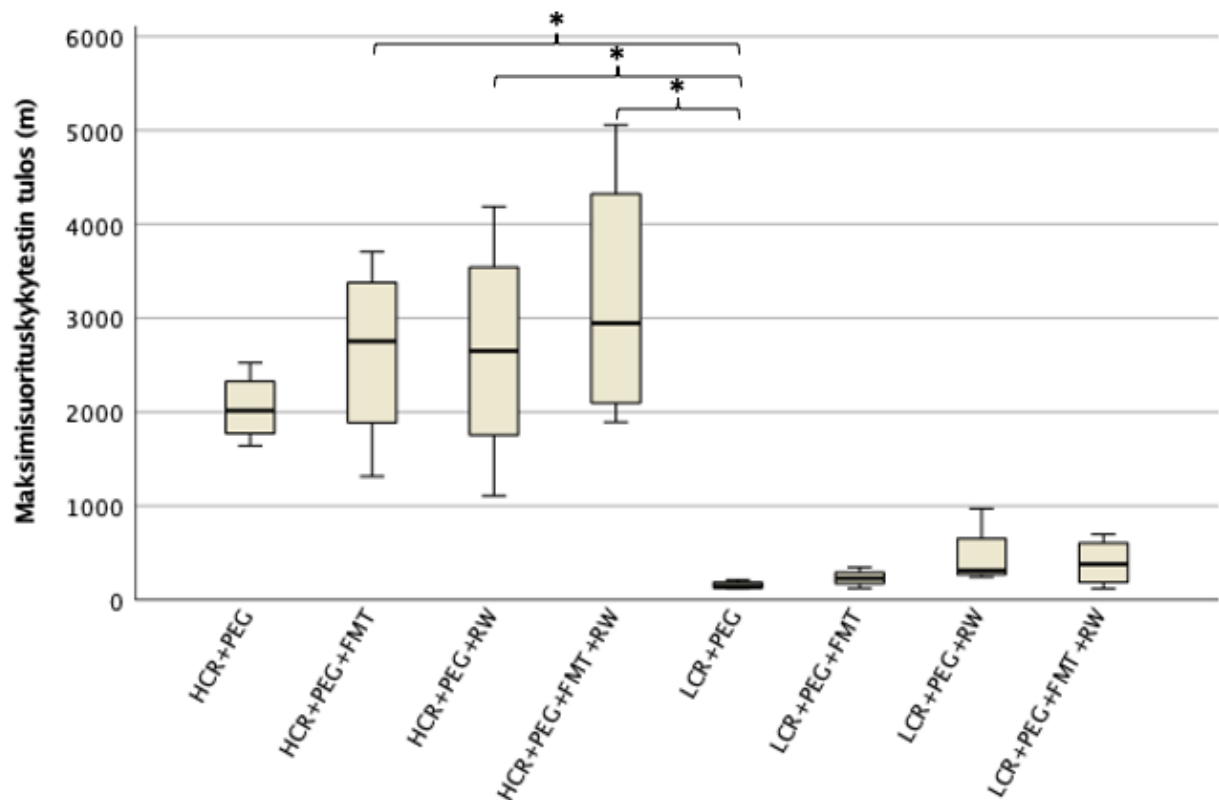


KUVIO 5. Juoksupyörällisten rottaryhmien kokonaisjuoksumatkojen keskiarvot metreinä viikossa ja 95 % -luottamusvälit kolmessa eri mittausajankohdassa. * = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p<0.05$ -tasolla. Analysoitu ANOVA -testiä käyttäen. HCR = High capacity

runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).

4.3 Maksimisuorituskykytesti

Kaikki rotat suorittivat maksimisuorituskykytestin yhteensä kolme kertaa. Kuviossa 6 on kuvattu tulosten (paras kolmesta) ryhmäkohtaiset keskiarvot ja 95 % -luottamusvälit keskiarvoille. Heikoiten juosseesta LCR+PEG (156 metriä) -ryhmästä erosivat HCR+PEG+FMT+RW- (3211 metriä, $p=0.026$), HCR+PEG+FMT- (2633 metriä, $p=0.038$) ja HCR+PEG+RW (2649 metriä, $p=0.049$) -ryhmät. Kokonaisuudessaan LCR-rottaryhmien keskimääräiset tulokset vaihtelivat ryhmästä riippuen välillä 156 – 396 metriä, kun taas HCR-rottaryhmien tulokset ryhmästä riippuen välillä 2050 – 3211 metriä.



KUVIO 6. Maksimisuorituskykytestin parhaiden tulosten keskiarvot ryhmittäin metreinä ja 95 % -luottamusvälit. * = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p<0.05$ -tasolla. Analysoitu Kruskal-

Wallis -testiä käyttäen. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).

4.4 Veriarvot

Kunkin rotan lopetuksen yhteydessä kerätystä verinäytteestä analysoitiin kokonaiskolesteroli, HDL- ja LDL -kolesterolit, glukoosi, sekä triglyseridit. Seuraavan sivun taulukossa 2 on kuvattu edellä mainittujen veriarvojen keskiarvot ja 95 % -luottamusvälit ryhmittäin. Ryhmien HCR+PEG+FMT+RW ja LCR+PEG ($p=0.005$), sekä HCR+PEG+FMT+RW ja LCR+PEG+RW ($p=0.033$) välillä havaittiin ero LDL-kolesterolin määrässä (Kuvio 7). LCR+PEG -ryhmän LDL-kolesterolin määrä oli yli kolminkertainen (0,49 mmol/L) ja LCR+PEG+RW -ryhmän kolesteroli hieman alle kolminkertainen (0,41 mmol/L) HCR+PEG+FMT+RW -ryhmän keskimääräiseen kolesteroliarvoon (0,15 mmol/L) nähden.

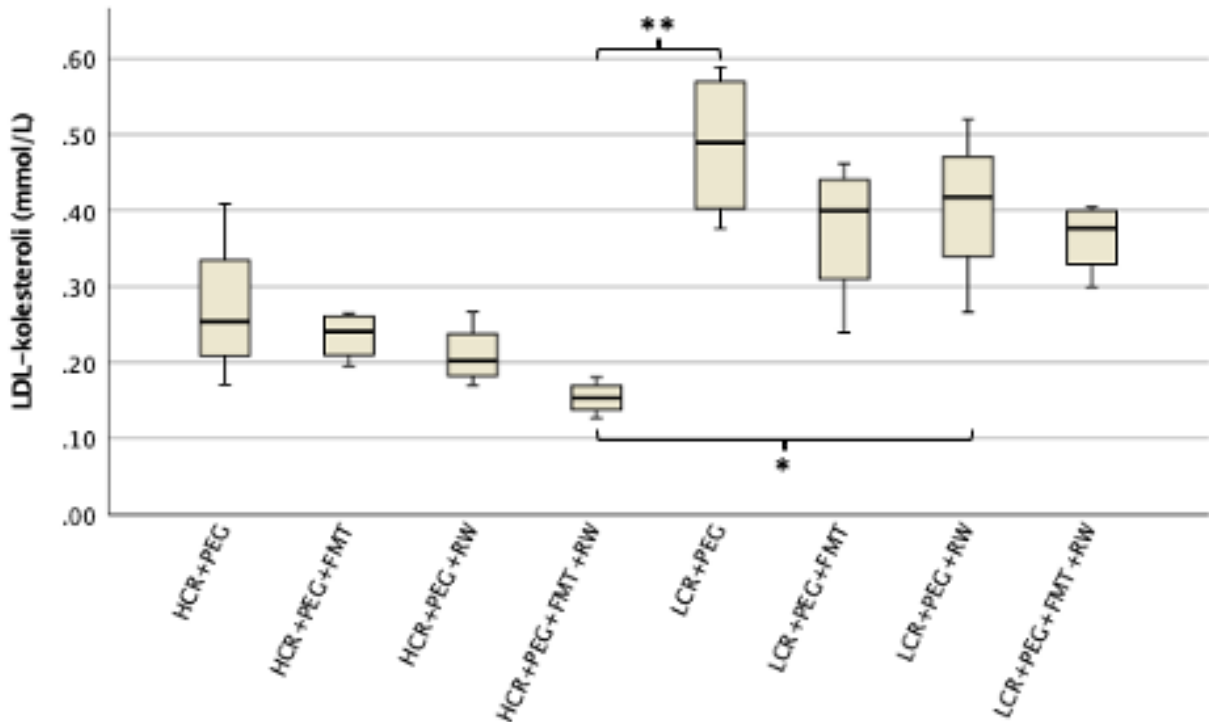
TAULUKKO 2. Lopetuksen yhteydessä mitattujen veriarvojen keskiarvot millimoolina litraa kohden (mmol/L) ryhmittäin ja 95 % -luottamusvälit keskiarvoille.

