

**PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA JA SEN TUTKIMINEN  
ISOTOOPPI-INFUUSIO -MENETELMÄLLÄ**

**Tarja Nykänen**

Pro gradu –tutkielma

Liikuntafysiologia

Jyväskylän yliopisto

Liikuntabiologian laitos

Työn ohjaajat: Antti Mero

ja Keijo Häkkinen

Syksy 2001

## TIIVISTELMÄ

Tarja Nykänen, 2001. Proteiiniaineenvaihdunta ja sen tutkiminen isotooppi-infuusio -menetelmällä. Liikuntafysiologian pro gradu -tutkielma. Jyväskylän yliopisto, liikuntabiologian laitos. 74s.

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia proteiiniaineenvaihdunnan tutkimuksessa käytettävän isotooppi-infuusio -menetelmän toistettavuutta ja tarkkuutta sekä osoittaa sitä käyttäen maksimivoimaharjoituksen aiheuttavan muutoksen proteiiniaineenvaihdunnan muuttujissa. Menetelmä perustuu kolmiollasmalliin, joka kuvaa aminohappojen liikettä kolmen eri aminohappoaltaan; valtimon, laskimon ja lihaksen välillä. Menetelmässä koehenkilöön infusoidaan suonensisäisesti isotoopilla leimattua aminohappoa.

Lepomittauksessa koehenkilöihin (n=4) infusoitiin  $^2\text{H}_5$  leimattua fenyylialaniinia ja verinäytteitä (2 x 2 ml) alettiin kerätä valtimo- ja laskimokatetreista 135 minuuttia infuusion aloittamisesta 10 minuutin välein yhteensä neljä. Viimeisen verinäytteen jälkeen otettiin lihasnäyte. Toinen vastaava mittausjakso aloitettiin 270 minuuttia infuusion aloittamisesta. Jokainen verinäyte analysoitiin kahteen kertaan ja GC/MS mittasi näytteen isotooppikertymän kahdesti. Voimaharjoitusmittauksessa (n=4) alaraajojen lihaksistoa kuormittava hypertrofinen maksimivoima-tyyppinen voimaharjoitus tehtiin ennen ensimmäisiä verinäytteitä. Kolmiollasmalliin perustuen valtimo-, laskimo- ja lihasnäytteistä laskettiin proteiinien synteessin, hajoamisen ja nettotilanteen arvot suhteutettuna veren virtausnopeuteen ja jalan tilavuuteen. Nettotilanne tarkoittaa synteessin ja hajoamisen välistä erotusta.

Lepomittauksessa mittausjakson 1 (135-165 minuuttia) proteiinien synteesi, hajoaminen tai nettoarvo eivät eronneet mittausjaksosta 2 (270-300 minuuttia). Rinnakkaisten näytesarjojen välillä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää eroa missään proteiiniaineenvaihdunnan muuttujassa. Mittausjaksojen ja näytesarjojen variaatiokerroin vaihteli 5-70 %. Voimaharjoitus kiihdytti proteiinien synteesiä ( $p<0.05$ ) ja hajoamista ( $p<0.05$ ) mutta ei vaikuttanut nettoarvoon mittausjaksolla 1. Välivaiheiden fenyylialaniinin kertymä- ja pitoisuusarvoissa esiintyi systemaattista virhettä näytesarjojen välillä. Voimaharjoitus aiheutti tilastollisesti merkitsevää eroa laskimon pitoisuusarvoissa ( $p<0.01$ ) mittausjaksolla 2. Verinäytteiden rinnakkaisten GC/MS-tulosten korrelaatiokerroin oli kaikissa leporyhmän näytesarjoissa vähintään  $r=0,942$  ( $p<0.01$ ). Näytesarjojen välillä korrelaatiokerroin oli  $r=0,967$  ( $p<0.01$ ). GC/MS-tulosten variaatiokerroin oli yhtä poikkeusta lukuun ottamatta alle 10 %. Lihasnäytteiden variaatiokerroin vaihteli 1-24 % välillä.

Lopullisissa proteiiniaineenvaihdunnan muuttujissa tilastollista eroa ei ilmennyt, vaikka välivaiheiden muuttujissa esiintyi systemaattista ja satunnaisvirhettä. Maksimivoimaharjoitus kiihdytti proteiinien synteesiä ja hajoamista heti voimaharjoituksen jälkeen. Rinnakkaiset näytesarjat ja tulokset olivat yhteneväisiä. Näiden päätulosten perusteella isotooppi-infuusio -menetelmää voidaan pitää toistettavana ja tarkkana tutkimusmenetelmänä, jolla pystytään osoittamaan maksimivoimaharjoituksen aiheuttamat muutokset proteiiniaineenvaihdunnassa.

## ESIPUHE

Opinnäytetyön tekeminen on vaatinut tässä tapauksessa yli kahden vuoden työrupeaman, kolmen kuukauden työmatkan Yhdysvaltoihin ja kolme lämmintä kesäkuukautta. Välillä on hikeä pyyhitty otsalta, mutta tässä vaiheessa ollaan onneksi jo loppusuoralla.

Pro gradu -opinnäytetyöni on osa mittavaa ternimaitovalmisteprojektia. Projektin johtajana toimi professori Antti Mero, jolle kiitoksista ensimmäiset kuuluvat. Professori Mero on suurella luottamuksella työntekijöitään kohtaan mahdollistanut tämänkin työn valmistumisen. Toisen maininnan ansaitsee professori Robert R. Wolfe tutkimusryhmineen Teksasin yliopistossa Galvestonissa. Erityisesti tutkija Kevin D. Tipton ohjasi tutkimuksen suunnittelussa ja toteutuksessa oman työnsä ohessa.

Filosofian maisteri Kaisa Lahti työskenteli ansiokkaasti kanssani Galvestonissa sekä Jyväskylässä. Hänen päättäväisen ja tehokkaan työn seurauksena olen saanut tämänkin työn tulokset valmiiksi. Kiitokset menevät myös muulle projektin tutkimusryhmälle; lääkäri Olavi Keinäselle, professori Markku Alenille, Keski-Suomen keskussairaalan sisätautien teho-osaston sairaanhoitajille, proviisori Kristiina Peräkorvelle sekä Jyväskylän yliopiston liikuntalaboratorion työntekijöille, joiden kaikkien kanssa vietettiin hauskoja hetkiä totisen työn ohella.

Koehenkilöiden panos tähän työhön oli merkittävä. Ilman heidän rohkeuttaan ja kiinnostunutta asennettaan ei tämä tutkimus olisi ollut mahdollista. Heidän ennakkoluuloton asenteensa oli välttämätöntä, jotta uutta tutkimusta saadaan aikaan.

Lämmin kiitos myös lähimmille ystäväilleni ja perheelleni, jotka ovat valittamatta jaksaneet kuunnella työn edistymistä ja edistymättömyyttä. Kokonaisuudessaan projekti on ollut pitkä ja vaiheikas, jolloin ystävien ja perheen tukea on totisesti tarvittu.

Jyväskylässä 7.8. 2001

Tarja Nykänen

## KÄYTETYT LYHENTEET

GC/MS	<i>gas chromatography mass spectrometer</i>	kaasukromatografi- massaspektrometri
E	<i>enrichment</i>	kertymä
C	<i>concentration</i>	pitoisuus
TTR	<i>tracer to tracee ratio</i>	luonnollisen ja merkkiaineen välinen suhde
APE	<i>atom percent excess</i>	
IGF-1	<i>insulin-like growth factor -1</i>	insuliinin kaltainen kasvutekijä -1
t-BDMS		tertiäärinen butyyli-di- metyylisilyyli
m-RNA	<i>messenger-RNA</i>	lähetti-RNA
t-RNA	<i>transfer-RNA</i>	siirtäjä-RNA
r-RNA	<i>ribosomal-RNA</i>	ribosomaalinen RNA
IS	<i>internal standard</i>	sisäinen standardi
ICG	<i>indocyanine green</i>	indosyaaniini-väriaine
IRMS	<i>isotope ratio mass spectrometer</i>	isotooppisuhde- massaspektrometri
Ra	<i>rate of appearance</i>	esiintyvyys
Rd	<i>rate of disappearance</i>	häviäminen



# SISÄLLYS

<b>1. JOHDANTO</b>	4
<b>2. PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA</b>	4
2.1 PROTEIINIEN RAKENNE	6
2.2. PROTEIINISYNTEESI JA PROTEIINIEN HAJOAMINEN	6
2.2.1 Transskriptio	7
2.2.2 Translaatio	9
2.2.3 Proteiinien hajoaminen	9
2.3. PROTEIINIAINEENVAIHDUNTAAN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	11
2.3.1 Entsyymit	11
2.3.2 Hormonit	11
2.3.3 Ravinto	13
<b>3. PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA KUORMI- TUKSESSA</b>	15
3.1 VOIMAHARJOITUKSEN VAIKUTUS PROTEIINIAINEENVAIHDUNTAAN	15
3.2 KESTÄVYYSHARJOITUKSEN VAIKUTUS PROTEIINIAINEENVAIHDUNTAAN	17
<b>4. PROTEIINIAINEENVAIHDUNNAN TUTKIMUS- MENETELMÄT</b>	19
4.1 ISOTOOPPIEN KÄYTTÖ FYSIOLOGISISSA TUTKIMUKSISSA	19
4.1.1 Radioaktiiviset isotoopit	20
4.1.2 Stabiili-isotoopit	20
4.1.3 Jatkuva infuusio ja <i>flooding dose</i> –menetelmä	21
4.2 TYPPITASE	22
4.3 MUUT MENETELMÄT	22

<b>5. ALKUANNOS-JATKUVA INFUUSIO –MENETELMÄN</b>	
<b>PERIAATTEET</b>	23
5.1 INFUUSION PERIAATTEET	23
5.2 ALKUANNOKSEN MERKITYS	25
5.3 INFUUSIONOPEUS JA ALKUANNOKSEN KOKO PROTEIINIINLAINEENVAIHDUNNAN TUTKIMISESSA	27
<b>6. VERI- JA LIHASNÄYTTEIDEN KÄSITTELY JA</b>	
<b>MITTAAMINEN LABORATORIOSSA</b>	28
6.1 NÄYTTEIDEN KÄSITTELYN TARKOITUS	28
6.2 DERIVATISOINTI	28
6.3 MITTAAMINEN KAASUKROMATOGRAFI- MASSASPEKTROMETRILLÄ	29
<b>7. KOLMIALLASMALLI JA SIIHEN PERUSTUVAT</b>	
<b>LASKUTOIMITUKSET</b>	30
7.1 PITOISUUDEN LASKEMINEN SISÄISEN STANDARDIN MENETELMÄLLÄ	30
7.2 KORJAUSKERTOIMET	31
7.3 KOLMIALLASMALLI	32
7.4 VEREN VIRTAAUSNOPEUDEN MITTAAMINEN	34
<b>8. ISOTOOPPIMENETELMÄN ONGELMAT</b>	36
8.1 MENETELMÄN FYSIOLOGISET OLETTAMUKSET	36
8.2 VERI- JA LIHASNÄYTTEIDEN KÄSITTELY	37
8.3 VEREN VIRTAAUKSEN MITTAAMISEEN LIITTYVÄT ONGELMAT	38
8.4 MENETELMÄN TOISTETTAVUUS JA LUOTETTAVUUS	38
<b>9. TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESEIT</b>	40

<b>10. MITTAUSMENETELMÄT</b>	41
10.1 KOEHENKILÖT	41
10.2 KOEASETELMA	41
10.3 AINEISTON KERÄYS	43
10.4 AINEISTON ANALYSOINTI	46
10.5 LASKUTOIMITUKSET	47
10.6 TILASTOLLINEN KÄSITTELY	47
<b>11. TULOKSET</b>	49
11.1 PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA LEVOSSA	49
11.2 PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA VOIMA- HARJOITUKSEN JÄLKEEN	51
11.3 KERTYMÄ- JA PITOISUUSARVOT	52
11.4 GC/MS:LTÄ SAADUT ARVOT	55
<b>12. POHDINTA</b>	58
12.1 INFUUSION TOTEUTTAMINEN	58
12.2 PROTEIINIEN SYNTEESI JA HAJOAMINEN	59
12.3 VEREN VIRTAUSNOPEUS	62
12.4 KOLMIALLASMALLIIN TARVITTAVIEN VERI- NÄYTTEIDEN TULOSTEN TOISTETTAVUUS	63
12.5 KOLMIALLASMALLIIN TARVITTAVIEN LIHAS- NÄYTTEIDEN TULOSTEN TOISTETTAVUUS	66
12.6 JOHTOPÄÄTÖKSET	67
<b>LÄHTEET</b>	69
<b>LIITTEET 1-6</b>	

# 1. JOHDANTO

Proteiinien tehtävä ja aineenvaihdunta ihmisillä on hyvin monimuotoinen ja sen vuoksi proteiinien kinetiikan tutkiminen on laaja tutkimuskohde. Vaikka aineenvaihduntareitit on kartoitettu hyvinkin tarkasti (Pangborn, 1987), kaikkien näiden reaktioiden huomioon ottaminen proteiinisynteesin ja hajoamisen tutkimisessa on ongelmallista myös nykyajan proteiinitutkijoille.

Yksi proteiiniaineenvaihdunnan uusimmista tutkimusmenetelmistä on isotooppi-infuusio. Elimistöön infusoidaan alkuaineen isotoopilla leimattua aminohappoa, jonka kulkua seurataan veri- ja lihasnäytteiden avulla. Menetelmän laskennalliset muuttujat kuvataan kolmiollasmallissa (Wolfe, 1992). Mallin mukaan aminohapot siirtyvät vapaasti valtimoveren, laskimoveren ja lihasten välillä. Kun huomioidaan veren virtaus kudoksessa ja tarkasteltavan yksikön tilavuus, päästään laskemaan proteiinien synteesin ja hajoamisen arvot.

Aminohappoinfuusiota on käytetty lääketieteessä hoitomuotona silloin, kun halutaan varmistaa valmiiksi pilkottujen proteiinien saatavuus ja näin ollen kudosten nopea uusiutuminen. 1980-luvulla yleistyi infuusion käyttö terveiden ihmisten aineenvaihduntatutkimuksissa. Proteiinien ohella myös muita energiasubstraatteja voidaan tutkia infusoimalla leimattua substraattia verenkiertoon. Isotooppi-infuusio on siis energiametabolian perustutkimusmenetelmä, jota voidaan soveltaa niin kliinisiin toimenpiteisiin kuin myös liikuntafysiologisiin tutkimuksiin.

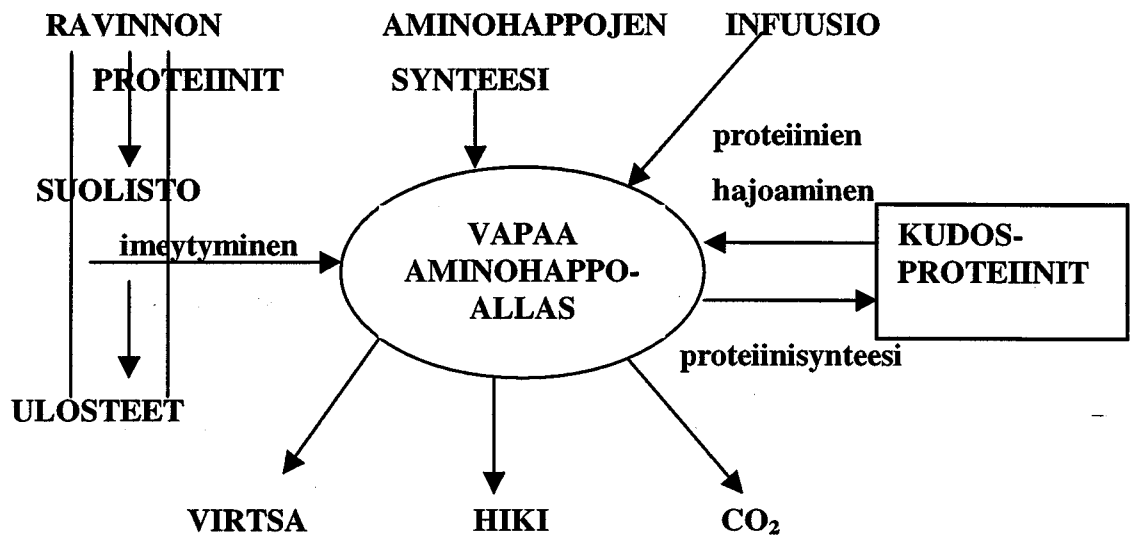
Tämän tutkimuksen kirjallisuusosan tarkoituksena oli selvittää proteiiniaineenvaihdunnan perusteet ja isotooppi-infuusio -menetelmän fysiologiset periaatteet ja niiden soveltaminen käytäntöön. Kokeellisessa osassa mitattiin menetelmän toistettavuutta ja tarkkuutta ja pyrittiin osoittamaan voimaharjoituksen aiheuttama muutos proteiiniaineenvaihdunnassa.

## 2. PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA

Proteiinit toimivat elimistössä monissa tärkeissä tehtävissä. Kaikkia kemiallisia reaktioita katalysoivat entsyymit ovat proteiineja. Solussa ja solukalvolla proteiinit toimivat reseptoreina ja kuljetustehtävissä. Lihaksien supistuvat komponentit ovat proteiineja, samoin luiden, jänteiden ja ligamenttien osat, hormonit ja hemoglobiini.

