

**YHDISTETYN HYPERTROFIA- JA ANGIOGENEESITERAPIAN VAIKUTUS
LIHASSOLUKOKOON, SOLUTYYPPIIN JA LIHASSOLUJEN TUMIEN
MÄÄRÄÄN HIIRILLÄ**

Satu Vertainen

Liikuntafysiologian pro gradu -tutkielma

Liikuntatieteellinen tiedekunta

Jyväskylän yliopisto

Kevät 2023

TIIVISTELMÄ

Vertainen, S, 2023. Yhdistetyn hypertrofia- ja angiogeneesiterapian vaikutus lihassolukokoon, solutyypin ja lihassolujen tumien määrään hiirillä. Liikuntatieteellinen tiedekunta, Jyväskylän yliopisto, liikuntafysiologian pro gradu -tutkielma, 65 s.

Tässä pro gradu -tutkielmassa tutkittiin eri geeniterapiahoitojen vaikutuksia hiirten luurankolihasrudoksen kokoon sekä kapillaarien määrään. Lisäksi haluttiin selvittää, voidaanko lihasten solukokoa ja kapillaarien määrää kasvattaa suhteessa niin, että saadaan metabolisesti terve kudus. Hiiret jaettiin neljään ryhmään ja jokaista eri hoitomuotoa saanutta ryhmää verrattiin keskenään, sekä tyyppiin IIB ja muiden lihassolutyypin osalta. Loppujen lopuksi hiirillä tutkittiin TA lihaksen lihassolujakaumaa, lihastumien määrää sekä lihassolun poikkipinta-alaa.

Hiirten lopetus ja preparaatio suoritettiin jo aiemmin ennen tätä tutkimusta. Kudosleikkeet ja muu immunohistokemiallinen protokolla suoritettiin Liikuntatieteellisen tiedekunnan laboratoriossa. Tutkimuksessa käytettiin 10 viikon ikäisiä C57BL/6J uroshiiriä, joihin injektoidiin anestesian aikana rekombinantti-adenovirusvektoreita (rAAV) lihaksensisäisesti molempien raajojen TA lihaksiin 30 µl/TA, joista vain yhtä TA lihasta käytettiin tässä tutkimuksessa. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 20 hiirtä, jotka jaettiin satunnaisesti neljään eri ryhmään: kontrolli, VEGF-B, Pro-MSTN ja yhdistelmäryhmä. Kokeen aikana yksi hiiristä kuoli, joten kaikissa muissa ryhmissä oli viisi (5) hiirtä paitsi kontrolliryhmässä neljä (4). Jäätäneet leikkeet ilmakeivattiin huoneenlämmössä 10 min, jonka jälkeen ne pestiin PBS:llä, fiksattiin -20°C asteisessa metanolissa 10 minuuttia, pestiin PBS:llä ja blokattiin NGS:llä 1 h. Leikkeille asetettiin primääri vasta-aineet ja annettiin inkuboitua 1 h tai yön yli +4 asteessa ja pestiin 3x5 min PBS:llä. Sen jälkeen laitettiin sekundaari vasta-aineet, annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 1 h ja pestiin 3x5 min PBS:llä. Viimeisenä objektitasit kuivattiin, puhdistettiin ja kiinnitettiin. Värjäyksen jälkeen näytteet kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM 700) 20 x suurennoksella. Kuva-analyysit suoritettiin ImageJ Fiji ja MyoVision ohjelmistoilla. Tilastollisina menetelminä käytettiin Microsoft Excel- ja GraphPad Prism 9 -ohjelmaa. Tulokset normalisoitiin Shapiro-Wilk-testillä ja analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (one-way ANOVA). Ei-parametriset muuttujat, kuten ryhmien väliset muuttujat analysoitiin Kruskal-Wallis-testillä. Tilastollisesti merkitseväksi arvoksi asetettiin p-arvo <0.05.

Tämän tutkimuksen perusteella hiirten TA lihasten painoa kasvatti eniten yhdistelmähoito (VEGF-B+Pro-MSTN). Yhdistelmäryhmän hiirillä TA lihakset painoivat 31,9 % enemmän kuin kontrolliryhmän hiirillä. Tutkimuksessa selvisi myös, että pelkkä VEGF-B hoito kasvatti tyyppiin IIB ja muun tyyppiin lihassolujen poikkipinta-alaa 10 %. Lihassolujen tumien määrässä tai lihassolujakaumassa ei havaittu merkitseviä muutoksia tutkimuksen aikana.

Asiasanat: luurankolihas, hypertrofia, geeniterapia, myostatiini, VEGF-B, immunohistokemia

ABSTRACT

Vertainen, S. 2023. Effects of gene delivery on hypertrophy, cell type and number of myonuclei in mice. The Faculty of Sport and Health Sciences, University of Jyväskylä, Master's thesis, 65 pp.

This master's thesis investigated the effects of different gene delivery treatments on the skeletal muscle cell size and the number of capillaries in skeletal muscle. The aim of this master's thesis was also to determine whether the ratio between muscle cell size and number of capillaries could be increased to produce metabolically healthy tissue. This study consisted of 20 mice, divided in four separate groups. Each group received different treatments, and the groups were then compared against each other, both for type IIB and other fiber type. Finally, the fiber type distribution, the number of myonuclei and the muscle cell cross-section area of tibialis anterior (TA) were examined.

The euthanasia and preparation of the laboratory rodents had already been performed prior to this study. Tissue dissections and other immunohistochemical protocols were performed at the laboratory of the Faculty of Sport and Health Sciences. C57BL/6J male mice aged 10 weeks, were used for the study. Under anesthesia, mice were injected with recombinant adeno-associated virus vectors (rAAV) intramuscularly, into both TA muscles at 30 μ l/TA, of which only one TA muscle was used in this study. The mice were randomly divided into four different groups: control, VEGF-B, Pro-MSTN and combination group. During the experiment, one mouse died, so there were five (5) mice in all groups except four (4) in the control group. Frozen coverslips were air-dried at room temperature for 10 min, washed with PBS, fixed in -20°C methanol for 10 min, washed with PBS and blocked by NGS for 1 h. Primary antibodies were loaded on the coverslips and allowed to incubate for 1 h or overnight at +4°C and washed 3x5 min with PBS. Secondary antibodies were applied, incubated at room temperature for 1 h and washed 3x5 min with PBS. Finally, the coverslips were dried, cleaned and mounted. After staining, samples were imaged with a confocal microscope (Zeiss LSM 700) at 20 x magnification. Image analysis was performed using ImageJ Fiji and MyoVision software. Microsoft Excel and GraphPad Prism 9 were used as statistical analysis. Results were normalized using the Shapiro-Wilk test and analyzed by one-way ANOVA. Non-parametric variables such as between-group variables were analysed using the Kruskal-Wallis test. Statistical significance was set at p-value <0.05.

This study found that the TA muscle weight of the mice increased 31.9 % more in the VEGF-B+Pro-MSTN group, when compared against the control. The study also showed that the VEGF-B treatment increased the cross-sectional area of type IIB and other muscle cell types by 10%. No significant changes in the number of myonuclei or fiber type changes were observed during the study.

Key words: skeletal muscle, hypertrophy, gene delivery, myostatin, VEGF-B, immunohistochemistry

TÄRKEIMMÄT KÄYTETYT LYHENTEET

| | |
|--------------|------------------------------------|
| AAV | adeno-assosioitu virus |
| PBS | fosfaattipuskuroitu suolaliuos |
| MHC | myosiinin raskasketju |
| NGS | tavallinen vuohen seerumi |
| Pro-MSTN | myostatiinipropeptidi |
| TGF- β | transformoiva kasvutekijä beeta |
| VEGF | verisuonten endoteelikasvutekijä |
| VEGF-B | verisuonten endoteelikasvutekijä B |

SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

| | |
|---|----|
| 1 JOHDANTO..... | 1 |
| 2 LIHASKUDOKSEN HYPERTROFIAN TÄRKEIMMÄT SÄÄTELYTEKIJÄT..... | 3 |
| 2.1 TGF-B perhe..... | 3 |
| 2.1.1 Aktiviinit..... | 4 |
| 2.1.2 Follistatiini..... | 5 |
| 2.2 Myostatiini..... | 6 |
| 2.2.1 Myostatiinin signalointireitti luurankoliuksessa..... | 8 |
| 2.2.2 Myostatiinin tuotto | 9 |
| 2.3 Myostatiinipropeptidi | 10 |
| 2.4 Lihaskudoksen hypertrofia | 12 |
| 3 ANGIOGENEESI LUURANKOLIHAKSESSA JA VEGF-B ANGIOGENEESIN SÄÄTELIJÄNÄ | 14 |
| 3.1 Luurankoliuksen angiogeneesi | 14 |
| 3.2 Verisuonten endoteelikasvutekijät (VEGFs)..... | 15 |
| 3.3 Verisuonikasvutekijä B (VEGF-B) | 16 |
| 4 LUURANKOLIHAKSEEN ANNETTAVA GEENITERAPIA..... | 20 |
| 3.4 Geeniterapia..... | 20 |
| 3.5 AAV vektorit | 21 |
| 4 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEEESIT | 23 |
| 5 TUTKIMUSMENETELMÄT | 24 |
| 5.1 Tutkimusasetelma ja koe-eläimet | 24 |
| 5.2 Näytteiden preparointi | 25 |
| 5.3 Immunohistokemia | 25 |
| 5.4 Kuvankäsittely | 27 |

| | |
|---|----|
| 5.5 Tilastolliset menetelmät..... | 27 |
| 6 TULOKSET | 29 |
| 6.1 Taustatulokset..... | 29 |
| 6.2 Lihaksen poikkipinta-ala | 31 |
| 6.3 Lihassolujakauma | 33 |
| 6.4 Lihastumien määrä | 36 |
| 6.5 Feret Diameter | 38 |
| 7 POHDINTA..... | 41 |
| 7.1 Keskeiset tulokset..... | 41 |
| 7.1.1 Lihassolujen poikkipinta-alat ryhmittäin ja solutyypeittäin | 42 |
| 7.1.2 Lihastumien määrä | 45 |
| 7.1.3 Lihassolujakauma | 47 |
| 7.2 Tutkimuksen vahvuudet ja heikkoudet..... | 48 |
| 7.3 Johtopäätökset | 49 |
| LÄHTEET | 51 |

1 JOHDANTO

Geeniterapiaa on tutkittu mahdollisena hoitomuotona erilaisiin sairauksiin jo 1980-luvulta alkaen (Wartiovaara 2021). Monien erityisesti perinnöllisten sairauksien tiedetään johtuvan mutaatioista geneissä ja tällaisia sairauksia on raportoitu maailmassa jo tuhansia. Geeniterapiassa viallisen geenin toiminta palautetaan ennalleen tai se voidaan korvata kokonaan uudella terveellä geenillä. Geeniterapiaa hoitomuotona on tutkittu paljon esimerkiksi eri syöpien yhtenä hoitomuotona. (Shahryari ym. 2021) Erilaisen lihassairauksien, kuten lihasdystrofian ja kakeksian yhtenä mielenkiintoisena hoitomuodon kohteena on ollut kehon kasvutekijöiden reseptorit ja niiden solunsisäiset signalointireitit (Caestecker 2004). Yksi näistä on TGF-B geeniperheeseen kuuluva myostatiini, jonka biologiset toiminnot ovat nostaneet esiin mahdollisuuden, että sen signalointireitin manipulaatio voisi olla tehokas keino lihaskudoksen ylläpitämiseksi useissa kliinisissä sovelluksissa. Luurankolihasdystrofiassa tiedetään olevan merkittävä rooli mm. asentojen säätelyssä, liikkumisessa sekä elimistön metaboliassa ja sen toimintaa säädellään tasapainoillen lihassolujen proteiinisynteesin ja proteolyysin välillä (Jorgenson ym. 2020; Verbrugge ym. 2018; Huang ym. 2011). Myostatiinin yhteyttä on tutkittu aiemmin myös muiden metabolisten sairauksien, kuten lihavuuden ja tyypin II diabeteksen yhtenä hoitomuotona (Lee 2004).

Uusien kapillaarien muodostumisen (angiogeneesi) tiedetään olevan tärkeää kaikille kudoksille läpi elämän. Kun mikroverenkierto ei riitä tyydyttämään solujen ja fyysisten voimien lihakselle asettamia metabolisia vaatimuksia, kapillaariverkosto kasvaa. Perifeerinen mikroverisuonisto vastaa lisääntyneen liikunnan määrään muuttamalla verisuoniston rakennetta ja toimintaa. Suuri kapillaaripinta-ala lisää hapen ja aineenvaihduntatuotteiden kuljetuspotentiaalia, mikä puolestaan parantaa kestävyyttä ja aerobista kapasiteettia. (Olfert ym. 2015) Uusien kapillaarien muodostumista lihaskudoksessa säätelee erilaiset verisuonikasvutekijät, joiden toiminnan tiedetään olevan välttämättömiä lihasten kapillaarien riittäväälle toiminnalle ja kehitykselle (Huey 2018). Toisaalta angiogeneesiä on havaittu myös kehon patologisissa prosesseissa kuten kasvaimissa, jonka vuoksi näiden mekanismien hallinta ja oikeanlainen sovellutus geeniterapiahoidolla on eri sairauksien hoitotutkimuksen keskiössä (Olofsson ym. 1998; Tammela ym. 2005). Tässä tutkimuksessa käytetty verisuonikasvutekijä B (VEGF-B) löydettiin 90-luvun puolivälissä ja sen tiedetään toimivan verisuonten endoteelisolujen kasvutekijänä. Sen merkitystä on tutkittu eniten sydämessä, mutta sitä ilmenetään muissakin

metabolisesti aktiivisissa kudoksissa, kuten luurankolihasissa ja aivoissa. (Olofsson ym. 1996; Bry ym. 2014) VEGF-B:n vaikutusta luurankolihaskudokseen on tutkittu vain vähän ja saadut tulokset ovat ristiriitaisia keskenään. Sen vaikutuksista on kuitenkin selkeää näyttöä sydämessä ja rasvakudoksessa, joten oletettavaa on, että sillä olisi vaikutusta myös luurankolihasissa.

Aiemmat tutkimukset osoittavat, että vähentynyt kapillaaritiheys suhteessa lihassolujen koon kasvuun saattaa aiheuttaa lihaskudokseen toiminnallisia häiriöitä puutteellisen kapillaariverkon vuoksi (Li ym. 2022). Lisäksi aiemmin hiirillä tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että lihassolujen kokoa kasvattamalla lihaskudoksen kapillaariverkon koko ei kasva (Hulmi ym. 2013). Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena on selvittää geeniterapian avulla, saadaanko luurankolihasen solukokoa sekä lihaskudoksen kapillaarien määrä kasvatettua yhdistelmähoidolla niin, että saadaan metabolisesti aktiivinen ja terve kudos. Lisäksi tarkoituksena on selvittää eri hoitomuotoja saavien ryhmien (CTRL, Pro-MSTN VEGF-B ja VEGF-B+PRO-MSTN) välisiä eroja lihassolutyypeissä, lihastumien määrässä sekä lihassolujen poikkipinta-aloissa.

2 LIHASKUDOKSEN HYPERTROFIAN TÄRKEIMMÄT SÄÄTELYTEKIJÄT

Lihaskudoksen hypertrofiaan vaikuttaa useat eri säätelytekijät kuten ympäristö, voimaharjoittelu, ruokavalio sekä geenit. Geenien ilmentymistä säädellään voimaharjoittelun seurauksena ja joitain geenejä ilmennetään pääosin ainoastaan lihaskudoksessa. (Verbrugge ym. 2018) Tässä luvussa keskitytään erityisesti tämän tutkimuksen kannalta merkittävimpään lihaskoon säätelytekijään, myostatiiniin.

2.1 TGF- β perhe

Transformoiva kasvutekijä beeta-superperheellä (TGF- β) on moninaisia vaikutuksia eri epiteeli- ja mesenkymaalisten kohdesolujen kasvuun, erilaistumiseen ja toimintaan (Roberts ym. 1990). TGF- β -geeniperhe koostuu rakenteellisesti hyvin samantyyllisistä polypeptidi kasvutekijöistä, jotka jaetaan pääsääntöisesti TGF- β /aktiviineihin ja luun morfogeneettisiin proteiineihin (BMP)/kasvu- ja erilaistumistekijöihin (GDF) haaroihin ja niiden alaryhmiin. Suurin osa TGF- β -perheen ligandeista erittyy aktiivisessa muodossa, joiden toimintaa voidaan kuitenkin inhiboida paikallisesti. (Caestecker 2004) TGF- β kasvutekijät ilmentyvät varhain embryogeneesissä ja niiden kudosspesifinen ja kehityksestä riippuvainen ilmentyminen viittaa vahvasti siihen, että niillä on keskeinen rooli erilaisissa morfogeneettisissä ja histogeneettisissä prosesseissa. TGF- β -tekijöiden tiedetään olevan 65–80-prosenttisesti homologisia keskenään ja niillä on useita eri ligandeja. (Roberts ym. 1990)

TGF- β -geeniperheen jäsenillä on keskeinen rooli kudosten homeostaasin ylläpidossa, ja ne välittävät vaikutuksensa solujen sisälle tyypin I ja tyypin II seriini-/treoniinikinaasireseptorien kautta lopulta tumaan transkriptioon (Piek ym. 1999). TGF- β -reseptorit ja niiden solunsisäiset signaalintireitit ovat olleet tutkimuksen alla erilaisten sairauksien mahdollisena hoitomuotona (Caestecker 2004). Signaalintireittien toiminnassa ilmenevät häiriöt voivat vaikuttaa mm. syöpien tai keuhkosairauksien ilmentymiseen. Lukuisten tutkimusten myötä on saatu selville, että solunsisäisen signaalintikaskadin muodostavat SMAD-proteiinit. Näiden proteiinien kautta signaalit solun ulkopuolelta kulkeutuvat solun sisälle tumaan. (Attisano & Wrana 2002)

Luurankoli hasten ylläpidon, proteiinisynteesin ja proteolyysin taustalla on useiden eri molekyyli signaalireittien vuorovaikutus. Normaaleissa fysiologisissa olosuhteissa

signalointiverkostot ohjaavat atrofisia ja hypertrofisia viestejä, joiden tarkoituksena on tasapainotilan säilyttäminen. Kuten jo aiemmin todettiin, luurankolihasmassan atrofia voi johtaa kakeksiaan ja kakeksia lisää entuudestaan riskiä kuolleisuuteen jo vakavien sairauksien lisäksi. On kuitenkin tunnistettu joitain signalointireittejä, jotka indusoivat lihasten hypertrofiaa sairastumisen jälkeen. (Caestecker 2004)

2.1.1 Aktiviinit

Aktiviinit tunnistettiin ensimmäisen kerran vuonna 1986 yhdessä follistatiinin ja inhibiinin kanssa munasarjahormoneiksi, jotka ohjaavat aivolisäkkeen etulohkon erittämää follikkelia stimuloivaa hormonia. Tämän jälkeen niiden on huomattu osallistuvan myös moniin muihin biologisiin prosesseihin ja yhdessä ne säätelevät mm. kudosten kehitystä auto- ja parakriinisesti. Aktiviini indusoi solun signaalireittien toimintaa inhibiinin ja follistatiinin toimiessa aktiviinin luonnollisina inhibiittoreina. (Searchlist & Keri 2019). Erityisesti aktiviini A:n huomattiin olevan ihmisillä fysiologisesti tärkein isoformi ja nykyään se luokitellaan hormoniksi, kasvutekijäksi ja sytokiiniksi. Aktiviini A:ta esiintyy lisääntymiselinten lisäksi maksassa, aivoissa, luissa, keuhkoissa ja suolistossa sekä sillä tiedetään olevan merkittävä vaikutus kasvainten biologiassa. Aktiviini A:n vaikutukset ovat fysiologisesti paljon monimutkaisempia ja laajempia, kuin inhibiinin vaikutukset. (Bloise ym. 2018)

Aktiviinit ovat yksi TGF- β -superperheen ligandien jäsenistä, ne ovat dimeerisiä polypeptidejä ja ne koostuvat kahdesta inhibiinin β -alayksiköstä. Aktiviineista on löydetty viisi erilaista β -alayksikköä (aktiviini A (β A/ β A), aktiviini B (β B/ β B), aktiviini AB (β A/ β B), aktiviini C (β C/ β C) ja aktiviini E (β E/ β E)). Näistä kuitenkin vain aktiviini A:lla, aktiviini B:llä ja aktiviini AB:llä on pystytty määrittelemään niiden biologinen vaikutus. (Bloise 2018) Aktiviinin signalointi alkaa, kun se sitoutuu jompaankumpaan sen kahdesta seriini-/treoniinikinaasikompleksista (ACTR-I tai ACTR-II). Tyypin II reseptoreista on tunnistettu kaksi samanlaista muotoa ja ne on nimetty ActRIIA:ksi ja ActRIIB:ksi. Tyypin I reseptoria kutsutaan myös aktiviinireseptorin kaltaiseksi kinaasiksi (ALK), jolla ilmenee seitsemää eri varianttia. Tämä aktivoi SMAD2/3-signalointiproteiineja, jotka muodostavat kompleksin SMAD4 kanssa siirtyen joko stimuloimaan tai tukahduttamaan kohdegeenin transkription. (Searchlist & Keri 2019) Aktiviini toimii myostatiinin tavoin luurakolihasmassan kasvun negatiivisena säätelijänä (Egerman & Glass 2013).

Aktiviinin alayksikkö β A ilmentyy INHBA geenistä ja β B INHBB geenistä (Searchlist & Keri 2019). Ihmisen ja hiiren aktiviinireseptoreiden tiedetään olevan aminohapposekvenssiltään 99 % samankaltaisia keskenään (Bloise 2018).