Ryhmä	Kokonaiskolesteroli (mmol/L)	HDL-kolesteroli (mmol/L)	LDL-kolesteroli (mmol/L)	Glukoosi (mmol/L)	Triglyseridit (mmol/L)
HCR+PEG	2,06 (1,79 – 2,33)	2,03 (1,78 – 2,27)	0,27 (0,11 – 0,43)	12,88 (10,11 – 15,66)	0,75 (0,52 – 0,97)
HCR+PEG+FMT	2,01 (1,73 – 2,29)	1,96 (1,70 – 2,22)	0,24 (0,18 – 0,29)	12,04 (9,98 – 14,09)	0,89 (0,38 – 1,39)
HCR+PEG+RW	1,73 (1,03 – 2,42)	1,66 (1,03 – 2,30)	0,21 (0,15 – 0,27)	12,19 (7,36 – 17,02)	0,87 (0,40 – 1,33)
HCR+PEG+FMT+RW	1,71 (1,28 – 2,14)	1,66 (1,21 – 2,10)	0,15 **/* (0,12 – 0,19) ^{a/b}	10,85 (6,58 – 15,13)	1,00 (0,07 – 1,93)
LCR+PEG	2,29 (1,74 – 2,84)	2,20 (1,66 – 2,73)	0,49 ** (0,33 – 0,64) ^a	12,84 (5,08 – 20,60)	0,78 (0,59 – 0,97)
LCR+PEG+FMT	1,82 (0,87 – 2,77)	1,80 (0,97 – 2,64)	0,38 (0,22 – 0,53)	9,71 (9,71 – 6,92)	0,54 (0,12 – 0,95)
LCR+PEG+RW	2,09 (1,07 – 3,10)	1,99 (1,16 – 2,81)	0,41 * (0,24 – 0,57) ^b	10,47 (6,92 – 14,01)	0,60 (0,04 – 1,17)
LCR+PEG+FMT+RW	1,71 (1,24 – 2,17)	1,72 (1,33 – 2,11)	0,36 (0,29 – 0,44)	9,07 (5,04 – 13,10)	0,40 (0,15 – 0,64)

** = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.01$ -tasolla (Kruskal-Wallis -testi).

* = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.05$ -tasolla (Kruskal-Wallis -testi).

^a = HCR+PEG+FMT+RW ja LCR+PEG. ^b = HCR+PEG+FMT+RW ja LCR+PEG+RW. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).



KUVIO 7. LDL-kolesterolin keskiarvot ryhmittäin millimooleina litraa kohden (mmol/L) ja 95 % -luottamusvälit keskiarvoille. ** = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.01$ -tasolla, * = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.05$ -tasolla. Analysoitu Kruskal-Wallis -testiä käyttäen. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).

4.5 Kehonkoostumukselliset muuttujat

Rottien lopetuksen yhteydessä mitattuun kehonpainoon suhteutetun kaksoiskantalihaksen (m. gastrocnemius) koon ja epididymaalirasvan määrän, sekä vieroitus- ja lopetuspainon keskiarvot on esitetty taulukossa 3 ryhmittäin. HCR+PEG -ryhmän epididymaalirasvan kehonpainoon suhteutettu prosentuaalinen osuus oli kaikista ryhmistä suurin (0,95 %BW), eroten LCR+PEG+FMT+RW- (0,55 %BW, $p=0.015$), sekä LCR+PEG+RW (0,57 %BW, $p=0.049$) -ryhmistä.

TAULUKKO 3. Gastrocnemius -lihaksen suhteellisen koon prosenttiosuus kehonpainosta, epididymaalirasvan suhteellisen määrän prosenttiosuus kehonpainosta, vieroitus- ja lopetuspainojen keskiarvot ryhmittäin, sekä 95 % -luottamusvälit keskiarvoille.

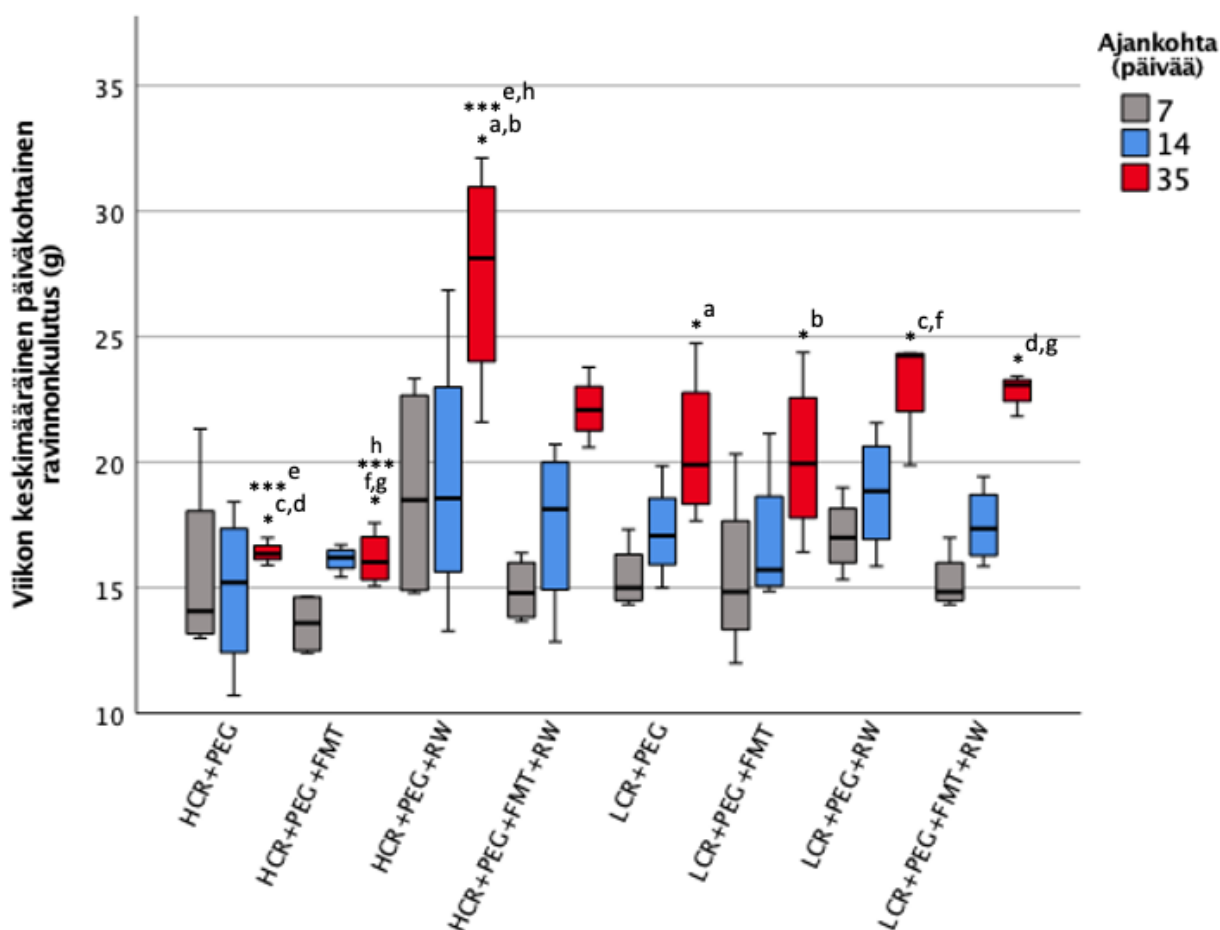
Ryhmä	Gastrocnemius -lihas (Lopetus, %BW)	Epididymaalirasva (Lopetus, %BW)	Vieroituspaino (g)	Lopetuspaino (g)
HCR+PEG	0,48 (0,45 – 0,51)	0,95 * (0,86 – 1,05) ^{a,b}	63,90 (45,73 – 82,07)	199,98 (179,31 – 220,64)
HCR+PEG+FMT	0,49 (0,47 – 0,52)	0,80 (0,21 – 1,39)	62,68 (45,24 – 80,11)	190,80 (151,29 – 230,31)
HCR+PEG+RW	0,46 (0,45 – 0,47)	0,68 (0,59 – 0,77)	68,45 (40,14 – 96,76)	242,70 (180,99 – 304,41)
HCR+PEG+FMT+RW	0,46 (0,40 – 0,52)	0,67 (0,56 – 0,79)	58,03 (55,69 – 60,36)	194,68 (174,21 – 215,14)
LCR+PEG	0,49 (0,47 – 0,51)	0,85 (0,65 – 1,04)	70,38 (55,03 – 85,72)	261,40 (219,99 – 302,81)
LCR+PEG+FMT	0,50 (0,46 – 0,53)	0,79 (0,60 – 0,98)	65,25 (51,79 – 78,71)	256,15 (188,69 – 323,61)
LCR+PEG+RW	0,50 (0,45 – 0,54)	0,57 * (0,43 – 0,70) ^b	74,53 (61,51 – 87,54)	260,28 (224,87 – 295,68)
LCR+PEG+FMT+RW	0,48 (0,44 – 0,53)	0,55 * (0,47 – 0,63) ^a	77,28 (69,41 – 85,14)	258,95 (228,51 – 289,39)

* = Ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.05$ -tasolla (Kruskal-Wallis -testi).

^a = HCR+PEG ja LCR+PEG+FMT+RW. ^b = HCR+PEG ja LCR+PEG+RW. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä), %BW = Kehonpainoon suhteutettu paino prosentteina.