(Houston, 2001, 3)

Proteiineja saadaan ravinnosta, aminohappojen synteesistä tai infuusion avulla. Ruoansulatuksessa proteiineista hajotetut aminohapot kulkeutuvat ensin vapaaseen aminohappoaltaaseen, josta ne käytetään synteesiin, hapetetaan energiaksi tai hajotetaan poistettavaksi hien, virtsan tai ulosteen mukana. Vapaa aminohappoallas on lyhytaikainen aminohappojen varasto. Vapaita aminohappoja on plasmassa ja kudoksien intrasellulaaritulassa. Altaan aminohappopitoisuus on alhainen, sillä proteiinien synteesiä ja hajoamista tapahtuu jatkuvasti. Proteiinien kinetiikka on esitetty kuviossa 1. (Lemon, 1998)



KUVIO 1. Proteiinien kinetiikka. (mukaeltu Lemon, 1998)

Verenkierto huolehtii aminohappojen kuljetuksesta tarvittaville kudoksille. Plasman aminohappopitoisuus on normaalisti 35-65 mg/dl. Ruoansulatuskanavasta aminohappojen siirtyminen verenkierron kautta soluun vie vain lyhyen aikaa, joten aminohapot eivät kumuloidu plasmassa. Aminohappojen siirtyminen solukalvon läpi vaatii useimmiten energiaa. Siirryttyään soluun aminohapot käytetään heti synteesiin ja proteiinien

hajoamisessa vapautuneet aminohapot siirtyvät vapaaseen aminohappoaltaaseen. Solunsisäinen aminohappopitoisuus pysyy siis koko ajan alhaisena. (Guyton, 1996, 878-879)

## 2.1 PROTEIINIEN RAKENNE

Proteiinit rakentuvat aminohapoista. Aminohappomolekyylit koostuvat aminoryhmästä ja karboksyyli-ryhmästä sekä sivuketjuista, jotka vaihtelevat eri aminohapoilla. Peptidi muodostuu aminoryhmän ( $\text{NH}_2$ ) ja karboksyyli-ryhmän ( $\text{COOH}$ ) yhdistyessä peptidisidoksella. Termillä polypeptidi tarkoitetaan kymmeniä tai satoja aminohappoja sisältävää peptidiketjua. Proteiinit koostuvat yhdestä tai useammasta polypeptidiketjusta, joihin voi olla liittynyt muita aineita kuten metalli-ioneja, hiilihydraatteja, rasvoja tai lipidejä. (Houston, 2001, 3, 8-9)

Proteiinien primäärirakenteella tarkoitetaan aminohappojen järjestystä polypeptidiketjussa. Kaikki 20 erilaista aminohappoa voivat yhdistyä peptidiketjuissa tuhansilla eri tavoilla. Polypeptidiketjun selkärangan muodostavat hiiliatomi, aminoryhmä ja karboksyyli-ryhmä. Tämä kolmesta komponentista koostuvan selkärangan muoto antaa proteiinille sen sekundäärirakenteen. Tavallisimmat sekundäärirakenteet ovat  $\alpha$ -helix ja  $\beta$ -levy. Tertiäärirakenteen muodostavat proteiiniin liittyneiden sivuketjujen välillä tapahtuvat sidokset. Tertiäärirakenteeseen kuuluu myös muiden substanssien järjestyminen peptidiketjussa. Monet proteiinit koostuvat yhdestä tai useammasta polypeptidiketjusta, joilla on oma primääri-, sekundaari- ja tertiäärirakenne. Näitä ketjuja voidaan kutsua alayksiköiksi (*subunit*). Kvarternäärirakenne muodostuu alayksikköjen järjestäytymisestä toisiinsa nähden. Esimerkiksi lihasproteiineista myosiini sisältää kuusi alayksikköä, jossa molekyylipainoltaan kevyet ja raskaat ketjut saavat aktiinin kanssa liittyessään aikaan lihassupistuksen. (Houston, 2001, 9-11; McArdle, 1996, 29)

## 2.2 PROTEIINISYNTESI JA PROTEIINIEN HAJOAMINEN

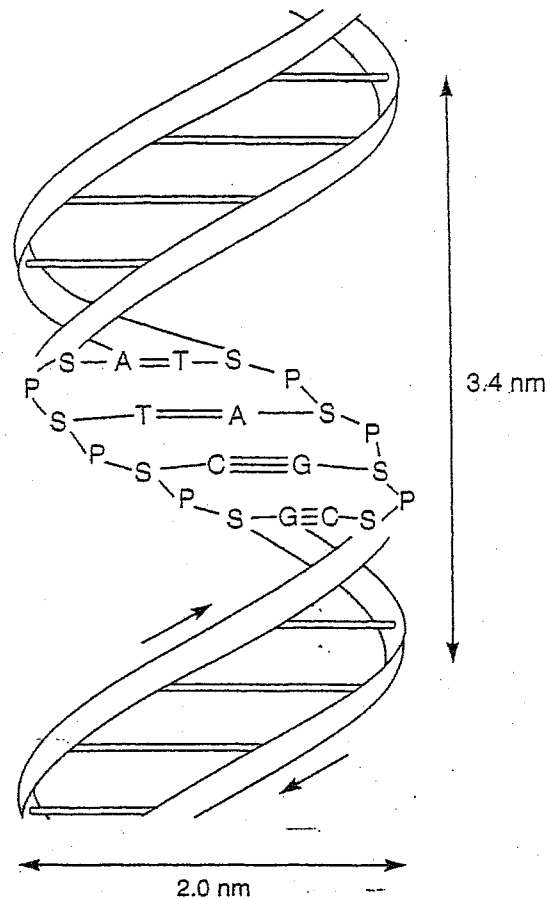
Homeostaasitilanteessa proteiinisynteesin ja proteiinien hajottamisen avulla kehon proteiinimäärä pyritään pitämään vakiona. Proteiinisynteesin rakennusaineita saadaan proteiinipitoisesta ravinnosta tai elimistö tuottaa niitä itse. Aminohappoja valmistetaan transaminaatiossa, jossa aminoryhmä siirretään rakentuvalle aminohapolle. Esimerkiksi

alaniinia valmistetaan liittämällä glutamaatin aminoryhmä pyruvaattiin. Kaikkia tarvittavia aminohappoja elimistö ei itse pysty valmistamaan. Näitä kymmentä aminohappoa kutsutaan välttämättömiksi aminohapoiksi ja niitä ihmisen tulee saada ravinnosta. (Wolfe, 1992, 360; Guyton, 1996, 27; Houston, 2001, 3, 117)

Proteiinisynteesissä aminohapoista rakennetaan satoja aminohappoja sisältäviä proteiinimolekyylejä. Tuman DNA:ssa sijaitsevat geenit sisältävät tiedon, mistä aminohapoista voidaan muodostaa tarvittava proteiini. DNA:sta kopioidaan transskriptioksi kutsutussa reaktiossa lähetti-RNA-molekyylä (mRNA). Transskriptio tapahtuu tumassa, mutta seuraavat proteiinisynteesin vaiheet solun sytosolissa. Translaatioissa mRNA:n sisältämän koodin mukaan rakennetaan aminohapoista proteiinimolekyylä. Reaktiossa tarvitaan mRNA:n ja energian lisäksi siirtäjä RNA (tRNA), joka tuo sopivan aminohapon paikalle sekä ribosomaalinen RNA (rRNA), jonka pinnalla translaatio tapahtuu. Aminohapot liitetään toisiinsa peptidisidoksin ja valmis proteiini voidaan vapauttaa tarvittavaan tehtävään. (Houston, 2001, 35)

### 2.2.1 Transskriptio

Transskriptiossa tuman DNA:ssa sijaitsevista geneista muodostetaan proteiinisynteesiin tarvittava lähetti-RNA -ketju. DNA eli deoksiribonukeliinihappo rakentuu fosforihaposta, deoksiriboosi-sokerista sekä neljästä erilaisesta emäksestä. Puriineja ovat adeniini ja guaniini ja pyrimidiineiksi kutsutaan tymiinia ja sytosiinia. DNA-ketjujen selkärankoina ovat fosforihappo ja deoksiriboosi ja niiden välissä emäsparit muodostavat vetysidoksen ja pitävät ketjut yhdessä. Emäspareina toimivat aina adeniini ja tymiini sekä guaniini ja sytosiini. Kuviossa 2 voidaan myös nähdä, että DNA-ketjut kiertyvät kaksoiskierteiseksi. (Guyton, 1996, 27; Houston, 2001, 21-22)



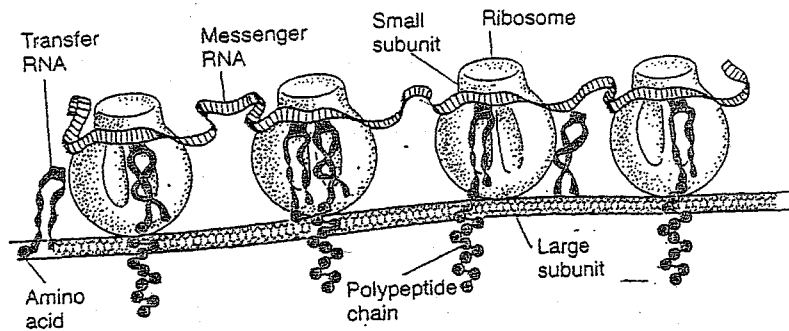
KUVIO 2. DNA:n rakenne (S=deoksiriboosi, P=fosforihappo, A=adeniini, T=tymiini, C=sytosiini, G=guaniini). (Houston 2001, 32)

RNA:n synteesissä DNA-ketjut hajoavat väliaikaisesti, jolloin toinen niistä toimii mallina lähetti-RNA -ketjulle. Toinen DNA-ketju jää inaktiiviseksi. RNA muistuttaa perusrakenteeltaan DNA:a. RNA:ssa sokeri on riboosi ja tymiini korvataan urasiililla. RNA:n muodostaminen alkaa reaktiota katalysoivan entsyymin tunnistaessa DNA-ketjussa aloituskohdan, jota kutsutaan promoottoriksi. Entsyymi aiheuttaa DNA:n kaksoiskiirteen purkautumisen ja halkeamisen kahdeksi eri ketjuksi. Entsyymi liikkuu pitkin DNA-ketjua ja kasvattaa samalla promoottorin perään RNA-ketjua. Kun entsyymi saavuttaa DNA-ketjun pätekohdan, entsyymi irtoaa DNA:sta ja jatkaa tehtävänsä RNA:n muodostamisessa. Uusi RNA sisältää noin 90 % introneiksi kutsuttua tarpeetonta materiaalia. RNA-ketju pilkotaan seuraavissa vaiheissa siten, että vain eksonit (n. 10 %) käytetään proteiinin rakentamiseen. (Guyton, 1996, 29; Houston, 2001, 157-170)



## 2.2.2 Translaatio

Translaatioksi kutsutaan varsinaista proteiinimolekyylin synteesiä. Lähetti-RNA:n aloituskodonissa on ohje ribosomin alayksikön muodostamiseen. Ribosomi on isosta ja pienestä alayksiköstä koostuva molekyyli, jonka pinnalla aminohappoketjun rakentaminen tapahtuu. Aminohappojen liittymisessä on mukana siirtäjä-RNA, joka tuo ribosomin pinnalle sellaisen aminohapon, jonka kodoni vastaa lähetti-RNA -ketjun kodonia. Aina kun ribosomyksikkö liikkuu pitkin lähetti-RNA -ketjua, liittyy ketjuun uusi aminohappo. Terminaalivaiheessa lähetti-RNA:ssa on lopetuskodoni, jolloin eri yksiköt irtoavat toisistaan ja valmis proteiini vapautetaan. (Guyton, 1996, 32; Houston, 2001, 174-180)



KUVIO 3. Proteiinimolekyylien muodostuminen (*transfer RNA* = siirtäjä-RNA, *messenger RNA* = lähetti-RNA, *small subunit* = pieni alayksikkö, *ribosome* = ribosomi, *amino acid* = aminohappo, *polypeptide chain* = polypeptidiketju, *large subunit* = iso alayksikkö). (Guyton, 1996, 32)

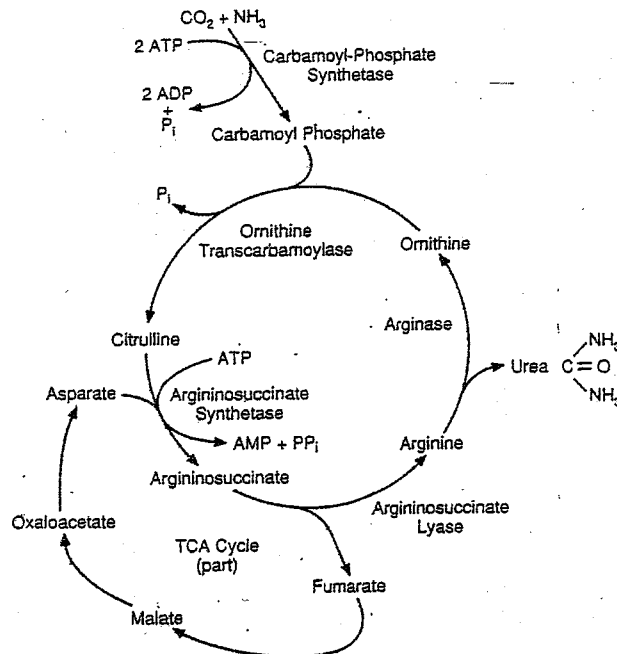
## 2.2.3 Proteiinien hajoaminen

Proteiinien hajoaminen tarkoittaa proteiinimolekyylin pilkkoutumista alkuperäisiin aminohappoihin ja muihin molekyylin tarvitsemiin tukiryhmiin. Hajoaminen tapahtuu entsyymien avulla. Suurin osa entsyymeistä sijaitsee lysosymeissa. Lysosymaalinen systeemi on osa vakuolia, joka on solun sisällä solukalvoon yhteydessä oleva rakenne mitokondrioita lukuun ottamatta. Lysosymaaliset entsyymit valmistetaan karkeassa endoplasmisessa retikulussa, josta ne siirtyvät sileän endoplasmisen retikulumin kautta Golgin laitteeseen. Siellä ne muodostavat vesikkeleitä, joita kutsutaan ensisijaisiksi lysosymeiksi (*primary lysosomes*). (Wolfe, 1992, 380-381)

Vakuolissa on kahdenlaisia proteiineja sisältäviä vesikkeleitä. Ekstrasellulaariproteiinit ovat tulleet solun sisälle endosytoosin kautta ja vesikkeleitä kutsutaan heterofagiseksi

vakuoliksi. Intraselulaariproteiineja sisältävät yksiköt ovat autofagisia vakuoleja. Kun ensisijainen lysosymi kohtaa proteiinivakuolin, syntyy toissijainen lysosymi (*secondary lysosyme*). Lysosymin pH laskee ja proteiini hajoaa hydrolyysiksi kutsutussa reaktiossa. Proteiinien hydrolyysissä hajotetaan vesimolekyylin avulla peptidisidokset siten, että hydroksyyli-ioni liittyy toiseen ja vetyioni toiseen aminohappoon ja polypeptidiketju pilkkoutuu. (Wolfe, 1992, 380-381; Guyton, 1996, 833)

Kaikkia normaalin proteiinien hajoamisen seurauksena vapautuneita aminohappoja ei käytetä uudelleen synteesiin. Koska aminohappoja ei voi varastoida, ne kuljetetaan maksaan pilkkottavaksi. Aminohappoja hajotetaan hapetusreaktioissa tai niissä oleva typpiryhmä eritetään ureasyklissä virtsaan. Hapetusreaktiossa menetetään elektroneja ja vapautuvasta hiilirungosta saadaan energiaa. Ureasyklissä karbamoyylifosfaatin ja aspartaatin typpiryhmät muodostavat lopulta arginiinin, josta urea vapautuu. Ureasyklin päävaiheet on esitetty kuviossa 4. (Campbell, 1995, 524-525)



KUVIO 4. Ureasykli. (Wolfe, 1992, 343)

Kun ravinnosta saadaan kulutukseen nähden liikaa proteiineja, suurin osa proteiineista varastoidaan. Lihas toimii proteiinien suurimpana varastona. Pieni määrä proteiineja on myös maksassa. Paastossa, aliravitsemuksessa tai vähäenergisessä ruokavaliassa hiilihydraatteja ei ole tarpeeksi saatavilla tai niitä hyödynnetään huonosti. Koska aivot pystyvät käyttämään vain hiilihydraatteja energianlähteenään, voidaan hiilihydraatteja valmistaa proteiininvarastoista. Lihaksen proteiinit kulkeutuvat maksaan aminohappoina, jossa niiden hiilirunko käytetään glukoosin uudismuodostukseen (glukoneogeneesi). (Aro, Mutanen & Uusitupa, 1999, 108; Campbell, 1995, 524-525)

## 2.3. PROTEIINI-AINEENVAIHDUNTAAN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

Kudokset ja solut pystyvät säätelemään tiettyjen proteiinien pitoisuutta ja proteiinituotantoa proteiinisynteesin avulla. Funktionaalisesti katsottuna proteiinisynteesiä säädelään yleisellä (hormonit, ravinto, kuormitus) ja spesifillä (entsyymit, hormonit) tasolla. Yleinen taso tarkoittaa koko kehon proteiinitasapainoa, kun taas spesifi taso tiettyjen proteiinien muodostamista solussa. Proteiinien hajoamista säädelään sen mukaan, miten ravinnon proteiinit riittävät elimistön tarpeisiin. (Millward & Waterlow, 1978)

### 2.3.1 Entsyymit

Entsyymit ovat muutaman kymmenen aminohappoa sisältäviä proteiinimolekyylejä, jotka katalysoivat useita kemiallisia reaktioita alentamalla tarvittavaa energiaa ja nopeuttamalla niitä. Helikaasi avaa DNA-ketjun RNA:n muodostamista varten. Itse transkriptiota säätelevät RNA polymeeraasi -entsyymit. Ne ovat ryhmä proteiinientsyymejä, joista esimerkiksi polymeeraasi I toimii korjaavana entsyyminä ja polymeeraasi III uuden RNA-ketjun muodostajana. Ribonukleaasi-entsyymit kontrolloivat sitä, kuinka kauan lähetti-RNA on solulimassa. Translaatiossa aloittamistekijät (*initiation factors*), aminohappoketjun pidentämiseen vaikuttavat tekijät (*elongation factors*) ja lopetustekijät (*termination factors*) säätelevät aktiivisuudellaan synteesiä. (Guyton, 1996, 29, 35; Houston, 2001, 13, 32-33, 37; Campbell, 1995, 610-612)

### 2.3.2 Hormonit

Hormonit ovat solujen välisiä viestinviejiä. Hormoneja syntetisoidaan endokriinisissä elimissä ja ne kulkeutuvat kohdesoluihin verenkierron välityksellä. Kemiallisen rakenteen mukaan hormonit jaetaan steroideihin (esim. testosteroni), polypeptideihin (esim. insuliini) ja aminohappojohdannaisiin (esim. tyroksiini). Hormonit voidaan jakaa myös niiden vaikutusten suhteen anabolisiin ja katabolisiin hormoneihin. Anabolisia hormoneja ovat insuliini, IGF-1 (insuliinin kaltainen kasvutekijä 1), kasvuhormoni ja testosteroni. Tärkein katabolinen hormoni on kortisoli. (Guyton, 1996, 882; Campbell, 1995, 566)

Insuliini osallistuu ravinnosta saatavien ravintoaineiden varastoimiseen. Haiman erittämä insuliini aktivoi tiettyjen aminohappojen (valiini, leusiini, isoleusiini, tyrosiini ja fenyylialaniini) kulkeutumista soluun. Proteiinisynteesiä insuliini kiihdyttää välillisesti, sillä hormoni lisää lähetti-RNA:n translaatiota, jolloin proteiineja syntetisoidaan enemmän. Insuliinin tiedetään aktivoivan joidenkin DNA-sekvenssien transkriptiota. Insuliinin ja leusiinimetabolian välisiä yhteyksiä on tutkinut mm. Castellino et al. (1987). Hyperinsulemia alentaa plasman leusiinin pitoisuutta, estää proteiinien hajoamista, lisää leusiinin hapettumista sekä proteiinisynteesiä. Jos aminohappoja on runsaasti vapaissa aminohappoaltaissa, proteiinien hajoaminen on vähentynyt, mutta leusiinin hapettuminen ja proteiinisynteesi kiihtyneet. Insuliinin puute voi lakkauttaa proteiinisynteesin kokonaan. Mekanismeja ei tunneta tarkkaan, mutta insuliini stimuloi tiettyjen proteiinien kulkeutumista soluun. Energiametabolian kannalta insuliini ja glukagoni ylläpitävät veren glukoosipitoisuutta, jolloin proteiineja ei hapeteta energiaksi. (Guyton, 1996, 882, 976; Viru, 1996)