2.1.2 Follistatiini

Follistatiini (FST) löydettiin alun perin sian munasarjojen follikkelinesteestä, jossa sen rooli tunnistettiin follikkeliä stimuloivan hormonin (FSH) vapautumisen estäjänä. Myöhemmin osoitettiin, että mekanismi, jolla follistatiini estää FSH:n eritystä perustuu aktiviinin inhibointiin. Follistatiini on FST-geenin koodaama glykoproteiini, jota esiintyy vaihtelevia määriä lähes kaikissa kudoksissa. (Alzaidy ym. 2015)

Follistatiinin tiedetään olevan yksi myostatiinin ja aktiviinien signaalireitin estäjistä mutta tapa, jolla follistatiini edistää lihasten hypertrofiaa tapahtuu usean eri TGF-perheen jäsenen säätelyn kautta. (Alzaidy ym. 2015; Gilson ym. 2009). Follistatiinipuutteisilla hiirillä on todistettavasti vähentynyt lihasmassa, luuvikoja, kitukasvuisuutta ja ne kuolevat muutamassa tunnissa syntymästä, kun taas siirtogeenisillä hiirillä, jotka tuottavat suuria määriä follistatiinia lihasmassa lisääntyy 194–327 %, mikä puolestaan johtunee lisääntyneen lihassolujen määrän (hyperplasia) ja koon (hypertrofia) vaikutuksesta. Follistatiinilla on tästä syystä havaittu olevan hyvät mahdollisuudet laajaan soveltuvuuteen kliinisissä tutkimuksissa ja sitä voitaisiin käyttää mahdollisesti lihassairauksien, kuten Beckerin lihasdystrofiaan hoidossa. (Alzaidy ym. 2015)

Follistatiinin kaltaisia proteiineja on viittä eri tyyppiä, joiden luokittelussa on määritelty niiden spesifisyyttä edustavat samankaltaisuudet ja erot. Follistatiinin homologit ilmentyvät lähes kaikissa elinjärjestelmissä ja kudoksissa niillä ollen parakriininen ja autokriininen aktiivisuus. (Parfenova ym. 2021) FST:tä ilmentyy kahtena suurena isoformina: kiertävä FST 315 ja pienempi solukalvoon sitoutuva FST 288. Isoformit sitoutuvat aktiviiniin inhiboiden aktiviinin toimintaa. Kaksi FST-molekyyliä sitoo irreversiibelisti aktiviini dimeerin, mikä estää aktiviinia sitoutumasta myös sen sukulaisreseptoreihin ja käyttämästä solun sisäisiä myöhempiä signaalireittejä. FST:lle on olemassa rakenteellisia homologeja, kuten FSTL3, jotka myös sitovat aktiviinia ja estävät sen vuorovaikutukset aktiviinireseptorin kanssa. (Searchlist & Keri 2019) Myostatiinin blokkaminen follistatiinin avulla voisi olla mahdollinen lihasten

surkastumisen terapeuttinen lähestymistapa yhdessä muiden tautikohtaisten geenikorvaushoitojen kanssa (Alzaidy ym. 2015; Gilson ym. 2009).

2.2 Myostatiini

McPherron, Lawler & Lee (1997) löysivät kasvun erilaistumistekijä-8:n (GDF-8), joka tunnetaan paremmin nimellä myostatiini vuonna 1997 hiiren luurankoliihaksesta. Nisäkkäiden myostatiinigeenin rakenne koostuu kahdesta intronista ja kolmesta eksonista ja se koodaa 375 proteiinia (McPherron & Lee 1997). Myostatiini on TGF- β -superperheeseen kuuluva proteiini, jonka tiedetään säätelevän negatiivisesti luurankolihaksen kasvua ja kehitystä parakriinisten ja autokriinisten signalointireittien avulla (Gao ym. 2013). Myostatiinin eston tiedetään johtavan luurankolihaksen painon kasvuun kasvattamalla lihassolujen kokoa sekä määrää eri lajeilla kuten ihmisillä, hiirillä, naudoilla ja sioilla (McPherron & Lee 1997). Kuten muutkin TGF-B perheen jäsenet, myös myostatiini syntetisoituu esiasteisena proteiinina, joka käy myöhemmin läpi kaksi proteolyyttistä prosessia biologisesti aktiivisen myostatiinin tuottamiseksi (McPherron ym. 1997). Myostatiinia tuotetaan pääosin lihaskudoksessa, josta se vapautuu verenkiertoon ja kiertää seerumin proteiinina, mutta myös sydämessä ja rasvakudoksessa. (Sharma ym. 1999; Foster ym. 2009) Myostatiinin säätelyä ja toimintaa lihasmassan hallinnassa on tutkittu intensiivisesti, koska se on mahdollinen kohde lihasten kasvun lisäämiseksi ja/tai lihasten surkastumisen välttämiseksi kliinisessä hoidossa. (Al-Zaidy ym. 2015).

Luurankolihaskudoksella on merkittävä rooli asentojen säätelyssä ja ylläpidossa, hengityksessä, liikkumisessa sekä elimistön metaboliassa (Jorgenson ym. 2020). Lihasmassaa säädellään tasapainoillen lihasten solujen replikaation ja proteiinisynteesin sekä lihaksen proteolyysin ja solujen apoptoosin välillä (Huang ym. 2011). Luurankolihas on heterogeeninen kudos, joka koostuu hitaasti ja nopeasti supistuvista lihassoluista (Verbrugge ym. 2018). Lihassolut voidaan luokitella neljään eri ryhmään: hitaasti supistuva tyyppin I ja nopeasti supistuvat tyyppin IIA, IIX/D ja IIB. Lihassolutyypitys pohjautuu eri myosiinin raskasketjun (MHC) isoformien ilmentymismallien perusteella, jotka ovat yhteneväisiä eri biokemiallisten ominaisuuksien kanssa. Tyyppin I ja IIA solut ovat ulkonäöltään punaisia, mikä johtuu niiden korkeasta myoglobiinipitoisuudesta. Niissä on runsaasti mitokondrioita ja ne käyttävät ATP:n tuottoon pääasiassa glukoosia ja rasvahappoja. Lisäksi tyyppin I ja IIA lihassoluissa on usein

enemmän kapillaareja ja ne kestävät paremmin väsymistä. Vastaavasti glykolyttiset tyypin IIX/d ja IIB lihassolut ovat yleensä väriltään vaaleita, niissä on vähemmän myoglobiinia ja mitokondrioita, niiden ATP:n tuotto perustuu pääasiassa glykolyysiin, niissä on vähemmän kapillaareja ja ne väsyvät nopeammin. Lihassolutyypin muutokset ovat kuitenkin mahdollisia etenkin voimaharjoittelun seurauksena. (Fan ym. 2013)

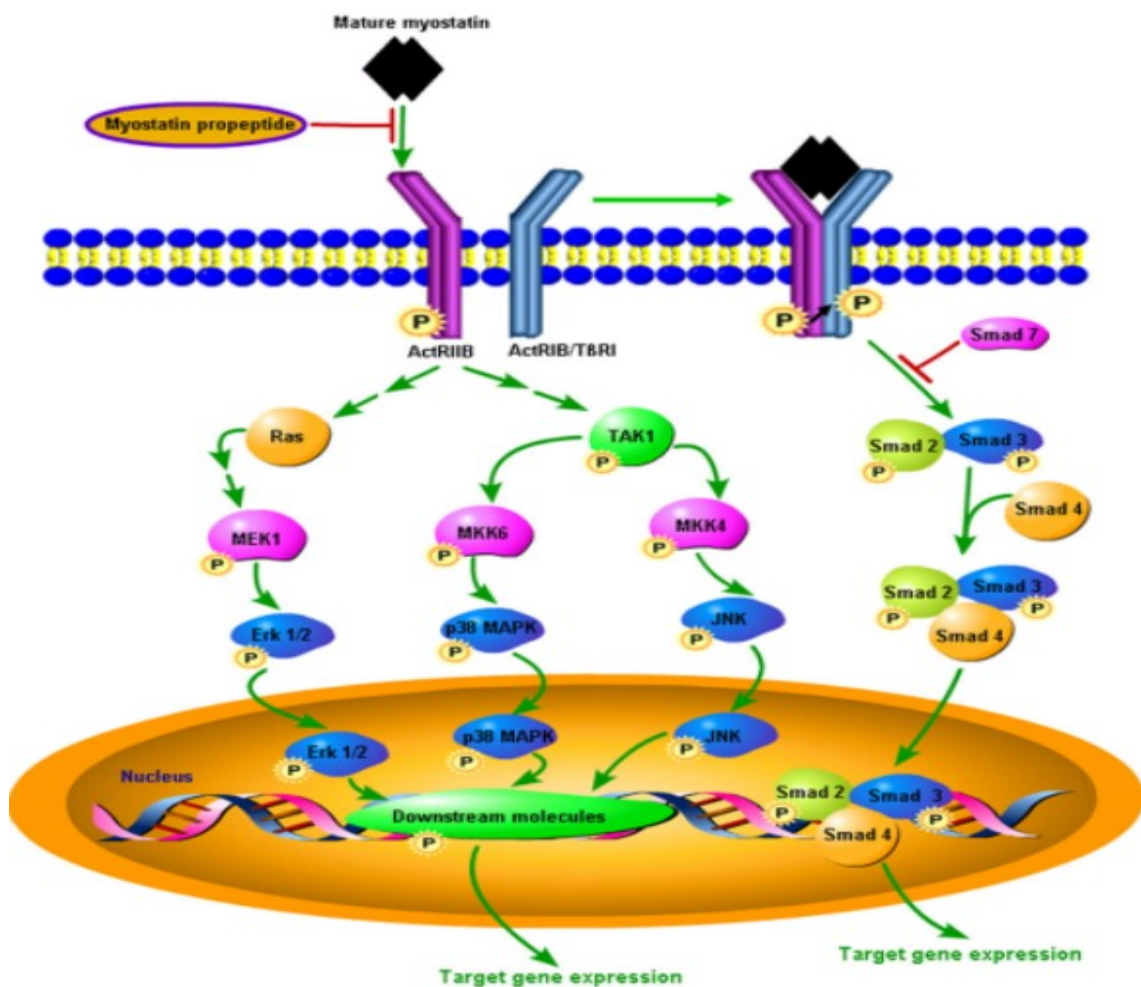
Luonnossa esiintyy myös joitain myostatiinin mutaatioita, jotka ovat yhdistetty suuriin lihaksiin tietyillä karjaroduilla (Belgian Blue, Piedmontese ja Marchigiana) ja joillakin ihmisillä (Kollias & McDermott 2008). On myös hyvä muistaa, että verrattaessa hiirten ja ihmisten välisiä myostatiinitutkimuksia ihmisillä seerumin myostatiinipitoisuudet ovat huomattavasti alhaisempia (Hill ym. 2002). Lihavilla ja insuliiniresistenteillä henkilöillä on puolestaan havaittu lisääntynyttä myostatiinin mRNA:ta ja proteiiniekspressiota (Huang ym. 2011).

Myostatiinin tiedetään estävän joidenkin myoblastien profileraatiota ja toimintaa pysäyttämällä solusyklin sekä estämällä erilaistumista edistävien geenien ilmenemistä (Huey 2018; McFarlane ym. 2011). Myostatiinin kyky säädellä lihassyiden kokoa voi viitata siihen, että sillä on vaikutus myös satelliittisoluihin. Satelliittisolut ovat yksittäisten lihassyiden sarkolemman ja tyvikalvon välissä sijaitsevia soluja, jotka toimivat lihaskudoksen kantasoluina. (Chen ym. 2021) Myostatiinin on osoitettu ylläpitävän satelliittisoluja lepotilassa (McFarlane ym. 2011). Satelliittisolut ovat sijaintinsa vuoksi läheisessä yhteydessä lihaksen kapillaarien endoteelisolujen kanssa. Satelliittisolujen ja kapillaarien välinen läheinen yhteys näyttäisi olevan tärkeää myös lihaksen hypertrofian kannalta. (Huey 2018)

Lihassyiden kasvaessa satelliittisolut lisääntyvät ja fuusioituvat lihassoluihin muuttuen lihassolun tumiksi. Kuten tiedetään, myostatiinin blokkaukset aiheuttavat lihassolun kasvua, on myös arveltu, että se saattaisi estää satelliittisolujen proliferaatiota tai erilaistumista. Vaikka myoblastien ja satelliittisolujen tiedetään olevan yksi tärkeä kohde myostatiinin signaloinnissa on myös näyttöä siitä, että muutkin solut kuin lihassolut reagoivat siihen. Myostatiinin yliekspression on osoitettu aiheuttavan hiirillä huomattavaa lihas- ja rasvamassan menetystä. (Lee 2004) Sen lisäksi, että myostatiini on myogeeninen säätelytekijä, se osallistuu myös myogeeniseen erilaistumiseen. Tutkimuksista on käynyt ilmi, että myostatiini säätelee negatiivisesti luurankolihasen satelliittisolujen proliferaatiota ja erilaistumista. (Chen ym. 2021)

2.2.1 Myostatiinin signalointireitti luurankolihasessa

Myostatiini on erittyvä proteiini, joka välittää signaalin kohdesolun tumaan useiden eri reaktioiden kautta (Chen ym. 2021). Myostatiini signaloi solukalvolla aktiviinireseptori IIB:n (ActRIIB) kautta (Lee 2001). Myostatiinin sitouduttua ActRIIB:n ligandi ja tyypin II reseptori muodostavat kompleksin tyypin I reseptorin kanssa. Tyypin I reseptori on ALK4 tai ALK5 (aktiviinireseptorin kaltainen kinaasi), joka stimuloi solun sisällä Smad2/3-transkriptiotekijöiden fosforylaatiota. Fosforyloituneet Smad2/3 siirtyvät tumaan ja muokkaavat kohdegeenien, kuten MyoD:n, transkriptiota. (Han ym. 2013) Tarkempi kuva myostatiinin signalointireitistä löytyy kuvasta 1. Tämä reitti säätelee negatiivisesti luurankolihasen kasvua ensisijaisesti estämällä Akt-signalointireittiä, jonka tiedetään edistävän proteiinisynteesiä (Egermann & Glass 2013; Huang ym. 2011).

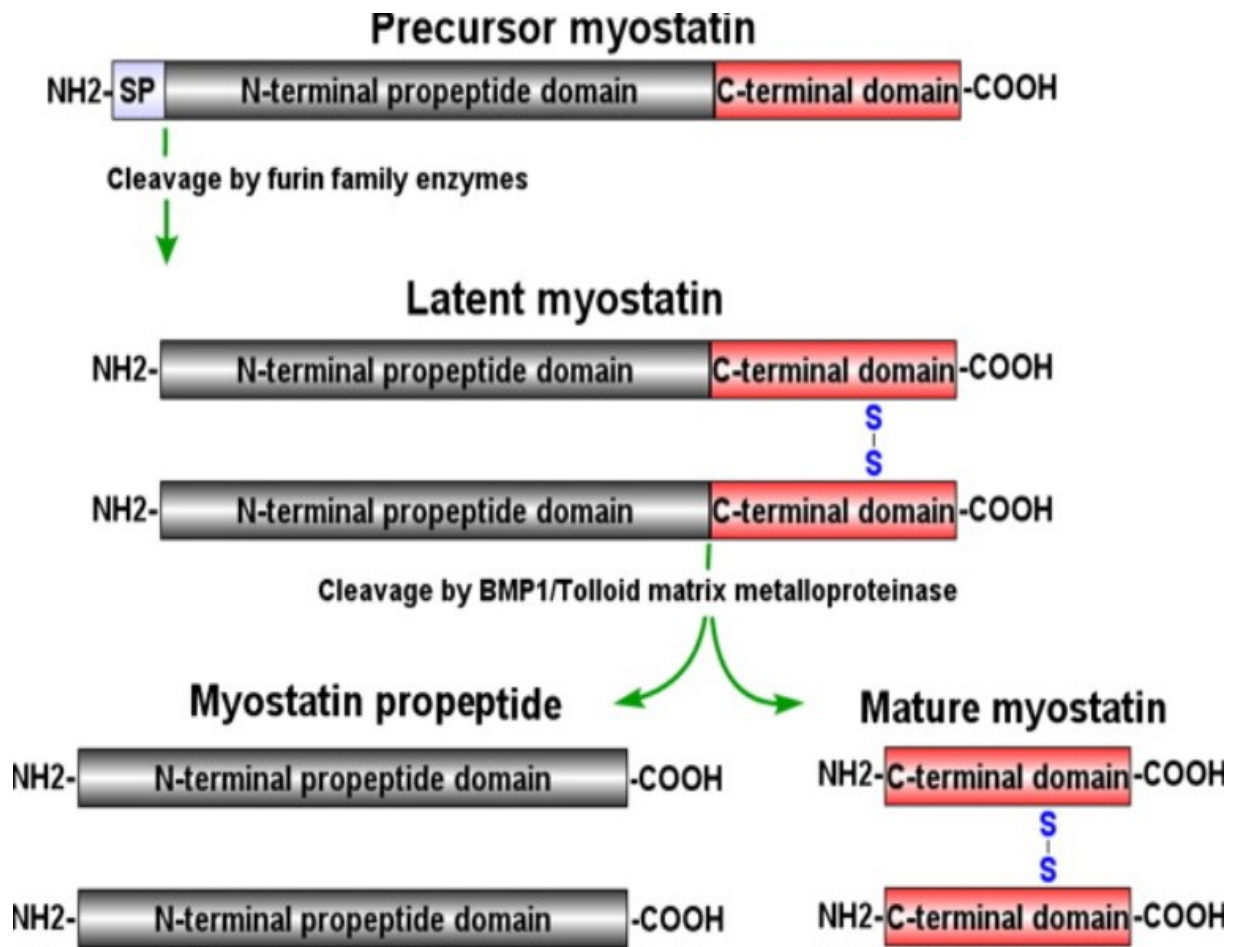


KUVA 1. Myostatiinin signalointireitti. (Huang ym. 2011)

Myostatiini on yksi tärkeimmistä luurankolihasen massan negatiivisista säätelytekijöistä. Myostatiinin ja aktiviinin signaloinnin estäminen hiirten sääriluun etuosan (TA) lihaksissa vaikutti lihasten hypertrofiaan > 150 %, joka oli riippuvainen Smad2/3-reitin estämisestä. (Chen et al. 2017.) Myostatiinin signalointireitin estäminen on lupaava geeniterapiavaihtoehto eri sairauksista kärsiville, kuten lihasdystrofiapotilaille (Al-Zaidy ym. 2015).

2.2.2 Myostatiinin tuotto

Myostatiini syntetisoidaan 376 aminohappoisena esiasteena, joka koostuu signaalisekvenssistä, N-terminaalista propeptidialueesta ja C-terminaalista alueesta, josta syntyy aktiivinen myostatiini (Kuva 2). Myostatiinin aktivoituminen edellyttää kahta proteolyyttistä pilkkoutumista esiaste-proteiinista. Ensimmäiseksi sekvenssistä poistetaan 24:n aminohapon signaalipeptidi (SP) furiini-perheen entsyymien toimesta. Toinen pilkkominen tapahtuu BMP1/tolloidimatriksin metalloproteiinaasin suorittamana RSRR- kohdasta (Arg-Ser-Arg-Arg) aminohappojen 240–243 kohdalla jättäen N-terminaalisen ja C-terminaalisen domeenin. (aminohapot on numeroitu ensimmäisen signaalisekvenssin poiston jälkeen ensimmäisestä aminohaposta alkaen.) (Huang ym. 2011) N-terminaalia kutsutaan proteolyyttisen pilkkomisen jälkeen propeptidiksi (Lee 2004). Biologisesti aktiivinen myostatiini on C-terminaalisen domeenin disulfididisidoksinen dimeeri ja se on 100 % identtinen esim. ihmisen, hiiren ja koiran välillä (Huang ym. 2011). Myostatiinia tuotetaan varhain alkion myoblasteissa ja sen jälkeen kehittyvissä ja aikuisten luurankolihaksissa tietyissä olosuhteissa (Al-Zaidy ym. 2015).



KUVA 2. Myostatiinin rakenne ja proteolyttinen prosessointi. (Huang ym. 2011)

Myostatiinin vapautumista solusta voidaan indusoida tai inhiboida useilla eri tavoilla. Seuraavaksi tarkastellaan, miten myostatiinia voidaan estää erityisesti sen propeptidin avulla.

2.3 Myostatiinipropeptidi

Myostatiinipropeptidi on endogeeninen myostatiinille spesifinen inhibiittori, joka tukahduttaa myostatiinin aktiivisuuden. Myostatiini kiertää elimistössä systeemisen verenkierron mukana ja suurin osa (> 70 %) seerumin myostatiinista on sitoutuneena sen propeptidiin (kuva 2). (Huang ym. 2011; Lee & McPherron 2001) Myostatiinipropeptidin on osoitettu estävän myostatiinin biologista aktiivisuutta ja spesifistä sitoutumista myoblastisolujen reseptoreihin (Thies ym. 2001). Propeptidi sitoutuu myostatiiniin sen biosynteesin aikana ja irtaantuu kun myostatiini aktivoidaan (Lee 2004).

Myostatiinin proteolyyttisen pilkkoutumisen jälkeen sen propeptidillä tiedetään olevan tärkeä rooli C-terminaalisen domeenin oikeanlaisessa kystiinisolmurakenteen laskostumisessa sekä C-terminaalisen (aktiivinen myostatiini) dimeerin aktiivisuuden säätelyssä. Propeptidin kyky inhiboida C-terminaalisen dimeerin aktiivisuutta on osoitettu in vivo ja in vitro tutkimuksissa. Erityisesti puhdas propeptidi voi inhiboida myostatiinin aktiivisuutta sekä sen reseptoreita. Jo aktiivinen myostatiini voidaan uudelleen inaktivoida myostatiinipropeptidin avulla. (Lee 2004)

Myostatiinipropeptidiä voidaan myös siirtää luurankolihakseen eliön ulkopuolelta erilaisten virusvektoreiden ja geenien avulla. DNA-virukset sisältävät viruksen genomina yksi- tai kaksijuosteista DNA:ta ja merkittävimmät geeninsiirtovälineinä käytetyt DNA-virukset ovat adenovirus, adeno-assosioitu virus (AAV) ja Herpes Simplex Virus (HSV). Näitä viruksia käytetään laajalti vektorijärjestelmien rakentamiseen, koska niillä on suuret pakkauskapasiteetit, laaja kohdesolujen infektiöväli sekä tehokas virusinfektio ja geeninsiirto. (Walther & Stein 2000)

Myostatiinin estäjien lisäksi on kehitetty neutraloiva vasta-aine estämään myostatiinin toimintaa (Huang ym. 2011). Myostatiini voidaan blokata sitä neutraloivalla vasta-aineella mRK35:lla. mRK35 on osoittanut myostatiinisignaalin voimakasta estoa villityypin ja mdx-hiirillä, mikä näkyy lisääntyneenä rasvattomana ruumiinpainona sekä lihaskudoksen painon kasvuna, joka johtui lihassolujen poikkipinta-alan kasvusta. Lihassolujen lukumäärässä tai uudismuodostuksessa ei kuitenkaan havaittu muutoksia. (St Andre ym. 2017) Myös Huang ym. (2011) ja Lee (2004) ovat raportoineet, että myostatiinin blokkaminen neutraloivalla vasta-aineella aiheuttaa lihasten poikkipinta-alan kasvua hiirillä. Myostatiinin blokkauksen eri muodoista voisi näin ollen olla hyötyä lihasdystrofiaa sairastavien lisäksi myös metabolisten sairauksien, kuten lihavuuden ja tyypin II diabeteksen hoidossa (Huang ym. 2011).