4.6 Ravinnon kulutus

Ravinnon kulutusta tarkasteltiin kolmessa eri aikapisteessä, 7, 14 ja 35 päivän kohdalla. 7, 14 ja 35 päivän tulokset kuvaavat kyseistä päivää edeltävän viikon keskiarvoa. Viikon keskimääräistä päiväkohtaista ravinnon kulutusta on tarkasteltu kuviossa 8. 35 päivän mittaustulosta edeltävällä viikolla eniten ravintoa kuluttaneesta HCR+PEG+RW -ryhmästä (27,5 g) erosivat ryhmät LCR+PEG (20,6 g, $p=0.017$), LCR+PEG+FMT (20,2 g, $p=0.010$), HCR+PEG (16,4 g, $p<0.001$) ja HCR+PEG+FMT (16,2 g, $p<0.001$). Lisäksi LCR+PEG+RW -ryhmästä (23,2 g) erosivat ryhmät HCR+PEG (16,4 g, $p=0.022$) ja HCR+PEG+FMT (16,2 g, $p=0.016$), sekä LCR+PEG+FMT+RW -ryhmästä (22,9 g) HCR+PEG- (16,4 g, $p=0.035$) ja HCR+PEG+FMT (16,2 g, $p=0.025$) -ryhmät. Muissa aikapisteissä ryhmien välisiä eroja ei havaittu.



KUVIO 8. Viikon keskimääräinen päiväkohtainen ravinnonkulutus grammoina (g) ja 95 % -luottamusvälit keskiarvoille. * = ryhmien välinen ero on merkitsevä $p<0.05$ -tasolla. *** =

ryhmien välinen ero on merkitsevä $p < 0.001$ -tasolla. ^a = HCR+PEG+RW ja LCR+PEG. ^b = HCR+PEG+RW ja LCR+PEG+FMT. ^c = HCR+PEG ja LCR+PEG+RW. ^d = HCR+PEG ja LCR+PEG+FMT+RW. ^e = HCR+PEG ja HCR+PEG+RW. ^f = HCR+PEG+FMT ja LCR+PEG+RW. ^g = HCR+PEG+FMT ja LCR+PEG+FMT+RW. ^h = HCR+PEG+FMT ja HCR+PEG+RW. Analysoitu ANOVA -testiä käyttäen. HCR = High capacity runner (korkean aerobisen kapasiteetin juoksija), LCR = Low capacity runner (matalan aerobisen kapasiteetin juoksija), PEG = Polyetyleeniglykoli (suolihuuhtelun vastaanottanut ryhmä), FMT = Fecal microbiota transplant (ulosteensiirron vastaanottanut ryhmä), RW = Running wheel (juoksupyörällinen ryhmä).

5 POHDINTA

5.1 Ulosteensiirron vaikutus suolistomikrobiston koostumukseen

Aiemmissä tutkimuksissa aineenvaihdunnallisille sairauksille ominaisen suhteellisesti runsaamman firmikuutti- ja matalamman bakteroidi -pääjakson määrän on todettu siirtyvän ulosteensiirron yhteydessä siirteen saaneelle eläimelle (Burz ym. 2021; Le Roy ym. 2013; Ridaura ym. 2013). Ridaura ym. (2013) havaitsivat, että kehonkoostumuksellisesti toisistaan poikkeavilta ihmiskaksosilta saaduista ulosteensiirtein voitiin kyseiselle luovuttajalle ominainen suolistomikrobiston koostumus siirtää ulosteensiirron vastaanottavalle hiirelle. Samassa tutkimuksessa todettiin lisäksi bakteroidi -pääjakson asuttavan suoliston firmikuutti -pääjaksoa tehokkaammin, mikäli asuttava suolisto on mikrobeista vapaa. Havainto tehtiin, kun mikrobeista vapaat hiiret sijoitettiin samaan häkkiin firmikuutti-bakteroidi -suhteeltaan eroavan hoikan ja lihavan hiiren kanssa (Ridaura ym. 2013). Kun LCR+PEG -ryhmän suolistomikrobiston koostumusta tarkastellaan pääjaksotasolla, havaittiin PRE- ja PEG -aikapisteiden välillä lasku firmikuuttien määrässä, sekä kasvu epsilonbakteerien määrässä. PEG- ja POST -aikapisteiden välillä epsilonbakteerien määrän nähtiin kuitenkin laskevan jälleen kohti PRE -mittauksen tasoa, kun taas bakteroidien osuus hieman kasvoi. Vaikka muutokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, voidaan suunnan katsoa olevan runsaampaa bakteroidien ja niukempaa firmikuuttien määrää suosiva. HCR+PEG -ryhmän firmikuuttien määrä puolestaan vaikutti kasvaneen PRE -aikapisteestä PEG -aikapisteeseen, mutta bakteroidien ottaneen jälleen vallan POST -aikapisteeseen edetessä. Koska LCR+PEG- ja HCR+PEG -ryhmille suoritettiin ainoastaan suoliston puhdistus mikrobeista, voidaan muutosten arvella johtuvan kyseisestä toimenpiteestä, jonka jälkeen mikrobiston koostumus muotoutui jälleen kohti kyseiselle ryhmälle ominaista suolistomikrobiston koostumusta (Jalanka ym. 2015). HCR+PEG+FMT- ja HCR+PEG+FMT+RW -ryhmien suolistomikrobiston firmikuutti-bakteroidi -suhdeluvuissa huomattiin myös laskusuuntainen, joskaan ei tilastollisesti merkitsevä muutos kohti POST -aikapistettä edetessä. Tämän lisäksi voitiin havaita aiempiin aikapisteisiin sekä muihin ryhmiin nähden runsas spirokeettojen osuus. Muutos firmikuuttien ja bakteroidien suhdeluvussa kyseisten ryhmien osalta tukee siinä mielessä aiempaa tutkimusnäyttöä, että kyseisten ryhmien vastaanottama ulosteensiirre on

peräisin nuorilta LCR-rotilta. Niiden suolistomikrobiston on aiemmin todettu sisältävän hieman suuremman osuuden bakteeroideja ja spirokeettoja HCR-rottiin nähden (Pekkala ym. 2017). Kun tarkastellaan puolestaan LCR+PEG+FMT- ja LCR+PEG+FMT+RW -ryhmien suolistomikrobiston koostumusta, voitiin kuitenkin huomata firmikuuttien ja bakteroidien määrän muutoksen poikkeavan HCR+FMT -ryhmien tuloksista siten, että vaikkakin ulosteensiirteet olivat peräisin nuorelta HCR-rotalta, joiden suolistomikrobiston on aiemmin havaittu sisältävän suhteellisesti runsaammin firmikuutteja kuin LCR-rottien (Pekkala ym. 2017), oli mikrobiston koostumuksessa havaittavissa muutos kohti runsaampaa bakteroidien määrää. Yleisellä tasolla suolistomikrobiston koostumuksen voidaan todeta jokaisen ryhmän osalta kehittyneen kohti niukempaa firmikuutti-bakteroidi -suhdelukua, eli mikrobiston bakteroidien määrän lisääntyneen. Jotta siirteelle ominaisen koostumuksen siirtymistä vastaanottavalle ryhmälle voitaisiin arvioida tarkemmin, olisi tarpeen tarkastella sekä HCR-ryhmien, että LCR-ryhmien vastaanottamien siirteiden koostumusta.

5.2 Ulosteensiirron vaikutus suorituskykyyn ja juoksumotivaatioon

Kaikki HCR-ryhmät, HCR+PEG -ryhmää lukuun ottamatta, erosivat LCR+PEG -ryhmästä suorituskyvyn suhteen merkitsevästi. Vaikka muut ryhmät eivät eronneet toisistaan maksimisuorituskykytestissä, oli HCR- ja LCR-rottalinjojen välillä havaittavissa selkeä ero HCR-ryhmien eduksi. Mainittavia eroja juoksupyörällisten ryhmien tai ulosteensiirtoryhmien välillä HCR- ja LCR -linjoittain ei maksimisuorituskyvyn suhteen näyttänyt olevan. Kokonaisjuoksumatkaa tarkastellessa todettiin puolestaan HCR+PEG+FMT+RW -ryhmän juosseen LCR+PEG+FMT+RW -ryhmään nähden huomattavasti enemmän viimeisellä mittausviikolla. Mielenkiintoista on, että vaikka HCR-ryhmät erosivat maksimisuorituskyvyltään selkeästi LCR-ryhmiin nähden, havaittiin juoksumäärien kuitenkin kasvavan tutkimuksen edetessä ryhmästä ja rottalinjasta riippumatta. LCR-ryhmien juoksumäärät näyttävät olleen HCR-ryhmiin nähden jopa suuremmat 7 ja 14 päivän mittausviikoilla, ja vasta viimeisessä mittausajankohdassa HCR-ryhmät innostuivat juoksemaan suuremmissa määrin. Kyseinen ilmiö kertoo todennäköisesti enemmän ryhmien juoksumotivaatiosta kuin itse suorituskyvystä. Onkin kiinnostavaa, että aiemmissa tutkimuksissa LCR-rottien vapaaehtoisen juoksumotivaation on kuvattu olevan HCR-ryhmien rottiin verraten vaatimattomampi (Park ym. 2016). Tämän havainnon nähtiin toki toistuvan

suorituskykytestissä. HCR-ryhmistä ulosteensiirron vastaanottaneen ryhmän juoksumotivaatio näytti kokonaisjuoksumatkan perusteella olleen viimeisellä viikolla parempi kuin pelkän suolihuuhtelun vastaanottaneen ryhmän, kun taas LCR-ryhmien kesken tilanne oli päinvastainen. Kahden ensimmäisen viikon tulosten perusteella HCR-rotilta vastaanotettu ulosteensiirre saattoi mahdollisesti kasvattaa LCR-rottien juoksumotivaatiota hetkellisesti, sekä LCR-rotilta saatu ulosteensiirre puolestaan heikentää HCR-rottien innokkuutta juoksemiseen väliaikaisesti. Suorituskykyä mittaavan maksimijuokсутestin perusteella ulosteensiirron vaikutuksista ei voida juuri johtopäätöksiä vetää, sillä ulosteensiirron vastaanottaneet ryhmät eivät näyttäneet eroavan toisista saman rottalinjan ryhmistä.