Insuliinin kaltainen kasvutekijä 1 (IGF-1) vaikuttaa proteiiniaineenvaihduntaan insuliinin tavoin. Russell-Jones & Umplebyn (1996) mukaan *in vitro* IGF-1 stimuloi DNA:n synteesiä ja solujen lisääntymistä. *In vivo* IGF-1:n on todettu hidastavan proteiinien hajoamista, mutta synteesissä ei tapahtunut muutoksia. *In vitro* -kokeissa synteesin on kuitenkin todettu kiihtyvän. Ihmisillä tehdyt tutkimukset on mitattu pääasiassa paastotilassa, jolloin aminohappojen riittävyys proteiinisynteesiin on kyseenalainen. Tutkimustulosten perusteella IGF-1 kiihdyttää proteiinisynteesiä vain, jos aminohappoja on runsaasti saatavilla. (Russell-Jones & Umpleby, 1996)

Aivolisäkkeestä erittyvä kasvuhormoni lisää lihasmassaa ja kiihdyttää yleistä kasvua ja kehitystä. Proteiiniaineenvaihdunnassa kasvuhormoni stimuloi proteiinisynteesiä lisäämällä aminohappojen kuljetusta solukalvon läpi sekä transkriptio- ja translaatioaktiivisuutta. Proteiinien hajoamiseen kasvuhormoni ei vaikuta. Välillisesti kasvuhormoni toimii rasva-aineenvaihdunnan kautta. Kasvuhormoni lisää varastorasvojen vapautumista, mikä inhiboi aminohappojen käyttöä energiaksi. Kun aminohappojen hapettuminen hidastuu, vapaita aminohappoja voidaan käyttää synteesiin. (Guyton, 1996, 882; Russell-Jones & Umpleby, 1996)

Testosteronilla on kasvuhormonin kaltaisia, anabolisia vaikutuksia. Testosteronin teho kestää muutamia kuukausia, kun taas kasvuhormonin vaikutus kestää koko eliniän. Anaboliset steroidit stimuloivat myofibrillaarisia proteiineja sekä RNA polymeraasin aktiivisuutta ja sitä kautta proteiinisynteesiä. (Guyton, 1996, 882; Viru, 1996)

Aineenvaihduntaa säätelevä tyroksiini vaikuttaa välillisesti proteiiniaineenvaihduntaan. Muiden energianlähteiden ollessa riittämättömät, kilpirauhasesta erittyvä tyroksiini aiheuttaa nopeasti proteiinien hajottamisen energiaksi. Tyroksiini kiihdyttää proteiinisynteesiä siinä tapauksessa, kun aminohappoaltaassa on paljon vapaita aminohappoja, jolloin ne kuljetetaan solukalvon läpi syntetisoitavaksi. (Guyton, 1996, 882)

Glukokortikoidit alentavat proteiinien määrää kudoksissa, joten vapaiden aminohappojen sekä maksan ja plasman proteiinien pitoisuus lisääntyy. Kun plasmassa on paljon proteiineja, maksan proteiinisynteesi kiihtyy. Kortisoli on anabolisten hormonien vastavaikuttaja. Se inhiboi proteiinisynteesiä ja aktivoi proteiinien hajoamista, muualla paitsi maksassa. Kortisolin vaikutuksesta proteiinivarastot pienentyvät ja aminohappojen kuljetus vähenee. Lihaksessa RNA:a ei muodostu niin paljon, jolloin proteiinien synteesi inhiboituu. (Guyton, 1996, 962)

### 2.3.3 Ravinto

Paljon proteiineja sisältäviä ruokia ovat liha, kala, kananmuna sekä maitotaloustuotteet. Lähes kaikki ravinnon proteiinit pilkotaan ruoansulatuksessa aminohapoiksi, sillä vain harvat polypeptidiketjut tai kokonaiset proteiinit voivat imeytyä suoraan verenkiertoon. Proteiineja pilkkovat ohutsuolen polypeptidaasientsyymit, jotka katkaisevat peptidisidokset muodostaen di- ja tripeptidejä. Epiteelisolun di- ja tripeptidaasit pilkkovat di- ja tripeptidit aminohapoiksi, jotka siirtyvät kuljettajaproteiinin välityksellä verenkiertoon. Pieni osa aminohappoja imeytyy kerrallaan ja vastaavasti verestä aminohapot siirtyvät soluihin 5-10 minuutissa. (Aro, Mutanen & Uusitupa, 1999, 124; Guyton, 1996, 878)

Kansainvälisten ravitsemussuosituksen (RDA) mukaan päivittäinen proteiinin tarve aikuisella ihmisellä on 0,8 g proteiineja painokiloa kohden. Säännöllinen liikunta lisää proteiinien tarvetta 150-210 %. Voimaharjoittelussa proteiineja tarvitaan kiihdyttämään elimistön anabolisia prosesseja. Kuormituksen jälkeen proteiinisynteesi on kiihtynyt, jolloin aminohappoja tarvitaan synteesiin rakennusaineiksi (esim. Biolo et al., 1997). Proteiinien tarve voimaurheilijoilla on 1,6-1,7 g/kg/vrk. Myös kestävyysharjoittelu lisää proteiinien tarvetta. Kestävyysurheilijat tarvitsevat proteiineja 1,2-1,4 g/kg/vrk. Proteiinisynteesi kiihtyy, koska lihaksen kudosaauriota pyritään korjaamaan. Osa

lihaksen proteiineista hapetetaan energiaksi. Aminohappojen ja hiilihydraattien nauttiminen ennen ja jälkeen suoritusta sekä suorituksen aikana nostaa vapaiden aminohappojen määrää ja nopeuttaa palautumista. (Lemon, 1998)

Sukupuolen ja iän on todettu vaikuttavan proteiinien tarpeeseen. Miehillä on enemmän lihasmassaa ja vähemmän rasvakudosta kuin naisilla, jolloin proteiinivarastot hupenevat erityisesti kuormituksen yhteydessä. Miesten ja naisten erilaista proteiinitarvetta selitetään myös hormonaalisilla tekijöillä. Lapsilla ja nuorilla proteiineja tarvitaan kasvuun ja kehitykseen. Fyysisesti aktiivisen lapsen ja nuoren tulee huolehtia riittävästä proteiinien saannista, sillä proteiinien kulutus on suurta. Ikääntyessä lihasmassa pienenee, jota voidaan yrittää hidastaa riittävällä proteiinien saannilla. (Aro, Mutanen & Uusitupa, 1999, 212; Lemon, 1998)

Vaikka proteiineja nautitaan huomattavasti enemmän kuin mitä RDA-suositukset osoittavat, sillä ei ole todettu olevan haitallisia vaikutuksia. Ainoastaan munuaisten vajaatoiminnasta kärsiville ei suositella ylimääräistä proteiinia. Proteiinipitoinen ravinto saattaa lisätä kalsiumin menetystä virtsan mukana, mikä on haitallista osteoporoosin riskiryhmässä oleville naisille. (Lemon, 1998)

Proteiinien puute johtaa varastoproteiinin hajottamiseen. Jos energian saanti ja kulutus eivät ole tasapainossa, proteiineja tarvitaan energiaksi. Silloin lisäproteiinikaan ei toimi anabolisesti. Paastotilassa RNA:n pitoisuus laskee ja kolmessa viikossa proteiiniton, vähäproteiininen tai vähäenerginen ruokavalio alentaa lihaksen RNA:n ja proteiinien suhdetta jopa 75 % ja näin ollen hidastaa proteiinisynteesiä. (Lemon, 1998; Millward & Waterlow, 1978)

### **3. PROTEIINIAINEENVAIHDUNTA KUORMITUKSESSA**

Kuormituksella on todettu olevan monia akuutteja ja pitempiaikaisia vaikutuksia proteiiniaineenvaihduntaan. Aminohappoja mobilisoidaan enemmän hapettumista ja glukoosin uudismuodostusta (glukoneogeneesi) varten. Kuormituksen aikana 5-15 % tarvittavasta energiasta saadaan proteiineista. Energiaa pilkotaan lihaksen ja maksan aminohapoista. (Tipton & Wolfe 1998; Hargreaves, 1995, 131-132)

Supistuvien lihasproteiinien hajoaminen hidastuu kuormituksen aikana, mutta kiihtyy välittömästi palautumisen alkaessa. (Tipton & Wolfe, 1998; Dohm et al., 1987) Kuormituksen jälkeen palautumistilassa pyritään saavuttamaan elimistön normaali homeostaasi, täyttämään vajavaiset energiavarastot ja korjaamaan rakenteelliset vauriot. Proteiinimetabolian muutokset voivat kestää kuormituksen jälkeen muutamista minuuteista useisiin päiviin. (Viru, 1996; Tipton & Wolfe, 1998)

Proteiiniaineenvaihduntaa tutkittaessa on huomioitava myös muutokset proteiinien hajoamisessa. Vaikka synteesi on kiihtynyt, suurempi hajoaminen voi kumota anabolisen vaikutuksen. Voimaharjoituksen jälkeen synteessin on raportoitu kiihtyvän (Tipton & Wolfe, 1998), mutta hajoamisen taso on pysynyt samana. Silloin synteessin vaikutukset ovat todellisia. Synteessin ja hajoamisen välistä suhdetta voidaan tarkastella proteiinitasapainon avulla. Tiptonin et al. (1999a) tutkimuksessa kuormituksen jälkeen nautittu aminohappovalmiste muutti proteiinitasapainon negatiivisesta positiiviseksi.

#### **3.1 VOIMAHARJOITUKSEN VAIKUTUS PROTEIINIAINEEN- VAIHDUNTAAN**

Proteiinisynteesin on todettu kiihtyvän voimaharjoituksen jälkeen (taulukko 1) ja kestävän jopa 48 tuntia. (Tipton & Wolfe, 1997; Chesley et al., 1992; Carraro et al., 1990a; Carraro et al., 1990b). Biolon et al. (1995b) tutkimuksessa synteessin taso nousi noin 100 % ja hajoaminen kiihtyi noin 50 %. Proteiinitasapaino muuttui vähemmän negatiiviseksi, mutta ei aivan saavuttanut positiivista arvoa. Jotta harjoituksen anabolinen vaikutus saataisiin esiin, ravintotekijät on huomioitava harjoittelun yhteydessä. (Biolo et al. 1995b)

TAULUKKO 1. Voimaharjoituksen vaikutus proteiiniaineenvaihduntaan

TEKIJÄ	MENETELMÄ	MÄÄRÄ, KUORMA	KUORMITUS-TAPA	PROTEIINI-AINEEN-VAIHDUNTA
Phillips et al. (1999)	<sup>2</sup> H <sub>5</sub> -fenyylialaniinin ja <sup>15</sup> N-fenyylialaniinin infuusio	8 x 10/3' 120 % 1 RM	plyometrinen voimaharjoitus, mm. jalkojen ekstensio	proteiinisynteesi ↑
Biolo et al. (1995b)	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -fenyylialaniinin, <sup>13</sup> C-leusiinin, <sup>15</sup> N-lysiinin ja <sup>13</sup> C-alaniinin infuusio	5 x 10 ja 4 x 8/2'-3' 10-12 RM	jalkaprässi, jalkojen ekstensio	proteiinisynteesi ↑ proteiinien hajoaminen ↑
Chesley et al. (1992)	<sup>13</sup> C-leusiinin infuusio, RNA-määrittäminen	4 x 6-12/3' 80 % 1 RM	ylävartalon voimaharjoitus	proteiinisynteesi ↑
Tarnopolsky et al. (1991)	<sup>13</sup> C-leusiinin infuusio	30 sek/2' 70 % 1 RM	kuntopiiri	ei muutosta

Synteesin kiihtyminen johtuu siitä, että rakennusaineita on runsaasti saatavilla. Elimistön omaa proteiinia hajotetaan enemmän ja vapaiden aminohappojen kuljetus on tehostunut, jolloin aminohappoja pääsee kulkeutumaan lihasten käytettäväksi. Synteesin tehostuminen on peräisin transskription jälkeisten mekanismien kiihtymisestä, koska Chesley et al. (1992) mukaan RNA:n pitoisuuksissa ei tapahdu akuutteja muutoksia. Sen lisäksi aminohappoinfuusion on todettu kiihdyttävän proteiinisynteesiä (Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1997). Tipton et al., 1999b mukaan riittävä aminohappojen saanti ja siten kiihtynyt proteiinisynteesi voidaan varmistaa myös suun kautta nautituilla aminohappo- ja proteiinivalmisteilla. (Tipton & Wolfe, 1998; Biolo et al., 1995b).

Voimaharjoituksen jälkeistä proteiinien hajoamismekanismeja ei tarkkaan tunneta, mutta rottakokeissa lysosomaalisten proteinaasien on todettu olevan mukana hajoamisprosessissa ja proteolyyttinen aktiivisuus on kiihtynyt. Proteolyyttinen aktiivisuus lisääntyy lihassoluvaurioiden ja tulehduksen seurauksena. (Dohm et al. 1980; Evans & Cannon, 1991)



### 3.2 KESTÄVYYSHARJOITUKSEN VAIKUTUS PROTEIINI- AINEENVAIHDUNTAAN

Kestävyysharjoituksen aikana voidaan mitata kuormituksen aikana tapahtuvia proteiiniaineenvaihdunnan muutoksia. Taulukon 2 mukaan useissa tutkimuksissa proteiinien hajoamisen on todettu kiihtyvän. Samaan aikaan proteiinisynteesin taso laskee (Dohm et al., 1987). Kestävyysuorituksen aikaisessa kataboliassa vapautuneet aminohapot käytetään energiaksi. Tästä todisteena on Knapikin et al. (1991) tutkimus, jossa leusiinin hapettuminen kiihtyi. Koska leusiini hapettuu lihaksessa, voidaan päätellä, että proteiinien hajotuksesta saatavaa energiaa tarvitaan työskenteleville lihaksille. (Tipton & Wolfe, 1998)

TAULUKKO 2. Kestävyysuorituksen vaikutus proteiiniaineenvaihduntaan

TEKIJÄ	MENETELMÄ	KUORMA, MÄÄRÄ	KUORMITUS- TAPA	PROTEIINI- AINEEN- VAIHDUNTA
Carraro et al. (1994)	<sup>15</sup> N-alaniini	45 % VO <sub>2</sub> max 2 h	kävely	proteiinien hajoaminen↑
Phillips et al. (1993)	typpitase, <sup>13</sup> C-leusiinin infuusio	65 % VO <sub>2</sub> max 1,5 h	juoksu	proteiinien hajoaminen↑
Knapik et al. (1991)	<sup>13</sup> C-leusiinin infuusio	45 % VO <sub>2</sub> max levosta uupumukseen	pyöräily	leusiinin hapettuminen ↑ ja proteiinien hajoaminen↑
Carraro et al. (1990)	<sup>13</sup> C-leusiinin infuusio, 3-metyyli- histidiini	40 % VO <sub>2</sub> max 4 h	kävely	ei vaikutusta
Stein et al. (1989)	<sup>13</sup> C-leusiinin infuusio	53 % VO <sub>2</sub> max 8 h	3 h pyöräily ja 5 h kävely	proteiinien hajoaminen↑ tietylle tasolle

Proteiinien hajoamisen yhteydessä muodostuu yleensä ureaa. Kuormituksen aikana tai kuormituksen jälkeen ureaa ei erity enemmän kuin lepotilassakaan. Urean sisältämä typpi voidaan kierrättää takaisin proteiinien rakennusaineeksi, jolloin sitä ei erity virtsaan. Toinen selittävä tekijä on se, että urean muodostuminen on niin hidasta, ettei sen lisääntynyttä eritystä pystytä rekisteröimään lyhyen mittausjakson aikana. (Tipton & Wolfe, 1998)

Tipton et al. (1996) tutkivat yhdistetyn voima- ja kestävyysharjoituksen vaikutusta proteiiniaineenvaihduntaan. Voima- tai kestävyysharjoitus yksinään ei vaikuttanut proteiinisynteesiin niin paljon kuin yhdistelmäharjoitus. Tähän saattoi olla syynä se, että yhdistelmäharjoituksen kuormittavuus oli suurempi kuin yksittäisen harjoituksen. Proteiinien hajoamisen muutokseen harjoitusmuodolla ei ollut vaikutusta.

## 4. PROTEIINIAINEENVAIHDUNNAN TUTKIMUS- MENETELMÄT

### 4.1 ISOTOOPPIEN KÄYTTÖ FYSIOLOGISISSA TUTKIMUKSISSA

Isotoopilla tarkoitetaan saman alkuaineen atomeja, joilla on erisuuret massaluvut. Samalla alkuaineella on ytimessään sama määrä protoneja, mutta neutronien määrä vaihtelee. Isotooppien kemiallisissa reaktioissa ei ole eroja, joten niitä voidaan käyttää merkkiaineina fysiologisissa tutkimuksissa. Alkuaineilla esiintyy yksi tai useampia isotooppeja, joiden massaluku on  $n$ ,  $n+1$ ,  $n+2$  jne. Taulukossa 3 esitetään tavallisimpien alkuaineiden luonnollinen isotooppijakauma. (Wolfe, 1992, 1-2)

TAULUKKO 3. Tavallisimpien alkuaineiden isotooppijakauma. (Wolfe, 1992, 2)

ALKUAINE	ISOTOOPPI	LUONNOLLINEN ESIINTYVYYS (%)
VETY (H)	1	99,985
	2	0,015
HIILI (C)	12	98,89
	13	1,11
TYPPI (N)	14	99,63
	15	0,37
HAPPI (O)	16	99,76
	17	0,037
	18	0,204
RIKKI (S)	32	95,0
	33	0,76
	34	4,22

#### 4.1.1 Radioaktiiviset isotoopit

Jotkut isotoopit ovat radioaktiivisia, jolloin neutronit voivat vapaasti hajota protoniksi ja neutroniksi. Hajoamisessa vapautuu energiaa. Esimerkiksi hiilellä on radioaktiivinen isotooppi  $^{14}_6\text{C}$ . Ytimessä on kahdeksan neutronia ja kuusi protonia. Kun yksi neutroni hajoaa, neutroneita on yksi vähemmän kuin alkuperäisellä hiilellä eli seitsemän. Reaktiossa vapautuu pieni määrä energiaa. Vapautuneesta energiasta voidaan laskea säteilyn määrä, jota radioaktiivinen isotooppi lähettää. (Wolfe, 1992, 3)

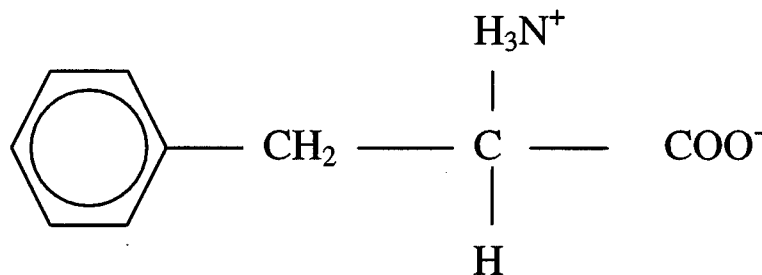
Käytettäessä radioaktiivisia merkkiaineita on laskettava säteilyn määrä, jolle tutkittava kohde altistuu. Säteilyannos ei saa ylittää yleisesti tunnettuja rajoja. Radioaktiivisista isotoopeista käytetään yleensä vetyä ( $^3\text{H}$ ) ja hiiltä ( $^{14}\text{C}$ ). Näytteiden säteilyn määrän perusteella voidaan laskea aineenvaihduksen muuttujia. (Wolfe, 1992, 15-16)

#### 4.1.2 Stabiili-isotoopit

Stabiili-isotooppien käyttö perustuu radioaktiivisiin isotooppitutkimuksiin, joita tehtiin ihmisille yli 20 vuotta ennen kuin menetelmästä luovuttiin. Stabiili-isotooppitutkimukset perustuvat oletukseen, että merkkiaineet jäljittelevät merkkiaamattomien aineiden liikettä ja aineenvaihduntaa. Elimistö ei todennäköisesti pysty erottamaan merkattua ja merkkiaamatonta ainetta. Useampia isotooppeja voidaan antaa koehenkilölle samanaikaisesti, jolloin tulosten luotettavuus paranee. Stabiili-isotooppien käyttö vaatii erittäin tarkkoja laboratorioanalyysijä, ja näytteiden puhtaus on olennainen tekijä mitattaessa GC/MS:llä. (Wolfe, 1992, 14-15)

Proteiiniaineenvaihduksen tutkimiseen käytetään merkkiaineena isotoopilla leimattua aminohappoa. Yleisimpiä aminohappoja ovat fenyylialaniini, leusiini, lysini ja alaniini (Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1995a). Fenyylialaniinia voidaan merkata vedyllä ( $^2\text{H}$ ) tai hiilellä ( $^{13}\text{C}$ ). Leusiini ja alaniini leimataan yleisimmin hiilen isotoopilla  $^{13}\text{C}$  ja lysini typpellä  $^{15}\text{N}$ .