Propeptidin lisäksi myös useiden muiden proteiinien on osoitettu olevan kykeneväisiä sitoutumaan ja estämään aktiivisen myostatiinin toimintaa kuten follistatiini, FLRG ja GASP-1. (Lee 2004: Huang ym. 2011) sekä neutraloivat vasta-aineet. Lee & McPherronin (2001) mukaan myostatiiniantagonistit, kuten follistatiini, myostatiinipropeptidi tai aktiviini tyypin II reseptorin (ACTRII) antagonistit, voivat olla tehokkaita lihassolujen hypertrofian tai hyperplasian aiheuttajia.

hypertrofia vasteen. Lihasproteiinisynteesi on kuitenkin todennäköisempää suuremmilla kuormilla, jotka tehdään 60 %-90 % 1 RM toistosta. (Wackerhage ym. 2019)

Verbrugge ym. (2018) tutkimuksessa havaittiin 47 geeniä, joiden geneettinen manipulointi johti merkittävään luurankolihasen hypertrofiaan hiirillä. Tämä vahvistaa aikaisempia tuloksia siitä, että lihasmassalla ja lihasten hypertrofiolla on polygeeninen ominaisuus. Tutkimuksessa 47 geenistä 18 menetti toimintakykynsä ja lopputuloksena yliekspressoitiin hypertrofian saavuttamiseksi. Tämä osoittaa, että lihasmassaa säätelevät sekä lihaskasvutekijät että lihasmassan estäjät. Nämä 47 hypertrofiaa indusoivaa geeniä ovat kandidaattigeenejä, jotka mahdollisesti osallistuvat aikuisen lihasmassaan kasvuun vasteena voimaharjoittelulle. Säätelöhäiriöt näissä geneissä saattavat vaikuttaa lihaskudoksen rappeuman eli sarkopenian syntyyn sekä useisiin muihin atrofian muotoihin.

Lihassolutyypin vaikutus myös geenien ilmenemiseen. Myostatiini ilmenee 20-kertaisesti tyypin IIB lihassoluissa verrattuna tyypin I lihassoluihin. Lihaksen hypertrofiaan vaikuttavien geenien ilmeneminen ei rajoitu lihaskudokseen, vaan myös muissa kudoksissa ilmennetään hypertrofiolle olennaisia proteiineja. (Verbrugge ym. 2018)

3 ANGIOGENEESI LUURANKOLIHAKSESSA JA VEGF-B ANGIOGENEESIN SÄÄTELIJÄNÄ

Seuraavaksi käsitellään luurankoliuksen angiogeneesiä ja siihen vaikuttavia tekijöitä.

3.1 Luurankoliuksen angiogeneesi

Uusien kapillaarien muodostuminen (angiogeneesi) on tärkeää kaikille kudoksille koko elämän ajan. Kestävyyssuunnalla on osoitettu olevan myönteisiä vaikutuksia eri sydän- ja verisuonitautien ehkäisyssä ja hoidossa. Perifeerinen mikroverisuonisto vastaa lisääntyneeseen kestävyysliikuntaan muuttamalla sen rakennetta ja toimintaa, kuten lisäämällä kapillaarien määrää. Suuri kapillaaripinta-ala lisää hapen ja aineenvaihduntatuotteiden kuljetuspotentiaalia, mikä puolestaan parantaa kestävyyttä ja aerobista kapasiteettia. (Olfert ym. 2015)

Tiedetään hyvin, että luurankoliuksen kapillaarisoitumisen päätehtävä on toimittaa happea ja ravinteita kudoksiin sekä vastaavasti poistaa aineenvaihduntatuotteita kudoksista. Luurankoliuksen kapillaarien kasvua säädellään tiukasti monella eri tasolla. Kun mikroverenkierto ei riitä tyydyttämään solujen ja fyysisten voimien lihakselle asettamia metabolisia vaatimuksia, kapillaariverkosto kasvaa. Lihas- ja endoteelisolut havaitsevat ulkoisen fyysisen ärsyksen ja vastaavat lisäämällä verisuonten endoteelikasvutekijöiden (VEGFs) geeniekspressiota, joka johtaa uusien verisuonten endoteelisolujen muodostumiseen. Verisuonten endoteelikasvutekijät on yhdistetty uusien verisuonten muodostumisen keskeiseksi säätelijäksi. Angiogeneesin ajatellaan päättyvän, kun metabolinen homeostaasi palautuu ennalleen. (Olfert ym. 2015) Angiogeneesiä esiintyy lisäksi monissa muissa fysiologisissa sekä patologisissa prosesseissa, kuten kasvainten kehittämisessä, naisen kuukautiskierron aikana, haavojen paranemisprosessissa sekä alkion kehitysprosessissa (Olofsson ym. 1998).

Ihmisillä ja jyrsijöillä on löydetty kaksi tärkeää tapaa lisätä luurankoliuksen angiogeneesiä. Angiogeneesi voidaan jakaa kahteen tyyppiin: 1) pituussuuntainen halkaisu (splitting), johon liittyy sytoplasminen invaginaatio ja silta verisuonen lumenin yli, ja 2) itäminen (sprouting), johon liittyy stroomasolujen infiltraatio. Endoteelisolujen proliferaatio ja migraatio ovat angiogeneesin itämismuodon tunnusmerkkejä. Angiogeneesin pilkkomisen ajatellaan olevan

energiatehokkaampi ja mahdollisesti nopeampi tapa laajentaa mikroverenkiertoa, koska siihen liittyy huomattavasti vähemmän endoteelisolujen kasvua. Matalan intensiteetin ja suuren volyymin harjoitusohjelmat voivat tuottaa voimakkaamman angiogeneettisen ärsyksen ja mahdollisesti käyttää pitkittäistä pilkkomista ja siten johtaa nopeampaan kapillaariseen sopeutumiseen. Itämisen katsotaan puolestaan aiheutuvan korkean intensiteetin ja pienen volyymin harjoituksesta, jota käytetään yleisesti jyräjien juoksumattotutkimuksissa. Havainnot viittaavat siihen, että suuren volyymin ja matalan intensiteetin harjoituksen (eli hiirillä vapaaehtoisen juoksun) yhdistäminen johtaa suurempaan angioadaptiiviseen vasteeseen kuin matalan volyymin ja korkean intensiteetin harjoitus. (Olfert ym. 2015)

Lihaksissa on alueellista vaihtelua lihassolutyypissä ja siten lihaskapillaarisuudessa, mikä saattaa johtaa tahattomaan harhaan kapillaaritiedoissa. Gastrocnemius- ja tibialis anterior -lihakset ovat tunnetuimpia lihaksia, jotka ilmentävät useita lihassolutyyppejä. Lihassyiden solutyypin- ja kapillaariheterogeenisuutta voidaan kuitenkin havaita missä tahansa luurankolihasessa. Lihaksen mikroverisuonisto on enimmäkseen yhdensuuntainen lihassyiden pituusakselin kanssa. (Olfert ym. 2015)

3.2 Verisuonten endoteelikasvutekijät (VEGFs)

Verisuonten endoteelikasvutekijäperheeseen (VEGF) kuuluu viisi jäsentä: VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C ja VEGF-D. VEGF-C ja VEGF-D ovat tunnettuja lymfa angiogeneesiä tekijöitä, jotka edistävät imusuonten kasvua (Tammela ym. 2005). VEGF:ien tiedetään säätelevän useita angiogeneettisten prosessien vaiheita, kuten endoteelisolujen apoptoosia, proliferaatiota, migraatiota sekä uusien verisuonten muodostumista. Ensisijainen hypoksian vaikutuksesta indusoituva angiogeneettinen tekijä on VEGF (Olofsson ym. 1998; Tammela ym. 2005). VEGF sitoutuu kahteen tyrosiinikinaasireseptoriin; VEGFR-1:een ja VEGFR-2:een, jotka ilmentyvät pääasiassa endoteelisoluissa (Olofsson ym. 1998). VEGF:n aiheuttama endoteelin typpioksidisyntaasin (eNOS) stimulaatio ja sitä seuraava typpioksidin tuotannon lisääntyminen edistää vasodilataatiota (Tammela ym. 2005).

VEGF:stä on useita homodimeerisiä isoformeja: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ja VEGF206. Luurankolihasessa VEGF165 ja sen useat isoformit on havaittu keskeisimmiksi proangiogeneettisiksi tekijöiksi. (Olfert ym. 2015) VEGF toimii ilmeisesti myös endoteeli- ja

satelliittisolujen välisenä signaalimolekyylinä, joka lisää angiogeneesiä ja satelliittisolujen aktivaatiota. Tämän lisäksi VEGF:n ilmentymisestä luurankolihasessa lisää akuutti ja krooninen voimaharjoittelu ja sen tiedetään olevan välttämätön tekijä hypertrofisen lihaksen kapillaarien ylläpidolle. (Huey 2018) On havaittu, että akuutti kuormitus lisää VEGF:ien mRNA-ekspressiota ja VEGF-proteiinien tasoja moninkertaisiksi. Aerobisen liikunnan jälkeen mRNA-tasot palaavat lähtötasolle 4–6 tunnin jälkeen mutta VEGF-proteiinien tasot voivat jäädä koholle harjoittelemattomilla jopa muutamaksi viikoksi. VEGF-proteiinitasojen muutokset ovat riippuvaisia yksilön iästä ja terveydentilasta, sekä proteiinien varastoitumisesta lihassyiden vesikkeleihin. (Olfert ym. 2015)

VEGF:llä ja niiden reseptoreilla tiedetään olevan kriittinen rooli verisuonijärjestelmän kehityksessä ja imusuoniston muodostumisessa. Nämä molekyylit ovat myöhemmin elämässä välttämättömiä kudosten korjaamisessa ja naisen kohdun limakalvon syklisessä uudelleenrakentamisessa. Veri- ja imusuonten angiogeneesillä voi olla merkitystä lisäksi kasvainten etäpesäkkeissä. Näiden mekanismien hallinta kohdennetuilla molekyylihoitoilla on tästä syystä eri sairauksien hoitotutkimuksen keskiössä. (Tammela ym. 2005).

VEGF-proteiinien tuoton lisääminen ei näyttäisi olevan riippuvainen niiden erittymisestä. Erittyminen solun ulkoiseen tilaan on välttämätöntä, jotta lihassyistä peräisin oleva VEGF voi indusoida angiogeneesiä. Mekaaninen stressi tai aktiivinen lihassupistus johtaa lihasten interstitiaalisten VEGF-tasojen nousuun. Luurankolihasesta tapahtuvan VEGF:n erityksen mekanismeja ja sitä, miten sairaudet ja liikunta vaikuttavat siihen, ei vielä tunneta. Vaikka on vahvaa näyttöä siitä, että VEGF:ää tarvitaan angiogeneesiin, on huomattava, että VEGF ei toimi yksinään, vaan angiogeneesiin tarvitaan myös muita tekijöitä. (Olfert ym. 2015)

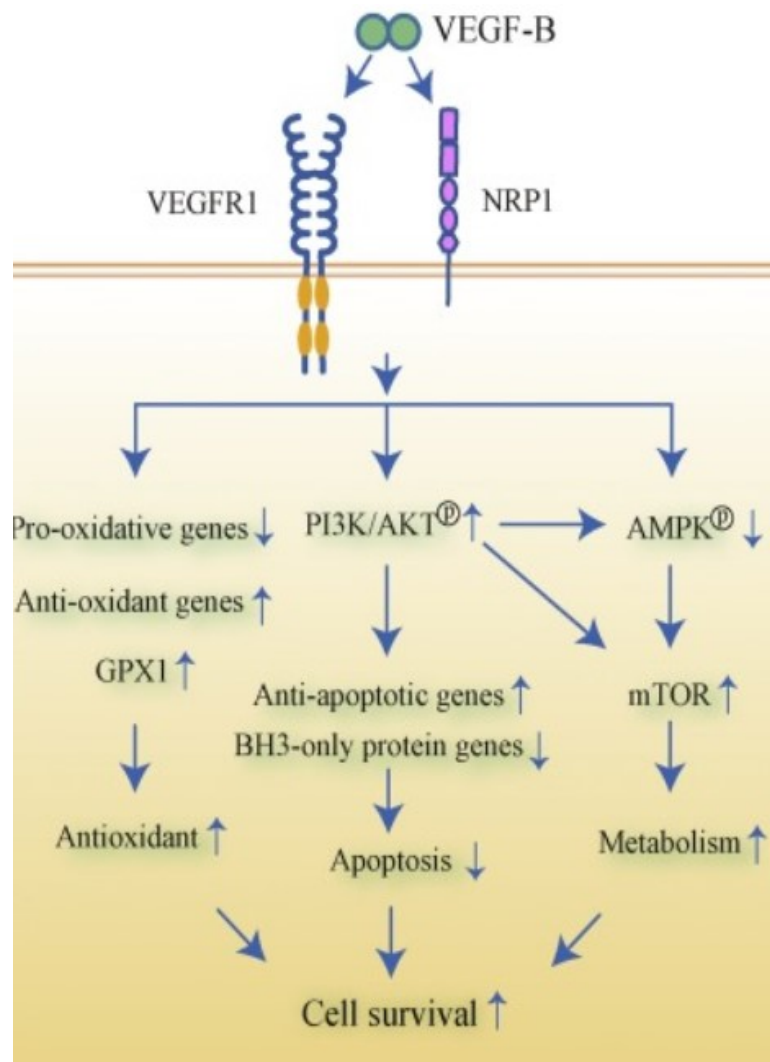
Seuraavaksi käsitellään tämän tutkimuksen kannalta merkittävintä verisuonikasvutekijää, VEGF-B:tä.

3.3 Verisuonikasvutekijä B (VEGF-B)

Vuonna 1996 Olofsson ym. (1996) löysivät verisuonten endoteelikasvutekijä B:n (VEGF-B). Northern blot -analyysillä analysoitiin VEGF-B:n transkriptien ilmentymistä hiiren ja ihmisen

kudoksissa ja tuloksia verrattiin VEGF:n transkriptien ilmentymiseen. VEGF-B-transkriptiota löytyi hiirten sydäimestä, aivoista, luurankolihaksista ja munuaisista, sekä tämän lisäksi ihmisen haimasta, luurankolihaksista, sydäimestä ja eturauhasesta. (Bry ym. 2014) VEGF-B geeni on konservoitunut nisäkkäillä ja ihmisen ja hiiren kasvutekijöillä on 88 % homologiaa aminohapposekvenssissä (Olofsson ym. 1996).

VEGF-B:tä ilmentävät solut, joilla on korkea metabolinen aktiivisuus kuten sydänlihassolut, luurankolihassolut, ruskea rasvakudos ja hermosolut (Li 2010). Tästä voidaan päätellä, että VEGF-B:llä on tärkeä rooli angiogeneesin ja metabolian välisessä yhteydessä (Bry ym. 2014). VEGF-B sitoutuu verisuonten endoteelikasvutekijä reseptoriin-1 (VEGFR-1) ja neuropiliini-1:een (NRP-1) (Li 2010). VEGF reseptorit aktivoituvat solukalvolla ligandien aiheuttamalla dimerisatiolla, jota seuraa solunsisäisen kinaasodomeerin tyrosiinin autofosforylaatio, joka synnyttää alempien signalointireittien aktivoitumisen. (Bry ym. 2014) Tarkempi kuvaus VEGF-B:n signalointireitistä löytyy kuvasta 3. Endoteelisolut reagoivat VEGF-B:hen lisäämällä uPA- ja PAI-1-proteiinien tuotantoa (Olofsson ym. 1998). VEGF-B:n ilmentymistä voidaan lisätä muun muassa transgeenisesti ja/tai adenovirusten avulla geeniterapiaa tai genisiirtoa käyttäen (Bry ym. 2010).



KUVA 3. VEGF-B:n reseptorit ja solusisäiset signalointireitit. (Chen ym. 2019)

VEGF-B-geeni tuottaa ihmisillä ja hiirillä kahta isoformia: VEGF-B167 ja VEGF-B186 (Li 2010). Se paikantuu ihmisen kromosomiin 11q13 ja koostuu seitsemästä eksonista (Tammela ym. 2005; Bry ym. 2014). VEGF-B167 on yleisin isoformi, jota esiintyy useimmissa kudoksissa ja elimissä. Sen osuus VEGF-B:n transkriptien kokonaismäärästä on yli 80 %, kun taas VEGF-B186:ta esiintyy harvemmissa kudoksissa ja pienemmissä määrin. (Li 2010) Molemmat isoformit sisältävät samanlaisen 116 aminohapon N-terminaalisen alueen mutta eroavat toisistaan C-terminaaliselta alueelta (Nash ym. 2006). VEGF-B167 sitoo heparaanisulfaattiproteoglykaaneja (HSPG) solun pinnalla ja solun ulkoisessa matriksissa, kun taas VEGF-B186 on vapaasti diffundoituva muoto. Molemmat muodot ilmentyvät pääasiassa verisuonten endoteelisoluissa. (Olofsson ym. 1999) VEGF-B ei stimuloi suoraan verisuonten kasvua vaan enemmänkin endoteelisolujen määrän kasvua. (Bry ym. 2014) VEGF-B on VEGF perheen heikoin angiogeenisin tekijä (Chen ym. 2019).

VEGF-B ilmentyy jo varhain sikiön kehityksessä. VEGF-B:n ilmentymistä luurankolihasessa säätelee transkriptiotekijä PGC-1 α . PGC-1 α tunnetaan mitokondrioiden biogeneesin ja oksidatiivisen aineenvaihdunnan tärkeänä säätelijänä ja tämä korostaa hapen toimituksen ja kohdekudoksen aineenvaihdunnan suhdetta. VEGF-B ilmentyminen luurankolihasessa indusoituu liikunnan vaikutuksesta hiirillä sekä ihmisillä. (Bry ym. 2014)

Aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että lihassolujen kokoa kasvattamalla lihaskudoksen kapillaarien määrä ei näytä lisääntyvän samassa suhteessa. Hulmi ym. (2013) tekemässä tutkimuksessa hiirille annettiin liukoista aktiviinireseptori IIB:ta (sActRIIB-Fc) kaksi kertaa viikossa kahden viikon ajan, jolla blokattiin myostatiinin ja aktiviinin aktiivisuus. Hoito aiheutti odotetusti kehonpainon lisäystä kasvattamalla lihasolujen kokoa sekä poikkipinta-alaa. Tämän lisäksi huomattiin, että samalla se vähensi kapillaaritiheyttä lihaskudoksen pinta-alaa kohden. Kapillaarien määrissä per lihasolu ei tapahtunut muutosta, joten kapillaaritiheyden väheneminen selittynee lihassolujen koon kasvulla. Vähentynyt kapillaaritiheys suhteessa lihaskudoksen kasvuun voi aiheuttaa lihaksen toiminnallisia häiriöitä. Kapillaarien ja lihasolujen välinen suhde on tehokas indeksi kuvaamaan kudoksen verisuonitiheyttä (Li ym. 2022).

Räsänen ym. (2016) tutkimuksessa havaittiin, että VEGF-B geeniterapiahoito voi estää sydämen kapillaarien harvenemista, vähentää DNA:n vaurioita, suojata verisuonten endoteelisoluja apoptoosilta sekä parantaa mitokondrioiden ja endoteelisolujen toimintaa. VEGF-B saattaa myös aiheuttaa lievää sydämen ja kardiomyosyyttien hypertrofiaa, joka ei kuitenkaan muutu kardiomyopatiaksi. Tämä voi johtua siitä, että VEGF-B:n aiheuttama kardiomyosyyttien hypertrofia perustuu endoteelin signaalointiin VEGFR2 reseptorin kautta, joka johtaa samanaikaisesti sepelvaltimoiden määrän lisääntymiseen. Bry ym. (2014) tarkentavat, että kehityksen aikana VEGF-B ilmentyminen korreloi ajallisesti sepelvaltimoiden endoteelikasvun ja etenemisen kanssa, joka viittaa sen rooliin sepelvaltimoiden kehityksessä.

VEGF-B:n vaikutusta luurankolihasokudokseen on tutkittu vähän ja tulokset ovat ristiriitaisia keskenään. Sen vaikutuksista on kuitenkin selkeää näyttöä sydämessä ja rasvakudoksessa, joten on mahdollista, että sillä on vaikutusta myös luurankolihasissa.

4 LUURANKOLIAHAKSEEN ANNETTAVA GEENITERAPIA

Tässä luvussa tarkastellaan luurankoliahakseen annettavaa geeniterapian muotoa.