Vaikka tämän tutkimuksen pohjalta ei voida esittää selkeitä johtopäätöksiä ulosteensiirron vaikutuksesta juoksumotivaatioon tai suorituskykyyn, on aiemmissa hiiritutkimuksissa havaittu ryhmien välisiä eroavaisuuksia, joskaan ei LCR/HCR -asetelmassa. Scheiman ym. (2019) havaitsivat tutkimuksessaan kestävyysjuoksijoiden suolistomikrobiston sisältävän harjoituksen jälkeen suuremman määrän *Veillonella* -suvun bakteereita harjoitetta edeltäneeseen näytteeseen verraten. *Veillonella* -suvun bakteerien todettiin lisäksi olevan suuremmissa määrin tavattavissa urheilijoilla, kuin heidän urheilemattomilla verrokeillaan. Edeltävän havainnon pohjalta Scheiman ym. (2019) tarkastelivat hiirikoeasetelmassa nenä-mahaletkulla annosteltavan *Veillonella atypica* -bakteerilajin vaikutusta suorituskykyyn, käyttäen vertailukohteena *Lactobacillus bulgaricus* -lajia. Laktaattiaineenvaihduntaa tehostavan *Veillonella atypica* -lajin havaittiin parantavan juokсутestin avulla mitattua maksimisuorituskykyä, kun taas laktaattiaineenvaihduntaan osallistumatonta *Lactobacillus bulgaricus* -bakteeria saaneen ryhmän tulokset jäivät merkittävästi heikommiksi (Scheiman ym. 2019). Lee ym. (2019; 2020) puolestaan huomasivat *Bifidobacterium longum* -lajin OLP-01 -alalajin parantavan puristusvoimaa ja kestävyyttä, sekä *Lactobacillus salivarius* -lajin alalajin *Salicinius* SA-03:n parantavan lihasvoimaa ja kestävyysuorituskykyä hiirillä. Tässä pro gradu -tutkielmassa ei havaittu muutosta Veillonellaceae- ja Lactobacillaceae -heimojen, tai *Bifidobacterium* -suvun bakteerimäärissä minkään ryhmän osalta tai ryhmien välillä, vaikka eroja ryhmien suorituskyvyssä havaittiinkin. Edellä mainituissa tutkimuksissa tarkasteltujen bakteerilajien määriä ei tämän tutkielman puitteissa tarkasteltu.

5.3 Ulosteensiirron vaikutus veriarvoihin

Veriarvojen suhteen merkitseviä eroja nähtiin ainoastaan LDL-kolesteroliarvoissa. Sekä LCR+PEG- että LCR+PEG+RW -ryhmien LDL-kolesteroliarvot olivat HCR+PEG+FMT+RW -ryhmän arvoon nähden merkitsevästi korkeammat. Vaikka muiden ryhmien välillä merkitseviä eroja ei havaittu, olivat HCR-ryhmien arvot keskimääräisesti hiukan matalampia LCR-ryhmien LDL-kolesteroliarvoihin nähden. Ulosteensiirron vastaanottaneiden LCR-ryhmien LDL-kolesteroliarvot olivat puolestaan hieman matalammat kahteen muuhun LCR-ryhmään verraten, kun taas mielenkiintoisesti HCR-ryhmistä alhaisimman LDL-kolesteroliarvon omai LCR-peräisen ulosteensiirteen vastaanottanut ryhmä. Ulosteensiirron vastaanottaneiden LCR-ryhmien matalammat LDL-kolesteroliarvot voivat mahdollisesti kertoa HCR-rotilta saadun ulosteensiirteen hyödyllisestä vaikutuksesta. LCR-rotilta saatu ulosteensiirre ei kuitenkaan näyttänyt vaikuttaneen HCR-vastaanottajan LDL-kolesteroliarvoon sitä kohottaen, vaan enemmänkin kolesterolin määrää laskien. Muiden veriarvojen suhteen eroja ei havaittu, joskin triglyseridiarvot näyttävät olleen LCR-linjan RW- ja FMT -ryhmissä vastaaviin HCR-linjan ryhmiin nähden matalammat.

Ulosteensiirretutkimuksissa on aiemminkin havaittu eroja erityisesti kolesteroliarvoissa. Burz ym. (2021) totesivat ei-alkoholiperäistä rasvamaksasairautta sairastaneelta henkilöltä ulosteensiirteen saaneiden hiirten LDL- ja HDL -kolesteroliarvojen olevan seitsemän viikkoa ulosteensiirron jälkeen korkeammat kuin hiirillä, jotka saivat ulosteensiirteen terveiltä luovuttajilta. Zhang ym. (2020) puolestaan huomasivat normaalin glukoosinsietokyvyn omaavilta luovuttajilta saadun ulosteensiirteen vaikuttavan kroonisesti diabetesta sairastavan (*db/db*) hiiriryhmän LDL-kolesteroliarvoihin niitä merkitsevästi laskien, kun arvoa verrattiin pelkästään fysiologista suolaliuosta (PBS) saaneen ryhmän kolesteroliarvoihin. Poikkeaviakin tuloksia löytyy, sillä esimerkiksi Lai ym. (2018) eivät havainneet LDL-kolesterolissa eroja fyysisesti aktiivisten ryhmien välillä, jotka vastaanottivat ulosteensiirteen rasvaisella tai normaalilla ruokavaliolla olleilta hiiriltä. Kiinnostavaa kuitenkin on, että samassa tutkimuksessa havaittiin normaalilla ravinnolla ruokituilta hiiriltä ulosteensiirteen saaneen ryhmän paastoverensokerin olevan matalampi kuin fyysisesti passiivisella kontrolliryhmällä, kun taas rasvaisella ruokavaliolla ruokituilta hiiriltä ulosteensiirteen saaneen ryhmän tulokset eivät kontrolliryhmästä merkitsevästi poikenneet (Lai ym. 2018). Edellä mainitut tutkimukset

poikkesivat kuitenkin tämän tutkielman puitteissa tarkastellusta rottakannasta, sillä kyseisissä tutkimuksissa ei käytetty HCR- tai LCR -jalostettuja rottia.

5.4 Ulosteensiirron vaikutus kehonkoostumukseen

Kehonkoostumusta tutkittaessa ainoastaan epididymaalirasvan määrässä havaittiin tilastollisesti merkitsevät muutokset ryhmien HCR+PEG ja LCR+PEG+RW sekä LCR+PEG+FMT+RW välillä. Molempien LCR-ryhmien kehonpainoon suhteutettu epididymaalirasvan määrä jäi selkeästi HCR+PEG -ryhmää alhaisemmaksi. Kyseisten LCR-ryhmien epididymaalirasvamäärät olivat samanaikaisesti kaikista ryhmistä pienimmät. Näyttäisi siis siltä, että HCR-rotilta saatu ulosteensiirre ja suolihuuhtelu vaikuttivat suotuisasti LCR-rottien epididymaalirasvan määrää vähentäen, kun taas puolestaan HCR-rotilla epididymaalirasvan määrä näytti suolihuuhtelun seurauksena lisääntyvän. Edellä mainitun havainnon myötä voidaankin pohtia, voitaisiinko tulevaisuudessa kehon rasvamassan määrään vaikuttaa ulosteensiirteellä? Gastrocnemius-lihaksen koossa tai vieroitus- ja lopetuspainoissa ei ryhmien välillä eroja havaittu, joskin LCR-ryhmien rotat vaikuttivat olleen lopetusvaiheessa keskimääräisesti HCR-ryhmien rottia painavampia. Aiemmissä tutkimuksissa ulosteensiirron on havaittu vaikuttavan kehonkoostumukseen vaihtelevasti. Esimerkiksi Lai ym. (2018) havaitsivat normaaliruokavaliolla ruokituilta hiiriltä saadun ulosteensiirteen vastaanottaneen ryhmän kehonpainon kehittyneen 24 viikossa lähes samaan tapaan kuin ryhmällä, joka liikkui aktiivisesti. Pelkillä ulosteensiirroilla saavutettiin siis kehonpainoa tarkastellessa lähes sama vaikutus kuin liikunnalla, ilman että kehon rasvamassa erosi ryhmien välillä merkitsevästi (Lai ym. 2018). Samoin Zhou ym. (2017) huomasivat kehonpainon ja epididymaalirasvan määrän pysyvän alhaisempana ulosteensiirron saaneella ryhmällä, kun ulosteensiirtoryhmää ja verrokkiryhmää ruokittiin rasvaisella ravinnolla. Ulosteensiirtoryhmän epididymaalirasvan määrän havaittiin tosin olevan edelleenkin noin kaksinkertainen normaaliravinnolla ruokittuun kontrolliryhmään verraten (Zhou ym. 2017). Zoll ym. (2020) eivät puolestaan havainneet muutosta kehonpainossa, rasvamassan määrässä, rasvattoman massan määrässä, tai kehon rasvaprosentissa ulosteensiirteen joko fyysisesti aktiivisilta tai fyysisesti passiivisilta hiiriltä saaneiden ryhmien välillä. Tämän pro gradu -tutkielman tulosten perusteella ulosteensiirron ei voida katsoa vaikuttaneen koe-eläinten kehonkoostumukseen, vaan alhaisemman kehonpainoon suhteutetun epididymaalirasvan määrän omaavat ryhmät näyttäisivät kuuluvan

FMT-ryhmien sijaan RW-ryhmiin. Todennäköisin selitys suhteellisesti matalammalle epididymaalirasvan määrälle onkin muita ryhmiä korkeampi fyysisen aktiivisuuden taso.