Fenyylialaniini on aromaattinen aminohappo, jolla ei ole polaarista sivuketjuja (Wolfe, 1992, 359; Campbell, 1995, 73). Fenyylialaniinin rakennekaava on kuviossa 5.



KUVIO 5. Fenyylialaniinin rakennekaava. (Campbell, 1995, 73)

Kun käytetään isotooppia merkkiaineena, joku rakenteen alkuaineista korvataan sen isotoopilla. Siksi yleisimmät isotoopit ovat vety, hiili, typpi ja rikki, koska niitä löytyy orgaanisten aineiden rakenteista. Kun fenyylialaniini leimataan vedyllä, rengasrakenteen vetyatomit ( $^1\text{H}$ ) korvataan isotoopilla ( $^2\text{H}$ ). (Wolfe, 1992, 14-15; Campbell, 1995, 10)

#### 4.1.3 Jatkuva infuusio ja *flooding dose* -menetelmä

Jatkuvan infuusion menetelmässä infusoidaan leimattua isotooppia alhaisella nopeudella niin kauan, että isotooppia tulee ja poistuu altaasta samalla nopeudella. Tässä menetelmässä yleisimpiä isotooppeja ovat vedyn, typen ja hapen isotoopit. Typen isotooppia ( $^{15}\text{N}$ ) käytettäessä voidaan näytteitä kerätä verestä tai virtsasta, sillä typpi erittyy loppujen lopuksi virtsaan. Tällöin infuusioaika on verrattain pitkä (30-40 tuntia) ja osa typestä kierrätetään uudestaan. Typpeä menetetään myös hien ja ihon mukana, mikä on otettava huomioon tulosten tulkinnassa. Menetelmän olettamuksena on, että virtsan muodostukseen erittyvä typpi on lähtöisin samasta aminohappoaltaasta kuin proteiinisynteesiin tarvittavat aminohapot. Menetelmän etuna on näytteiden keräyksen helppous. Lisäksi infuusioaikaa voidaan lyhentää antamalla aminohappoaltaan kokoon nähden sopiva alkuannos. (Wolfe 1992, 385)

Hapen isotoopilla leimattua leusiinia käytetään yleisesti proteiiniaineenvaihdunta-tutkimuksissa (Knapik et al., 1991; Lamont et al., 1990; Stein et al., 1989). Infuusion aikana näytteistä analysoidaan leusiinin aineenvaihduntatuotteen,  $\alpha$ -ketoisokaproaatin ( $\alpha$ -KIC) kertymää. Leusiinin hapettuminen voidaan määrittää hengityskaasunäytteistä, koska happi erittyy hiilidioksidina pois elimistöstä ja myös hapen isotooppi poistuu samaa reittiä. Leusiini hapettuu lihaksessa, jolloin kaikki lihaksen intrasellulaaritulasta kadonnut leusiini on mennyt proteiinisynteesiin tai hapetettavaksi. Tasapainotilassa synteesi lasketaan hajooneen ja hapettuneen leusiinin erotuksesta. (Wolfe, 1992, 387) *Flooding*

*dose* –menetelmässä infusoidaan leimattua ja leimaamatonta isotooppia niin suuri kerta-annos, että ekstra- ja intrasellulaarituloissa isotooppeja on yhtä paljon. Proteiinisynteesin nopeus lasketaan lihakseen sitoutuneen ja intrasellulaaritilan leimatun isotoopin välisestä suhteesta tiettyinä ajanjaksona. Menetelmässä vapaassa aminohappoaltaassa leimaamatonta isotooppia on kaikkialla yhtä paljon, joten eroja aminohappoaltaiden pitoisuuksissa eri puolilla elimistöä ei ole. Koska plasma on suurin vapaa aminohappoallas, isotooppien välinen suhde voidaan määrittää verinäytteistä. Näytteiden keräys tapahtuu lyhyen ajanjakson sisällä, verrattuna jatkuvaan infuusioon, jossa isotooppia on infusoitava useita tunteja. *Flooding dose* –menetelmän olettamuksena on, että isotooppien kerta-annos ei vaikuta proteiinisynteesiin. (Chinkes, Rosenblatt & Wolfe, 1993)

## 4.2 TYPPITASE

Typpitaseessa mitataan ravinnon mukana saatu ja virtsan ja ulosteiden mukana menetetty typpi. Hien, ihon ja hiusten mukana menetetty typpi on osuudeltaan vähäinen ja niiden osuus arvioidaan kehon koon, sukupuolen ja fyysisen aktiivisuuden mukaan. Saadun ja menetetyt tyypin erotuksesta saadaan selville positiivinen tai negatiivinen typpitase. Jos arvo on positiivinen, ravinnosta saadun tyypin määrä on suurempi kuin menetetty typpi ja negatiivisessa taseessa menetetään enemmän typpiä kuin sitä saadaan. Nämä kertovat elimistön anabolisesta ja katabolisesta tilasta. Niiden avulla ei kuitenkaan saada selville proteiinisynteesin ja hajoamisen suuruutta. (Aro, Mutanen & Uusitupa, 1999, 105)

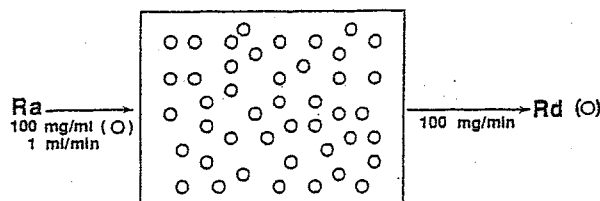
## 4.3 MUUT MENETELMÄT

Proteiinien hajoamista voidaan arvioida 3-metyylihistidiinin avulla. Sitä erittyy virtsaan siinä suhteessa, kun lihasproteiineja hajotetaan, joten se kuvaa koko kehon proteiinien hajoamista. On kuitenkin osoitettu, että eritetystä 3-metyylihistidiinistä noin 75 % on lihasperäistä. Sen vuoksi mitataan myös kreatiniinin pitoisuutta, joka epäsuorasti kuvaa lihasmassan määrää. Kreatiniinin ja 3-metyylihistidiinin välinen suhdeluku kertoo paremmin lihaksen proteiinien hajoamisesta kuin 3-metyylihistidiinin pitoisuus yksin. (Russell-Jones & Umpleby, 1996; Wolfe, 1992, 412) Kudoksen ribosomien määrä kuvaa proteiinisynteesin tasoa. Lihasnäytteiden ribosomien profiilin avulla arvioidaan translaation aktiivisuutta. (Russell-Jones & Umpleby, 1996)

## 5. ALKUANNOS-JATKUVA INFUUSIO –MENETELMÄN PERIAATTEET

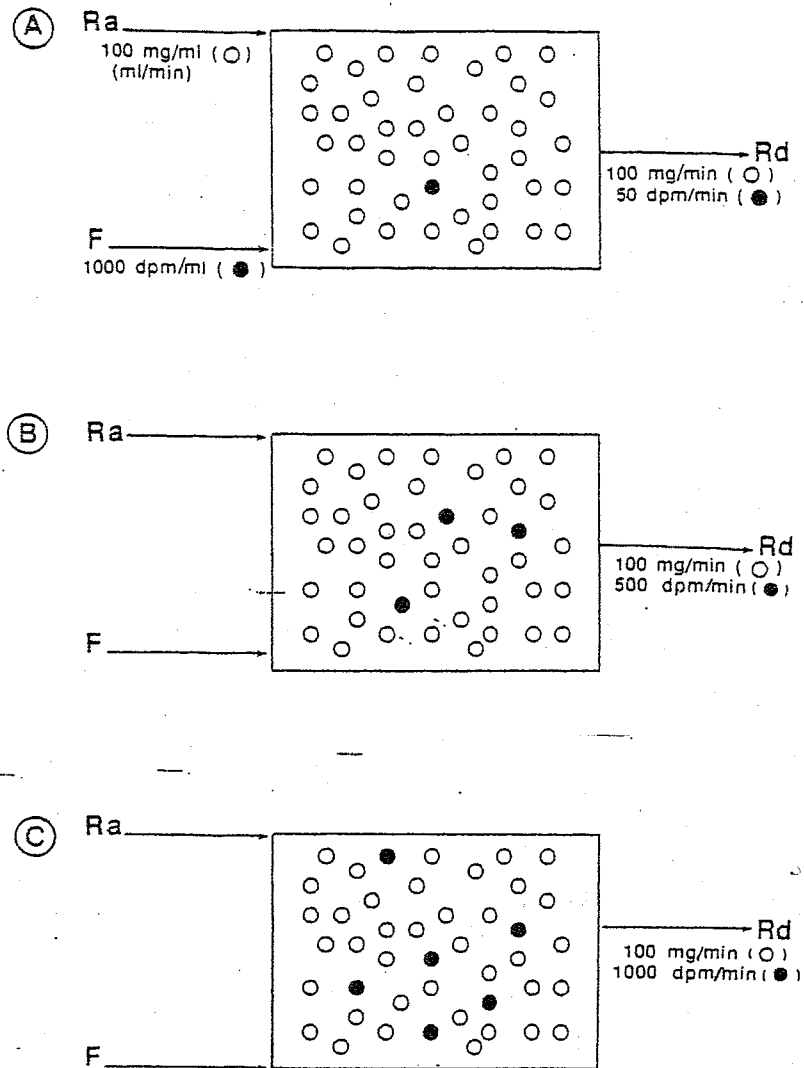
### 5.1 INFUUSION PERIAATTEET

Aineenvaihduntaa mitattaessa määritetään aminohapon (substraatin) esiintyvyys ja häviäminen vapaasta aminohappoaltaasta. Englannin kielessä termit ilmaistaan *rate of appearance* ( $R_a$ ) ja *rate of disappearance* ( $R_d$ ). Jatkuvan infuusion tavoitteena on saavuttaa isotooppinen tasapainotila (*isotopic steady state*), jolloin  $R_a$  ja  $R_d$  ovat samansuuruiset. Kuviossa 6 esitetään tilanne, jossa leimaamatonta substraattia infusoidaan nopeudella 1 ml/min. Liuoksen konsentraatio on 100 mg/ml. Koska  $R_d$  on 100 mg/min, isotooppinen tasapainotila on saavutettu. (Wolfe, 1992, 119-120)



KUVIO 6. Substraattialtaan isotooppinen tasapainotila, jossa  $R_a=R_d$ . (Wolfe, 1992, 120)

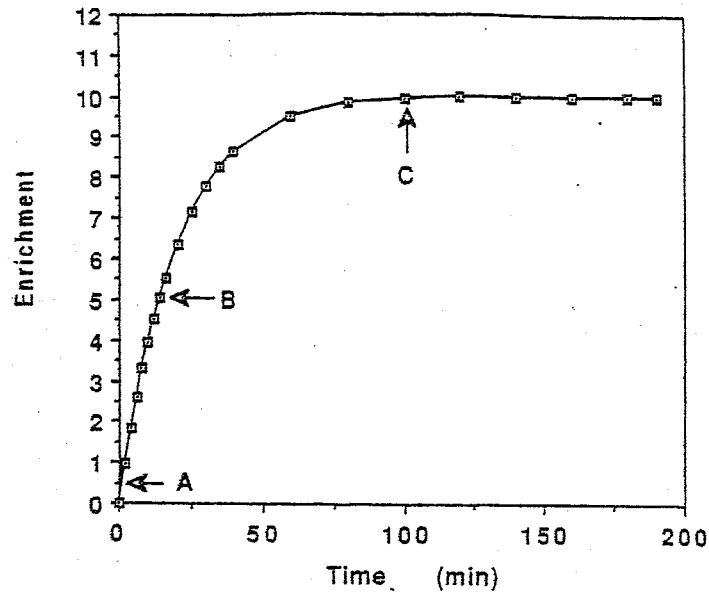
Altaaseen (*pool*), johon substraattia infusoidaan, tulee substraattia myös luonnollisia aineenvaihduntareittejä pitkin. Sen takia arvioitaessa steady state –tilaa on otettava huomioon kaksi väylää, joista substraattia tulee altaaseen: infuusio ja luonnollinen esiintyvyys. Kun infuusio aloitetaan, isotooppisen tasapainotilan saavuttamiseen kuluu jonkin verran aikaa, riippuen substraattialtaan koosta ja aineenvaihdunnan vilkkaudesta. Kuviossa 7 edetään tilanteeseen, jossa saavutetaan isotooppinen tasapainotila. Valkoiset pallot kuvaavat leimaamatonta, luonnollisesti esiintyvää substraattia ja mustat infusoitua, leimattua isotooppia. (Wolfe, 1992, 120)



KUVIO 7. Isotooppisen tasapainotilan saavuttaminen, kun infusoidaan leimattua isotooppia (valkoiset pallot=leimaamatonta substraattia, mustat pallot=leimattua substraattia). (Wolfe, 1992, 120)

Mitattaessa leimattua ja leimaamatonta substraattia tulokset ilmoitetaan näiden välisenä suhteena ja sitä voidaan nimittää termillä kertymä (*enrichment*). Kuviossa 8 esitetään kertymäkäyrä infuusion aloittamisesta tasapainotilan saavuttamiseen. Kirjaimet A, B ja C viittaavat kuviossa 7 esitettyyn tilanteeseen. (Wolfe, 1992, 121)



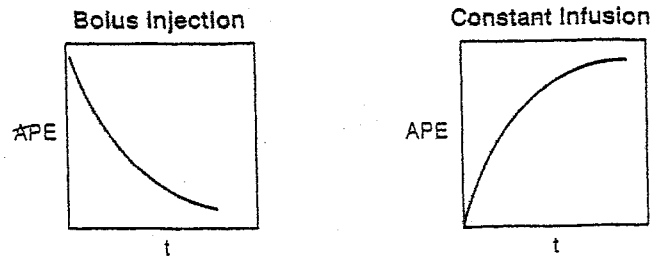


KUVIO 8. Leimatun ja leimaamattoman substraatin välinen suhde (*enrichment*) infuusion aloittamisesta. (Wolfe, 1992, 121)

## 5.2 ALKUANNOKSEN MERKITYS

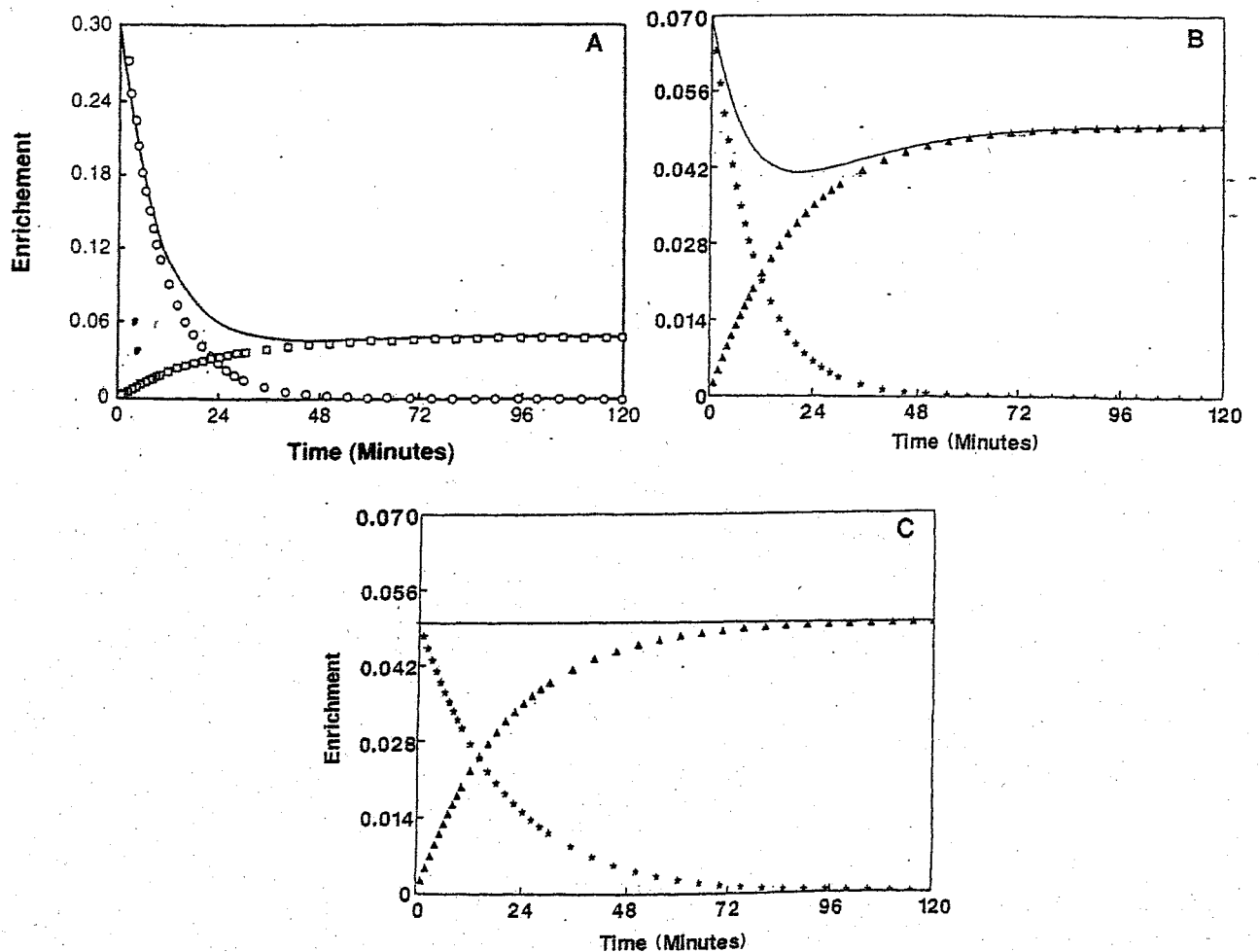
Substraatin kiertokulku voi olla hidasta -suurella substraattialtaassa, joten pelkällä infuusiolla isotooppisen tasapainotilan saavuttaminen voi viedä useita tunteja. Potilaan tai koehenkilön hyvinvoinnin kannalta pyritään tasapainotila saavuttamaan mahdollisimman nopeasti. Sen vuoksi ruiskutetaan infusoitavaa substraattia kerta-annos ennen varsinaisen infuusion aloittamista, jolloin tasapainotila saavutetaan huomattavasti nopeammin. Alkuannos ei vaikuta kertymääröihin, eikä häiritse muutenkaan substraatin aineenvaihduntaa. (Wolfe, 1992, 126)