3.4 Geeniterapia

Terapeutistien geenien tehokas toimittaminen ja asianmukainen geeniekspressio ovat ratkaisevia kysymyksiä kliinisesti merkityksellisessä geeniterapiassa. Virukset ovat luonnostaan kehittyneitä apukeinoja, jotka siirtävät tehokkaasti geenejä eteenpäin, mikä tekee niistä suotavia virusvektorijärjestelmiä terapeutistien geenien toimittamiseen. Viime aikoina laboratorio- ja kliinisessä käytössä olleet virusvektorit perustuvat RNA- ja DNA-viruksiin, jotka käsittelevät hyvin erilaisia genomirakenteita ja isäntälajeja. Tietyt virukset on valittu geeninsiirtovälineiksi, koska ne kykenevät siirtämään vieraita geenejä ja saavat aikaan tehokkaan geeniekspressioon. Nämä ovat tärkeimmät syyt siihen, miksi retroviruksista, adenoviruksista, adeno-assosioituneista viruksista (AAV), herpesviruksista (HSV) ja poxviruksista peräisin olevia virusvektoreita käytetään yli 70 % kliinisistä geeniterapiakokeista maailmanlaajuisesti. Geenejä on toisaalta myös luonnehdittu tautien aiheuttajiksi, mikäli ne menettävät normaalin toimintansa esim. deleetion, mutaation tai alleelien häviämisen vuoksi. Tästä syystä geenien käyttöönotto normaalin toiminnan palauttamiseksi tai terapeutistien geenien siirtämiseksi tiettyjen sairauksien, kuten syövän tai virusinfektioiden hoitamiseksi kiinnostaa yhä enemmän. (Walther & Stein 2000)

Ensimmäinen geeniterapiakoe suoritettiin Yhdysvalloissa 1989, vaikkakin sen hoitomuotoa on pohdittu jo 1970-luvulta alkaen. Perinnöllisiin sairauksiin ajateltu hoito on sittemmin laajentunut moniin muihinkin sairauksiin. (Wartiovaara 2021) Perinnölliset sairaudet johtuvat pienistä tai suurista mutaatioista geneeissä ja maailmanlaajuisesti on raportoitu yli 7000 harvinaista perinnöllistä sairautta. Esimerkiksi syövät johtuvat osaltaan geenimutaatioista, mutta myös muista geenien ulkopuolisista tekijöistä. Geeniterapia onkin yksi syöpien tärkeistä hoitomuodoista. Geeniterapian ideana on palauttaa viallisen geenin toiminta tai korvata mutatoitunut geeni. Geeniterapian ensimmäiset vaiheet ovat mutatoituneen geenin tunnistaminen ja geneettisen sairauden molekyyliarakenteen ymmärrys. (Shahryari ym. 2021)

Geeniterapian hoitomuodolla tarkoitetaan DNA:n siirtoa tai geenimuokkausta. Geeniterapia jaetaan yleisesti kahteen muotoon: in vivo ja ex vivo. In vivossa soluja muokataan geneettisesti elävässä kudoksessa ja ex vivossa soluja muokataan kudoksen ulkopuolella, jonka jälkeen ne siirretään vastaanottajaan. Suuri osa geeniterapiasta perustuu siihen, että soluun siirretään sellaiset DNA:n komponentit, jotka ilmentävät haluttua osaa geenistä. Tämä johtaa solun toiminnan muutokseen tuottamalla haluttua proteiinia tai RNA:ta. Siirto tapahtuu usein viruksen tai jonkin muun vektorin avulla. (Wartiovaara 2021)

Geeniterapian onnistumisen kannalta menetelmän turvallisuus ja tehokkuus on merkittävää. Toteutus on erityisen vaikeaa neuromuskulaarisissa sairauksissa kuten lihasdystrofiassa, sillä arviolta 40 % ihmisen kehonpainosta koostuu lihaskudoksesta. Viimeaikaisissa kliinisissä tutkimuksissa on osoitettu, että suuret AAV-vektoriannokset saattavat johtaa vakaviin haittavaikutuksiin, kuten maksan toksisuuteen. Mahdollisesti tulevaisuudessa tarvittaisiin paljon tehokkaampia vektoreita. (Chamberlain 2022)

Geeniterapia on kehittynyt lukuisten kliinisten kokeiden myötä ja seuraava vuosikymmen näyttää lupaavalta ihmisten sairauksien geeniterapioiden kannalta. Suurimpia geeniterapian haasteita kuitenkin ovat sen tehokkuus ja turvallisuus, epäselvät geenimanipulaatiot, immuunijärjestelmän reaktiot ja geenihoidotuotteiden korkeat hinnat. Näiden lisäksi geeniterapian systemisen puoliintumisajan parantuminen voisi lisätä terapeuttista pysyvyyttä. (Shahryari ym. 2021)

3.5 AAV vektorit

Virusgeenin erilaisia siirtojärjestelmiä on käytetty in vivo- geeniterapian eri sovellutuksissa. Virusvektoreita on kehitetty kohdennettua geeninsiirtoa ja pysyvää tai ohimenevää geeniekspressiota varten. Virusvektoreille on ominaista geenien toimittaminen kohdesolun tumaan. Geeninsiirtojärjestelmien hyviä puolia ovat sen korkea tehokkuus, kudoksen spesifisyys sekä niiden ohimenevä ja/tai pysyvä vaikutus. (Shahryari ym. 2021)

Adeno-assosioitunut virus (AAV) on yksijuosteinen DNA-riippuvainen virus, joka kuuluu parvovirusten perheeseen. AAV:n genomissa on kaksi geeniä, Rep ja Cap, jotka osallistuvat viruksen pakkaamiseen ja replikaatioon. Nämä kaksi geeniä eroavat toisistaan ilmentämällä eri

proteiineja. AAV:llä on ainutlaatuinen rakenne eikä sillä tiedetä olevan tautiaiheita. AAV-vektoreita voidaan käyttää useisiin eri solutyyppeihin ollen ideaalinen vektori useisiin in vivo-geeniterapiasovellutuksiin. (Walther & Stein 2000; Shahryari ym. 2021) Virallinen AAV-geenisiirojärjestelmä hyväksyttiin vuonna 1995 (Shahryari ym. 2021).

AAV vektoreiden rakenteessa kymmenet kapsidiproteiinit muodostavat kuoren, jonka sisällä terapeutinen geeni kuljetetaan kohdesoluun. AAV:t kulkeutuvat soluihin reseptorivälitteisen endosytoosin kautta, jonka jälkeen yksijuosteinen genomi muuttuu kahdeksi juosteeksi ja siirtogeneeni transkriptoituu. AAV:ta käytetään usein tiettyyn kudokseen tai elimeen. (Shahryari ym. 2021) Luonnosta on löydetty useita AAV-serotyyppejä, jotka eroavat toisistaan aminohappojärjestyksen suhteen (Chamberlain 2022).

Geeniterapiaa on tutkittu myös lihaskasvun ja kapillaarien määrän lisääntymiseen. Esimerkiksi Foster et al. (2009) tutkivat systemaattisesti injektoidujen adeno-assosioituneen viruksen-8 (AAV8) myostatiinipropeptidi vektoreiden vaikutuksia hiirillä. He havaitsivat merkittävää lihasmassan lisääntymistä sekä hitaiden että nopeiden lihasten fenotyypeissä. Tämän lisäksi tulokset osoittivat merkittävää tuman ja sytoplasman suhteen vähenemistä kaikissa lihassolutyypeissä eikä hyperplasiaa ollut havaittavissa. Tulokset viittaavat siihen, että myostatiinin estävän geeniterapian käytöllä voi olla lihaskohtaisia etuja lihasdystrofian hoidossa. Kapillaarien määrän lisääntymiseen mainittakoon geeniterapiatutkimus, jossa Pajusola ym. (2015) injisoivat hiirten TA lihaksiin verisuonikasvutekijöitä ja hypoksiasta indusoivan tekijän-1 α (HIF-1 α) stabiilia muotoa. Tuloksista selvisi, että HIF-1 α lisäsi merkittävästi kapillaarien itämistä ja proliferaatiota, kun taas verisuonikasvutekijät indusivat verisuonten endoteelisolujen proliferaatiota.

4 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT

1. Miten myostatiinipropeptidi vaikuttaa solukokoon ja solutyyppeihin?

Hypoteesi: Myostatiinipropeptidin tiedetään inhiboivan myostatiinin sitoutumista sen reseptoreihin sekä tukahduttavan myostatiinin aktiivisuuden, joten oletettavaa on, että tämän seurauksena lihassolujen poikkipinta-ala kasvaa mutta lihassolutyypit ei muutu (Lee 2004; Huang ym. 2011).

2. Onko VEGF-B:llä vaikutusta lihaskudoksen kapillaarien määrään tai solukokoon?

Hypoteesi: VEGF-B:n on havaittu lisäävän sydänlihaskudoksen kapillaarien määrää sekä sydänlihaksen hypertrofiaa hiirillä (Kivelä ym. 2014). Tutkimustietoa luurankolihasen osalta ei kuitenkaan ole, mutta oletettavaa on, että VEGF-B:llä on samankaltaisia vaikutuksia lihaskudoksessa kuin sydänlihaksessakin.

3. Millaisia vaikutuksia yhdistelmähoidolla on lihassolujen kokoon ja kapillaarien määrään?

Hypoteesi: Myostatiinin blokkauksen tiedetään lisäävän lihaskudoksen hypertrofiaa, mutta samalla se voi ainakin akuutisti vähentää kudoksen kapillaaritiheyttä (Hulmi 2013). Lisäämällä kapillaarien määrää ja kasvattamalla lihassolujen kokoa geeninsiirron avulla halutaan selvittää, voidaanko solukokoa kasvattaa suhteessa niin, että kapillaaritiheys ei vähene.

1. Miten edellä mainitut geeniterapiat vaikuttavat lihastumien määrään?

Hypoteesi: Lihassolujen hypertrofiaa pidetään edellytyksenä uusien tumien fuusioitumiselle lihassoluun. On kuitenkin näyttöä, että jo olemassa olevat tumat pystyvät lisäämään proteiinisynteesiä ja kasvattamaan lihassolun hypertrofiaa vasteena kevyelle tai kohtalaiselle harjoittelulle. (Conceição ym. 2014) Oletuksena on, ettei lihastumien määrä lisäänty huomattavasti, mutta pientä tumien määrän lisäystä saattaa olla havaittavissa.

5 TUTKIMUSMENETELMÄT

Seuraavaksi käsitellään aineiston keräämistä ja tutkimusmenetelmiä, sekä erityisesti tässä tutkimuksessa käytettyä immunohistokemiallista värjäysmenetelmää.

5.1 Tutkimusasetelma ja koe-eläimet

Kyseessä on kokeellinen tutkimus ja tässä tutkimuksessa käytettiin 10 viikon ikäisiä C57BL/6J uroshiiriä. Kaikki tutkimuksen eläinkokeet on hyväksytty valtakunnallisessa hankelupalautakunnassa (lupnumero: ESAVI-22658-2018). Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 20 hiirtä ja hiiret jaettiin satunnaisesti neljään eri ryhmään: 1. kontrolli (CTRL, N = 5), 2. VEGF-B, joille injektoitiin verisuonten endoteelikasvutekijä B:tä (VEGF-B, N = 5), myostatiinipropeptidi, joille injektoitiin myostatiinipropeptidia (Pro-MSTN, N = 5) sekä yhdistelmäryhmä, jotka saivat VEGF B:tä sekä myostatiinipropeptidia (VEGF-B+Pro-MSTN, N = 5). Kokeen aikana kontrolliryhmästä kuoli yksi hiiri (CTRL N=4). 4 viikkoa injektion jälkeen hiiret nukutettiin ja lopetettiin sydänpunctiolla, jota seurasi lihasnäytteiden leikkaaminen ja punnitus. Näytteet upotettiin OCT geeliin, jäädytettiin nestetyypellä kylmennetyssä isopentaanissa ja säilytettiin -80 °C asteessa myöhempää käsittelyä varten. Tässä tutkimuksessa käytettiin jokaiselta hiireltä yhtä tibialis anterior (TA) lihasta.

Hiiret elivät vakioituissa olosuhteissa ja niillä oli vapaa pääsy ruokaan ja juomaan. Hiiriin injektoitiin anestesian aikana rekombinantti-adenovirusvektoreita (rAAV) lihaksensisäisesti molempien raajojen TA lihaksiin. Hiiriin injektoitu hoitoannos oli 30 µl/TA. Tarkempi erittely annetuista hoitoannoksista löytyy taulukosta 1.

TAULUKKO 1. AAV vektoreiden hoitoannos kutakin ryhmää kohden. VP=virus particles.

| Ryhmä | AAVs | AAV (#1) | AAV (2#) | AAV (3#) | Yhteensä/TA |
|-------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|
| CTRL | S2 (1#) | 6x10 ¹⁰ VP | | | 6x10 ¹⁰ VP in 30µl |
| VEGF-B | VEGF-B (#1) +S2 (#2) | 5x10 ¹⁰ VP | 1x10 ¹⁰ VP | | 6x10 ¹⁰ VP in 30µl |
| Pro-MSTN | Pro-MSTN (#1) +S2 (#3) | 1x10 ¹⁰ VP | | 5x10 ¹⁰ VP | 6x10 ¹⁰ VP in 30µl |
| VEGF-B + Pro-MSTN | VEGF-B (#1) +Pro-MSTN (#2) | 5x10 ¹⁰ VP | 1x10 ¹⁰ VP | | 6x10 ¹⁰ VP in 30µl |

5.2 Näytteiden preparointi

Immunohistokemiallisiin analyyseihin käytettiin kunkin hiiren yhtä TA lihasta. Poikkileikkeet leikattiin lihaksen keskiosasta kryomikrotomilla (Leica CM 3000) Jyväskylän yliopiston liikuntalaboratoriossa laboratoriomestarin toimesta. Peitinlasille kerättiin kaksi leikettä samasta lihaksesta. Peitinlaseille leikatut näytteet jäädytettiin -80 asteeseen myöhempää käsittelyä varten.

5.3 Immunohistokemia

Jäätäneet leikkeet otettiin -80 asteesta huoneenlämpöön ja annettiin ilmakeivua huoneenlämmössä 10 minuuttia, jonka jälkeen ne pestiin PBS:llä (fosfaattipuskuroitu suolaliuos). Tämän jälkeen leikkeiden annettiin fiksoitua -20°C asteisessa metanolissa 10 minuuttia, pestiin PBS:llä ja blokattiin NGS:llä (Normal goat serum) tunnin ajan. Seuraavaksi leikkeille asetettiin primaari vasta-aine, joka oli laimennettu 10 % NGS, annettiin inkuboitua tunnin ajan huoneenlämmössä tai yön yli +4 asteessa ja pestiin PBS:llä 3x5 min. Sekundääri vasta-aineet laimennettiin PBS:llä, annettiin inkuboitua yhden tunnin huoneenlämmössä ja pestiin PBS:llä 3x5 min. Sekä primaari että sekundääri vasta-aineet sekoitettiin hyvin ennen leikkeille laittoa. Tutkimuksessa käytetyt primarit vasta-aineet ja niiden laimennossuhteet löytyvät taulukosta 2. ja sekundääri vasta-aineet taulukosta 3.

Ennen virallisia värjäyksiä optimoitiin sopivia vasta-aineita sekä laimennossuhteita testileikkeillä useaan kertaan, kunnes saavutettiin halutut tulokset. Kunkin näytteen päälle laitettiin 100 µl sekä primaari että sekundaari vasta-ainetta. Viimeisenä objektilasit kuivattiin, puhdistettiin ja peitinlasit kiinnitettiin ProLong® Diamondilla.

TAULUKKO 2. Käytetyt primaari vasta-aineet ja vastaavat laimennokset.

| Tarkoitus | Kohde | Geeni | Vasta-aine | Valmistaja | Laimennos |
|-----------------------|-------------------------|-------|-----------------|--------------------------------------|-----------|
| Lihassolu kalvo | Dystrofiini | DMD | Mouse-Dys2 IgG1 | | 1:500 |
| Tyypin IIB lihassolut | Myosiinin raskasketju 4 | MYH4 | BF-F3 | Developmental Studies Hybridoma Bank | 1:40 |
| Lihassolun tumat | PCM1 | PCM1 | PCM1 | Prestige Antibodies | 1:500 |
| Kaikki tumat | DNA | | DAPI | | 1:100 |

TAULUKKO 3. Käytetyt sekundääri vasta-aineet ja vastaavat laimennokset.

| Tarkoitus | Vasta-aine | Koodi | Valmistaja | Laimennos |
|-----------------------|------------------------|-------|-------------------------------|-----------|
| Lihassolu kalvo | aMs IgG1 | 488 | Novacastra | 1:300 |
| Tyypin IIB lihassolut | Goat aMs IgGM | 647 | Life Technologies Corporation | 1:500 |
| Lihassolun tumat | Donkey anti-rabbit IgG | 550 | Abcam | 1:500 |
| Kaikki tumat | DAPI | | | 1:100 |

5.4 Kuvankäsittely

Näytteet kuvattiin värjäyksen jälkeen konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM 700) ja kuvat tallennettiin Zeiss:n omalla Zen-ohjelmalla czi-tiedostoksi. Näytteet jaettiin neljälle eri kanavalle (DAPI, dystrofiini, PCM1 ja tyypin IIB lihassolut) ja kuvattiin kanava kerrallaan 20x suurennoksella. Jokaisesta näytteestä otettiin satunnaisesti 3–4 kuvaa eri puolilta poikkileikettä.

Kuva-analyysit suoritettiin ImageJ Fiji ja MyoVision ohjelmistoilla. Kuvankäsittelyn ensimmäisenä vaiheena oli kirkkauden ja kontrastin säätö manuaalisesti kuva kerrallaan käyttäen ImageJ:ta. Tällä toimenpiteellä haluttiin poistaa kuvista niiden ylimääräinen taustaväri, jottei se häiritsisi myöhempää analysointia. Tämän jälkeen kuvat tallennettiin kanava kerrallaan png-tiedostoksi.

Seuraavaksi kuvat analysoitiin automaattisella kuvankäsittelyohjelmalla MyoVisionilla. Ohjelmalla analysoitiin jokaisesta kokonaisesta kuvasta kanava kerrallaan tumien määrä (DAPI), lihassolujen koko (dystrofiini), lihassolujen tumat (PCM1) sekä tyypin IIB lihassolut. MyoVision muodosti valituista kanavista yhden kokonaisen kuvan sen perusteella, kuinka kuvat oli nimen mukaan tallennettu ImageJ:n analysoinnin jälkeen. Jokaisen kanavan analysointi tuli ajaa manuaalisesti erikseen. Valmiit tulokset kustakin kuvasta tallennettiin excel-tiedostoksi. MyoVisionilla kuvien analysointiin käytettiin pikseliasteikkoa 1.25, joka saatiin laskemalla alkuperäisen kuvan (zeiss) koko (640 μm) jaettuna kuvan resoluutiolla (512 pikseliä).

5.5 Tilastolliset menetelmät

Excelillä laskettiin keskiarvot hiirten TA lihaksen lihassolujen poikkipinta-alasta, glykolyyttisten tyypin IIB ja aerobisten muiden solutyypin absoluuttisesta ja prosentuaalisesta määrästä, sekä lihassolujen tumien määrästä. Jokaisesta leikkeestä analysoitiin kolme tai neljä kuvaa, joista laskettiin keskiarvo kullekin hiirelle. Tämän jälkeen hiiret jaettiin omiin ryhmiin (CTRL, VEGF-B, Pro-MSTN ja VEGF-B+Pro-MSTN), joiden kaikista tuloksista laskettiin keskiarvot kullekin ryhmälle.

GraphPad Prism 9 -ohjelmaa käytettiin kaikkeen tilastolliseen analysointiin. Normaalijakaumaa tarkasteltiin käyttämällä Shapiro-Wilk-testiä ja analysoitiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä (one-way ANOVA). Ei-parametriset muuttujat, kuten ryhmien väliset muuttujat analysoitiin käyttäen Kruskal-Wallis-testiä. Tilastollisesti merkitseväksi arvoksi asetettiin p-arvo <0.05 . Kuvaajien ja taulukoiden muodostukseen käytettiin GraphPad Prism 9, Microsoft Excel ja Microsoft Word ohjelmistoja.

6 TULOKSET

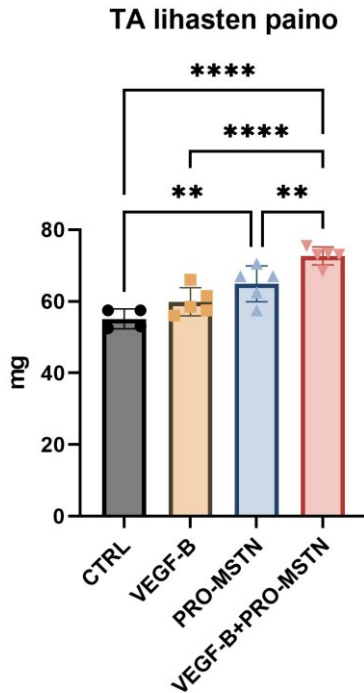
Tässä luvussa kerrotaan ensin taustatulokset, jonka jälkeen siirrytään tämän tutkimuksen tuloksiin. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 20 hiirtä, joista yksi kuoli tutkimuksen aikana. Hiiret jaettiin neljään eri tutkimusryhmään ja hiiriä oli jokaisessa ryhmässä 4–5. Tässä työssä tarkasteltiin hiirten eri geeniterapiahoitomuotoja sekä kontrolliryhmää lihassolukokojen, lihastumien määrän sekä lihassolutyypien osalta. Tutkimuksesta jätettiin pois alkuperäisen suunnitelman mukainen hiirten verisuonidata, koska emme saaneet testivaiheessa siitä riittävän luotettavia tuloksia. Tutkimuksessa verrattiin kaikkia neljää ryhmää keskenään.

6.1 Taustatulokset

Taulukossa 4 nähdään hiirten kehonpaino, absoluuttinen TA lihasten paino sekä TA lihasten paino suhteutettuna kehonpainoon. Kuvassa 4 nähdään keskiarvo hiirten TA lihasten yhteispainosta eri ryhmien välillä. Ryhmien CTRL ja VEGF-B+PRO-MSTN, sekä VEGF-B ja VEGF-B+PRO-MSTN välillä havaittiin tilastollisesti erittäin merkitseviä eroja lihasten painossa ($p \leq 0,001$), joissa molemmissa yhdistelmähoidon saaneiden hiirten TA lihakset painoivat enemmän. Tämän lisäksi tilastollisesti merkitseviä eroja havaittiin CTRL ja PRO-MSTN sekä PRO-MSTN ja VEGF-B+PRO-MSTN ryhmien välillä ($p \leq 0,01$).