5.5 Ravinnonkulutus tutkimuksen eri vaiheissa

Ravinnonkulutuksen kehitys vaikutti olleen lähes jokaisessa ryhmässä nousujohteista ja 35 päivän mittaustulosten osalta useiden eri ryhmien välillä havaittiin merkitseviä eroja. Eniten ravintoa kului HCR+PEG+FMT+RW -ryhmällä, kun taas vähiten HCR+PEG ja HCR+PEG+FMT -ryhmillä. Juoksupyörälliset HCR-ryhmien rotat näyttivät syöneen etenkin 35 päivän mittaustulosten osalta juoksupyörättömiä HCR-ryhmiä enemmän, kun taas LCR-ryhmien kesken vastaavaa eroa ei havaittu. Ulosteesiirron vastaanottaneiden ryhmien ja muiden ryhmien välillä ei havaittu mitään tietynsuuntaista kehitystä, eli ulosteesiirron vaikutuksista ravinnonkulutukseen ei tämän tutkielman perusteella voida vetää johtopäätöksiä. Aiemmissa tutkimuksissa on päädytty samankaltaisiin tuloksiin ulosteesiirron saaneiden ryhmien ja muiden ryhmien välisten erojen osalta. Esimerkiksi Lai ym. (2018) eivät havainneet ulosteesiirron vaikuttavan ravinnonkulutukseen, kun siirre oli peräisin joko normaaliravinnolla tai rasvaisella ravinnolla ruokitulta fyysisesti aktiivisilta hiiriltä. Myöskään Le Roy ym. (2013) eivät huomanneet eroa ravinnonkulutuksesta ryhmien välillä, kun ryhmät saivat siirteen joko ei-alkoholiperäiselle rasvamaksasairaudelle alttiilta hiiriltä tai hiiriltä, jotka eivät kehittäneet ei-alkoholiperäistä rasvamaksasairautta rasvaisesta ravinnosta huolimatta. Samoin Zoll ym. (2020) eivät todenneet ravinnonkulutuksessa eroja ryhmien välillä, kun ryhmät saivat ulosteesiirteen joko fyysisesti aktiivisilta tai passiivisilta hiiriltä.

5.6 Tutkimuksen luotettavuus ja eettisyys

5.6.1 Tutkimuksen validiteetti ja reliabiliteetti

Tutkimuksen luotettavuutta voidaan tarkastella Heikkilän (2014) mukaan sekä validiteetin, että reliabiliteetin näkökulmasta. Tutkimuksen voidaan katsoa olevan validi, mikäli se mittaa sitä, mitä on alun perin tarkoituskin mitata. Validin tutkimuksen ei tulisi lisäksi sisältää systemaattisia virheitä, ja sen tulisi antaa keskimäärin oikeita vastauksia (Heikkilä 2014).

Heikkilän (2014) mukaan tutkimuksen validiutta varmistettaessa tulee ensimmäisenä ottaa huomioon tutkimuskysymykset, joiden tulisi olla oikeita asioita mittaavia, yksiselitteisiä ja tutkimusongelman kattavia. Tässä pro gradu -tutkielmassa pyrittiin selvittämään, voidaanko perinnöllinen alttius aerobiseen kapasiteettiin hetkellisesti kumota hyvän aerobisen kapasiteetin omaavilta rotilta saadulla ulosteensiirteellä? Tutkimuskysymyksiksi asetettiin suolistomikrobiston koostumusta, vapaaehtoista juoksuharjoittelua, maksimisuorituskykyä, sekä seerumin rasva-, sokeri- ja insuliiniarvoja tarkastelevat kohdat. Tutkimuksen edetessä tarkasteltiin edellä mainittujen muuttujien lisäksi vielä kehonkoostumuksellisia muuttujia, sekä ravinnon kulutusta. Edellä mainittujen tutkimuskysymysten voidaan katsoa ensinnäkin mittaavan oikeita asioita ja toiseksi olevan varsin yksiselitteisiä. Kokonaisuudessaan kysymysten voidaan katsoa vastanneen tutkimusongelmaan varsin kattavasti. On tosin aina mahdollista laajentaa tarkastelutapaa ja sisällyttää tutkimukseen suurempi määrä huomioitavia muuttujia. Esimerkiksi tässä tutkielmassa suolistomikrobiston koostumusta tarkasteltiin pääjaksoittain, heimoittain ja suvuittain, eikä vaikkapa bakteerilajeittain. Toisaalta on myös huomioitava käytettävissä olevat resurssit, kuten vaikkapa pro gradu -tutkielman puitteissa käytettävissä oleva ajallinen resurssi. Seuraavana tutkimuksen validiutta varmistavana tekijänä Heikkilä (2014) mainitsee perusjoukon selkeä määrittelyn, kattavan luetteloinnin tai rekisteröinnin, sekä tutkimusjoukkoa hyvin edustavan otoksen valinnan. Tämän pro gradu -tutkielman perusjoukko koostui LCR- ja HCR -rottapopulaatiosta, joka on huolellisesti ja tiettyä kaavaa noudattaen jalostettu. Jyväskylässä syntyneet 44. sukupolven rotat muodostivat tämän pro gradu -tutkielman otoksen, eli varsinaista valintaa ei ole sen tarkemmin toteutettu. Viimeisenä kohtana Heikkilä (2014) nostaa esille korkean vastausprosentin, jolla voisi tässä tapauksessa tarkoittaa kerättyjen tulosten ja puuttuvien arvojen määrää. Tämän pro gradu -tutkielman aineistosta puuttui kahden ryhmän POST-aikapisteen suolistomikrobiston koostumusta kuvaavat arvot teknisistä syistä johtuen, jonka vuoksi kyseisiä ryhmiä ei pystytty sisällyttämään esimerkiksi ryhmien väliseen PRE-POST- tai PEG-POST -aikapistevertailuun. Onnekasta puuttuvien arvojen kannalta oli se, että kyseessä olevat ryhmät eivät vastaanottaneet ulosteensiirtoa vaan toimivat ikään kuin kontrolliryhminä.

Heikkilän (2014) mukaan tutkimuksen voidaan puolestaan todeta olevan reliaabeli, kun se antaa tarkkoja, ei-sattumanvaraisia tuloksia. Reliaabelin tutkimuksen tulisi aina olla toistettavissa siten, että tulokset vastaavat toisiaan (Heikkilä 2014). Heikkilän (2014) mukaan reliabiliteetin

varmistamiseksi tulee ensin varmistaa riittävän suuri ja perusjoukkoa hyvin edustava otoskoko. Pienen otoskoon voidaankin katsoa olleen tämän pro gradu -tutkielman suurin kompastuskivi. Otos sisälsi yhteensä 32 rottaa, jonka vuoksi kahdeksaan ryhmään jaettaessa yhden ryhmän koko jäi ainoastaan neljään rottaan. Mahdollisesti juuri pienen otoskoon vuoksi tilastollisten merkitsevyyksien määrä jäi tässä tapauksessa vähäiseksi (Heikkilä 2014). Viimeiseksi reliabiliteettia varmistettaessa tulisi Heikkilän (2014) mukaan varmistaa huolellinen ja virheetön tiedonkeruu, sekä tulosten syöttö ja käsittely. Tiedonkeruu tehtiin tässä pro gradu -tutkielmassa ilman allekirjoittaneen työpanosta, joten tiedonkeruumenetelmien arviointi on tämän pohdinnan puitteissa haastavaa. Tulosten käsittelyyn voi sen sijaan liittyä virheitä, sillä aineistoa käsiteltiin pitkälti manuaalisesti ja aineistoa oli määrällisesti paljon. Kaikki työvaiheet on pyritty raportoimaan mahdollisimman huolellisesti ja läpinäkyvästi tämän pro gradu -tutkielman menetit -osiossa.

5.6.2 Tutkimuksen eettisyys

Clarkeburnin ja Mustajoen (2007, 61 - 62) mukaan tutkimusetiikan peruskysymyksiin kuuluvat olennaisesti juurikin eläinkokeisiin liittyvät tutkimuseettiset ongelmat. Koe-eläintutkimusta voidaan karkeasti arvioida kahdesta eri näkökulmasta, joita ovat seurauseettinen ja periaatteellinen näkökulma. Seurauseettisestä näkökulmasta koe-eläinten käyttö tutkimuksessa voidaan perustella silloin, kun saavutetut hyödyt ovat haittoja suuremmat. Eläimiä tulisi käyttää ainoastaan silloin kun se on välttämätöntä ja samalla huolehtia niiden kokevan mahdollisimman vähän kipua. Välttämättömien tai mahdollisimman vähän kipua tuottavien menettelytapojen määrittely on kuitenkin sinällään haastavaa ja tapauskohtaiseen arvioon perustuvaa (Clarkeburn & Mustajoki 2007, 61 – 62). Periaatteellisesta näkökulmasta tarkasteltuna eläimillä katsotaan puolestaan olevan tietynlaisia oikeuksia, kuten oikeus vapauteen, kivuttomaan elämään ja lajityypilliseen käyttäytymiseen. Periaatteellisesta näkökulmasta kyseisiä oikeuksia ei tulisi rikkoa siinäkään tapauksessa, jossa kyseisen tutkimuksen tuottaman tiedon avulla voitaisiin saavuttaa lääketieteellisesti merkittäviä tuloksia (Clarkeburn & Mustajoki 2007, 62 – 63). Tässä pro gradu -tutkielmassa käsitelty eläinkoe toteutettiin Etelä-Suomen aluehallintoviraston hyväksynnällä (lupa ESAVI/12840/2019 ja lisälupa edelliseen ESAVI 166/2020). Koe-eläimille ennen Suomeen saapumista tehdyt testit suoritettiin Toledon yliopiston Animal Care and Use Committee luvalla. Kaikki koe-eläimille suoritettut tutkimukset toteutettiin Euroopan

Unionin neuvoston direktiivin 86/609/EEC ja European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes linjausten mukaisesti (Council of Europe No 123, Strasbourg 1985). Kaikki tutkimukseen osallistuneet, koe-eläimiin kohdistuvista tutkimuksista vastuussa olevat henkilöt olivat FELASA:n (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) ohjeistuksen mukaisesti koulutettuja.