Alkuannoksen tarkoituksena on saattaa substraattialtaaseen mahdollisimman nopeasti leimattua substraattia. Olettamuksena on, että alkuannoksen molekyylejä otetaan käyttöön samalla nopeudella kuin infusoitavaa substraattia. Graafisesti esitettynä alkuannoksen ja infuusion käyrä ajan suhteen on kuvion 9 mukainen. (Wolfe, 1992, 128)



KUVIO 9. Alkuannoksen (*bolus injection*) ja jatkuvan infuusion (*constant infusion*) kertymä (APE=*atom percent excess*, atomien suhdeluku). (Wolfe, 1992, 128)

Alkuannoksen koko määräytyy substraattialtaan suuruuden mukaan ja se voidaan laskea tai kokeellisesti osoittaa. Kuviossa 10 on kolmen erikokoisen alkuannoksen vaikutus isotooppikertymään (*enrichment*). Yhtenäinen viiva kuvaa alkuannoksen ja infuusion yhteisvaikutusta kertymään. Viimeisessä kuvassa kertymäviiva on vaakasuora, mikä osoittaa alkuannoksen olevan oikeansuuruinen substraattialtaaseen ja infuusion nähden. (Wolfe, 1992, 130)



KUVIO 10. Erisuuruisten alkuannosten vaikutus isotooppikertymään. (Wolfe, 1992, 130)

### 5.3 INFUUSIONOPEUS JA ALKUANNOKSEN KOKO PROTEIINI- AINEENVAIHDUNNAN TUTKIMISESSA

Infuusion nopeus ja alkuannoksen koko määräytyvät substraattialtaan koosta, substraatin kierron nopeudesta ja koehenkilön koosta. Käytännössä tämä tarkoittaa tietyn aminohapon pitoisuutta veressä. Eri aminohapoilla pitoisuus vaihtelee. Leusiinia on noin 130 nmol/ml, lysiniä 160 nmol/ml, alaniinia 140 nmol/ml ja fenyylialaniinia 50 nmol/ml (Tipton et al., 1999) laskimoveressä. Valtimoveren pitoisuudet ovat hiivenen korkeampia (Tipton et al., 1999). Leusiini, lysini ja fenyylialaniini ovat välttämättömiä aminohappoja ja alaniini ei-välttämätön. Alaniinia muodostetaan pyruvaatista transaminaatiossa (Wolfe, 1992, 360).

Koska fenyylialaniinin konsentraatio veressä on pieni, infuusionopeus ja alkuannos ovat myöskin pieniä. Fenyylialaniinilla käytetään nopeutta 0,05  $\mu\text{mol/kg/min}$  ja alkuannoksena 2  $\mu\text{mol/kg}$ . Leusiinilla vastaavat arvot ovat 0,08  $\mu\text{mol/kg/min}$  ja 4,8  $\mu\text{mol/kg}$ , lysiinillä 0,08  $\mu\text{mol/kg/min}$  ja 7,2  $\mu\text{mol/kg}$  ja alaniinilla 0,35  $\mu\text{mol/kg/min}$  ja 35  $\mu\text{mol/kg}$ . (Biolo et al., 1995a; Biolo et al., 1995b)

## 6. VERI- JA LIHASNÄYTTEIDEN KÄSITTELY JA MITTAAMINEN LABORATORIOSSA

### 6.1 NÄYTTEIDEN KÄSITTELYN TARKOITUS

Leimattujen aminohappojen pitoisuudet määritetään lihas- ja verinäytteistä. Esikäsitellyssä aminohapot erotetaan ja puhdistetaan ioninvaihtokromatografian avulla. Prosessi on nimeltään deproteiinisaatio, jossa aminohappojen väliset sidokset katkeavat. Ioninvaihtokromatografian erottelukyky perustuu näytteen ja ioninvaihtohartsin välillä oleviin varaus-varaus -suhteisiin. Ioninvaihtohartsia puhdistetaan hapolla ja emäksellä sekä tislattulla vedellä. Sen jälkeen näyte kaadetaan ioninvaihtohartsiin, jolloin veri- ja lihasnäytteiden orgaaniset yhdisteet (aminohapot) tarttuvat hartsiin kemiallisten varausten vuoksi. Hartsista näyte irrotetaan sopivalla liuottimella ja näytettä haihdutetaan typpievaporaattorissa ja haihduttavassa sentrifuugissa. Näyte kuivataan täysin vedettömäksi, sillä GC/MS:n mittauskky heikkenee, jos näyte sisältää vettä. (Lahti, 2000)

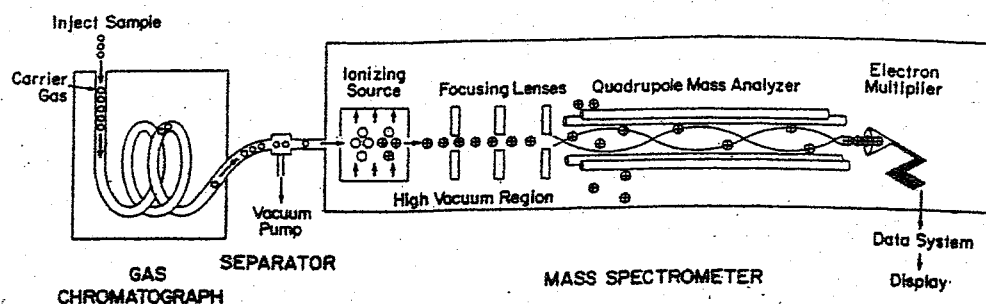
### 6.2 DERIVATISOINTI

Jotta mittauksessa pystytään käyttämään GC/MS:a, näytteistä tehdään johdannaisia derivatisoimalla ne. Derivatisoinnissa näytteeseen lisätään yhdistettä, joka on kemiallisesti pysyvä, lämpötilan vaihteluita kestävä, mutta haihtuva alle +300 asteessa. Derivatisoinnin tarkoituksena on lisätä haihtuvuusominaisuuksia ja parantaa näytteen kromatografista ilmentyvyyttä ja toimivuutta. Derivatisointireagenssina käytetään yleisesti joko NAP- (N-asetyyli, *n*-propyyli) tai t-BDMS- (tertiäärinen butyyli-*di*-metyylisilyyli) derivaattia. NAP-derivaattia pysyy stabiilina useita kuukausia, kun taas t-BDMS-derivaattia on stabiili vain muutaman viikon (Wolfe, 1992, 37; Lahti, 2000)

Näytteet derivatisoidaan useimmiten mittauspäivänä. Derivatisointireagenssista riippuen näytteet pysyvät mittauskelpoisina kahdesta viikosta useisiin kuukausiin. Derivatisoinnin jälkeen näytteet siirretään vialleihin, jotka suljetaan ilmatiiviillä korkilla. Jos näytteet joudutaan ajamaan useaan kertaan, korkit vaihdetaan, jotta vettä tai muita epäpuhtauksia ei pääse näytteeseen. (Lahti, 2000)

### 6.3 MITTAAMINEN KAASUKROMATOGRAFI- MASSASPEKTROMETRILLÄ

Näytteiden isotooppikertymä (*isotopic enrichment*) mitataan laitteella, jossa yhdistyvät kaasukromatografi ja massaspektrometri. Kromatografiassa yhdisteet erottuvat liikkuvan ja stationäärifaasin välityksellä. Kaasukromatografissa liikkuva faasi on kaasu (helium, vety, typpi). Laitteen herkkyys ja nopeus riittävät erottelemaan aminohapot. Kaasukromatografian vaatimuksena on näytteiden kyky höyrystyä, mutta niiden on oltava riittävän stabiileja analyysiin. Näistä syistä näytteet derivatisoidaan. Massaspektrometrissä yhdiste hajotetaan elektronipommituksella edelleen ioneihin, joita voidaan kontrolloida jännitteen ja sähkökentän avulla. Kun halutaan lisätä GC/MS:n herkkyttä, käytetään SIM-tekniikkaa (*selected ion monitoring*). Sen avulla voidaan keskittyä tarkastelemaan vain tietyn molekyylipainon omaavia ioneja. Koska leimatun aminohapon molekyylipaino on suurempi kuin luonnollisesti esiintyvän aminohapon, leimaamattoman ja leimatun aminohapot erottuvat GC/MS:ltä ja aminohappojen ionien määrä voidaan laskea. GC/MS:n osat on kuviossa 11. (Wolfe, 1992, 37-38, 50, 89; Lahti, 2000)



KUVIO 11. GC/MS:n kaaviokuva (*GAS CHROMATOGRAPHY* = kaasukromatografi, *SEPARATOR* = erottaja, *MASS SPECTROMETER* = massaspektrometri, *Inject sample* = näytteen injektointi, *Carrier Gas* = kantajakaasu, *Vacuum pump* = vakuumpumppu, *Ionizing Source* = ionisointilähde, *High Vacuum Region* = alipainealue, *Focusing Lenses* = tarkentavat linssit, *Quadrupole Mass Analyzer* = nelitahoinen massan analysoija, *Electron Multiplier* = elektronivahvistin, *Data System* = tietokoneohjelmisto, *Display* = näyttö). (Wolfe 1992, 38)

## 7. KOLMIALLASMALLI JA SIIHEN PERUSTUVAT LASKUTOIMITUKSET

Kaasukromatografi-massaspektrometristä saaduista tuloksista voidaan laskea isotoopin kertymä korjauskertoimien avulla ja pitoisuus sisäisen standardin avulla. Kertymä- ja pitoisuusarvot sijoitetaan kolmiallasmalliin, jossa tarvitaan veren virtausarvoja kuvaamaan aminohappojen virtausta eri yksiköiden välillä. (Biolo et al., 1995b)

### 7.1 PITOISUUDEN LASKEMINEN SISÄISEN STANDARDIN MENETELMÄLLÄ

GC/MS:n luvut kertovat leimatun isotoopin ja luonnollisen isotoopin välisen suhteen eli kertymän (*E*, *enrichment*). Kertymä tarkoittaa samaa kuin TTR (*tracer to tracee ratio*). Sisäisen standardi on leimatun isotoopin kanssa mahdollisimman samankaltainen aine, jota lisätään näytteeseen tunnettu määrä. GC/MS mittaa sisäisen standardin kertymän samalla kertaa kuin näytteen isotoopin kertymän. Kun tunnetaan näytteen tilavuus, laskukaava voidaan ilmoittaa seuraavasti:

$$C = Q_{IS} / (V * E_{IS})$$

missä C = konsentraatio (nmol/l),

$Q_{IS}$  = sisäisen standardin määrä (nmol),

V = näytteen tilavuus (l),

$E_{IS}$  = sisäisen standardin kertymä GC/MS:lla mitattuna. (Biolo et al. 1995b)

Sisäisen standardin avulla voidaan selvittää isotoopin kertymä myös lihaksen intrasellulaaritulassa. Laboratorioanalyysissä lihasnäytteen jauhamisen yhteydessä erotetaan supernatantti ja tämän liuoksen kertymä edustaa lihaksen pitoisuutta. (Biolo et al., 1995b; Lahti, 2000)

## 7.2 KORJAUSKERTOIMET

Aminohappojen pitoisuuden laskemisessa on otettava huomioon tuloksiin vaikuttavia tekijöitä, jotka pystytään välttämään korjauskertoimilla. Pitoisuuden laskemisessa käytetään kahta erilaista korjausmenetelmää; isotooppikorjauskerrointa ja *overlapping*-korjauskerrointa. (Wolfe, 1992, 65)

Isotooppikorjauskerroin ( "skew" correction factor) huomioi alkuaineen isotooppijakauman. Lähes kaikki alkuaineet esiintyvät myös luonnostaan yhtä yksikköä painavammassa muodossa. Esimerkiksi  $^1\text{H}$  esiintyy 99,985 % ja deuteriumia ( $^2\text{H}$ ) 0,015 % kaikista vetyatomeista (Taulukko 3). Sen takia GC/MS:stä saatu kertymäärä ei ole todellinen, sillä se sisältää myös luonnollisesti esiintyvän isotoopin. Todellinen lukema saadaan kaavasta

$$E_t = E * 1/(1+An),$$

missä  $E_t$  = todellinen kertymä,

$E$  = kertymä GC/MS:ltä,

$A$  = leimauksessa käytetyn isotoopin luonnollinen esiintyvyys,

$n$  = leimattujen atomien lukumäärä.

Esimerkiksi kun infusoidaan  $^2\text{H}_5$  leimattua fenyylialaniinia, aminohappomolekyylin hiiliatomissa on viisi deuteriumatomia ja silloin korjauskerroin =  $1/(1 + 0,00015 * 5) = 0,999251$ . Jos GCMS:n ilmoittama kertymäärä  $^2\text{H}_5$  -fenyylialaniinille on 7,38 %, todellinen luku on silloin  $E_t = 7,38 * 0,999251 = 7,374$  %. (Wolfe 1992, 66)

Vastaavat korjaukset lasketaan myös sisäiselle standardille. Sisäisenä standardina käytetään yleensä samaa aminohappoa, joka on leimattu muulla alkuaineella tai toisella isotoopilla kuin infusoitu isotooppi. Esimerkiksi  $^2\text{H}_5$  -fenyylialaniinin sisäisenä standardina voidaan käyttää  $^{13}\text{C}_6$  -fenyylialaniinia (Tipton et al., 1999a). (Wolfe, 1992, 66)

*Overlapping*-korjausta käytetään silloin, kun infusoidaan kahdella alkuaineella leimattua aminohappoa tai kun sisäinen standardi häiritsee aminohappokertymää. Teoreettisesti GC/MS ilmoittaa  $m+1$  ja  $m+2$  kertymät.  $M+1$  on myötävaikuttanut  $m+2$  esiintyvyyteen yliarvioiden sitä. Jos esimerkiksi infuusioliuos sisältää  $^{13}\text{C}$ -leusiinia ja  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$ -leusiinia, GC/MS:stä saadaan luotettava  $^{13}\text{C}$  -leusiinin kertymä, mutta toisen

isotoopin kertymä yliarvioidaan.  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  -leusiinin kertymä on siis todellista suurempi, sillä se sisältää myös infusoidun isotoopin kertymän ( $^{13}\text{C}$ -leusiini on edellytyksenä  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  leusiinin muodostumiselle). Koska laskutoimituksissa halutaan käsitellä vain todenmukaisia arvoja, kertymäarvot korjataan *overlapping*-kertoimen avulla. Kerroin saadaan vähentämällä  $m+2$  kertymästä  $m+1$  kertymä, joka on kerrottu  $m+1$  luonnollisella esiintyvyydellä. Kertoimen matemaattinen muoto on esitetty kuviossa 12. (Wolfe, 1992, 67-68)

$$\text{TTR}(M + k) = \left[ \left( \frac{P_{M+k}}{P_M} \right)_s - \left( \frac{P_{M+k}}{P_M} \right)_o \right] - \sum_{j=1}^{k-1} \text{TTR}(M + j) \left( \frac{P_{M+(k-j)}}{P_M} \right)_o$$

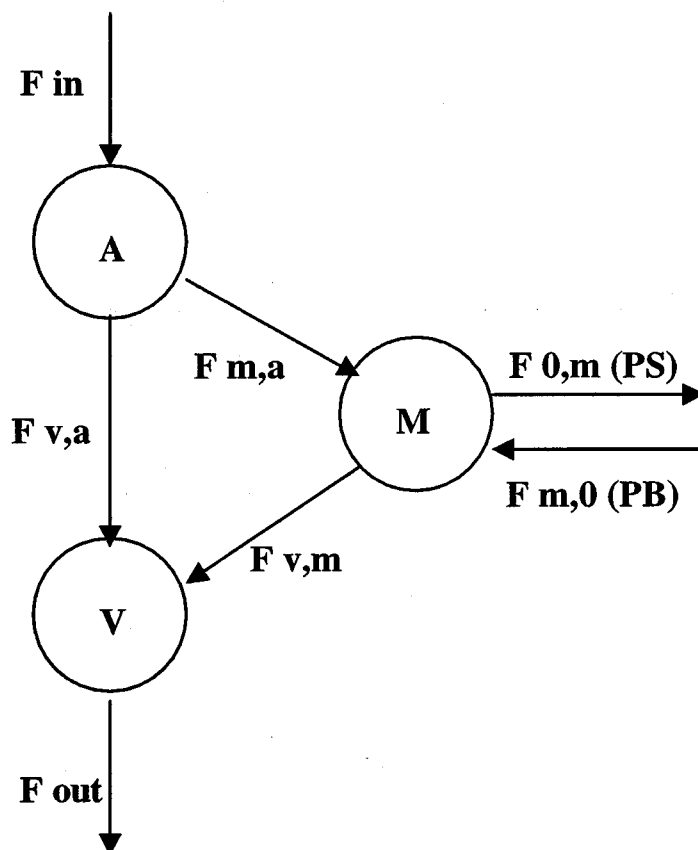
KUVIO 12. *Overlapping*-kertoimen matemaattinen malli. (Wolfe, 1992, 67)

### 7.3 KOLMIALLASMALLI

Kolmiallasmallin kehittelyn pohjana on ollut A-V -eron (valtimo- ja laskimonäytteiden erotus) määrittäminen. Siinä aminohappojen liikettä kuvataan vain valtimon ja laskimon välillä. A-V -ero ei ota huomioon aminohappojen uudelleenkäyttöä (*de novo* -synteesi), jolloin synteesiä ja hajoamista hieman aliarvioidaan. Biolo et al. (1995a,b) kehitti menetelmän, jossa myös lihaksen intrasellulaaritalan aminohappojen kertymää ja pitoisuutta mitataan. Kolmiallasmalliksi kutsutussa menetelmässä voidaan yhdistää useampia merkkiaineita, esim. välttämättömiä ja ei-välttämättömiä aminohappoja, jolloin saadaan selville *de novo* -synteesin osuus. Kolmiallasmalli huomioi myös aminohappojen virtauksen suoraan valtimosta laskimoon. (Wagenmakers, 1999)

Kolmiallasmallin yksiköt ja substraatin kulkureitit on piirretty kuvioon 13.