TAULUKKO 4. Hiirten TA lihasten absoluuttinen ja suhteellinen paino. HN16 hiiri kuoli tutkimuksen aikana.

| ID | Kehonpaino (g) | TA L (mg) | TA R (mg) | Absoluuttinen (mg) | %/kehonpaino |
|-----------|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| HN1 | 32,1 | 57 | 58 | 115 | 0,36 % |
| HN2 | 30 | 72 | 74 | 146 | 0,49 % |
| HN3 | 32,1 | 71 | 75 | 146 | 0,45 % |
| HN4 | 30 | 74 | 77 | 151 | 0,50 % |
| HN5 | 29,6 | 65 | 72 | 137 | 0,46 % |
| HN6 | 29,5 | 52 | 54 | 106 | 0,36 % |
| HN7 | 30,6 | 60 | 55 | 115 | 0,38 % |
| HN8 | 28,5 | 54 | 58 | 112 | 0,39 % |
| HN9 | 27,3 | 70 | 64 | 134 | 0,49 % |
| HN10 | 31,9 | 78 | 69 | 147 | 0,46 % |
| HN11 | 33 | 71 | 70 | 141 | 0,43 % |
| HN12 | 29,2 | 56 | 59 | 115 | 0,39 % |
| HN13 | 29,2 | 63 | 62 | 125 | 0,43 % |
| HN14 | 26,7 | 59 | 56 | 115 | 0,43 % |
| HN15 | 32,1 | 69 | 65 | 134 | 0,42 % |
| HN16 | | | | | |
| HN17 | 27,5 | 52 | 53 | 105 | 0,38 % |
| HN18 | 28,1 | 57 | 60 | 117 | 0,42 % |
| HN19 | 30,3 | 68 | 64 | 132 | 0,44 % |
| HN20 | 32 | 55 | 68 | 123 | 0,38 % |



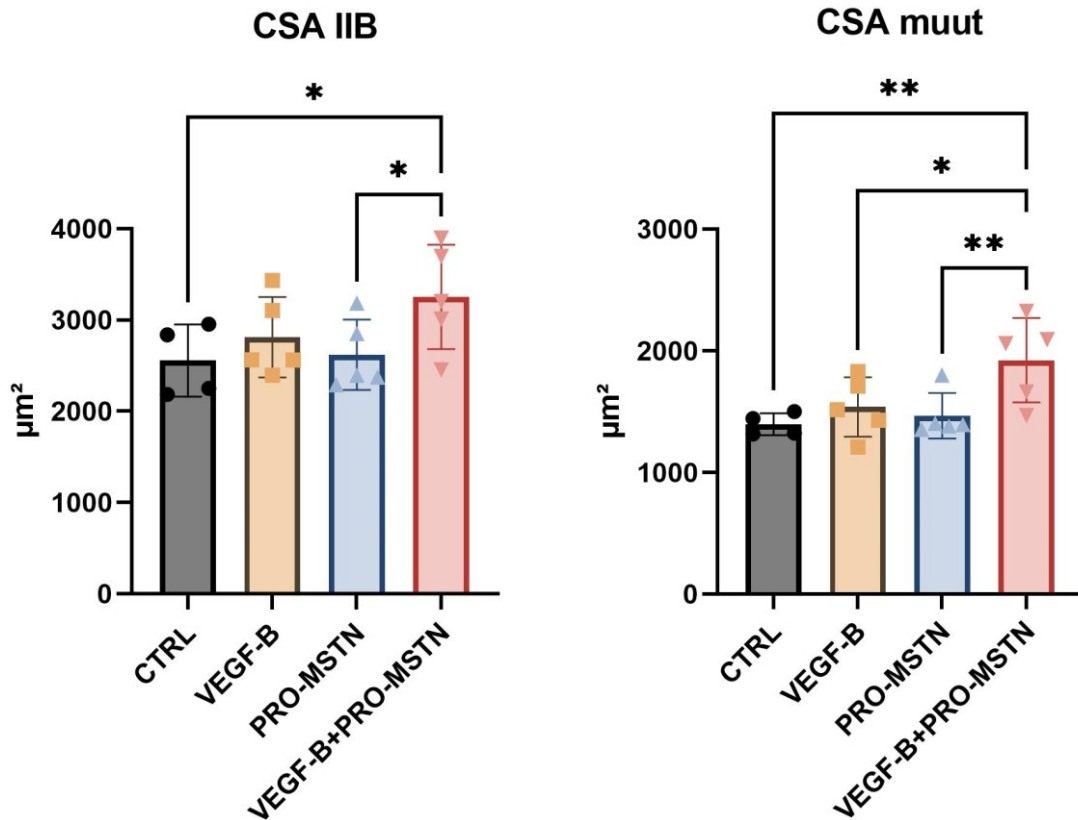
KUVA 4. Keskiarvot hiirten TA lihasen painosta ryhmittäin. Kuvassa on esitetty myös keskihajonnat ja yksittäisten hiirten tulokset. ****muutos tilastollisesti merkitsevä $p < 0,0001$, **muutos tilastollisesti merkitsevä $p < 0,01$.

6.2 Lihaksen poikkipinta-ala

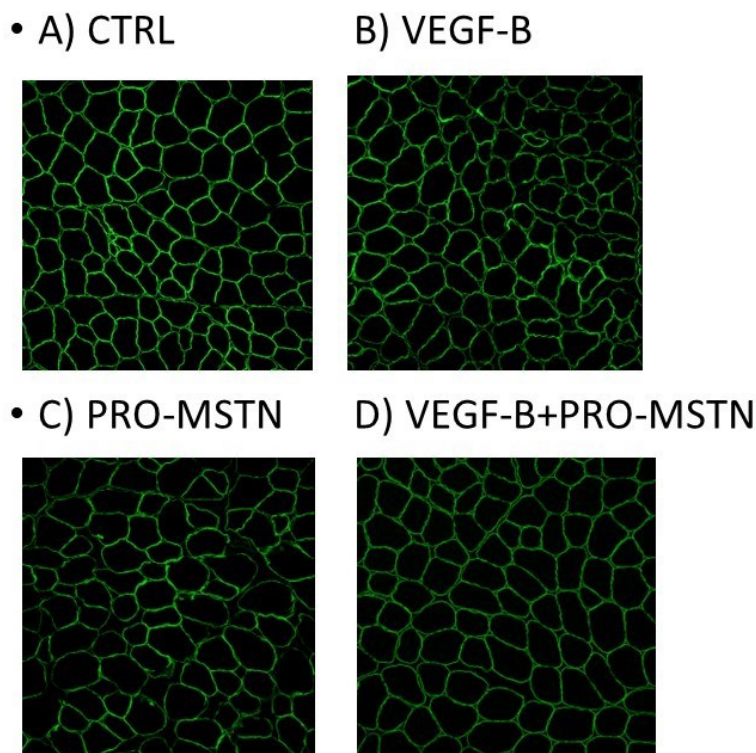
Kuvassa 5 nähdään keskiarvot hiirten tyypin IIB sekä muiden tyypin lihassolujen poikkipinta-aloista. Yleisesti voidaan sanoa, että glykolyttiset tyypin IIB lihassolut olivat poikkipinta-alaltaan ($2811,47 \mu\text{m}$) suurempia kuin muut aerobisen tyypin lihassolut ($1581,47 \mu\text{m}$). Tyypin IIB lihassolut olivat 43,75 % suurempia kuin muun tyypin lihassolut. Keskiarvot solujen poikkipinta-aloista tyypin IIB lihassolujen osalta olivat ryhmittäin CTRL $2557,76 \mu\text{m}$, VEGF-B $2812,40 \mu\text{m}$, Pro-MSTN $2619,96 \mu\text{m}$ ja yhdistelmäryhmä $3255,75 \mu\text{m}$. Kun taas muun tyypin lihassolut olivat kooltaan huomattavasti pienempiä keskiarvoltaan CTRL $1396,80 \mu\text{m}$, VEGF-B $1539,30 \mu\text{m}$, Pro-MSTN $1466,96 \mu\text{m}$ ja yhdistelmäryhmä $1922,82 \mu\text{m}$.

Tyypin IIB lihassolujen poikkipinta-aloissa havaittiin tilastollisesti merkitseviä kokoeroja ainoastaan CTRL ja VEGF-B+PRO-MSTN ($p = <0,05$) sekä PRO-MSTN ja VEGF-B+PRO-MSTN välillä ($p = <0,05$). Muiden lihassolujen välillä puolestaan havaittiin tilastollisesti merkitseviä kokoeroja pääasiallisesti ryhmien CTRL ja VEGF-B+PRO-MSTN ($p = <0,01$) sekä

PRO-MSTN ja VEGF-B+PRO-MSTN välillä ($p = <0,01$), mutta myös ryhmien VEGF-B ja VEGF-B+PRO-MSTN ryhmien välillä ($p = <0,05$). Muiden ryhmien välillä ei havaittu merkitseviä eroja. Kuvassa 6 nähdään mikroskooppikuvat solukalvovärjäyksistä kunkin ryhmän osalta. Kuvista on poistettu taustaväriä ja korostettu solukalvorajoja Fiji-ohjelman avulla.



KUVA 5. Hiirten lihassolujen poikkipinta-alat (CSA) ryhmittäin tyyppin IIB lihassoluista sekä muun tyyppin lihassoluista. Kuvissa on esitetty ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat sekä yksittäisten hiirten tulokset. *muutos tilastollisesti merkitsevä $p < 0,05$. **muutos tilastollisesti merkitsevä $p < 0,01$.

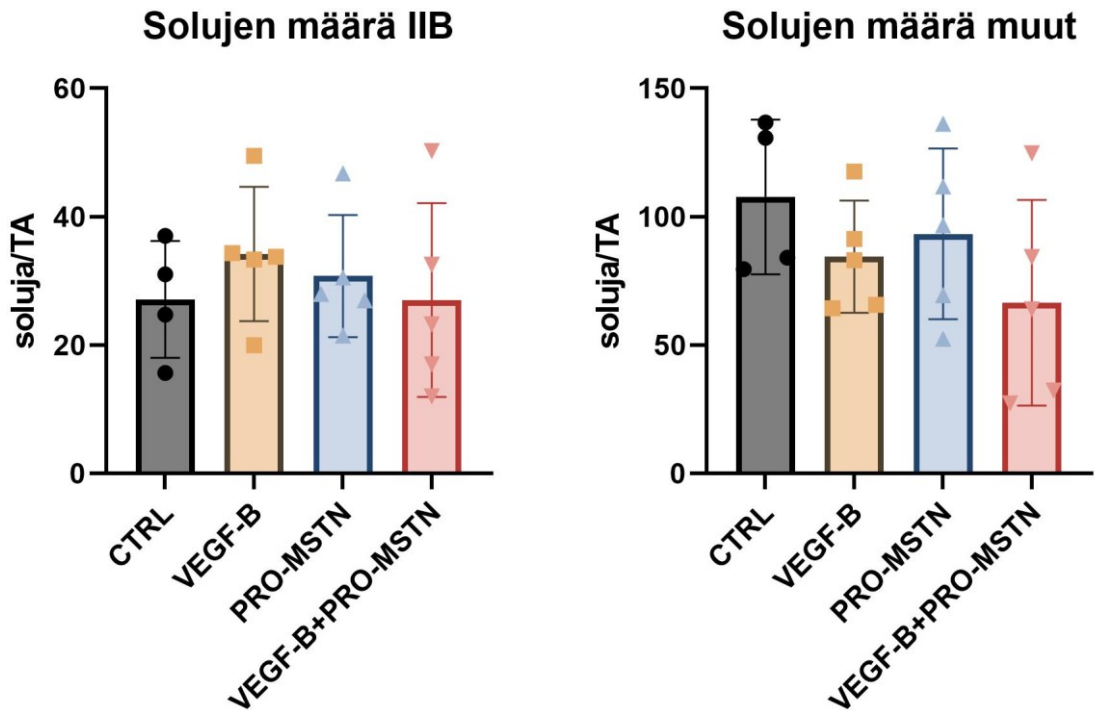


KUVA 6. Mikroskooppikuvat hiirten TA lihasten poikkipinta-aloista ryhmittäin: kontrolliryhmä (A), VEGF-B (B), PRO-MSTN (C) ja yhdistelmäryhmä VEGF-B+PRO-MSTN (D). Lihassolukalvot värjättiin dystrofiinillä (vihreä) ja kuvan suurennos on 20x.

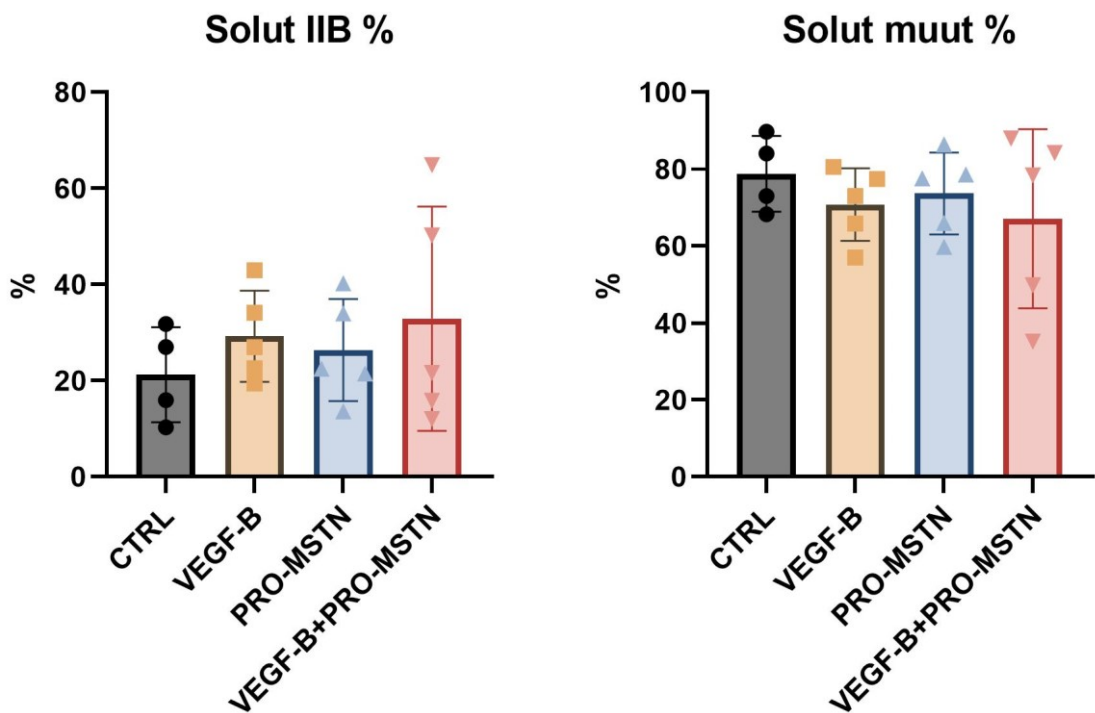
6.3 Lihassolujakauma

Lihassolujakauman avulla haluttiin selvittää, kuinka suuri osa hiirten TA lihasten soluista on tyyppin IIB soluja. Analyysiin laskettiin mukaan ainoastaan sellaiset solut, jotka olivat mikroskooppikuvissa kokonaisina. Puolikkaita tai muuten viallisia soluja ei laskettu mukaan. Lopullinen analyysi solujen määrästä suoritettiin Myovisionilla. Kuvasta 7 nähdään, että tyyppin IIB tai muiden solujen määrässä ei havaittu tilastollista eroavaisuutta ryhmien välillä. Kuvassa 8 puolestaan nähdään tyyppin IIB ja muiden lihassolujen prosentuaaliset osuudet kunkin ryhmän osalta. Keskiarvoja tarkasteltaessa voidaan huomata, että tyyppin IIB soluja oli prosentuaalisesti eniten yhdistelmäryhmässä (32,89 %) ja vähiten kontrolliryhmässä (21,23 %). VEGF-B ryhmän hiirillä tyyppin IIB soluja oli keskimäärin 29,22 % ja Pro-MSTN hiirillä 26,34 %. Muun tyyppin lihassoluja puolestaan oli kontrolliryhmässä 78,77 %, VEGF-B ryhmässä 70,78 %, Pro-MSTN

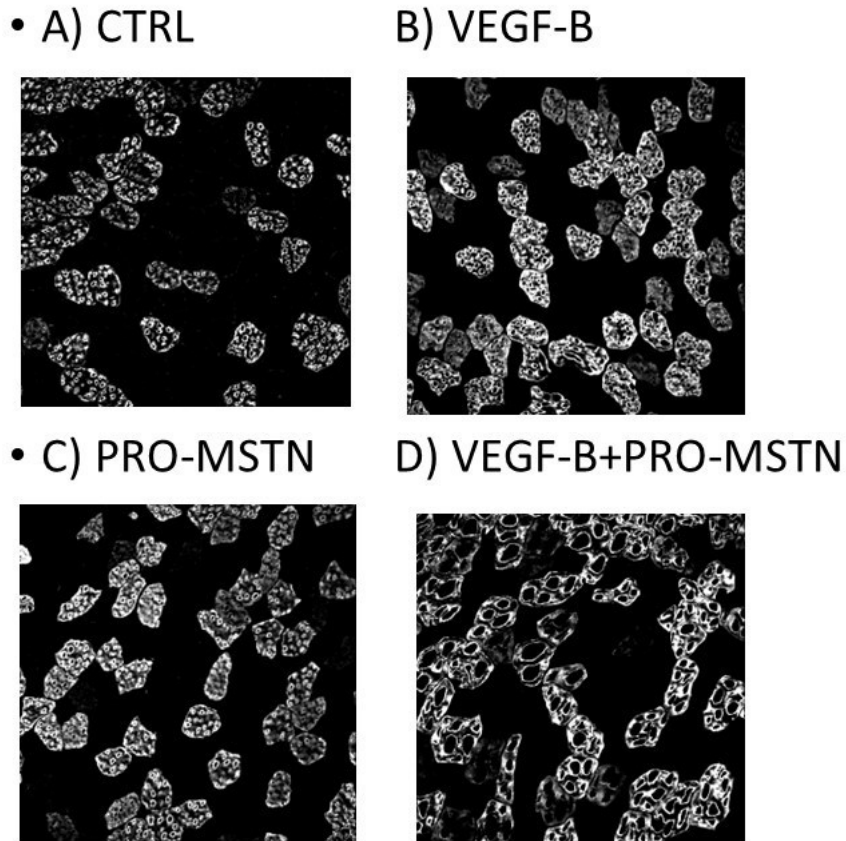
ryhmässä 73,66 % ja yhdistelmäryhmässä 67,11 %. Kaiken kaikkiaan hiirten TA lihaksista tyypin IIB lihassoluja oli 27,42 % ja muun tyyppin soluja 72,58 %.



KUVA 7. Tyypin IIB ja muiden solujen määrä TA lihaksessa. Kuvissa on esitetty ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat sekä yksittäisten hiirten tulokset.



KUVA 8. IIB lihassolujen ja muiden lihassolujen prosentuaalinen osuus TA lihaksessa. Kuvissa on esitetty ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat sekä yksittäisten hiirten tulokset.

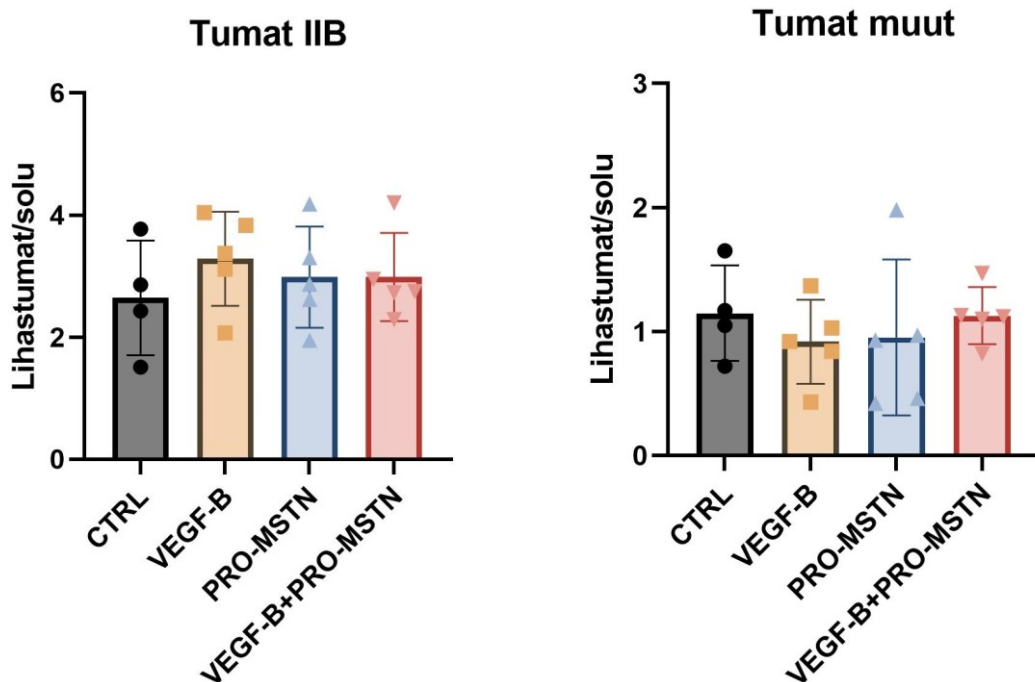


KUVA 9. Lihassolujakaumat ryhmittäin: kontrolliryhmä (A), VEGF-B (B), PRO-MSTN (C) ja yhdistelmäryhmä VEGF-B+PRO-MSTN (D). IIB lihassolujen osuus näkyy kuvassa valkoisella ja muiden lihassolujen osuus tummana. IIB lihassolujen immunohistokemiallinen värjäys tehtiin BF-F3 vasta-aineella ja kuvat on otettu 20x suurennoksella.