5.7 Johtopäätökset ja ehdotus jatkotutkimuksista

Tämän pro gradu -tutkielman tulosten pohjalta voidaan todeta suolihuuhtelun ja LCR-rotilta saadun ulosteensiirteen vähentävän mahdollisesti HCR-rottien suolistomikrobiston sisältämän firmikuutti -pääjakson osuutta. Suolihuuhtelun ja ulosteensiirron avulla voidaan lisäksi mahdollisesti vähentää HCR- ja LCR -rottien seerumin LDL-kolesterolin määrää. Ulosteensiirron ei puolestaan voida tämän tutkielman tulosten perusteella katsoa vaikuttavan HCR- tai LCR -rottien maksimisuorituskykyyn tai vapaaehtoisen juoksuharjoittelun määrään.

Jatkossa suositellaan selvittämään tässä tutkielmassa tarkasteltuja kysymyksiä ja muuttujia suuremmalla otannalla, jotta mahdolliset merkitsevät ja merkitykselliset ulosteensiirron aikaansaamat muutokset saadaan paremmin esille. Kuten aiemmissa tutkimuksissa on todettu, on suolistomikrobiston koostumus yhteydessä useisiin eri sairauksiin (Valdes ym. 2018; Rinninella ym. 2019) ja ulosteensiirron terapeuttinen hyöty puolestaan tunnistettu muun muassa *Clostridium difficile* -bakteerin aiheuttamaan antibioottiripulin hoidossa (Lahtinen ym. 2019). Kaikkia ulosteensiirron vaikutusmekanismeja ei kuitenkaan vielä täysin tunneta (Xiao ym. 2020) ja vastaanottajasta riippuen vasteen on raportoitu olevan hyvinkin yksilöllinen (Aron-Wisnewsky ym. 2019). Jotta ulosteensiirtoa voidaan tulevaisuudessa hyödyntää kliinisessä työssä, täytyy vaikutusmekanismit tuntea perinpohjaisesti.

LÄHTEET

- Adak, A. & Khan, M. R. 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (3), 473-493. doi:10.1007/s00018-018-2943-4.
- Allen, J. M., Mailing, L. J., Niemi, G. M., Moore, R., Cook, M. D., White, B. A., Holscher, H. D. & Woods, J. A. 2018. Exercise alters gut microbiota composition and function in lean and obese humans. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 50 (4).
- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, Clara G. & Gueimonde, M. 2012. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology* 79 (3), 763-772. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x.
- Aron-Wisnewsky, J., Clément, K. & Nieuwdorp, M. 2019. Fecal microbiota transplantation: A future therapeutic option for obesity/diabetes? *Current Diabetes Reports* 19 (8), 51. doi:10.1007/s11892-019-1180-z.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 (7346), 174-180. doi:10.1038/nature09944.
- Bansil, R., Stanley, E. & LaMont, J. T. 1995. Mucin biophysics. *Annual Review of Physiology* 57 (1), 635-657.
- Battson, M. L., Lee, D. M., Weir, T. L. & Gentile, C. L. 2018. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 56, 1-15. doi:https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.010.
- Beaumont, M., Goodrich, J. K., Jackson, M. A., Yet, I., Davenport, E. R., Vieira-Silva, S., Debelius, J., et al. 2016. Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. *Genome Biology* 17 (1), 189. doi:10.1186/s13059-016-1052-7.
- Britton, S. L. & Koch, L. G. 2005. Animal models of complex diseases: An initial strategy. *IUBMB Life* 57 (9), 631-638. doi:https://doi.org/10.1080/15216540500251684.
- Burz, S. D., Monnoye, M., Philippe, C., Farin, W., Ratzl, V., Strozzi, F., Paillarse, J., Chêne, L., Blottière, H. M. & Gérard, P. 2021. Fecal microbiota transplant from human to mice gives insights into the role of the gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) 9. doi:10.3390/microorganisms9010199.
- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., et al. 2017. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 66 (4), 569-580. doi:10.1136/gutjnl-2016-313017 [doi].
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., et al. 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58 (8), 1091. doi:10.1136/gut.2008.165886.

- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., et al. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56 (7), 1761. doi:10.2337/db06-1491.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. & Burcelin, R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat Diet-Induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57 (6), 1470. doi:10.2337/db07-1403.
- Christiansen, C. B., Gabe, M. B. N., Svendsen, B., Dragsted, L. O., Rosenkilde, M. M. & Holst, J. J. 2018. The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 315 (1), G53-G65. doi:10.1152/ajpgi.00346.2017.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P., W. & Cotter, P. D. 2012. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. *Gut Microbes* 3 (3), 186-202. doi:10.4161/gmic.20168.
- Clarke, S. F., Murphy, E. F., O'Sullivan, O., Lucey, A. J., Humphreys, M., Hogan, A., Hayes, P., et al. 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 63 (12), 1913. doi:10.1136/gutjnl-2013-306541.
- Clarkeburn, H. & Mustajoki, A. 2007. Tutkijan arkipäivän etiikka. Tampere: Vastapaino.
- Cornejo-Pareja, I., Muñoz-Garach, A., Clemente-Postigo, M. & Tinahones, F. J. 2019. Importance of gut microbiota in obesity. *European Journal of Clinical Nutrition* 72 (1), 26-37. doi:http://dx.doi.org/10.1038/s41430-018-0306-8.
- Cronin, O., Barton, W., Skuse, P., Penney, N. C., Garcia-Perez, I., Murphy, E. F., Woods, T., et al. 2018. A prospective metagenomic and metabolomic analysis of the impact of exercise and/or whey protein supplementation on the gut microbiome of sedentary adults. *mSystems* 3 (3), 44. doi:10.1128/mSystems.00044-18.
- de Aguiar Vallim, Thomas Q., Tarling, E. J. & Edwards, P. A. 2013a. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism* 17 (5), 657-669. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013.
- de Aguiar Vallim, Thomas Q., Tarling, E. J. & Edwards, P. A. 2013b. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism* 17 (5), 657-669. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013.
- de Boer, J. F., Bloks, V. W., Verkade, E., Heiner-Fokkema, M. R. & Kuipers, F. 2018. New insights in the multiple roles of bile acids and their signaling pathways in metabolic control. *Current Opinion in Lipidology* 29 (3), 194-202.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F. & Mithieux, G. 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156 (1), 84-96. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.016.
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M. & de Vos, W. M. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal*

of *Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (Pt 5), 1469-1476.
doi:10.1099/ijs.0.02873-0 [doi].

- Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. 2016. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 14 (1), 20-32. doi:10.1038/nrmicro3552.
- Durk, R. P., Castillo, E., Márquez-Magaña, L., Grosicki, G. J., Bolter, N. D., Lee, C. M. & Bagley, J. R. 2019. Gut microbiota composition is related to cardiorespiratory fitness in healthy young adults. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 29 (3), 249-253. doi:10.1123/ijsnem.2018-0024 [doi].
- Estaki, M., Pither, J., Baumeister, P., Little, J. P., Gill, S. K., Ghosh, S., Ahmadi-Vand, Z., Marsden, K. R. & Gibson, D. L. 2016. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome* 4 (1), 42. doi:10.1186/s40168-016-0189-7.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., et al. 2013. Cross-talk between *akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (22), 9066-9071. doi:10.1073/pnas.1219451110 [doi].
- Fang, S., Suh, J. M., Reilly, S. M., Yu, E., Osborn, O., Lackey, D., Yoshihara, E., et al. 2015. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* 21 (2), 159-165. doi:10.1038/nm.3760.
- Fielding, R. A., Reeves, A. R., Jasuja, R., Liu, C., Barrett, B. B. & Lustgarten, M. S. 2019. Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults. *Experimental Gerontology* 127, 110722. doi:https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.110722.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P. & Duncan, S. H. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9 (10), 577-589. doi:10.1038/nrgastro.2012.156 [doi].
- Goloshchapov, O. V., Olekhovich, E. I., Sidorenko, S. V., Moiseev, I. S., Kucher, M. A., Fedorov, D. E., Pavlenko, A. V., et al. 2019. Long-term impact of fecal transplantation in healthy volunteers. *BMC Microbiology* 19 (1), 312. doi:10.1186/s12866-019-1689-y.
- Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Beaumont, M., Jackson, M. A., Knight, R., Ober, C., Spector, T. D., Bell, J. T., Clark, A. G. & Ley, R. E. 2016. Genetic determinants of the gut microbiome in UK twins. *Cell Host & Microbe* 19 (5), 731-743. doi:https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.017.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., et al. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159 (4), 789-799. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.053.
- Gupta, S., Mortensen, M. S., Schjørring, S., Trivedi, U., Vestergaard, G., Stokholm, J., Bisgaard, H., Krogfelt, K. A. & Sørensen, S. J. 2019. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Communications Biology* 2 (1), 291. doi:10.1038/s42003-019-0540-1.