KUVIO 13. Kolmiallasmalli reiden lihaksen aminohappoaineenvaihdunnasta. (esim. Biolo et al., 1997; Biolo et al., 1995a,b; Volpi et al., 1998)

Kolmiallasmallin aminohappoaltaat ovat valtimo (A), laskimo (V) ja lihas (M) ja ne on yhdistetty nuolin osoittaen substraatin yksisuuntaisen virtauksen yksiköiden välillä. Aminohapot siirtyvät kudokseen reisivaltimon kautta ( $F_{in}$ ) ja poistuvat reiden laskimosta ( $F_{out}$ ).  $F_{v,a}$  tarkoittaa aminohappojen suoraa virtausta valtimosta laskimoon.  $F_{m,a}$  ja  $F_{v,m}$  merkinnöillä ilmoitetaan aminohappojen kulkeutumista valtimosta lihaksen intrasellulaaritilaan ja intrasellulaaritilasta laskimoon.  $F_{0,m}$  tarkoittaa aminohappojen häviämistä intrasellulaaritilasta ja vastaavasti  $F_{m,0}$  aminohappojen ilmaantumista intrasellulaaritilaan. Fenyylialaniini ja lysini eivät hapetu lihaksessa, joten  $F_{0,m}$  ilmoittaa, miten paljon näitä aminohappoja hyödynnetään proteiinisynteesiin (PS). Leusiinia käytettäessä on huomioitavaa, että sitä voidaan hapettaa lihaksessa ennen kuin se siirtyy intrasellulaaritilaan. Leusiinille  $F_{0,m}$  on siis proteiinisynteesin ja hapetetun leusiinin määrä. Ei-välttämättömille aminohapoille (alaniini)  $F_{0,m}$  on proteiinisynteesin ja *de novo*-synteesin määrä. Proteiinien hajoamista (PB) kaikilla aminohapoilla kuvaa  $F_{m,0}$ . (Biolo et al., 1995a,b)

Aminohappokinetiikan parametrit on määritelty seuraavasti:

$$F_{in} = C_a * BF$$

$$F_{out} = C_v * BF$$

$$NB = (C_a - C_v) * BF$$

$$F_{m,a} = \{[(E_m - E_v)/(E_a - E_m)] * C_v + C_a\} * BF$$

$$F_{v,m} = \{[(E_m - E_v)/(E_a - E_m)] * C_v + C_v\} * BF$$

$$F_{v,a} = F_{in} - F_{m,a}$$

$$F_{m,0} = F_{m,a} * (E_a/E_m - 1)$$

$$F_{0,m} = F_{m,0} + NB$$

missä  $C_a$  ja  $C_v$  ovat reiden valtimon ja laskimon aminohappokonsentraatiot.  $E_m$ ,  $E_v$  ja  $E_a$  tarkoittavat lihaksen, laskimon ja valtimon kertymiä.  $BF$  on reiden veren virtausnopeus, joka saadaan mitattua indosyaniiniväriaineen avulla (Jorfeldt & Wahren 1971).  $NB$  ilmoittaa aminohappojen nettotasapainon jalan lihaksessa. *Vastus lateralis* -lihasta käytetään kuvaamaan koko jalan aminohappokinetiikkaa, sillä sen hitaiden ja nopeiden lihasfibereiden jakauma on suunnilleen sama kuin koko jalan lihaksistossa. (Biolo et al., 1995b)

#### 7.4 VEREN VIRTAAUSNOPEUDEN MITTAAMINEN

Veren virtausnopeus vaikuttaa substraattien kuljetukseen, energian kulutukseen ja lihaksen aineenvaihdunnan aktiivisuuteen. Virtausnopeus vaihtelee sydämen sykkeen syklistä riippuen. Vaihtelu on niin nopeaa, ettei sillä ole merkitystä aineenvaihduntatutkimuksissa, jossa mittausjakso on huomattavan pitkä. Virtauksen keskiarvo on riittävän tarkka kuvaamaan steady state -tilaa. (Rådegran, 1999)

Väriilmennusmenetelmällä voidaan mitata veren virtausnopeutta levossa ja kuormituksen aikana. Menetelmässä infusoidaan indosyaniini-väriainetta (ICG) reisivaltimeen ja näytteitä kerätään yhtä aikaa reisilaskimosta ja perifeerisestä laskimosta. Ennen kuin näytteitä aletaan keräämään, infuusion on saavutettava steady state -tila eli indosyaniini on kiertänyt ison ja pienen verenkierron läpi. Levossa steady state -tilan saavuttamiseen kuluu kolme minuuttia ja kuormituksen aikana tai heti sen jälkeen 1 min 20 s. (Jorfeldt & Wahren, 1971)

Näytteet säilytetään huoneenlämmössä ennen sentrifugointia. Sentrifugoinnissa erottunut seerumi kaadetaan kyvetiin ja mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella 805 nm. Spektrofotometri kalibroidaan mitatun vahvuisella indosyaniini-seerumi -liuoksella. Spektrofotometrin tulokset sijoitetaan kaavaan

$$F_L = \frac{F_i(C_i - C_v)}{(C_v - C_p)(1 - \text{HCT})}$$

missä  $F_L$  = veren virtausnopeus jalassa (ml/min),

$F_i$  = infuusionopeus (ml/min),

$C_i$  = indosyaniinin konsentraatio ( $\mu\text{mol/l}$ ),

$C_v$  = indosyaniinin konsentraatio reisilaskimossa ( $\mu\text{mol/l}$ ),

$C_p$  = indosyaniinin konsentraatio perifeerisessä laskimossa ( $\mu\text{mol/l}$ ),

HCT = hematokriitti.

Hematokriitin perusteella saadaan koko veren virtaus, kun näytteistä analysoidaan vain seerumia. (Jorfeldt & Wahren, 1971)

Veren virtausnopeus suhteutetaan jalan tilavuuteen, jota lasketaan jalan ympärysmittojen avulla. Ympärysmitat otetaan kuudesta kohdasta ja niiden välinen pituus mitataan. Jalkaterän pituuden ja korkeuden sekä nilkan ympärysmittan perusteella lasketaan jalkaterän tilavuus, joka lisätään koko jalan segmenttien yhteenlaskettuun tilavuuteen (Liite 1.). Lihaksen osuus on noin 60 % koko jalan tilavuudesta, jolloin luiden, rasvan, ihon, jänteiden ja muiden kudosten yhteenlaskettu osuus on noin 40 %. Jones & Pearsonin (1969) julkaisema jalan tilavuuden laskukaava huomioi muiden kudosten osuudet, jolloin jalan tilavuuteen suhteutettu veren virtausnopeus kuvaa pelkästään jalan lihaksen veren virtausnopeutta. (Biolo et al., 1995a; Jorfeldt & Wahren, 1971; Jones & Pearson, 1969)

Veren virtausnopeuden muutokset heijastavat proteiiniaineenvaihduntaan. Verenkierron lisääntyessä vapaat aminohapot kulkeutuvat nopeammin kudoksiin. Kuormituksen jälkeen tehdyissä mittauksissa veren virtaus on 5-6 ml/min/100ml jalan tilavuudesta, kun taas levossa arvot ovat noin 3 ml/min/100 jalan tilavuudesta. (Biolo et al., 1995b; Rasmussen et al., 2000)

## 8. ISOTOOPPIMENETELMÄN ONGELMAT

### 8.1 MENETELMÄN FYSIOLOGISET OLETTAMUKSET

Isotooppimenetelmä perustuu tiettyihin fysiologisiin olettamuksiin. Laskutoimituksissa ei oteta huomioon sitä, että leimattua aminohappoa voidaan käyttää uudelleen synteesiin, kun se proteiinien hajoamisen tuloksena on päässyt takaisin intrasellulaaritalaan. Aminohappojen kierto vapaasta aminohappoltaasta kudokseen ja takaisin aminohappoltaaseen vaihtelee eri aminohapoilla. Kierron nopeus riippuu aminohapon pitoisuudesta intrasellulaaritalassa. Fenyylialaniinilla kierron nopeus on  $0,5 \pm 0,1$  h, leusiinilla  $0,4 \pm 0,1$  h, lysiinillä  $2,1 \pm 0,3$  h ja alaniinilla  $0,8 \pm 0,1$ . (Rasmussen et al., 2000; Biolo et al., 1995a)

Menetelmässä tulee huomioida aminohappojen erilainen aineenvaihdunta. Fenyylialaniini ja lysiniä ei hapeteta lihaksessa. Niitä käytettäessä kaikki lihaksen intrasellulaaritalasta hävinnyt aminohappo tarkoittaa aminohapon hyväksikäyttöä proteiinisynteesiin. Leusiinia hapetetaan lihaksessa, jolloin lihaksen intrasellulaaritalasta hävinnyttä aminohappoa käytetään synteesiin tai energiaksi. Jos leimattuna aminohappona on pelkästään leusiini, myös hapettuneen leusiinin määrä tulee mitata uloshengitysilmaasta (Tarnopolsky et al., 1991). Kun ei-välttämätöntä aminohappoa käytetään merkkiaineena, on huomioitava, että elimistö pystyy valmistamaan näitä aminohappoja myös itse. Alaniinilla mitattaessa lihaksen intrasellulaaritalaan tulleen alaniinin määrä kuvaa proteiinien hajoamisesta vapautunutta ja pyruvaatista muodostunutta alaniinia. (Biolo et al., 1995b)

Kudoksen kertymän ja veren aminohappopitoisuuksien uskotaan edustavan koko intrasellulaaritalaa. Intrasellulaaritalasta on erotettava ekstrasellulaaritala, jonka kautta aminohapot siirtyvät takaisin vereen. Ekstrasellulaaritalan kertymä- ja pitoisuusarvot ovat intrasellulaaritalan ja laskimon kertymien ja pitoisuuksien välillä. (Biolo et al., 1995c)

Intrasellulaaritalan tulee olla homogeeninen, jolloin kaikkien aminohappojen hyödyntäminen on niiden pitoisuuteen suhteutettuna samanlaista. Lisäksi oletetaan, että kaikki proteiinisynteesiin käytettävät aminohapot otetaan vapaasta aminohappoltaasta. (Rasmussen et al., 2000)

Leimattujen merkkiaineiden käytössä yleensä oletetaan, että leimattu aine ei häiritse luonnollisesti esiintyvää substraattia. Lisäksi leimatun aineen tulee jäljitellä luonnollisen substraatin aineenvaihduntaa. Leimattujen merkkiaineiden infusointi saattaa häiritä substraatin luonnollista aineenvaihduntaa, jos infuusionopeus on suuri. Suuri infuusionopeus on usein välttämätöntä, jotta merkkiaine näkyy GC/MS:ssä. (Wolfe 1992, 14-15)

Jalan lihaksen proteiiniaineenvaihdunta on 85-90 % koko jalan proteiiniaineenvaihdunnasta. Ihon, luun ja rasvakudoksen aineenvaihdunnan ei uskota olevan merkittävä tekijä aineenvaihdunnassa, eikä niitä huomioida kolmiollasmallissa. Lihasnäytteet otetaan *vastus lateralis* -lihaksesta, jolloin sen nopeiden ja hitaiden lihassolujen suhde vastaa koko jalan lihasten lihassolusuhdetta. (Biolo et al. 1995a)

## 8.2 VERI- JA LIHASNÄYTTEIDEN KÄSITTELY

A-V -mallin mittauksissa on havaittu, että valtimon ja laskimon pitoisuuksien muutokset tapahtuvat eri nopeudella. Kun valtimon pitoisuus nousee toiselle steady state -tasolle, laskimon pitoisuus kohoaa myöhemmin uudelle tasolle. Vastaavasti valtimon pitoisuuden laskiessa, laskimon pitoisuus alenee pienellä viiveellä. Näiden tekijöiden vuoksi verinäytteiden oton ajoitus on tärkeää. Nykykäsityksen mukaan neljä näytettä tasaisin intervallein on riittävä, kun jokaisesta näytteestä määritetään vielä rinnakkaisnäytteet. (Macdonald, 1999)

Kolmiollasmallin heikkoutena on lihaksen intrasellulaaritilan kertymäarvon määrittäminen. Määrittäminen tarkkuus ja toistettavuus riippuu suurelta osin näytteen laboratorioskäsitteystä. Ennen kun lihasnäyte jäädytetään, siitä poistetaan kaikki näkyvä rasva, veri ja sidekudos (Biolo et al., 1995a,b). Sen jälkeen näytteessä on vielä 10-20 % muuta kuin lihasproteiinia. Joissakin tapauksissa lihasproteiinin osuudeksi jää vain 50 %. (Wagenmakers, 1999)

Näytteet homogenisoidaan ja liuotetaan hapossa. Homogenisoinnin ja happoliotuksen tarkoituksena on erottaa rasva ja veri lihaskudoksesta, jolloin jäljelle jäävä näyte sisältää vain lihasproteiineja. Jos lihasnäytteeseen jää 'likaa', GC/MS:n erottelukyky heikkenee, jolloin kertymä- ja pitoisuusarvot vaihtelevat suuresti. Puhdistamattoman ja puhdistetun näytteen välillä pitoisuusero voi olla yli 20 %. Pitoisuusero tulee näkyviin substraateissa,

joiden pitoisuus intrasellulaaritulassa on huomattavasti suurempi kuin ekstrasellulaaritulassa (aminohapot). (Wagenmakers, 1999)

Valtimo- ja laskimonäytteitä otetaan yleensä neljän näytteen sarjoissa. Silloin niiden toistettavuusarvot voidaan määrittää. Sen sijaan lihasnäytteitä saadaan vain yksi, jolloin neljän verinäytteen arvoista lasketaan keskiarvot vastaamaan yhtä lihasnäytettä. (Wagenmakers, 1999)

Kolmiollasmallin vahvuutena on pieni näytekoko, koehenkilöiden turvallisuus (verrattuna radioaktiivisiin isotooppeihin) ja lihasnäytteestä saatava lisäinformaatio verrattuna pelkkään A-V -malliin. Lihasnäytteen kertymäärvoista tulisi saada lisätietoa. Varsinkin näytteiden toistettavuus ja tarkkuus on kyseenalaista. (Wagenmakers, 1999)

### 8.3 VEREN VIRTAUKSEN MITTAAMISEEN LIITTYVÄT ONGELMAT

Indosyaaniini-väriaineen infuusio veren virtauksen mittaamiseen on luotettava menetelmä, kun steady state -tila on saavutettu. Levossa steady state saavutetaan kolmessa minuutissa ja kuormituksen aikana tai jälkeen 1 min 20 sekuntia riittää steady state -tilan saavuttamiseen. Menetelmä ei myöskään rajoita kuormitusmallia. Menetelmän heikkoutena on sen invasiivisuus (tehdään paljon kliinisiä toimenpiteitä) ja näytteiden keräys verrattuna muihin menetelmiin (esim. MRI = *magnetic resonance imaging* ja termodiluutio). Kuormituksessa veren virtaus nousee nopeasti ja sopeutuu kuormituksen aikana lihastyön aiheuttamiin paineen muutoksiin verisuonissa. Mittausmenetelmän tulisi rekisteröidä virtausnopeus lihaksen supistus- ja relaksoitumisvaiheen aikana. Palautumisen aikana veren virtausnopeus laskee, kun aineenvaihduntaa aktivoivien ja lihaksen mekaanisten tekijöiden (enstyymit, hormonit) vaikutus vähenee. Kuormituksen jälkeen mitatut arvot eivät siis kuvaa kuormituksen aikaisia arvoja. (Rådegran, 1999)

### 8.4 MENETELMÄN TOISTETTAVUUS JA LUOTETTAVUUS

Verinäytteiden toistettavuuden mittauksissa johtopäätöksenä on, että tarvitaan neljä näyteparia ja jokaisesta näytteestä rinnakkaismääritys. Näiden keskiarvoa pidetään luotettavana arvona. (Macdonald, 1999)

Lahti (2000) käsitteli kaksi näytesarjaa ja mittasi molemmista näytesarjoista rinnakkaiset näytteet. Rinnakkaisten näytteiden keskiarvojen vaihtelu näytesarjojen välillä oli noin 4 %. (Lahti, 2000)

Vaikka Wagenmakers (1999) artikkelissaan epäilee lihasnäytteiden käsittelyn luotettavuutta, Patterson et al. (1997) tutkimuksellaan kumoaa nämä epäilyt. Lihasnäytteiden kertymäärvot ovat usein hyvin pieniä, jolloin laitteen on oltava tarpeeksi erottelukykyinen. Mitatut kertymäärvot nousivat lineaarisesti 0-0,01 % välillä ( $r^2 = 0,9999$ ). Kolme rinnakkaisnäytettä eivät eronneet toisistaan. Injektoidun näytteen määrä ei vaikuttanut mittaustulokseen, jolloin näytettä voidaan injektoida 0,1-2 nmol. GC/MS:llä pystytään mittaamaan luotettavasti pieniäkin kertymiä, kun valitaan oikea merkkiaine ja sopivat GC/MS:n ajo-olosuhteet. Aikaisemmin käytettiin pelkästään IRMS:ä (*isotope ratio mass spectrometer*), jolloin lihasnäytteen pitää olla vähintään 10 mg ja isotoopin  $^{13}\text{C}$ . GC/MS:llä voidaan mitata pieniä näytteitä ja useita eri isotooppeja. GC/MS:n käytössä on tiettyjä rajoituksia. Isotoopin on hyvä olla vähintään kolme yksikköä painavampi kuin luonnollinen isotooppi. Esimerkiksi  $^2\text{H}_5$ -fenyylialaniinissa on viisi vetyä korvattu  $^2\text{H}$ -isotoopilla ja GC/MS:ssä se näkyy viisi yksikköä painavampana kuin luonnollinen fenyylialaniini. (Patterson et al., 1997)

Hallidayn ja McKeranin (1975) tutkimuksessa GC/MS:n toistettavuutta mitattiin 14 kuukauden ajan. Näytteet valmistettiin väkevistä ammoniumsulfaateista ja albumiinista. Mittauksia tehtiin yhteensä 13. Ammoniumsulfaatilla kertymän keskihajonta oli 0,21 % ja albumiinilla 0,20 %. Rinnakkaisnäytteiden variaatio oli alle 0,02 % kertymäärhoista. Näytteiden koolla (25-100  $\mu\text{g}$ ) ei ollut vaikutusta toistettavuuteen.

Calder et al. (1999) tutkivat veren ja plasman aminohappoja GC/MS:llä t-BDMS-derivatisoinnin jälkeen. Toistettavuutta mitattiin 10 rinnakkaisesta veri- ja plasmanäytteestä. Yhtä poikkeusta lukuun ottamatta variaatio oli  $\leq 1.0\%$  (aspartaateilla 1.8 %). Aminohappoja lisättiin plasmaan tai vereen 96-103 %, mutta aspartaattia lisättiin vähemmän. Tämä saattaa olla syynä suurempaan variaatioon. Korrelaatiokerroin oli 0.9999.

Van Eijkin et al. (1999) tutkimuksessa korrelaatiokerroin vaihteli 0.9984 ja 0.9997 välillä. Keskihajonta väkevissä näytteissä oli 0.1-0.5 % ja laimeammassa näytteissä 0.2-0.8 %. Calderin et al. (1999) ja van Eijkin et al. (1999) tutkimuksien perusteella GC/MS:n toistettavuus on suurilla väkevyyksillä hyvä, mutta heikkenee näytteen ollessa laimeampi.

## 9. TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEEESIT

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää proteiiniaineenvaihduntaa mittaavan isotooppi-menetelmän toistettavuutta ja tarkkuutta rinnakkaisnäytteiden avulla sekä osoittaa hypertrofisen maksimivoimaharjoituksen aiheuttavan muutoksia proteiiniaineenvaihdunnassa isotooppimenetelmällä mitattuna.