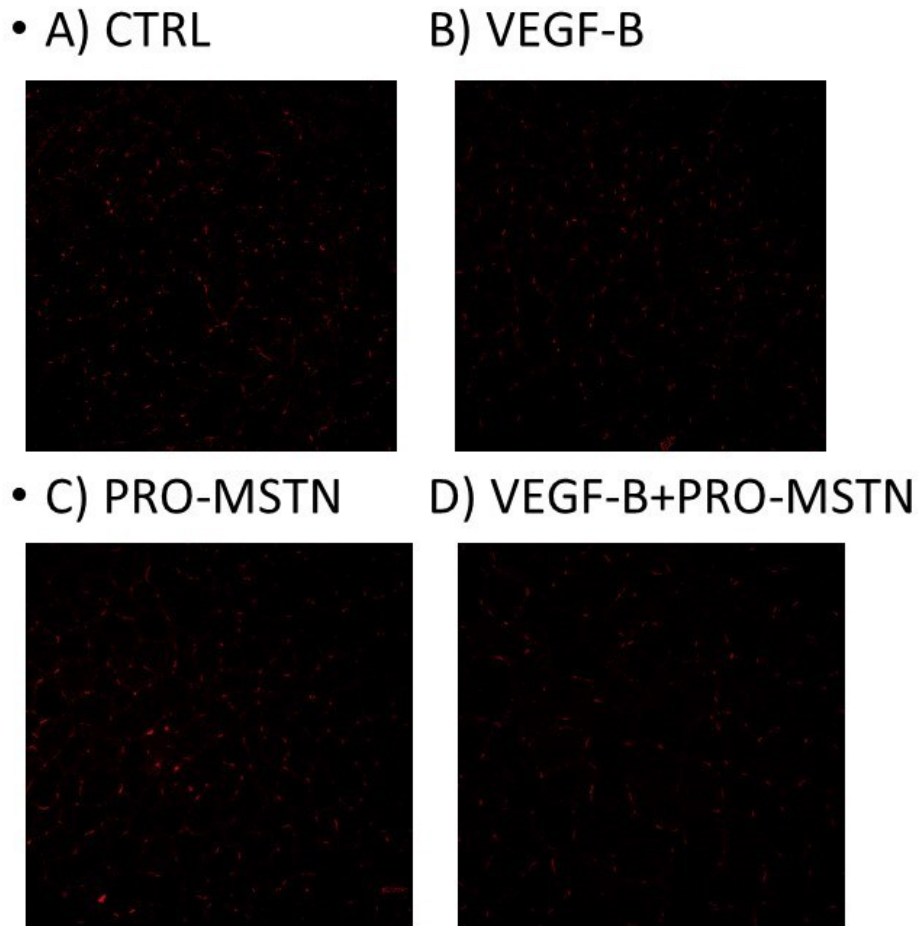
Kuvassa 9 on esitetty mikroskooppikuvat kustakin ryhmästä lihassolujakauman osalta. Tähän on kuvattu erityisesti tyypin IIB lihassolujen osuutta hiirten TA lihaksissa. Kuvasta voidaan havaita lihassolujen kokoeroja muttei niinkään eroavaisuuksia solujen kokonaismäärissä. Etenkin D kuvasta erottaa hyvin solun sisäistä jäätymisartefaktia, jota ilmeni mikroskooppikuvausten yhteydessä.

6.4 Lihastumien määrä

Tutkimuksessa haluttiin selvittää lihastumien määrää eri lihassolutyypeissä. Tarkoituksena oli tutkia, lisääntyykö lihastumien määrä erityisesti tyypin IIB lihassoluissa myostatiinin inhibition vaikutuksesta. Tumamarkkerina käytettiin PCM1 vasta-ainetta, joka toimi spesifisti lihassolujen tumiin. Kuvassa 10 nähdään, ettei lihastumien määrällä ole tilastollista eroavaisuutta ryhmien välillä tyypin IIB tai muissa soluissa. Tyypin IIB ja muiden solujen välillä voidaan kuitenkin todeta, että tyypin IIB soluissa tumia havaittiin enemmän kuin muun tyypin lihassoluissa. Tyypin IIB soluissa eniten tumia/solu havaittiin VEGF-B ryhmässä (3,28) ja vähiten kontrolliryhmässä (2,64). Pro-MSTN sekä yhdistelmäryhmässä tumia havaittiin yhtä paljon (2,98). Keskimäärin tyypin IIB lihassoluissa oli 2,97 tumaa/solu. Muun tyypin soluissa taas eniten tumia/solu oli kontrolliryhmässä (1,15) ja toiseksi eniten yhdistelmäryhmässä (1,13). VEGF-B ja Pro-MSTN ryhmissä tumia oli alle yksi/solu (VEGF-B 0,72, Pro-MSTN 0,95) Keskiarvoltaan tumia/solu muun tyypin soluissa oli 0,99. Tumia oli tyypin IIB lihassoluissa kolme kertaa enemmän kuin muun tyypin lihassoluissa.



KUVA 10. Lihassolujen tumien määrä IIB lihassoluissa ja muissa lihassoluissa TA lihaksessa. Kuvissa on esitetty ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat sekä yksittäisten hiirten tulokset.



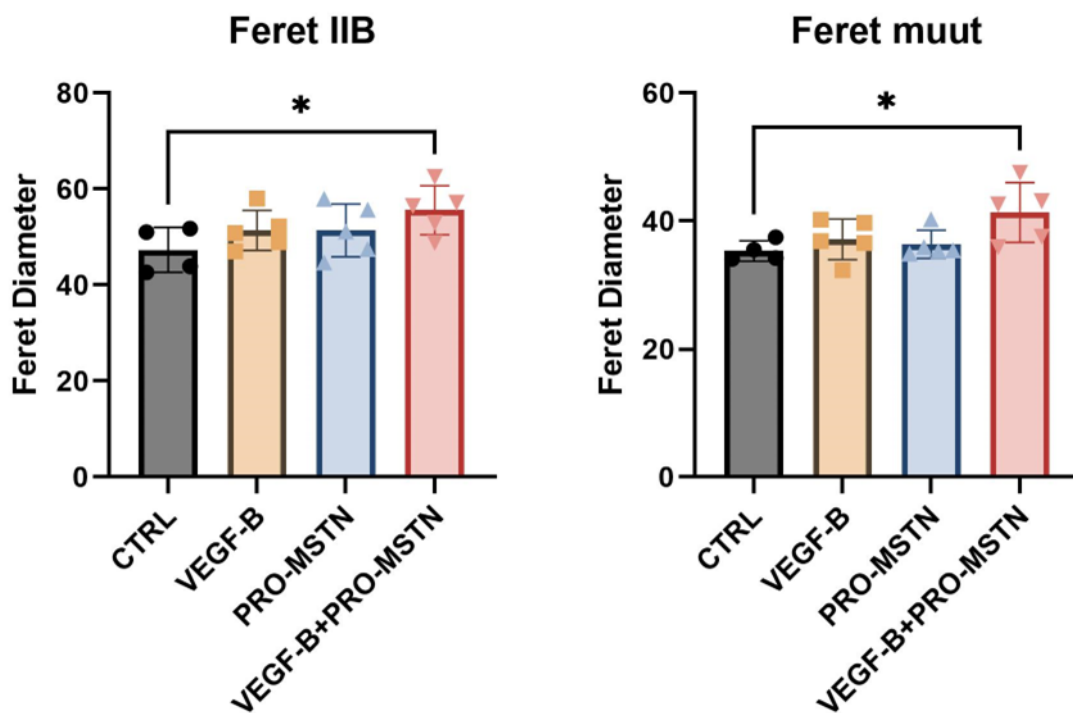
KUVA 11. Lihassolujen tumat ryhmittäin: kontrolliryhmä (A), VEGF-B (B), PRO-MSTN (C) ja yhdistelmäryhmä VEGF-B+PRO-MSTN (D). Lihastumien immunohistokemiallinen värjäys tehtiin PCM1 (punainen) vasta-aineella ja kuvat on otettu 20x suurennoksella.

Kuvassa 11 on esitetty hiirten TA lihasten lihastumien värjäykset ryhmittäin. Kuvassa näkyvät punaiset pisteet kertovat lihastuman sijainnista poikkileikkeessä. Kuvista on poistettu taustaväriä ja korjattu kontrastia Fiji -ohjelman avulla.

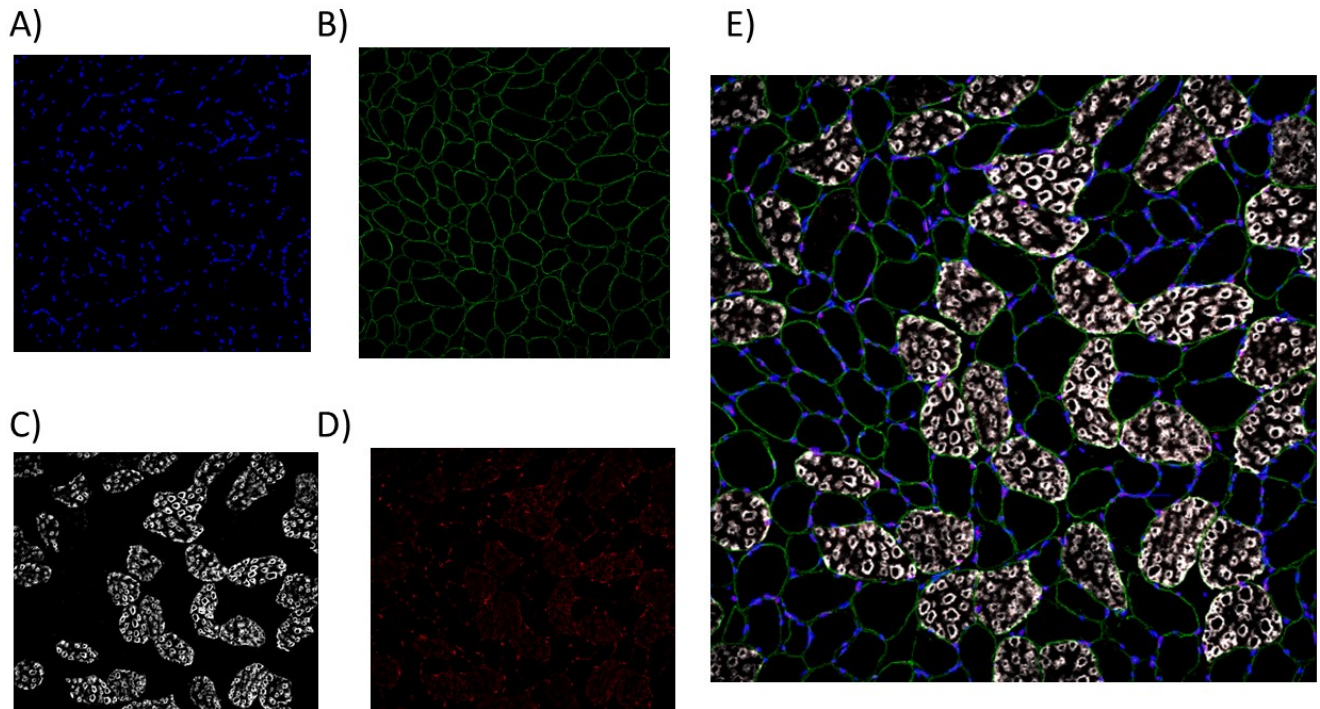
6.5 Feret Diameter

Tulosten analyysivaiheessa kuvankäsittelyohjelma Myovision laski myös eri lihassolutyypin ja ryhmien feret diameterin eli solun läpimitan. Lihassolutyypin ja ryhmien väliset eroavaisuudet on esitetty kuvassa 12. Tyypin IIB solujen osalta voidaan havaita, että tilastollista eroavaisuutta löytyy ryhmien CTRL ja VEGF-B+Pro-MSTN välillä ($p < 0,05$). Yhdistelmäryhmän hiirillä (55,58) nähdään keskiarvon perusteella suurempi solun läpimitta kuin kontrolliryhmän hiirillä (42,32). VEGF-B (51,39) ja Pro-MSTN (51,39) ryhmillä ei havaita tilastollista merkitsevyyttä minkään ryhmän välillä.

Myös muiden solujen osalta voidaan havaita tilastollista eroavaisuutta CTRL ja VEGF-B+Pro-MSTN ryhmien välillä ($p < 0,05$), jossa niin ikään yhdistelmäryhmän hiirillä (41,33) nähdään suurempi läpimitta, kuin kontrolliryhmän hiirillä (35,32). VEGF-B ja Pro-MSTN ryhmän hiirillä ei nähdä tilastollisia eroavaisuuksia. Lihassolutyyppejä vertailtaessa nähdään, että tyypin IIB soluilla on keskimäärin suurempi läpimitta kaikkien ryhmien osalta kuin muun tyypin lihassoluilla.



KUVA 12. Lihassolujen Feret Diameter IIB soluissa ja muissa soluissa. Kuvissa on esitetty ryhmien keskiarvot ja keskihajonnat sekä yksittäisten hiirten tulokset. *muutos tilastollisesti merkitsevä $p < 0,05$.



KUVA 13. Kuvassa on esitetty yhden kontrolliryhmään kuuluvan hiiren immunohistokemiallinen värjäys TA lihaksen poikkileikkeestä. A) DAPI, B) dystrofiini C) IIB lihassolut, D) lihassolujen tumat ja E) yhdistelmäkuva kaikista edellä mainituista (A, B, C ja D). Yhdistelmäkuvasssa magenta värillä nähdään lihassolujen tumat. Näytteet kuvattu 20x suurennoksella.

Kuvassa 13 on esitetty yhden hiiren mikroskooppikuvat kanavittain sekä kanavista muodostettu yhdistelmäkuva. Kuvassa A nähdään sinisellä DNA värjäys (DAPI) ja kuvassa B voidaan nähdä vihreällä lihassolujen kalvorajat (dystrofiini). Tyypin IIB lihassolut nähdään kuvassa C valkoisella (BF-F3). Tumma alue kuvastaa kaikkia muita lihassolutyyppejä, kuin IIB soluja. Lihassolujen tumat on esitetty kuvassa D punaisilla pisteillä (PCM1). Tässä kuvassa näkyy hieman myös taustaväriä punaisella. Immunohistokemialliset värjäykset onnistuivat hyvin ja kuvista A-D nähdään signaalien riittävä voimakkuus kuvantamista varten. Kaikki näytteet on kuvattu konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM 700) ja kuvista on poistettu ylimääräistä taustaväriä sekä parannettu kontrastia Fiji -ohjelmalla. Kaikista edellä mainituista kanavista on

muodostettu Fijin avulla yhdistelmäkuva, jossa nähdään magentan värillä olevat lihassolutumat. Kuvassa E nähdään lisäksi pieniä solunsisäisiä vaurioita.

7 POHDINTA

Tämän pro-gradun tarkoituksena oli selvittää geeniterapian avulla, saadaanko luurankolihasen solukokoa sekä lihaskudoksen kapillaarien määrää kasvatettua suhteessa niin, että saadaan metabolisesti aktiivinen ja terve kudosis. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää eri hoitomuotoja saaneiden ryhmien (CTRL, Pro-MSTN VEGF-B ja VEGF-B+Pro-MSTN) välisiä eroja lihassolutyypeissä, lihastumien määrässä sekä lihassolujen poikkipinta-aloissa.

7.1 Keskeiset tulokset

Tutkimuksen päätulokset olivat

(1) Tyypin IIB lihassolujen poikkipinta-ala (μm) kasvoi kontrolliryhmän (CTRL) ja yhdistelmäryhmän (VEGF-B+PRO+MSTN) välillä, sekä PRO-MSTN ja yhdistelmäryhmä välillä. Lihassolun poikkipinta-alan kasvua tapahtui myös muiden kuin tyypin IIB lihassolujen kohdalla merkitsevästi ryhmien CTRL ja yhdistelmäryhmän välillä sekä PRO-MSTN ja yhdistelmäryhmän välillä. Lihaskasvua tapahtui myös VEGF-B ja yhdistelmäryhmän välillä.

(2) Lihassolujen tumien määrässä ei havaittu merkitseviä eroja tyypin IIB tai eri ryhmien välillä.

(3) Lihassolujakauma ei muuttunut millään koeryhmällä verrattuna kontrolliryhmään. Tyypin IIB lihassolut olivat suurempia kuin muun tyypin lihassolut, ja tyypin IIB lihassoluja oli noin kolmasosa kaikista soluista.

(4) Sekä IIB, että muiden lihassolujen absoluuttisessa eikä suhteellisessa määrässä havaittu merkitseviä eroja ryhmien välillä.

Seuraavaksi käsitellään päätuloksia tarkemmin pohtimalla niiden luotettavuutta ja vertaillaan saatuja tuloksia aikaisempaan tutkimustietoon.

7.1.1 Lihassolujen poikkipinta-alat ryhmittäin ja solutyypeittäin

Tämän tutkimuksen mukaan tyypin IIB lihassolut olivat poikkipinta-alaltaan 43,75 % suurempia kuin muun tyypin lihassolut. Parry & Wilkinson (1990) ovat raportoineet omassa tutkimuksessaan aiemmin, että tyypin IIB lihassolut olivat jopa 56,31 % prosenttia suurempia, kuin muun tyypin lihassolut. Lihassolujen kokoeroja havaittiin lihassolutyypien lisäksi eri ryhmien välillä, vaikkei kaikki tulokset olleetkaan tilastollisesti merkitseviä. Seuraavaksi tarkastellaan tarkemmin tyypin IIB ja muiden lihassolujen poikkipinta-aloissa tapahtuneita muutoksia ja niihin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä eri tutkimusryhmien välillä.

Tyypin IIB soluissa lihassolun poikkipinta-alat kasvoivat kaikissa ryhmissä kontrolliryhmään verrattuna, mutta ainoastaan tilastollisesti merkitseviä kokoeroja nähtiin kontrolliryhmän ja yhdistelmäryhmän (CTRL ja VEGF-B+PRO-MSTN) sekä Pro-MSTN ja yhdistelmäryhmän välillä (PRO-MSTN ja VEGF-B+PRO-MSTN). Suurimpia solut olivat yhdistelmäryhmän (VEGF-B+PRO-MSTN) hiirillä, jossa keskimääräinen solukoko oli 3255,75 μm . Yhdistelmäryhmän hiirten solukoko oli 21,44 % suurempi kuin kontrolliryhmän hiirillä. Myös Pro-MSTN ryhmän ja yhdistelmäryhmän välillä havaittiin tilastollista eroavaisuutta ja yhdistelmäryhmän hiirten solukoot, olivat 19,53 % suurempia kuin Pro-MSTN ryhmässä.

Aiemmin on raportoitu, että myostatiinipropeptidi hoidolla hiirten TA lihaksen paino lisääntyi tilastollisesti merkitsevästi neljän (4) kuukauden hoitojakson aikana. Painon lisäys tapahtui nimenomaan hypertrofian vuoksi. Samassa tutkimuksessa tutkittiin lisäksi sydämen kokoa ja selvisi, että myostatiinipropeptidi hoidolla ei ollut vaikutusta sydänlihaksen koon kasvuun. (Qiao ym. 2008) Lee & McPherron (2001) tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että myostatiinia voidaan estää korkealla konsentraatiolla myostatiinin propeptidia. Myös heidän tutkimuksissaan siirtogeenisillä hiirillä, joille annettiin myostatiinin omaa propeptidiä, lihasmassa kasvoi erittäin merkitsevästi. Blaauw ym. (2013) lisäävät, että sama lihassolutyypin voi olla erikokoinen eri lihaksissa ja sen koko voi muuttua hypertrofian tai atrofian vaikutuksesta. Lihassolujen koko perustuu tasapainoiluun proteiinien syntetisoinnin ja hajoamisen välillä. Tutkimuksessamme lihassolujen poikkipinta-alat kasvoivat Pro-MSTN käsittelyllä ainoastaan lähes merkitsevästi, kun taas aiemmin tulokset ovat olleet merkitseviä tai erittäin merkitseviä. Tämän tutkimuksen kesto oli vain neljä viikkoa, kun useimmissa aiemmissa se on ollut selvästi pitempi. Saamaamme tulokseen saattaa vaikuttaa myös

heikentynyt lihaskudoksen laatu. Joissain mikroskooppikuvissa huomattiin solun sisäistä artefaktaa sekä solukalvon epätasaisuutta. On mahdollista, että lihassolukalvot eivät ole olleet kaikissa leikkeissä täysin ehjiä ja laadukkaita, jolloin solukalvoissa on voinut olla aukkoja ja solun sisäinen ja ulkoinen materiaali on sekoittunut. Tämä selittäisi alhaista poikkipinta-alan kasvua.

Vaikka lihassolujen poikkipinta-ala ei kasvanut tilastollisesti merkitsevästi Pro-MSTN-hoidolla, lihasten kokonaispaino kasvoi merkitsevästi. Mahdollisia syitä sille, ettei lihassolujen poikkipinta-alat kasvaneet tutkimuksen aikana voi olla tutkimuksessa käytetty hoitoannoksen määrä, tutkimuksen kesto tai todennäköisesti alhainen tilastollinen voima. Mikäli hiiristä olisi otettu useampi näyte TA lihaksesta tilastollista voimaa olisi saatu kasvatettua useammalla analysoidulla näytteellä. On myös hyvä muistaa, että tuloksiin vaikuttaa TA lihaksesta otetun näytteen sijainti. Useammista eri kohdista TA lihasta otetuista poikkileikkeistä olisi todennäköisesti saatu erilaisia tuloksia. TA lihasten absoluuttinen massa kasvoi tutkimuksen aikana annettujen geenihoidosten seurauksena, vaikkei tämän tutkimuksen mukaan lihassolujen koko kasvanutkaan merkitsevästi. Tämä tutkimus ei kerro sitä, mistä painon lisäys johtui.

Hiiriin injisoitiin alun perin verisuonikasvutekijä B:tä ja tarkoituksena oli tutkia lihaskudoksen kapillaareja paikantamalla verisuonten endoteelisoluja. Kuten tiedetään, VEGF-B ei stimuloi suoraan verisuonten angiogeneesiä vaan verisuonten endoteelisolujen kasvua (Bry ym. 2014). Vasta-aineiden sopivuutta testatessa huomasimme mikroskoopilla otetuista kuvista, että verisuonimarkkeri ei toimi näytteissä ja jouduimme jättämään kapillaarien tutkimisen tutkimuksesta kokonaan pois. Näytteistä on aiemmin tehty verisuonianalyysit, jotka osoittivat, että VEGF-B aikaansai angiogeneesiä lihaksissa sekä VEGF-B että VEGF-B+Pro-MSTN ryhmissä. Lisäksi tämän tutkimuksen tuloksista käy ilmi, että VEGF-B:llä näyttää olevan lihaskudoksessa myös lievä hypertrofinen vaikutus.