- Hailiang, X., Ruijin, G., Zhong, H., Feng, Q., Lan, Z., Qin, B., Kelly, K., et al. 2016. Shotgun metagenomics of 250 adult twins reveals genetic and environmental impacts on the gut microbiome. *Cell Systems* 3. doi:10.1016/j.cels.2016.10.004.
- Heikkilä, T. 2014. *Tilastollinen tutkimus*. 9 edition. Helsinki: Edita Publishing Oy.
- Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U. & Gessner, A. 2015. Analyses of intestinal microbiota: Culture versus sequencing. *ILAR Journal* 56 (2), 228-240. doi:10.1093/ilar/ilv017.
- Jalanka, J., Salonen, A., Salojärvi, J., Ritari, J., Immonen, O., Marciani, L., Gowland, P., et al. 2015. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 64 (10), 1562. doi:10.1136/gutjnl-2014-307240.
- Jia, W., Xie, G. & Jia, W. 2018. Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 15 (2), 111.
- Jingyuan, F., Bonder, M. J., Cenit María Carmen, Tigchelaar Ettje, F., Astrid, M., Dekens Jackie, A. M., Eelke, B., et al. 2015. The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. *Circulation Research* 117 (9), 817-824. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306807.
- Jumpertz, R., Le, D. S., Turnbaugh, P. J., Trinidad, C., Bogardus, C., Gordon, J. I. & Krakoff, J. 2011. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 94 (1), 58-65. doi:10.3945/ajcn.110.010132.
- Kern, T., Blond, M. B. æ, Hansen, T. H., Rosenkilde, M., Quist, J. S., Gram, A. S., Ekstrøm, C. T., Hansen, T. & Stallknecht, B. 2020. Structured exercise alters the gut microbiota in humans with overweight and obesity—A randomized controlled trial. *International Journal of Obesity* 44 (1), 125-135. doi:10.1038/s41366-019-0440-y.
- Kir, S., Beddow, S., Samuel, V., Miller, P., Previs, S., Suino-Powell, K., Xu, E., Shulman, G., Kliewer, S. & Mangelsdorf, D. 2011. FGF19 as a postprandial, insulin-independent activator of hepatic protein and glycogen synthesis. *Science (New York, N.Y.)* 331, 1621-4. doi:10.1126/science.1198363.
- Koch, L. G. & Britton, S. L. 2001. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological Genomics* 5 (1), 45-52. doi:10.1152/physiolgenomics.2001.5.1.45.
- Koch, L. G., Britton, S. L. & Wisløff, U. 2012. A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. *Trends in Cardiovascular Medicine* 22 (2), 29-34. doi:https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.06.007.
- Koch, L. G., Meredith, T. A., Fraker, T. D., Metting, P. J. & Britton, S. L. 1998. Heritability of treadmill running endurance in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 275 (5), R1455-R1460. doi:10.1152/ajpregu.1998.275.5.R1455.

- Koh, A. & Bäckhed, F. 2020. From association to causality: The role of the gut microbiota and its functional products on host metabolism. *Molecular Cell* 78 (4), 584-596. doi:10.1016/j.molcel.2020.03.005.
- Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., et al. 2017. Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition. *Cell Metabolism* 26 (4), 611-619.e6. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.008.
- Kralik, P. & Ricchi, M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology* 8, 108.
- Krisko, T. I., Nicholls, H. T., Bare, C. J., Holman, C. D., Putzel, G. G., Jansen, R. S., Sun, N., Rhee, K. Y., Banks, A. S. & Cohen, D. E. 2020. Dissociation of adaptive thermogenesis from glucose homeostasis in microbiome-deficient mice. *Cell Metabolism* 31 (3), 592-604.e9. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.012.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine; Real-Time Polymerase Chain Reaction* 27 (2), 95-125. doi:https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Lahtinen, P., Satokari, R., Mattila, E., Anttila, V. & Arkkila, P. 2019. Ulosteensiirron nykysuosituksset ja uudet sovellukset. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim* 135 (2), 165-73.
- Lai, Z., Tseng, C., Ho, H. J., Cheung, C. K. Y., Lin, J., Chen, Y., Cheng, F., et al. 2018. Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Scientific Reports* 8 (1), 15625. doi:10.1038/s41598-018-33893-y.
- Le Roy, T., Llopis, M., Lepage, P., Bruneau, A., Rabot, S., Bevilacqua, C., Martin, P., et al. 2013. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut* 62 (12), 1787. doi:10.1136/gutjnl-2012-303816.
- Lee, C. J., Sears, C. L. & Maruthur, N. 2020. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1461 (1), 37-52. doi:10.1111/nyas.14107.
- Lee, M. C., Hsu, Y. J., Chuang, H. L., Hsieh, P. S., Ho, H. H., Chen, W. L., Chiu, Y. S. & Huang, C. C. 2019. In vivo ergogenic properties of the bifidobacterium longum OLP-01 isolated from a weightlifting gold medalist. *Nutrients* 11 (9), 2003. doi: 10.3390/nu11092003. doi:10.3390/nu11092003 [doi].
- Lee, M. C., Hsu, Y. J., Ho, H. H., Hsieh, S. H., Kuo, Y. W., Sung, H. C. & Huang, C. C. 2020. *Lactobacillus salivarius* subspecies *salicinii* SA-03 is a new probiotic capable of enhancing exercise performance and decreasing fatigue. *Microorganisms* 8 (4), 545. doi: 10.3390/microorganisms8040545. doi:10.3390/microorganisms8040545 [doi].
- Li, F., Jiang, C., Krausz, K. W., Li, Y., Albert, I., Hao, H., Fabre, K. M., Mitchell, J. B., Patterson, A. D. & Gonzalez, F. J. 2013. Microbiome remodelling leads to inhibition of

- intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nature Communications* 4 (1), 2384. doi:10.1038/ncomms3384.
- Li, S. S., Zhu, A., Benes, V., Costea, P. I., Hercog, R., Hildebrand, F., Huerta-Cepas, J., et al. 2016. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* 352 (6285), 586. doi:10.1126/science.aad8852.
- Lim, M. Y., You, H. J., Yoon, H. S., Kwon, B., Lee, J. Y., Lee, S., Song, Y., Lee, K., Sung, J. & Ko, G. 2017. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut* 66 (6), 1031. doi:10.1136/gutjnl-2015-311326.
- Mariño, E., Richards, J. L., McLeod, K. H., Stanley, D., Yap, Y. A., Knight, J., McKenzie, C., et al. 2017. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nature Immunology* 18 (5), 552-562. doi:10.1038/ni.3713.
- Metsämuuronen, J. 2011. Tutkimuksen tekemisen perusteet ihmistieteissä. 1 (e-kirja) edition. Helsinki, Finland: International Methelp Oy.
- Mintz, M., Khair, S., Grewal, S., LaComb, J. F., Park, J., Channer, B., Rajapakse, R., et al. 2018. Longitudinal microbiome analysis of single donor fecal microbiota transplantation in patients with recurrent *clostridium difficile* infection and/or ulcerative colitis. *Plos One* 13 (1), e0190997.
- Motiani, K. K., Collado, M. C., Eskelinen, J., Virtanen, K. A., Löyttyniemi, E., Salminen, S., Nuutila, P., Kalliokoski, K. K. & Hannukainen, J. C. 2020. Exercise training modulates gut microbiota profile and improves endotoxemia. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 52 (1), 94-104.
- Mukhopadhyaya, I., Segal, J. P., Carding, S. R., Hart, A. L. & Hold, G. L. 2019. The gut virome: The 'missing link' between gut bacteria and host immunity? *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 12, 1756284819836620. doi:10.1177/1756284819836620.
- Munukka, E., Ahtiainen, J. P., Puigbó, P., Jalkanen, S., Pahkala, K., Keskitalo, A., Kujala, U. M., et al. 2018. Six-week endurance exercise alters gut metagenome that is not reflected in systemic metabolism in over-weight women. *Frontiers in Microbiology* 9, 2323. doi:10.3389/fmicb.2018.02323.
- Munukka, E., Wiklund, P., Pekkala, S., Völgyi, E., Xu, L., Cheng, S., Lyytikäinen, A., et al. 2012. Women with and without metabolic disorder differ in their gut microbiota composition. *Obesity* 20 (5), 1082-1087. doi:10.1038/oby.2012.8.
- Myers, J., Prakash, M., Froelicher, V., Do, D., Partington, S. & Atwood, J. E. 2002. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med* 346 (11), 793-801. doi:10.1056/NEJMoa011858.
- O'Sullivan, O., Cronin, O., Clarke, S. F., Murphy, E. F., Molloy, M. G., Shanahan, F. & Cotter, P. D. 2015. Exercise and the microbiota. *Null* 6 (2), 131-136. doi:10.1080/19490976.2015.1011875.
- Park, Y., Kanaley, J. A., Padilla, J., Zidon, T., Welly, R. J., Will, M. J., Britton, S. L., et al. 2016. Effects of intrinsic aerobic capacity and ovariectomy on voluntary wheel running