### Tutkimusongelmat:

1. Onko isotooppi-infuusio –menetelmä toistettava menetelmä proteiiniaineenvaihdunnan mittaamiseen?
2. Riittääkö menetelmän tarkkuus erottamaan maksimivoimaharjoituksen aiheuttamat muutokset proteiiniaineenvaihdunnassa?

### Hypoteesit:

$H_1$  *Isotooppi-infuusio on toistettava menetelmä proteiiniaineenvaihdunnan mittaamiseen.*

$H_2$  *Menetelmän tarkkuus on riittävä, jotta maksimivoimaharjoituksen aiheuttamat muutokset proteiiniaineenvaihdunnassa tulevat esiin.*

Isotooppi-infuusio –menetelmää on käytetty 1990-luvulta alkaen (Wolfe, 1992). Sitä pidetään tällä hetkellä parhaimpana proteiiniaineenvaihdunnan tutkimusmenetelmänä, koska sillä pystytään jäljittelemään aminohappojen luontaista aineenvaihduntaa *in vivo*. Menetelmän tarkkuus ei ole vakuuttanut kaikkia tutkijoita, sillä menetelmä on monivaiheinen ja vaatii tarkkoja laboratorioanalyysijä. (Wagenmakers, 1999). Calderin et al. (1999), van Eijkin et al. (1999) ja Pattersonin et al. (1997) mukaan verinäytteiden analyysin toistettavuus on hyvä (korrelaatiokerroin  $r=0,9999-0,9987$ ), kun näytteet ovat väkeviä. Isotoopin pienemmillä pitoisuuksilla verinäytteiden toistettavuusarvoja ei ole mitattu. Isotooppi-infuusio –menetelmässä merkkiaineiden pitoisuus on huomattavasti pienempi kuin Calderin et al. (1999) ja van Eijkin et al. (1999) tutkimuksissa. Isotooppi-infuusio –menetelmää voidaan käyttää kuvaamaan maksimivoimaharjoituksen aiheuttamia muutoksia proteiiniaineenvaihdunnassa, jolloin proteiinien synteesi ja hajoaminen kiihtyvät heti voimaharjoituksen jälkeen. (Biolo et al., 1995b)



## 10. MITTAUSMENETELMÄT

### 10.1 KOEHENKILÖT

Koehenkilöt (lepomittauksessa  $n=4$ , kuormitusmittauksessa  $n=4$ ) olivat terveitä, liikunnallisesti aktiivisia 22-37 -vuotiaita miehiä, joilla ei ollut todettu mitään proteiiniaineenvaihduntaan vaikuttavia sairauksia (diabetes, ruoka-aineallergiat, hormonaaliset häiriöt) (Taulukko 4). Koehenkilöille selvitettiin kirjallisesti ja suullisesti mittauspäivänä tehtävät toimenpiteet ja koehenkilöt allekirjoittivat suostumuslomakkeen. Tutkimussuunnitelma ja koehenkilötiedote oli hyväksytty Jyväskylän yliopiston eettisessä toimikunnassa sekä Keski-Suomen Sairaanhoidopiirin eettisessä toimikunnassa.

TAULUKKO 4. Koehenkilötiedot ( $n=8$ ).

IKÄ (v)	$26,4 \pm 5,0$
PITUUS (cm)	$180,5 \pm 9,4$
PAINO (kg)	$80,9 \pm 10,9$
HEMOGLOBIINI (g/l)	$153 \pm 12$
HEMATOKRIITTI (%)	$44,8 \pm 3,3$
SENKKA (mm/h)	$2,8 \pm 1,3$
GLUKKOOSI (mmol/l)	$4,3 \pm 0,3$
KOKONAISKOLESTEROLI (mmol/l)	$4,2 \pm 0,7$
HDL-KOLESTEROLI (mmol/l)	$1,3 \pm 0,2$
JALAN TILAVUUS (l)	$10,1 \pm 1,3$

### 10.2 KOEASETELMA

Koehenkilöiden tuli välttää raskasta fyysistä aktiivisuutta viikkoa ennen mittausta ja mittausta edeltävänä päivänä liikunta oli kokonaan kielletty. Kaikki koehenkilöt täyttivät ruokapäiväkirjaa viiden päivän ajan ja harjoituspäiväkirjaa kahden viikon ajan ennen mittausta. Henkilöt tulivat mittaukseen paastonneena edellisestä illasta alkaen. Mittauspäivän aikana he saivat juoda vettä ja tarpeen tullen käydä vessassa. Neljä koehenkilöä suoritti alaraajojen lihaksia kuormittavan hypertrofisen

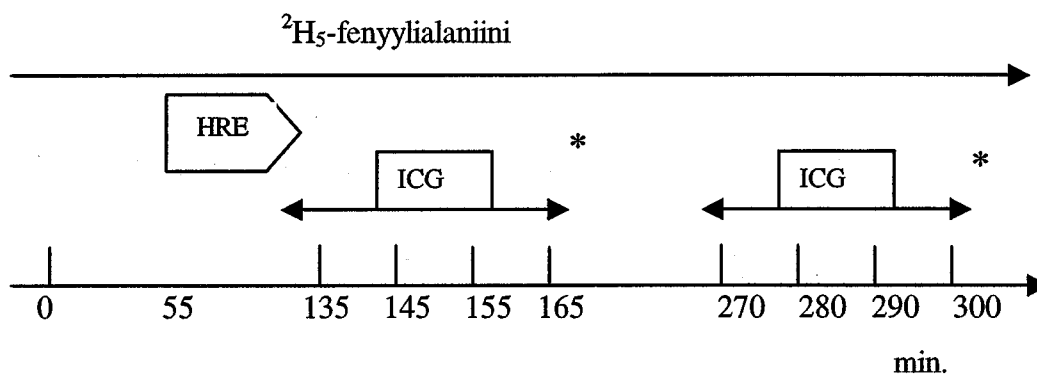
maksimivoimaharjoituksen. Maksimivoimaharjoituksen tiedetään aiheuttavan muutoksia proteiinien synteesissä ja hajoamisessa. Liikkeen maksimitoistomäärä (8-10 RM) mitattiin noin kaksi viikkoa ennen varsinaista mittauspäivää.

Koehenkilöt mitattiin kuvion 14 mukaisesti. Lepomittauksessa koehenkilöt olivat vuodelevossa koko mittauksen ajan. Kaikilta koehenkilöiltä otettiin proteiiniaineenvaihdunnan mittausta varten yhteensä kahdeksan näyteparia valtimosta ja 10 näyteparia laskimosta. Näytepari tarkoittaa 2 x 2 ml verta eri koeputkiin laitettuna. Laskimonäytteitä oli enemmän, koska taustanäytteet otettiin käsivarren laskimosta. Tämä ei vaikuttanut mittaustuloksiin, koska tarkasteltavaa  $^2\text{H}_5$ -fenyylialaniinia ei oltu vielä infusoitu. Molempien mittausjaksojen (mittausjakso 1 = 135, 145, 155, 165 minuuttia infuusion aloittamisesta; mittausjakso 2 = 270, 280, 290 ja 300 minuuttia infuusion aloittamisesta) neljän verinäytteen tuloksista laskettiin keskiarvo, joka suhteutettiin mittausjakson lopulla otettuun lihasnäytteeseen. Koska lihasnäytteen ottaminen vaikuttaa veren virtaukseen, sitä ei voitu ottaa verinäytejakson keskellä tai alussa, vaan paras vaihtoehto oli ottaa se välittömästi viimeisen verinäytteen jälkeen. Kuormitus ei vaikuttanut aikatauluun vaan kaikki tarvittavat näytteet otettiin samaan aikaan infuusion aloittamisesta kuin lepomittauksessa. Verinäytteistä näytesarjat 1 ja 2 käsiteltiin erikseen laboratoriossa ja jokaisesta näytteestä ajettiin GC/MS:llä kaksi rinnakkaista tulosta. Jokaisesta yksittäisestä näytteestä saatiin siis neljä rinnakkaista tulosta. Lihasnäytteistä jokaisesta näytteestä saatiin kolme rinnakkaista tulosta.

Veren virtauksen mittaamiseen tarvittavat näytteet (2 ml reisilaskimosta ja 2 ml kyynärlaskimosta) otettiin samaan aikaan kuin proteiiniaineenvaihdunnan mittaukseen tarvittavat näytteet. Molemmilta mittausjaksoilta saatiin neljä tulosta (135, 145, 155, 165 ja 270, 280, 290, 300 minuuttia infuusion aloittamisesta), joiden keskiarvoa käytettiin lopullisissa proteiiniaineenvaihdunnan muuttujissa.

- | verinäyte
- \* lihasbiopsia

HRE maksimivoimaharjoitus



KUVIO 14. Koeasetelma.

### 10.3. AINEISTON KERÄYS

#### *Esivalmistelut*

Mittauspäivän tarkka ohjelma on esimerkkinä liitteessä 1. Koehenkilöt saapuivat paastotilassa Jyväskylän yliopiston Liikunta- ja terveyslaboratorion liikuntabiologian laitokselle, jossa heidät punnittiin ja otettiin verinäytteet hematokriitin, hemoglobiinin ja kolesterolin määrittämistä varten. Sen jälkeen heidät kuljetettiin Keski-Suomen Keskussairaalalle mittausta varten varattuun huoneeseen. Jalan tilavuus mitattiin ennen infuusion aloittamista. Jalan ympärysmittat mitattiin mittanauhalla seitsemästä eri kohdasta ja jalkaterän pituus ja korkeus mitattiin (Liite 2). Mittaus suoritettiin kaksi kertaa ja kaikkien koehenkilöiden mittauksen teki sama henkilö.

#### *Taustaverinäytteet*

Polyuretaanikatetri (koko, 18G; Hydrocath™, Ohmeda, Iso-Britannia) asetettiin vasemman kyynärvarren laskimoon. Samalla otettiin taustaverinäytteet proteiiniaineenvaihdunnan ja veren virtauksen mittaamiseen. Taustaverinäytteet otettiin käsivarren laskimokatetrin avulla ruiskuun, josta sopiva määrä näytettä jaettiin koeputkiin.  $^2\text{H}_5$ -fenyylialaniinin (Cambridge Laboratories, USA) alkuannos ja infuusio käynnistettiin heti taustaverinäytteiden jälkeen.

### *Infuusioliuoksen valmistaminen*

Tarvittava  $^2\text{H}_5$ -fenyylialaniinin määrä laskettiin tarkasti koehenkilön painon mukaan (Liite 3). Aminohappoa punnittiin laskettu määrä ja jauhe liotettiin steriilisti fysiologiseen suolaliuokseen ja imettiin ruiskuun. Koska infuusioliuokset valmistettiin muutamaa vuorokautta aikaisemmin, ruiskuun laitettiin aminohappoliuoksille tarkoitettu suodatin steriilisyden ylläpitämiseksi. Ruiskut säilytettiin viileässä mittauspäivään asti. Alkuannos oli  $2 \mu\text{mol/kg}$  ja infuusionopeus  $0,05 \mu\text{mol/kg/min}$ . Koehenkilöiden aamupaino mitattiin ennen mittausta. Kun tiedettiin infuusioliuoksen tarkka konsentraatio, laskettiin tarkistettu pumpun nopeus, jotta varsinainen infuusionopeus olisi  $0,05 \mu\text{mol/kg/min}$  (Liite 4). Infuusioon käytettiin infuusiopumppua (Perfusion Pump, Saksa).

### *Katetrointi*

Katetrointi suoritettiin noin 100 minuuttia infuusion aloittamisesta. Reisivaltimon ja laskimon polyuretaanikatetrit (koko 20G; Hydrocath<sup>TM</sup>, Ohmeda, Iso-Britannia) asetettiin paikallispuudutuksessa oikeaan nivustaipeeseen. Valtimopaineen avulla tarkistettiin katetrien sijainti oikeassa suonessa. Samalla asetettiin oikeaan kyynärvarteen katetri veren virtaukseen tarvittavien näytteiden keräämistä varten.

### *Indosyaniini-infuusio*

Indosyaniini liotettiin suolaliuokseen, imettiin ruiskuun mittauspäivän aamuna ja säilytettiin huoneenlämmössä. Noin 125 minuuttia fenyylialaniini-infuusion aloittamisesta käynnistettiin indosyaniini-infuusio. Indosyaniinia ( $0,5 \text{ mg/ml}$ ) infusoitiin reisolaskimoon nopeudella  $60 \text{ ml/h}$  infuusiopumpulla (Perfusion Pump, Saksa).

### *Verinäytteiden ottaminen*

Ensimmäinen verinäyte otettiin 135 minuutin kohdalla. Veren virtausnäytteet otettiin samanaikaisesti reiden ja käsivarren laskimosta. Sen jälkeen otettiin reiden laskimonäyte ja valtimonäyte. ICG-infuusio pysäytettiin hetkeksi, jotta valtimonäyte saatiin otettua. Valtimo- ja laskimonäyte ( $2 \text{ ml}$ ) laitettiin esipunnittuihin (Liite 5.),  $2 \text{ ml}$   $15 \%$  sulfosalisyylihappoa (SSA) ja  $200 \mu\text{l}$  sisäistä standardia ( $50 \mu\text{mol/l}$   $^{13}\text{C}_6$ -fenyylialaniinia; Cambridge Laboratories, USA) sisältäviin koeputkiin, sekoitettiin huolellisesti sekoittajalla (Vortex) ja säilöttiin jäämurskaan. Veren virtausnäytteet ( $2 \text{ ml}$ ) laitettiin koeputkiin ja säilytettiin huoneenlämmössä. Vastaavat näytteet otettiin 145, 155 ja 165 minuutin kohdalla.

### *Lihasnäytteiden ottaminen*

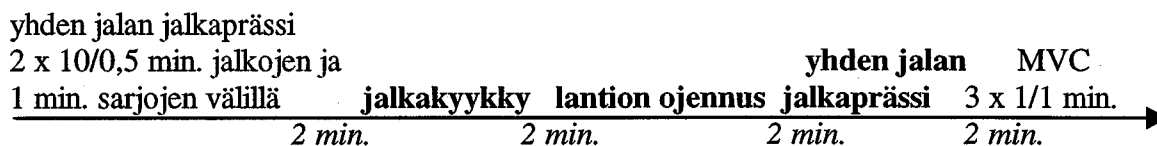
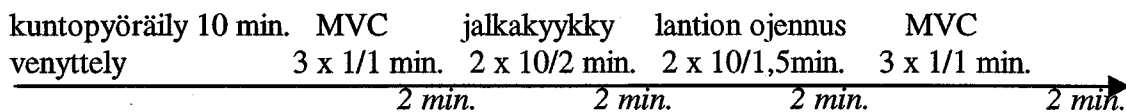
Välittömästi viimeisen verinäytteen jälkeen otettiin lihasnäyte. Lihasnäyte otettiin halkaisijaltaan 4 mm:n kokoisella Bergströmin biopsianeulalla. Iho ja ihonalainen kudos puudutettiin ja neula työnnettiin 6-7 mm:n kokoisesta viillosta 3-5 cm:ä syvälle lihakseen. Neulan leikkausikkuna pidettiin suljettuna, siihen asti kunnes sopiva näytekohta löytyi. Leikkaussylinteri suljettiin ja avattiin 2-4 kertaa, jolloin neulaan jäi 30-50 mg kudosta. Näytteestä poistettiin side- ja rasvakudos ja se huuhdeltiin jääkyllällä suolaliuoksella ennen siirtämistä näyteputkeen ja nestemäiseen tyypeen.

### *Toinen mittausjakso ja jälkitoimenpiteet*

ICG-infuusio lopetettiin lihasnäytteen ottamisen jälkeen ja aloitettiin uudestaan 260 minuutin kohdalla. Veri- ja lihasnäytteitä kerättiin toinen jakso 270, 280, 290 ja 300 minuutin kohdalla infuusion aloittamisesta. Molemmat infuusiot lopetettiin viimeisen lihasnäytteen ottamisen jälkeen. Käsivarsien ja reiden katetrit poistettiin ja nivusta painettiin voimakkaasti verenvuodon tyrehtyttämiseksi. Painamisen jälkeen nivusen päälle laitettiin paino ja koehenkilöä tarkkailtiin kahden tunnin ajan mittauksen lopettamisesta. Katetroinnin ja lihasnäytteen ottamisen takia fyysinen rasitus oli kielletty seuraavaan iltaan saakka.

### *Voimaharjoitus*

Verryttelyksi poljettiin kuntopyörällä 10 minuuttia vapaasti valittavalla kevyellä kuormalla. Sen jälkeen mitattiin jalkojen maksimaalinen voluntäärinen isometrinen ojennusvoima jalkadynamometrillä kolmella yrityksellä. Varsinaiseen voimaharjoitukseen kuuluivat jalkakyykky (syväkyykky, jolloin reiden yläosa on vaakatasossa), yhden jalan jalkaprässi ja lonkan ojennus päinmakuulla, joita kaikki tehtiin noin 2 x 10 RM. Sarjojen välillä oli minuutin mittainen palautus ja harjoitteiden välillä kahden minuutin palautus. Ennen kolmatta kierrosta mitattiin jalkojen maksimaalinen voluntäärinen isometrinen ojennusvoima. Kolmannella kierroksella harjoitteita tehtiin uupumukseen saakka kuorman pysyessä samana. Koehenkilöä kannustettiin voimakkaasti mahdollisimman moneen toistoon. Lopuksi mitattiin vielä jalkojen maksimaalinen voluntäärinen isometrinen ojennusvoima. Voimaharjoituksen jälkeen suoritettiin katetrointi ja mittausta jatkettiin edellä kuvatulla tavalla (Kuvio 14).



#### uupumukseen saakka suoritettu harjoite

MVC=maksimaalinen voluntäärinen isometrinen ojennusvoima

KUVIO 15. Kuormitusasetelma.

## 10.4. AINEISTON ANALYSOINTI

### *Verinäytteet*

Proteiiniaineenvaihdunnan mittausta varten verinäytteet punnittiin mittauksen päätyttyä, jotta näytteen tarkka määrä saatiin selville. Punnituksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin 4°C 10 minuutin ajan (2500 rpm)(Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech, Saksa), kirkas supernatantti pipetoitiin puhtaisiin näyteputkiin ja putket pakastettiin myöhempiä analyysejä varten.