Kun tarkastellaan lihaksen poikkipinta-alaa tyypin IIB lihassolujen osalta huomataan, että VEGF-B ryhmän solut olivat keskimäärin 10 % suurempia kuin kontrolliryhmän hiirillä. Myös muun tyypin lihassolujen osalta VEGF-B ryhmän solut olivat noin 10 % suurempia kuin kontrolliryhmällä. Vaikka tyypin IIB ja muiden solujen VEGF-B ryhmän hiirillä lihassolujen poikkipinta-ala kasvoi suhteessa kontrolliryhmään, tulokset eivät ole kummankaan osalta tilastollisesti merkitseviä tällä otoskoolla. Tuloksista voidaan kuitenkin päätellä, että VEGF-B indusoi lihassolujen hypertrofiaa.

Aikaisemmin VEGF-B:n merkitystä on tutkittu eniten sydämessä, jossa sillä on havaittu olevan positiivinen vaikutus sepelvaltimoiden kehitykseen (Bry ym. 2010). Tämän lisäksi sen on huomattu vaikuttavan sydämen energia-aineenvaihduntaan sekä sydämen hypertrofiaan. Rotilla tehty tutkimus osoitti, että sydämen toiminta säilyi normaalina hypertrofiasta huolimatta. Tämä tukee ajatusta siitä, että verisuonten endoteelisoluilla ja lihassoluilla on yhteismerkitys sydämessä. VEGF-B:n vaikutuksessa sydänlihaksessa aktivoitui Akt/mTORC1-signalointireitti, joka on liitetty luurankolihas kudoksessa lihassolujen kasvuun. Tämä signalointireitti aktivoituu fysiologisen hypertrofian seurauksena myös sydämessä. (Kivelä ym. 2014).

VEGF-B:tä on tutkittu sydämen lisäksi mm. jäniksen raajoissa, jossa se ei lisännyt angiogeneesiä (Rissanen ym. 2003), sekä hiiren verkkokalvon soluilla, jossa sen merkitys huomattiin solujen uusiutumiseen (Arjunan ym. 2018). Li ym. (2012) tutkimuksessa hiirille tehtiin VEGF-B geenin poisto ja VEGF-B puutoshiiret olivat terveitä ja pystyivät elämään normaaliolosuhteissa. Tiedetään, että VEGF-B:tä ilmenee luurankolihas kudoksessa, mutta sen merkitystä siellä ei vielä kunnolla tiedetä. Koska sillä on huomattu olevan hypertrofinen vaikutus sydämessä, on oletettavaa, että sillä olisi vaikutusta myös muissa metabolisesti aktiivisissa kudoksissa, kuten luurankolihas kudoksessa. Tutkimuksemme tuloksista käy ilmi, että VEGF-B:llä on vaikutusta myös luurankolihas kudoksessa. Tutkimuksemme lihassolujen koko kasvoi pelkällä VEGF-B-hoidolla noin 10 % ja vielä merkittävämpää kasvua nähtiin yhdistelmähoidon hiirillä.

VEGF-B on VEGF perheen ainoa jäsen, jolla ei ole todettu olevan suoraan angiogeneettistä vaikutusta, mutta sillä on todettu olevan antiapoptoottinen vaikutus solujen selviytymisessä estämällä apoptoosiin johtavien geenien ilmentymistä (Li ym. 2009). Nash ym. (2006) tarkentavat, että VEGF-B:n biologisesta merkityksestä tiedetään vielä hyvin vähän osaltaan siksi, että sen reseptorin VEGFR-1 signaloinnin toimintaa ei ole saatu selvitettyä. On kuitenkin viitteitä siitä, että sen reseptorilla on merkitystä erilaisissa patogeenisissä angiogeneeseissä, josta on noussut mahdollisuus käyttää sen reseptoria erilaisissa terapeuttisissa menetelmissä. Li ym. (2012) tutkimuksessa puolestaan selvisi, että VEGF-B saattaa jopa estää angiogeneesiä erityisesti patologisissa kasvaimissa. VEGF-B:llä ei näytä tällä hetkellä olevan suurta biologista merkitystä normaaliolosuhteissa, mutta sillä saattaa olla merkitystä eri sairauksien kulussa. VEGF-B:tä voidaan pitää selviytymiskasvutekijänä, joka viittaa sen terapeuttiseen arvoon

erilaisten sairauksien hoidossa, joissa kapillaariverkon tiedetään vähenevän (Li ym. 2009). Tutkimuksemme tulokset tarjoavat uutta tietoa VEGF-B:stä sen osalta, että sillä näyttää olevan biologinen merkitys myös normaaliolosuhteissa luurankolihasen kasvuun. Tuloksista ilmenee, että sillä on lievä hypertrofinen vaikutus itsessään ja vielä tehokkaampi vaikutus yhdistettynä Pro-MSTN-hoidon kanssa. Tutkimusta aiheesta on tehty vielä vähän, mutta tuloksemme viittaavat sen merkitykseen myös normaaliolosuhteissa ja tämän tyylisestä hoidosta saattaisi olla hyötyä erilaisissa lihasatrofia sairauksissa. Lisää tutkimusta aiheesta vielä kuitenkin tarvitaan.

7.1.2 Lihastumien määrä

Tässä tutkimuksessa havaittiin, että tyyppin IIB tai muun tyyppin lihassoluissa ei ryhmien välillä ollut tilastollista eroa tumien määrällä. Tumien määrä ei noussut tai laskenut merkitsevästi tutkimuksen aikana eri käsittelyjen seurauksena. Conceição ym. (2014) tekemästä katsauksesta käy ilmi, että lihassolujen tumien määrän lisäystä näyttää tapahtuvan, kun lihassolun poikkipinta-ala kasvaa ≤ 10 %, mutta johdonmukaisempaa tumien lisäystä tapahtuu hypertrofian ollessa >22 %. Lihassolujen hypertrofia on hyvin todennäköisesti välttämätöntä lihastumien lisääntymisen kannalta. Toisaalta on myös näyttöä siitä, että jo olemassa olevat lihassolujen tumat pystyvät lisäämään proteiinisynteesiä ja aiheuttavan hypertrofiaa vasteena kevyelle tai kohtalaiselle harjoittelulle. On hyvä muistaa, että jokainen lihassolun tuma kontrolloin tiettyä sytoplasmista lihaksen aluetta eikä tiedetä, ovatko tumat jakautuneet tasaisesti lihaksen pituussuunnassa. Tästä syystä on myös mahdollista, että tutkimuksiin valittuihin poikkileikkeisiin ei ole sattunut yhtään tumaa tai vastaavasti joihinkin leikkeeseen on voinut osua useampi tuma. Allen ym. (1999) kehittivät teorian ”myonuclear domain theory”, jossa jokaista lihassolun tumaa kohti on tietty määrä sytoplasmaa. Tästä johtuen uusien tumien fuusioitumisen myötä lihassolun poikkipinta-ala kasvaa vasteena lihassolun hypertrofisiin muutoksiin.

On myös tutkimusnäyttöä siitä, että iällä ja sukupuolella saattaa olla merkitystä lihassolujen tumien lisääntymisessä etenkin tyyppin II solujen osalta. Tumien määrä voi laskea iän myötä tyyppin II lihassoluissa ja voimaharjoittelu näyttää lisäävän tumien määrää nuorilla mutta ei vanhemmilla henkilöillä. (Petrella ym. 2006) Verdijk ym. (2014) tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että tyyppin II lihassolujen atrofiaan liittyy iäkkäillä satelliittisolujen määrän

väheneminen. Voimaharjoittelulla kuitenkin todettiin olevan merkittävä teho lisätä satelliittisolujen määrää sekä ehkäistä lihasatrofiaa. Conceição ym. (2014) katsauksessa puolestaan todetaan, että iällä, sukupuolella tai lihassolutyypillä ei näytä oleva vaikutusta lihassolujen tumien määrään, mutta kirjoittajat ovat samaa mieltä siitä, että voimaharjoittelu näyttää olevan tehokkaampi keino tumien lisäämiseen kuin kestävyysharjoittelu. Tutkimusnäyttö iän ja sukupuolten välillä on lihassolujen tumien ja osalta ristiriitaista. Tutkimuksessamme käytettiin 10 viikon ikäisiä hiiriä, joten ikä tuskin oli tumien määrään negatiivisesti vaikuttava tekijä. Lihassolujen tumien määrällä näyttäisi olevan kokonaisuudessaan merkittävä vaikutus lihaksen uudelleen sopeutumisprosessiin oli se sitten atrofinen tai hypertrofinen.

Tämän tutkimuksen tuloksista huomataan, että tyypin IIB lihassoluissa tumia on noin kolme kertaa enemmän (2,97), kuin muun tyypin lihassoluissa (0,99). Aikaisemmin on raportoitu hyvin samankaltaisia tuloksia tyypin IIB lihastumien määrässä solua kohti: 2,7 (Moore ym. 2018), 3,4 (Snijders 2018) 3,5 (Verdijk ym. 2013). Tumien määrää eri lihassolutyypeissä selittää osaltaan erot lihassolujen poikkipinta-aloissa. Kuten aiemmin todettiin, tiedetään, että tyypin IIB lihassolut ovat suurempia kuin tyypin I lihassolut. Tyypin IIB solut ilmentävät suurempia määriä myosiinin raskasketjun proteiinia tuottaen energiaa pääsääntöisesti glykolyysin avulla. Lihaksilla, jotka sisältävät enimmäkseen nopeita lihassoluja (IIB) tiedetään olevan vähemmän oksidatiivista kapasiteettia kuin hitailla lihassoluilla. (Hirofuji ym. 2000)

Tumien analysointimenetelmällä ja tumien merkkiaineilla on huomattu olevan merkitystä tumien määrään. Blocquiaux ym. (2020) tutkimuksessa käytettiin myös lihasolujen tumien värjäykseen PCMI vasta-ainetta, ja he huomasivat, että spesifillä tumamarkkerilla lihassolujen tumien määrä voi kasvaa jopa 15 % verrattuna tavalliseen tumien paikantamismalliin, jossa värjätään kaikki DNA (DAPI). Winje ym. (2018) lisäävät, että satelliittisoluja ja lihassolun tumia on ollut haasteellista erottaa toisistaan niiden sijainnin vuoksi, koska molemmat sijaitsevat lihassolukalvon tuntumassa, mutta ainoastaan kalvon sisäpuolella olevat tumat edistävät proteiinisynteesiä. Aikaisemmin, ilman tumien omaa markkeria lihassolujen tumat on määritelty niiden geometrisen keskustan perusteella lihassolun kalvolta, jolloin lihassolun tumaksi on laskettu ne, jotka ovat >50 % lihassolukalvon sisäpuolella. Tässäkin tutkimuksessa on mahdollista, että lihastumien määrä olisi ollut eri mikäli ne olisi analysoitu pelkän DNA merkkiaineen perusteella.

7.1.3 Lihassolujakauma

Eri ryhmien välillä ei tässä tutkimuksessa havaittu lihassolujakauman osalta. Tuloksista kuitenkin huomataan, että hiirten TA lihaksissa oli 72,58 % enemmän muita, kuin tyypin IIB soluja. Tyypin IIB lihassoluja oli 27,42 % kaikista lihassoluista. Lisäksi voidaan todeta, että eniten IIB soluja oli yhdistelmäryhmässä (32,89 %) ja vähiten kontrolliryhmässä (21,25 %), mutta ryhmien väliset erot eivät olleet merkitseviä. Etenkin yhdistelmäryhmässä ryhmän sisäinen vaihtelu oli erittäin suurta.

Hiirten TA lihasta pidetään yleisesti nopeana lihaksena sisältäen suurimman osan tyypin IIB lihassoluja (Schiaffino & Reggiani 2011). Lihassolutyypien muutokset vaihtelevat lihaksen eri osissa (syvät ja pinnalliset osat). Pinnallisten lihasten ja lihassolujen (kuten IIB lihassolut) tiedetään olevan yleisesti glykolyyttisempia, kun taas syvemmällä olevat lihakset sisältävät enemmän oksidatiivisia entsyymejä (IIA, tyypin I-lihassolut). Aikaisemmin on todettu, että suurin osa (>90 %) hiirten TA lihaksesta on tyypin IIB lihassoluja. (Parry & Wilkinson 1990) Kammoun ym. (2014) tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että hiirten TA lihaksessa on tyypin IIB lihassoluja keskimäärin 57 %. Augusto ym. (2004) tutkimus on samoilla linjoilla, että keskimäärin hiirten TA lihaksessa on eniten IIB soluja (59,68 %), mutta myös muun tyypin lihassoluja sekä hybridisoluja. Tämän tutkimuksen tulokset eivät tue aikaisempaa tutkimustietoa tyypin IIB lihassolujen määrän osalta TA lihaksessa. Tässä tutkimuksessa IIB solujen määrä TA lihaksissa vaihteli ryhmien välillä 21–33 %, kun aikaisemmissa tutkimuksissa IIB solujen määrä on ollut kaksinkertainen tuloksiimme nähden. Tämä voi johtua lihaksesta otettujen poikkileikkeiden sijainnista. Yhden poikkileikkeen osalta tehtiin johtopäätökset koko lihaksen lihassolujakaumasta, ja mikäli poikkileike olisi otettu eri kohdasta, voisi tulos olla toisenlainen. On myös hyvä muistaa, että lihassolujen sijainti vaihtelee lihaksessa ja yksilöiden lihassolutyypien välillä on suurta vaihtelua (Lexell ym. 1994).

Lihassolut kykenevät muuttamaan niiden fenotyyppiä vasteena muuttuneisiin toiminnallisiin vaatimuksiin, kuten lisääntyneeseen vai vähentyneeseen neuromuskulaariseen aktivaatioon, kilpirauhashormonien muutoksiin, ikääntymiseen tai mekaanisen kuormituksen muutoksiin (Pette & Staron 2000). Vaikka tässä tutkimuksessa ei havaittu tilastollista eroa solutyypijakaumassa, voidaan kuitenkin todeta, että yhdistelmäryhmässä oli enemmän tyypin IIB soluja kuin kontrolliryhmässä. Tämä voi viitata lihassolutyypimuutoksiin tutkimuksen

aikana. Myös VEGF-B ja Pro-MSTN ryhmissä oli enemmän tyyppin IIB lihassoluja kuin kontrolliryhmässä, joka puoltaa ajatusta lihassolutyyppien muutoksesta hitaasta nopeaan.

Lihaskudosta pidetään herkästi adaptoituvana kudoksena ja sen lihassolutyyppien muutokset perustuvat myosiinin raskasketjun (MHC) muutoksiin. Puhtaat lihassolutyyppit, kuten IIB solut ilmentävät ainoastaan yhtä MHC isoformia, kun taas hybridisolut ilmentävät kahta tai useampaa isoformia. Muutokset lihassoluissa voivat tapahtua hitaasta nopeaan tai nopeasta hitaaseen. (Pette & Staron 2000) Blaauw ym. (2013) tarkentavat, että muutokset lihassolutyypeissä heijastavat muutoksia geenien transkriptiossa, jotka johtavat solujen supistumisominaisuuksien tai metabolisen profiilin muutoksiin.

Solujen läpimitta (feret diameter) korreloi hyvin solun poikkipinta-alan tulosten kanssa, mikä oli oletettavaakin. Myös näissä tuloksissa näkyi merkitsevä kasvu yhdistelmäryhmä ja kontrolliryhmän välillä, mikä vahvistaa näyttöä yhdistelmägeeniterapian tehokkuudesta.

7.2 Tutkimuksen vahvuudet ja heikkoudet

Tutkimuksen vahvuutena oli hiirten määrä ja onnistunut geeniterapia. Vahvuutena on myös se, että hiiriä oli tarpeeksi, jotta ne pystyttiin jakamaan omiin ryhmiinsä, mutta tilastollinen teho ei kuitenkaan mahdollisesti riittänyt lihaskoon vaikutusten tutkimiseen. Kaikkien ryhmien välillä pystyttiin tekemään mielenkiintoista vertailua eri hoitomuotoja saaneiden hiirten välillä. Vahvuutta lisää kontrolliryhmän sisällyttäminen tutkimukseen. Tutkimuksen aikana kuoli ainoastaan yksi hiiri, jonka vuoksi N pysyi tarpeeksi suurena. Hiirten määrä kussakin ryhmässä oli kuitenkin suhteellisen pieni ja siksi yleistystä tutkimuksen tuloksista on vaikea tehdä.

Tutkimuksen vahvuutena on tutkimusasetelma, joka oli kokeellinen tutkimus, jonka tarkoituksena on tutkia eri ilmiöiden vaikutusta toisiinsa. Tällöin pystytään tekemään päätelmiä syy-seuraus-suhteista. Vahvuutena on myös onnistunut immunohistokemiallinen prosessi, joka sisältää kaikki vaiheet lihaksen poikkileikkauksesta värjäysten kuvantamiseen mikroskoopilla. Vahvuutta lisää tutkimuksen alkuvaiheessa tarkoin optimoidut vasta-aineet ja niiden testaus ennen varsinaista tutkimusta.

Tutkimuksen heikkoutena on käytettyjen kudokset heikentynyt laatu. Poikkileikkeistä käy ilmi, että kudokset sisälsivät jäätymisartefakteja ja haluttua verisuonidataa ei saatu tutkittua luotettavasti. Osassa näytteistä lihaksen solukalvot olivat hajonneet ja soluissa näkyi artefakteja. Tästä syystä tutkimuksesta jouduttiin jättämään verisuonidata kokonaan pois. Tutkimuksen heikkoutena on myös tutkijan vähäinen kokemus immunohistokemiallisesta menetelmästä, jolloin subjektiivisten virheiden riski on suurempi kuin kokeneemmalla tutkijalla. Lisäksi kuvien analysoinnissa käytetty kuvankäsittelyohjelma (MyoVision) oli suhteellisen uusi, joten ohjelman opettelu ja käyttö tuli opetella ennen analysointia.

MyoVision on automaattinen kuvankäsittelyohjelma, joka toisaalta myös poistaa tutkijasta riippuvaista subjektiivisuutta ja edistää analysoinnin johdonmukaisuutta. Se analysoi kuvat ilman merkittävää ihmisen panosta ja manuaalista korjausta. Tulokset riippuvat suurelta osin kudoksen kylmäsäilytyksestä ja histologisen leikkauksen laadusta; jäätyksen vaurioittama kudos ja / tai huono leikkaus saattavat aiheuttaa virheellisiä tuloksia. MyoVisionin suurin heikkous on sen herkkyys alkuperäisen kuvan laadulle, josta se analysoi tulokset. Huonontuneet fluoresenssisignaalit voivat vahingoittaa ohjelmiston tarkkuutta ja näytteen herkkä värjäytyminen saattaa estää solun tarkan havaitsemisen. Ohjelmisto ei salli solujen ääriviivojen manuaalista lisäämistä ja /tai muuttamista. Siksi tarkkojen tulosten saavuttamiseksi vaaditaan korkealaatuisia tulokuvia. (Wen ym. 2018)

7.3 Johtopäätökset

Tässä tutkimuksessa hiirten TA lihasten paino nousi merkitsevästi ryhmien CTRL ja Pro-MSTN sekä VEGF-B ja yhdistelmäryhmän välillä. Erittäin merkitsevästi TA lihasten paino nousi kontrolli- ja yhdistelmäryhmän välillä sekä VEGF-B ja yhdistelmäryhmien välillä. Yhdistelmähoitoa saaneiden hiirten TA lihakset olivat 31,9 % painavampia kuin kontrolliryhmän hiirillä. Tässä tutkimuksessa ei käy kuitenkaan ilmi, mistä lihasten painon lisäys johtui.

Lihassolujen poikkipinta-alat olivat odotetusti suurempia tyypin IIB lihassolujen osalta. Toisin kuin odotettiin, lihassolujen poikkipinta-alat eivät kasvaneet merkitsevästi tutkimuksen aikana Pro-MSTN-hoidolla. Merkitseviä tuloksia saatiin tyypin IIB solujen osalta kontrolliryhmän ja yhdistelmäryhmän välillä sekä Pro-MSTN ja yhdistelmäryhmän välillä. Muun tyypin

lihassoluissa poikkipinta-alan kasvu oli merkitsevää kontrolliryhmän ja yhdistelmätyhmän sekä Pro-MSTN ja yhdistelmäryhmän välillä. VEGF-B:n yhteyttä luurankolihasolujen hypertrofiaan on tutkittu aiemmin vain hyvin vähän. Tutkimuksemme paljastaa, että VEGF-B:llä on vaikutusta lihassolujen poikkipinta-alaan. Sekä tyypin IIB, että muun tyypin lihassoluissa VEGF-B ryhmän hiirillä lihassolujen koko kasvoi noin 10 % kontrolliryhmään verrattuna. On hyvä muistaa, että kyseessä on kokeellinen tutkimus eikä sen perusteella tuloksista voida vetää yleisiä päätelmiä. Tulokset antavat kuitenkin viitteitä VEGF-B:n merkittävydestä mahdollisena terapeutisena hoitomuotona erilaisiin lihassairauksiin mutta lisää tutkimusta aiheesta tarvitaan.

Lihassolujakauman osalta tutkimuksen aikana ei havaittu merkitseviä muutoksia tyypin IIB tai muun tyypin lihassolujen välillä. Tuloksista kuitenkin nähdään, että yhdistelmäryhmässä oli enemmän tyypin IIB lihassoluja kuin kontrolliryhmässä, joten pieniä solutyypimuutoksia hitaasta nopeaan mahdollisesti tapahtui. Tutkimuksen tulokset lihassolujakauman osalta ovat ristiriidassa aiemmin tutkittuun, sillä hiirten TA lihaksesta ainoastaan 27,42 % oli tyypin IIB lihassoluja, kun aiemmin on raportoitu suurimman osan (>50 %) olevan tyypin IIB lihassoluja.

Tutkimuksen aikana lihassolujen tumien määrässä ei tapahtunut merkitseviä muutoksia lihassolutyypien tai ryhmien välillä. Tumien määrä lihassolutyyppejä kohden tukee aiemmin raportoituja tuloksia, sillä tyypin IIB lihassoluissa tumia oli keskimäärin kolme kertaa enemmän kuin muun tyypin lihassoluissa.