- and nucleus accumbens dopamine receptor gene expression. *Physiology & Behavior* 164, 383-389. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.006>.
- Parséus, A., Sommer, N., Sommer, F., Caesar, R., Molinaro, A., Ståhlman, M., Greiner, T. U., Perkins, R. & Bäckhed, F. 2017. Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor. *Gut* 66 (3), 429. doi:[10.1136/gutjnl-2015-310283](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310283).
- Pedersen, H. K., Gudmundsdottir, V., Nielsen, H. B., Hyötyläinen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A. H., Forslund, K., et al. 2016. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 535 (7612), 376-381. doi:[10.1038/nature18646](https://doi.org/10.1038/nature18646).
- Pedersini, P., Turrone, S. & Villafañe, J. H. 2020. Gut microbiota and physical activity: Is there an evidence-based link? *Science of the Total Environment* 727, 138648. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138648>.
- Pekkala, S., Lensu, S., Nokia, M., Vanhatalo, S., Koch, L. G., Britton, S. L. & Kainulainen, H. 2017. Intrinsic aerobic capacity governs the associations between gut microbiota composition and fat metabolism age-dependently in rat siblings. *Physiological Genomics* 49 (12), 733-746. doi:[10.1152/physiolgenomics.00081.2017](https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00081.2017).
- Perry, R. J., Peng, L., Barry, N. A., Cline, G. W., Zhang, D., Cardone, R. L., Petersen, K. F., Kibbey, R. G., Goodman, A. L. & Shulman, G. I. 2016. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* 534 (7606), 213-217. doi:[10.1038/nature18309](https://doi.org/10.1038/nature18309).
- Poretzky, R., Rodriguez-R, L., Luo, C., Tsementzi, D. & Konstantinidis, K. T. 2014. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *Plos One* 9 (4), e93827.
- Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Cheng, J., Duncan, A. E., Kau, A. L., Griffin, N. W., et al. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341 (6150), 1241214. doi:[10.1126/science.1241214](https://doi.org/10.1126/science.1241214).
- Ridlon, J. M., Kang, D. J. & Hylemon, P. B. 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research* 47 (2), 241-259. doi:[R500013-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.R500013-JLR200) [pii].
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A., Gasbarrini, A. & Mele, M. C. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases 7. doi:[10.3390/microorganisms7010014](https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014).
- Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease* 26, 26050. doi:[10.3402/mehd.v26.26050](https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050).
- Ruan, W., Engevik, M. A., Spinler, J. K. & Versalovic, J. 2020. Healthy human gastrointestinal microbiome: Composition and function after a decade of exploration. *Digestive Diseases and Sciences* 65 (3), 695-705. doi:[10.1007/s10620-020-06118-4](https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4).
- Santacruz, A., Marcos, A., Wärnberg, J., Martí, A., Martín-Matillas, M., Campoy, C., Moreno, L. A., et al. 2009. Interplay between weight loss and gut microbiota composition

- in overweight adolescents. *Obesity* (Silver Spring, Md.) 17 (10), 1906-1915. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2009.112>.
- Scheiman, J., Lubber, J. M., Chavkin, T. A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L., Wibowo, M. C., et al. 2019a. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine* 25 (7), 1104-1109. doi:[10.1038/s41591-019-0485-4](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4).
- Scheiman, J., Lubber, J. M., Chavkin, T. A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L., Wibowo, M. C., et al. 2019b. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine* 25 (7), 1104-1109. doi:[10.1038/s41591-019-0485-4](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4).
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Brett Finlay, B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews* 90 (3), 859-904. doi:[10.1152/physrev.00045.2009](https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009).
- Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLOS Biology* 14 (8), e1002533.
- Shoelson, S. E., Lee, J. & Goldfine, A. B. 2006. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7), 1793-1801. doi:[10.1172/JCI29069](https://doi.org/10.1172/JCI29069).
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., et al. 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (43), 16731-16736. doi:[10.1073/pnas.0804812105](https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105) [doi].
- Staley, C., Kaiser, T., Vaughn, B. P., Graiziger, C. T., Hamilton, M. J., Rehman, T. u., Song, K., Khoruts, A. & Sadowsky, M. J. 2018. Predicting recurrence of clostridium difficile infection following encapsulated fecal microbiota transplantation. *Microbiome* 6 (1), 166. doi:[10.1186/s40168-018-0549-6](https://doi.org/10.1186/s40168-018-0549-6).
- Taniguchi, H., Tanisawa, K., Sun, X., Kubo, T., Hoshino, Y., Hosokawa, M., Takeyama, H. & Higuchi, M. 2018. Effects of short-term endurance exercise on gut microbiota in elderly men. *Physiological Reports* 6 (23), e13935. doi:[10.14814/phy2.13935](https://doi.org/10.14814/phy2.13935).
- Thursby, E. & Juge, N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* 474 (11), 1823-1836. doi:[10.1042/BCJ20160510](https://doi.org/10.1042/BCJ20160510).
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F. & Gribble, F. M. 2012. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-Protein-Coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 61 (2), 364. doi:[10.2337/db11-1019](https://doi.org/10.2337/db11-1019).
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R. & Gordon, J. I. 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine* 1 (6), 6ra14. doi:[10.1126/scitranslmed.3000322](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322) [doi].

- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., et al. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457 (7228), 480-484. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nature07540.
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E. & Spector, T. D. 2018. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *Bmj* 361, k2179. doi:10.1136/bmj.k2179.
- Vatanen, T., Franzosa, E. A., Schwager, R., Tripathi, S., Arthur, T. D., Vehik, K., Lernmark, Å, et al. 2018. The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature* 562 (7728), 589-594. doi:10.1038/s41586-018-0620-2.
- Vázquez, L., Guadamuro, L., Giganto, F., Mayo, B. & Flórez, A. B. 2017. Development and use of a real-time quantitative PCR method for detecting and quantifying equol-producing bacteria in human faecal samples and slurry cultures. *Frontiers in Microbiology* 8, 1155.
- Vily-Petit, J., Soty-Roca, M., Silva, M., Raffin, M., Gautier-Stein, A., Rajas, F. & Mithieux, G. 2020. Intestinal gluconeogenesis prevents obesity-linked liver steatosis and non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 69 (12), 2193. doi:10.1136/gutjnl-2019-319745.
- Vrieze, A., Nood, E., Holleman, F., Salojarvi, J., Kootte, R., Bartelsman, J., Dallinga-Thie, G., et al. 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 143, 913-916.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.031.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Matak, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., et al. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439 (7075), 484-489. doi:10.1038/nature04330.
- Xiao, Y., Angulo, M. T., Lao, S., Weiss, S. T. & Liu, Y. 2020. An ecological framework to understand the efficacy of fecal microbiota transplantation. *Nature Communications* 11 (1), 3329. doi:10.1038/s41467-020-17180-x.
- Yang, P., Lee, W., Tseng, P., Lee, P., Lin, M. & Yang, W. 2014. Bariatric surgery decreased the serum level of an endotoxin-associated marker: Lipopolysaccharide-binding protein. *Surgery for Obesity and Related Diseases* 10 (6), 1182-1187. doi:10.1016/j.soard.2014.02.022.
- Yu, E. W., Gao, L., Stastka, P., Cheney, M. C., Mahabamunuge, J., Torres Soto, M., Ford, C. B., Bryant, J. A., Henn, M. R. & Hohmann, E. L. 2020. Fecal microbiota transplantation for the improvement of metabolism in obesity: The FMT-TRIM double-blind placebo-controlled pilot trial. *PLOS Medicine* 17 (3), e1003051.
- Zhang, P., Li, L., Han, X., Li, Q., Zhang, X., Liu, J. J. & Wang, Y. 2020. Fecal microbiota transplantation improves metabolism and gut microbiome composition in db/db mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 41 (5), 678-685. doi:10.1038/s41401-019-0330-9.
- Zhang, Z., Mocanu, V., Cai, C., Dang, J., Slater, L., Deehan, E. C., Walter, J. & Madsen, K. L. 2019. Impact of fecal microbiota transplantation on obesity and metabolic syndrome—A systematic review. *Nutrients* 11 (10), 2291. doi:10.3390/nu11102291.

- Zhou, D., Pan, Q., Shen, F., Cao, H., Ding, W., Chen, Y. & Fan, J. 2017. Total fecal microbiota transplantation alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via beneficial regulation of gut microbiota. *Scientific Reports* 7 (1), 1529. doi:10.1038/s41598-017-01751-y.
- Zhou, J., Martin, R. J., Tulley, R. T., Raggio, A. M., McCutcheon, K. L., Shen, L., Danna, S. C., Tripathy, S., Hegsted, M. & Keenan, M. J. 2008. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (5), E1160-E1166. doi:http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.90637.2008.
- Zoll, J., Read, M. N., Heywood, S. E., Estevez, E., Marshall, J. P. S., Kammoun, H. L., Allen, T. L., Holmes, A. J., Febbraio, M. A. & Henstridge, D. C. 2020. Fecal microbiota transplantation from high caloric-fed donors alters glucose metabolism in recipient mice, independently of adiposity or exercise status. *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism* 319 (1), E203-E216. doi:10.1152/ajpendo.00037.2020.