LÄHTEET

- Allen, D. L. Roy, R. R. & Edgerton, V. R. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve*. 22 (10), 1350-1360. Doi: 10.1002/(sici)1097-4598(199910)22:10<1350::aid-mus3>3.0.co;2-8.
- Al-Zaidy, S. A. Sahenk, Z. Rodino-Klapac, L. R. Kaspar, B. Mendell, J. R. (2015). Follistatin Gene Therapy Improves Ambulation in Becker Muscular Dystrophy. *Journal of Neuromuscul Diseases*. 2 (3), 185-192. Doi:10.3233/JND-150083.
- Attisano, L. & Wrana, J. L. (2002). Signal Transduction by the TGF- β Superfamily. *Science*. 296 (5573), 1646-1647. Doi: 10.1126/science.1071809. Doi: 10.1126/science.1071809.
- Augusto, V. Padovani, C. R. & Campos, G. E. R. (2004). Skeletal Muscle Fiber Types in C57BL6J Mice. *Journal of Morphological Sciences*. 21 (2), 89-94.
- Blaauw, B Schiaffino, S. & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*. 3 (4), 1645-1687. Doi: 10.1002/cphy.c130009.
- Bloise, E. Ciarmela, P. Dela Cruz, C. Luisi, S. Petraglia, F. Reis, F. (2018). Activin A in Mammalian Physiology. *Physiological Reviews*. 99 (1), 739-780. Doi: 10.1152/physrev.00002.
- Blocquiaux, S. Gorski, T. Van Roie, E. Ramaekers, M. Van Thienen, R. Nielens, H. Delecluse, C. De Bock, K. & Thomis, M. (2020). The effect of resistance training, detraining and retraining on muscle strength and power, myofibre size, satellite cells and myonuclei in older men. *Experimental Gerontology*. 133 (110860). Doi: 10.1016/j.exger.2020.110860.
- Bry, M. Kivelä, R. Holopainen, T. Anisimov, A. Tammela, T. Soronen, J. Silvola, J. Saraste, A. Jeltsch, M. Korpisalo, P. Carmeliet, P. Lemström, K. B. Shibuya, M. Ylä-Herttuala, S. Alhonen, L. Mervaala, E. Andersson, L. C. Knuuti, J. & Alitalo, K. (2010). Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation. *Circulation*. 122 (17), 1725-1733. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.957332.
- Bry, M. Kivelä, R. Leppänen, V. M. & Alitalo, K. (2014). Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiological Reviews*. 94 (3), 779-794. Doi: 10.1152/physrev.00028.2013.
- Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor- β superfamily of receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 15 (1), 1-11. Doi: 10.1016/j.cytogfr.2003.10.004.

- Chamberlain, J. S. (2022). A boost for muscle with gene therapy. *The New England Journal of Medicine*. 386, 1184-1186. Doi: 10.1056/NEJMcibr2118576.
- Chen, J. Walton, K. Hagg, A. Colgan, T. Johnson, K. Gian, H. Gregorevic, P. & Harrison, C. (2017). Specific targeting of TGF- β family ligands demonstrates distinct roles in the regulation of muscle mass in health and disease. *PNAS*, 114 (26), 5266-5275. Doi: 10.1073/pnas.1620013114.
- Chen, M-M. Zhao, Yi-Ping. Zhao, Y. Deng, S-L. & Yu, K. (2021). Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9, 785712. Doi: 10.3389/fcell.2021.785712.
- Chen, R. Lee, C. Lin, X. Zhao, C. & Li, X. (2019). Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. *Pharmacological Research*. 143, 33-39. Doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.002.
- Conceição, M. S. Vechin, F. C, Lixandrão, M. Damas, F. Libardi, C. A. Tricoli, V. Roschel, H. Camera, D. & Ugrinowitsch, C. (2018). Muscle Fiber Hypertrophy and Myonuclei Addition: A Systematic Review and Meta-analysis. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 50 (7), 1385-1393. Doi: 10.1249/MSS.0000000000001593.
- Egerman, M. A. & Glass, D. J. (2013). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49 (1), 59-68. Doi: 10.3109/10409238.2013.857291.
- Fan, W. Atkins, A. R. Yu, R. T. Downes, M. & Evans, R. M. (2013). Road to Exercise Mimetics: Targeting Nuclear Receptors in Skeletal Muscle. *Journal of Molecular Biology*. 51 (3), 87-100. Doi: 10.1530/JME-13-0258.
- Foster, K. Graham, I. Otto, A. Foster, H. Trollet, C. Yaworsky, P. Walsh, F. Bickham, D. Curtin, N. Kavar, S. Patel, K. & Dickson, G. (2009). Adeno-associated virus-8-mediated intravenous transfer of myostatin propeptide leads to systemic functional improvements of slow but not fast muscle. *Rejuvenation Research*, 12 (2), 85-94. Doi: 10.1089/rej.2008.0815. PMID: 19405813.
- Gao F. Kishida T. Ejima, A. Gojo, S. & Mazda, O. (2013). Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 431 (2), 309-314. Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.105.
- Gilson H. Schakman O. Kalista S. Lause P. Tsuchida, K. & Thissen, J. P. (2009) Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both

- myostatin and activin. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 297 (1), 157-164. Doi:10.1152/ajpendo.00193.2009.
- Gubert, C. & Hannan, A. J. (2021). Exercise mimetics: harnessing the therapeutic effects of physical activity. *Nature*, 20, 862-879. Doi: 10.1038/s41573-021-00217-1.
- Hagberg, C. E. Falkevall, A. Wang, X. Larsson, E. Huusko, J. Nilsson, I. van Meeteren, L. A. Samén, E. Lu, L. Vanwildemeersch, M. Klar, J. Genove, G. Pietars, K. Stone-Elander, S. Claesson-Welsh, L. Ylä-Herttuala, S. Lindahl, P. & Eriksson, U. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*. 464, 917-921. Doi:10.1038/nature08945.
- Hagberg, C. E. Mehlem, A. Falkevall, A. Muhl, L. Fam, B. C. Ortsäter, H. Scotney, P. Nyqvist, D. Samén, E. Lu, L. Stone-Elander, S. Proietto, J. Andrikopoulos, S. Sjöholm, Å. Nash, A. & Eriksson, U. (2012). Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 490, 426-430. Doi:10.1038/nature11464.
- Han, H. Q. Zhou, X. Mitch, W. E. & Goldberg, A. L. (2013). Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 45 (10), 2333-2347. Doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.019.
- Hawley, J. A. & Holloszy, J. O. (2009). Exercise; it's a real thing!. *Nutrition reviews*. 3 (1), 172–178. Doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00185.x.
- Hill, J. J., Davies, M. V., Pearson, A. A., Wang, J. H., Hewick, R. M., Wolfman, N. M., & Qiu, Y. (2002). The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (43), 40735-40741. doi: 10.1074/jbc.M206379200.
- Hirofujii, C. Nakatani, T. Ishihara, A. Tanaka, M. Itoh, K. Itoh, M. Katsuta, S. & Ibata, Y. (2000). Cell Size and Succinate Dehydrogenase Activity of Different Types of Fibers in Different Regions of the Tibialis Anterior Muscle in Mice and Rats. *Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry*. 33 (4), 295-303. Doi: 10.1267/ahc.33.295.
- Huang, Z., Chen, X., & Chen, D. (2011). Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular Signalling*. 23 (9), 1441-1446. Doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.003.
- Huey, K. A. (2018). Potential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor During Skeletal Muscle Hypertrophy. *Exercise and Sport Science Reviews*. 46 (3), 195-202. Doi: 10.1249/JES.0000000000000152.
- Hulmi, J. J. Oliveira, B. M. Silvennoinen, M. Hoogaars, W. M. Ma, H. Pierre, P. Pasternack, A. Kainulainen, H. & Ritvos, O. (2013). Muscle protein synthesis,

- mTORC1/MAPK/Hippo signaling, and capillary density are altered by blocking of myostatin and activins. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 304 (1), 41-50. Doi: 10.1152/ajpendo.00389.2012.
- Jorgenson, K. W. Phillips, S. M. & Hornberger, T. A. (2020). Identifying the Structural Adaptations that Drive the Mechanical Load-Induced Growth of Skeletal Muscle. *Cells*. 9 (7), 1658. Doi: 10.3390/cells9071658.
- Kammoun, M. Cassar-Malek, I. Meunier, B. & Picard, B. (2014). A Simplified Immunohistochemical Classification of Skeletal Muscle Fibres in Mouse. *European Journal of Histochemistry*. 58 (2), 2254. Doi: 10.4081/ejh.2014.2254.
- Kivelä, R. Bry, M. Robciuc, M. R. Räsänen, M. Taavitsainen, M. Silvola, J. Saraste, A. Hulmi, J. Anisimov, A. Mäyränpää, M. Lindeman, J. Eklund, L. Hellberg, S. Hlushchuk, R. Zhuang, Z. Simons, M. Djonov, V. Knuuti, J. Mervaala, E. & Alitalo, K. (2014). VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart. *EMBO Molecular Medicine*. 6 (3), 307-321. Doi: 10.1002/emmm.201303147.
- Kollias, H. & McDermott, J. (2008). Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 104 (3), 579-587. Doi: 10.1152/jappphysiol.01091.2007.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular Pathology* 54 (5), 311-316. Doi: 10.1136/mp.54.5.311.
- Lee, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. (2004). *Annual review of Cell and Developmental Biology*. 20, 61-86. Doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.012103.135836.
- Lee, S. J. & McPherron, A. C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (16), 9306-9311. Doi:10.1073/pnas.151270098.
- Lexell, J. Jarvis, J. C. Currie, J. Downham, D. Y. & Salmons, S. (1994). Fibre type composition of rabbit tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. *Journal of Anatomy*. 185 (1), 95-101.
- Li, X. (2010). VEGF-B: a thing of beauty. *Cell Research*. 20, 741-744. Doi: 10.1038/cr.2010.77.
- Li, X. Lee, C. Tang, Z. Zhang, F. Arjunan, P. Li, Y. Hou, X. Kumar, A. & Dong, L. (2009). VEGF-B: A survival, or an angiogenic factor? *Cell Adhesion & Migration*. 3 (4), 322-327. Doi: 10.4161/cam.3.4.9459.

- Li, X. Kumar, A. Zhang, F. Lee, C. & Tang, Z. (2012). Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends in Molecular Medicine*. 18 (2), 119-127. Doi: 10.1016/j.molmed.2011.11.006.
- Li, S. Li, S. Wang, L. Quan, H. Yu, W. Li, T. & Li W. (2022) The Effect of Blood Flow Restriction Exercise on Angiogenesis-Related Factors in Skeletal Muscle Among Healthy Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Physiology*. 17 (13), 814965. Doi: 10.3389/fphys.2022.814965.
- Lähtenvuo, J. E. Lähtenvuo, M. T. Kivelä, A. Rosenlew, C. Falkevall, A. Klar, J. Heikura, T. Rissanen, T. T. Vähäkangas, E. Korpisalo, P. Enholm, B. Carmeliet, P. Alitalo, K. Eriksson, U. & Ylä-Herttuala, S. (2009). Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. *Circulation*. 119 (6), 845-856. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816454.
- McFarlane, C. Hui, G. Z. Amanda, W. Lau, H. Lokireddy, S. XiaoJia, G. Mouly, V. Butler-Browne, G. Gluckman, P. D. Sharma, M. Kambadur, R. (2011). Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 301 (1), 195-203. Doi: 10.1152/ajpcell.00012.2011.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90. Doi: 10.1038/387083a0.
- McPherron A. C. & Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 94 (23), 12457-12461. Doi: 10.1073/pnas.94.23.12457.
- Matsakas, A. Foster, K. Otto, A. Macharia, R. Elashry, M. Feist, S. Graham, I. Foster, H. Yaworsky, P. Walsh, F. Dickson, G. & Patel, K. (2009). Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. *Neuromuscular Disorders*, 19 (7), 489-499. Doi: 10.1016/j.nmd.2009.06.367.
- Moore, D. R. Kelly, R. P. Devries, M. C. Churchward-Venne, T. A. Phillips, S. M. Parise, G. & Johnston, A. P. (2018). Low-load resistance exercise during inactivity is associated with greater fibre area and satellite cell expression in older skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 9 (4), 747-754. Doi: 10.1002/jcsm.12306.
- Mouisel, E. Relizani, K. Mille-Hamard, L. Denis, R. Hourdé, C. Agbulut, O. Patel, K. Arandel, L. Morales-Gonzalez, S. Vignaud, A. Garcia, L. Ferry, A. Luquet, S. Billat, V. Ventura-Clapier, R. Schuelke, M. & Amthor, H. (2014). Myostatin is a key mediator between

- energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *American Journal of Physiology*. 307 (4), 444-454. Doi: 10.1152/ajpregu.00377.2013.
- Nash, A. D. Baca, M. Wright, C. & Scotney, P. D. (2006). The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 19 (1), 61-69. Doi: 10.1016/j.pupt.2005.02.007.
- Olfert, I. M. Baum, O. Hellsten, Y. & Egginton, S. (2016). Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *American journal of physiology, Heart and circulatory physiology*. 310 (3), 326–336. Doi:10.1152/ajpheart.00635.2015.
- Olofsson, B. Jeltsch, M. Eriksson, U. & Alitalo, K. (1999). Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Current Opinion in technology*. 39 (6), 528–535. Doi: 10.1016/s0958-1669(99)00024-5.
- Olofsson, B. Pajusola, K. Kaipainen, A. von Euler, G. Joukov, V. Saksela, O. Orpana, A. Pettersson, R. F. Alitalo, K. & Eriksson, U. (1996) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (6), 2576–2581. Doi:10.1073/pnas.93.6.2576.
- Olofsson, B. Korpelainen, E. Pepper, M. S. Mandriota, S. J. Aase, K. Kumar, V. Gunji, Y. Jeltsch, M. M. Shibuya, M. Alitalo, K. & Eriksson, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (20), 11709–11714. Doi:10.1073/pnas.95.20.11709.
- Pajusola, K. Künnapuu, J. Vuorikoski, S. Soronen, J. André, H. Pereira, T. Korpisalo, P. Ylä-Herttuala, S. Poellinger. L. & Alitalo, K. (2015). Stabilized HIF-1 α is superior to VEGF for angiogenesis in skeletal muscle via adeno-associated virus gene transfer. *The FASEB Journal*. 19 (10), 1365-1367. Doi: 10.1096/fj.05-3720fje.
- Parfenova, O. K. Kukes, V. G. Grishin, D. V. (2021). Follistatin-Like Proteins: Structure, Functions and Biomedical Importance. *Biomedicines*. 9 (8), 999. Doi: 10.3390/biomedicines9080999.
- Parry, D. J. & Wilkinson, R. S. (1990). The effect of reinnervation on the distribution of muscle fibre types in the tibialis anterior muscle of the mouse. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 68, 596-602. Doi: 10.1139/y90-086.
- Patel, K. & Amthor, H. (2005). The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade—new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*. (15) 2, 117-126. Doi: 10.1016/j.nmd.2004.10.018.

- Petrella, J. K. Kim, J. Cross, J. M. Kosek, D. J. & Bamman, M. M. (2006). Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. 291 (5), 937-946. Doi: 10.1152/ajpendo.00190.2006.
- Pette, D. & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*. 50 (6), 500-509. Doi: 10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7.
- Piek, E. Heldin, C-H. & Dijke, P. T. (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *The FASEB Journal*. 13 (15), 2105-224. Doi: 10.1096/fasebj.13.15.2105.
- Pawlikowski, B. Vogler, T. Gadek, K. & Olwin, B. (2017). Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Developmental Dynamics*. 246 (5), 359-367. Doi: 10.1002/dvdy.24495.
- Qiao, C. Li, J. Jiang, J. Zhu, X. Wang, B. Li, J. & Xiao, X. (2008). Myostatin Propeptide Gene Delivery by Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors Enhances Muscle Growth and Ameliorates Dystrophic Phenotypes in mdx Mice. *Human Gene Therapy*. 19 (3), 241-254. Doi: 10.1089/hum.2007.159.
- Relizani, K. Mouisel, E. Giannesini, B. Hourdé, C. Patel, K. Morales Gonzalez, S. Jülich, K. Vignaud, A. Piétri-Rouxel, F. Fortin, D. Garcia, L. Blot, S. Ritvos, O. Bendahan, D. Ferry, A. Ventura-Clapier, R. Schuelke, M. & Amthor, H. (2014). Blockade of ActRIIB signaling triggers muscle fatigability and metabolic myopathy. *Molecular Therapy*. 22 (8), 1423-1433. Doi: 10.1038/mt.2014.90.
- Roberts, A. B. Flanders, K. C. Heine U. I. Jakowlew, S. Kondaiah, P. Kim, S. J. & Sporn, M. B. (1990). Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*. 327 (1239), 145–154. Doi: 10.1098/rstb.1990.0050.
- Roberts, A. B. Manzano, M. A. Lanch, L. C. Smith, J. M. & Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78, 5339–5343. Doi: 10.1073/pnas.78.9.5339.
- Rodriguez, J. Vernus, B. Chelh, I. Cassar-Malek, I. Gabillard, J. C. Hadj Sassi, A. Seiliez, I. Picard, B. & Bonnieu, A. (2014). Myostatin and skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 4361-4371. Doi: 10.1007/s00018-014-1689-x.

- Räsänen, M. Degerman, J. Nissinen, T. A. Miinalainen, I. Kerkelä, R. Siltanen, A. Backman, J. T. Mervaala, E. Hulmi, J. J. Kivelä, R. & Alitalo, K. (2016). VEGF-B gene therapy inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by endothelial protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113 (46), 13144-13149. Doi: 10.1073/pnas.1616168113.
- Schiaffino, S. & Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*. 94 (1), 1447-1531. Doi: 10.1152/physrev.00031.2010.
- Schiaffino, S. Dyar, K. A. Cicillot, S. Blaauw. B. & Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS Journal*. 280 (17), 4294-4314. Doi: 10.1111/febs.12253.
- Shahryari, A., Burtscher, I., Nazari, Z. & Lickert, H. (2021). Engineering Gene Therapy: Advances and Barriers. *Advanced Therapeutics*. 4 (9), 2100040. Doi: 10.1002/adtp.202100040.
- Sharma, M. Kambadur, R. Matthews, K. G. Somers, W. G. Devlin, G. P. Conaglen, J. V. Fowke, P. J. & Bass, J. J. (1999). Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cellular Physiology*. 21, 1-9. Doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-V.
- Seachrist, D. D. & Keri, R. A. (2019) The Activin Social Network: Activin, Inhibin, and Follistatin in Breast Development and Cancer. *Endocrinology*. 160 (5), 1097–1110. Doi: 10.1210/en.2019-00015.
- Snijders, T. Bell, K. Nederveen, J. Saddler, N. Mazara, N. Kumbhare, D. A. Phillips, S. M. & Parise, G. (2018). Ingestion of a Multi-Ingredient Supplement Does Not Alter Exercise-Induced Satellite Cell Responses in Older Men. *The Journal of Nutrition*. 148 (6), 891-899. Doi:10.1093/jn/nxy063.
- St Andre, M. Johnson, M. Bansal, P. N. Wellen, J. Robertson, A. Opsahl, A. Burch, P. M. Bialek, P. Morris, C. & Owens, J. (2017). A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monkeys. *Skeletal muscle*. 7 (1), 25. Doi:10.1186/s13395-017-0141-y.
- Tammela, T. Enholm, B. Alitalo, K. & Paavonen, K. (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*. 65 (3), 550–563. Doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.002.

- Thies, R. S. Chen, T. Davies, M. V. Tomkinson, K. N. Pearson, A. A. Shakey, Q. A. & Wolfman, N. M. (2001). GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*. 18 (4), 251-259. Doi: 10.3109/08977190109029114.
- Verbrugge, S. Schönfelder, M. Becker, L. Yaghoob Nezhad, F. Hrabě de Angelis, M. & Wackerhage, H. (2018). Genes Whose Gain or Loss-Of-Function Increases Skeletal Muscle Mass in Mice: A Systematic Literature Review. *Frontiers in physiology*. 9 (553). doi: 10.3389/fphys.2018.00553.
- Verdijk, L. B. Snijders, T. Drost, M. Delhaas, T. Kadi, F. & van Loon, L. J. (2014). Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr)*. 36 (2), 545-557. Doi: 10.1007/s11357-013-9583-2.
- Wackerhage, H. Schoenfeld, B. J. Hamilton, D. L. Lehti, M. & Hulmi, J. J. (2019). Stimuli and sensors that initiate skeletal muscle hypertrophy following resistance exercise. *Journal of Applied Physiology*. 126, (1), 30-43. Doi: 10.1152/jappphysiol.00685.2018.
- Walther, W. & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*. 60 (2), 249-271. Doi:10.2165/00003495-200060020-00002.
- Wang, K. Li, Z. Li, Y. Zeng, J. He, C. Yang, J. Liu, D. & Wu, Z. (2013). Muscle-specific transgenic expression of porcine myostatin propeptide enhances muscle growth in mice. *Transgenic Research*. 22 (5), 1011–1019. Doi:10.1007/s11248-013-9709-4.
- Wartiovaara, K. (2021). Geenihoidojen menetelmät ja kliininen käyttö. *Duodecim*. 137 (8), 845-851.
- Winje, I. M. Bengtsen, M. Eftestøl, E. Juvkam, I. Bruusgaard, J. C. & Gundersen, K. (2018). Specific labelling of myonuclei by an antibody against pericentriolar material 1 on skeletal muscle tissue sections. *Acta Physiologica*. 223 (4). Doi: 10.1111/apha.13034.
- Wisløff, U., Najjar, S. M., Ellingsen, O., Haram, P. M., Swoap, S., Al-Share, Q., Fernström, M., Rezaei, K., Lee, S. J., Koch, L. G. & Britton, S. L. (2005). Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*. 307 (5708), 418-420. Doi: 10.1126/science.1108177.
- Ylä-Herttuala, S. & Alitalo, K. (2003). Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nature Medicine*. 9, 694-701. Doi: 10.1038/nm0603-694
- Yoshida, T. & Delafontaine, P. (2020). Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. 9 (9), 1970. doi:10.3390/cells9091970.