Verinäytteiden kertymä- ja pitoisuusarvoja varten valmistettiin kationinvaihtohartsia sisältävät kolonnit, ja hartsi puhdistettiin huolellisesti emäksellä, hapolla ja tislattulla vedellä. Näyte kaadettiin kolonniin, jolloin proteiinit tarttuivat hartsin. Proteiinit irrotettiin NH<sub>4</sub>OH:llä hartsista ja ne kerättiin lasiputkiin. Näytteet kuivattiin lämpimässä vesihauteessa, jonka haihdutusilma puhdistettiin aktiivihiehellä. Kuivatut näytteet derivatisoitiin t-BDMS-derivaatalla, jonka jälkeen niistä määritettiin <sup>2</sup>H<sub>5</sub>-fenyylialaniinin kertymä GC/MS:llä (HP Agilent 5973 N, GC 6890 Plus+, Hewlett Packard, USA). GC/MS:ssä käytettiin elektronipommitusta ionisaatioon. (Lahti, 2000)

### *Lihasnäytteet*

Lihasnäyte punnittiin ja koeputkeen lisättiin kylmää perkloorihappoa (5 % PCA). Sisäistä standardia (2,472 μmol/ml <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-fenyylialaniinia; Cambridge Laboratories, USA) lisättiin 2 μl/mg. Näyte jauhettiin teflonkärjellä varustetulla näytesurvimella ja sentrifugoitiin mikrosentrifugissa (Biofuge A, Heraeus Sepatech, Saksa) 4°C neljän minuutin ajan (3000

rpm). Liuososa otettiin erilliseen näyteputkeen ja happolisäys, jauhaminen ja sentrifugointi tehtiin vielä kahdesti ja molemmilla kerroilla otettiin liuososa talteen. Näytteet haihdutettiin yön yli +50 ° C uunissa. Seuraavana päivänä kuivunut näyte punnittiin ja kaadettiin lasiseen koeputkeen ja lisättiin suolahappoa. Näytettä pidettiin yön yli kuumennusalustalla, jonka jälkeen se käsiteltiin kuten verinäytteet. (Lahti, 2000)

#### *Veren virtausnopeusnäytteet*

Näytteet sentrifugoitiin 4°C 10 minuutin ajan (2500 rpm). Erottunut plasma kaadettiin mustiin kyvetteihin ja mitattiin spektrofotometrillä (Shimadzu UV 160-A, Japani) aallonpituudella 805 nm. Taustanäytteestä tehtiin standardiliuos lisäämällä punnittuun plasmaan tunnettu määrä ICG-liuosta ja mittaamalla tämän liuoksen absorbanssi. Standardiliuoksen tilavuuksien ja absorbanssin avulla laskettiin laimennuskertoimen. Verinäytteiden absorbanssin erotuksen, laimennuskertoimen, infuusionopeuden ja hematokriitin avulla voitiin laskea lopulliset veren virtausnopeuden arvot. (Liite 6.) (Jorfeldt & Wahren, 1971)

## 10.5 LASKUTOIMITUKSET

Verinäytteiden kertymä- ja pitoisuusarvot ja lihasnäytteiden kertymäarvot laskettiin kolmiollasmalliin perustuvilla laskutoimituksilla (Biolo et al., 1995a). Veri- ja lihasnäytteiden kertymäarvot korjattiin 'skew correction' – ja 'overlapping'-kertoimien avulla, jotka huomioivat isotoopin luonnollisen esiintyvyyden ja sisäisen standardin vaikutuksen GC/MS:n tuloksiin. Pitoisuusarvot laskettiin sisäisen standardin menetelmällä (Biolo et al., 1995a), jossa samaa aminohappoa, mutta eri isotoopilla leimattua aminohappoa lisättiin näytteeseen tunnettu määrä. Kun GC/MS määrittää sekä näytteen että sisäisen standardin kertymän ja kun tiedetään sisäisen standardin tilavuus, voidaan laskea isotoopin pitoisuus näytteessä.

## 10.6 TILASTOLLINEN KÄSITTELY

Proteiinien synteesin, hajoamisen ja nettotilanteen keskiarvot, keskihajonnat, korrelaatio- ja variaatiokertoimet laskettiin lepomittauksessa ja voimaharjoituksen jälkeen. Fenyylialaniinin kertymän ja pitoisuuden keskiarvot, keskihajonnat, korrelaatio- ja variaatiokertoimet laskettiin myös lepomittauksissa ja voimaharjoituksen jälkeen. Lisäksi laskettiin näytesarjojen ja rinnakkaisten tulosten keskiarvot, keskihajonnat ja

variaatiokertoimet GC/MS:ltä saaduista tuloksista. Lihaksen rinnakkaisnäytteiden keskiarvo ja keskihajonta laskettiin leporyhmän näytteistä. Kaikkien muuttujien tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin Studentin t-testin ja parittaisen kaksisuuntaisen t-testin avulla ja muuttujien välistä tilastollista yhteyttä Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla. Tilastollisen merkitsevyyden rajaksi asetettiin  $p=0.05$ . Veren virtauksen keskiarvot ja keskihajonnat laskettiin ja tilastollista merkitsevyyttä tarkasteltiin Studentin kaksisuuntaisen t-testin ja parittaisen kaksisuuntaisen t-testin avulla. Kaikkiin tilastollisiin analyyseihin käytettiin Microsoft Excel '97 –taulukkolaskentaohjelmaa.

Tilastomenetelmät valittiin aineiston perusteella siten, että keskiarvojen eroa tarkasteltiin t-testillä, joka kertoo tilastollisesti merkitsevän eron ryhmien välillä. Korrelaatiota käytettiin rinnakkaisnäytteiden tarkastelussa, jolloin toisiaan vastaavien näyteparien korrelaatio ja korrelaatiokerroin saatiin selville. Korrelaatiokertoimen ( $r$ ) selitysosuus saatiin kaavalla selitysosuus =  $r^2$ . Variaatiokerroin (CV) kuvaa joukon keskihajonnan suhdetta keskiarvoon. Sen avulla eri joukkojen variaatiota voidaan verrata toisiinsa.



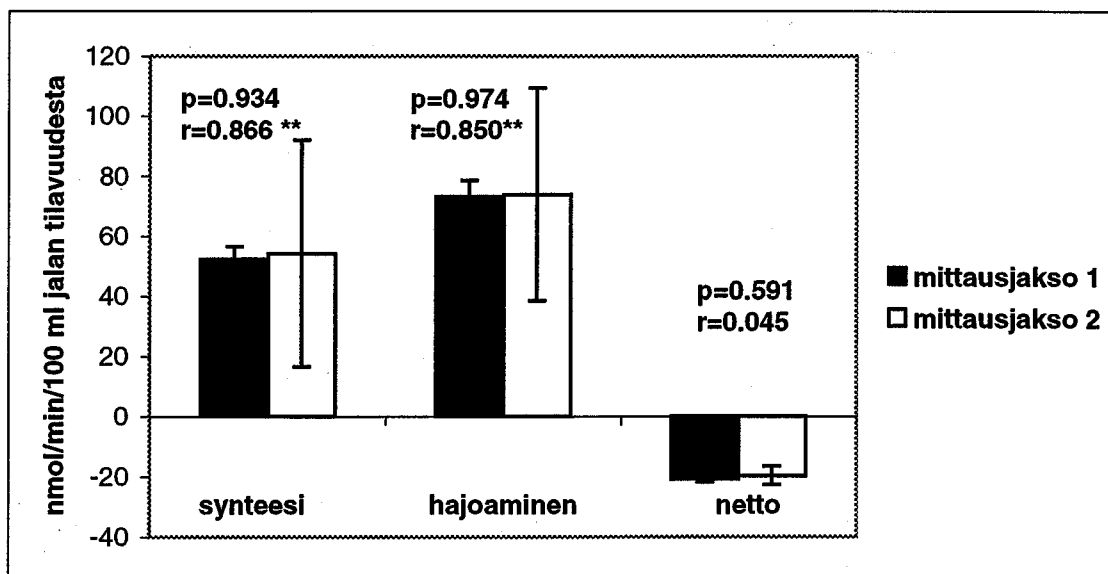
## 11 TULOKSET

Proteiiniaineenvaihdunnan mittaaminen perustuu aminohapon isotoopin infuusioon. Tässä tutkimuksessa infusoitiin  $^2\text{H}_5$ -fenyylialaniinia tavoitenopeudella 0,05  $\mu\text{mol/kg/min}$ . Todellinen infuusionopeus koeryhmällä oli keskimäärin 0,049971  $\mu\text{mol/kg/min}$ . Mittausta edeltävällä jaksolla koehenkilöiden fyysinen aktiivisuus ja ravinto olivat ennalta annettujen ohjeiden mukaisia. Kukaan ei tehnyt raskasta fyysistä suoritusta mittausta edeltävänä päivänä. Ravinto noudatti kaikilla koehenkilöillä Valtion ravitsemusneuvottelukunnan antamia suosituksia (Aro, Mutanen & Uusitupa, 1999, 35). Proteiinien osuus kokonaisenergiasta oli  $18,5 \pm 5,4 \%$  ja painokiloa kohden laskettuna  $1,3 \pm 0,3 \text{ g/kg}$ .

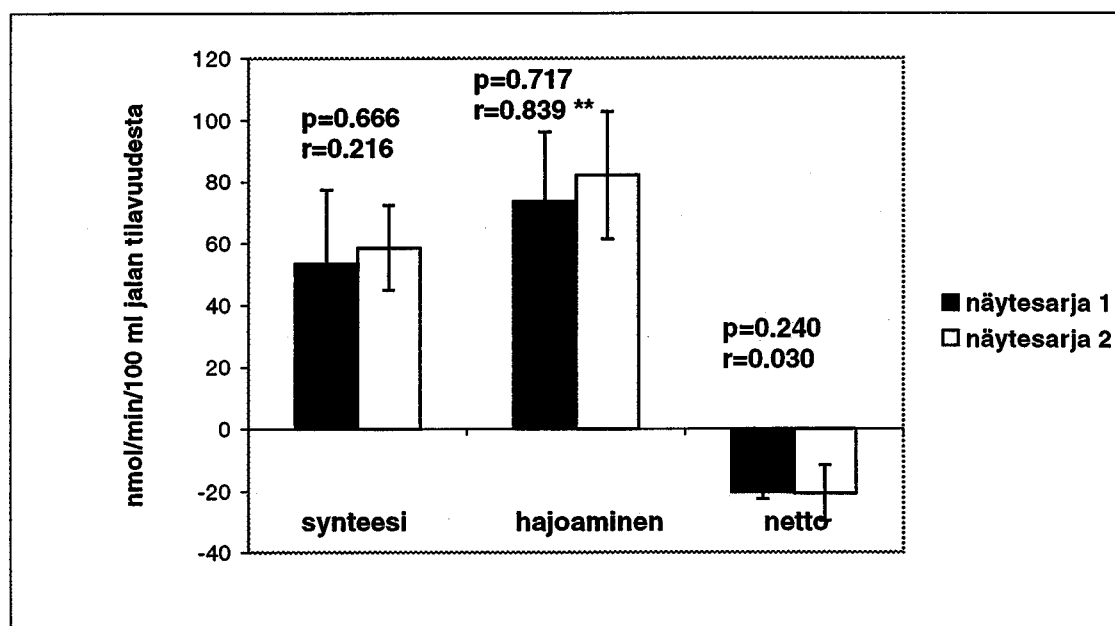
### 11.1 PROTEIINIINEENVAIHDUNTA LEVOSSA

Kuviossa 16 on esitetty proteiiniaineenvaihduntaa kuvaavat arvot lepomittauksessa mittausjaksoilla 1 ja 2. Mittausjakso 1 tarkoittaa 135, 145, 155 ja 165 minuuttia infuusion aloittamisesta otettuja verinäytteitä ja 165 minuutin kohdalla otettua lihasnäytettä. Mittausjakso 2 käsittää 270, 280, 290 ja 300 minuuttia infuusion aloittamisesta otettuja verinäytteitä ja 300 minuutin kohdalla otettua lihasnäytettä. Kuviossa 16 proteiiniaineenvaihdunnan arvot on laskettu kolmelta koehenkilöltä, joilta jokaiselta saatiin neljä verinäytettä ja yksi lihasnäyte. Näin ollen jokaiselta koehenkilöltä laskettiin neljän tuloksen keskiarvo, jotka edelleen keskiarvoistettiin. Proteiinien synteesi, hajoaminen tai nettotilanne eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Absoluuttiset keskiarvot 1 ja 2 jaksoilla olivat lähes samat. Mittausjaksojen väliset korrelaatiokertoimet ( $r$ ) on myös esitetty kuviossa 16.

Otettujen näytesarjojen 1 ja 2 välillä ei ollut eroja synteesissä ( $p=0.666$ ), hajoamisessa ( $p=0.717$ ) eikä nettoarvossa ( $p=0.240$ ). Keskiarvoistettujen 1. ja 2. mittausjaksojen näytesarjojen väliset korrelaatiokertoimet on esitetty kuviossa 17. Kuvion 17 arvot on laskettu kolmen koehenkilön kahdeksasta tuloksesta, koska yhden koehenkilön tulokset erosivat liikaa muiden tuloksista.



KUVIO 16. Proteiinien synteesi, hajoaminen ja netto mittausjaksoilla 1 ja 2. Mittausjakso 1 on 135, 145, 155, 165 minuuttia ja mittausjakso 2 on 270, 280, 290 ja 300 minuuttia infuusion aloittamisesta. P-arvo ja r-arvo kuvaavat mittausjaksojen 1 ja 2 välistä yhteyttä. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta,  $n=3$ , \*\*  $p<0.01$ )



KUVIO 17. Proteiiniaineenvaihdunnan mittausjaksojen 1 ja 2 keskiarvoistetut muuttujat 1- ja 2-näytteiden välillä. Näytteiden 1 ja 2 väliset yhteydet on esitetty p- ja r-arvoilla. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, \*\*  $p<0.01$ ,  $n=3$ )

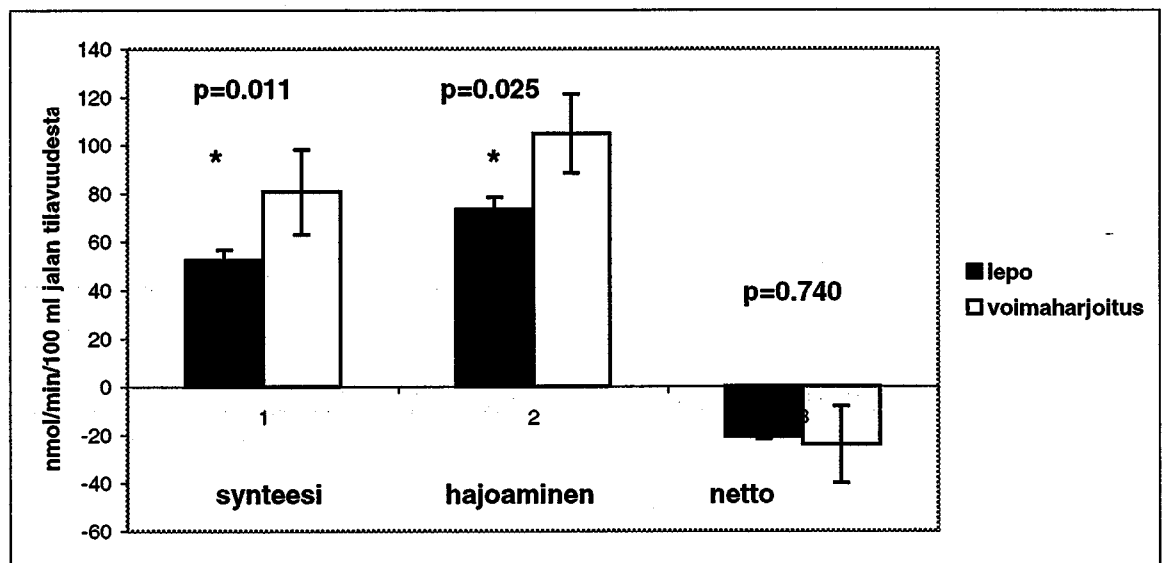
Mittausjaksojen 1 ja 2 sekä näytesarjojen 1 ja 2 variaatiokertoimet on esitetty taulukossa 5.

TAULUKKO 5. Mittausjaksojen 1 ja 2 (n=3) sekä näytesarjojen 1 ja 2 (6 tulosta) variaatiokertoimet (CV(%)).

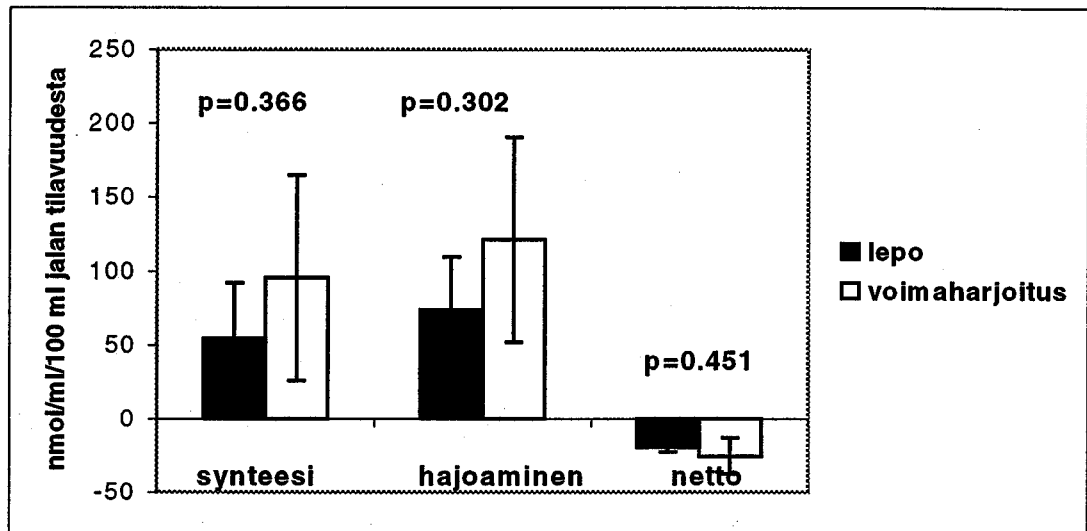
	MITTAUS- JAKSO 1	MITTAUS- JAKSO 2	NÄYTE- SARJA 1	NÄYTE- SARJA 2
Synteesi	8	70	45	17
Hajoaminen	7	48	31	19
Netto	5	16	11	28

## 11.2 PROTEIINIINEENVAIHDUNTA VOIMAHARJOITUKSEN JÄLKEEN

Jalkojen maksimaalisen isometrisen ojennusvoimalla mitattuna maksimivoimaharjoitus aiheutti lihaksiston väsymistä. Muutosprosentti alkuarvoon nähden oli harjoituksen puolessa välissä  $5 \pm 4 \%$  ja lopussa  $8 \pm 4 \%$ . Voimaharjoituksen aiheuttama ärsyke näkyi proteiiniaineenvaihdunnan muuttujissa heti voimaharjoituksen jälkeen mittausjaksolla 1 (Kuvio 18). Synteesi ( $p=0.011$ ) ja hajoaminen ( $p=0.025$ ) olivat tilastollisesti merkitsevästi kiihtyneet, mutta nettotilanteessa ei tapahtunut tilastollisesti merkitsevää muutosta ( $p=0.740$ ). Toisella mittausjaksolla ei tilastollisesti merkitseviä eroja syntynyt lepo- ja voimaharjoitusmittausten välillä, vaikka synteesin ja hajoamisen absoluuttiset arvot olivat korkeampia vastaaviin lepoarvoihin verrattuna. (Kuvio 19).



KUVIO 18. Proteiinien synteesi, hajoaminen ja netto levossa ja voimaharjoituksen jälkeen mittausjaksolla 1. Mittausten välistä eroa on kuvattu p-arvoilla. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, \*  $p < 0.05$ ,  $n=3$  lepomittauksessa,  $n=4$  voimaharjoituksessa)



KUVIO 19. Proteiinien synteesi, hajoaminen ja netto levossa ja voimaharjoituksen jälkeen mittausjaksolla 2. Mittausten välistä eroa on kuvattu p-arvoilla. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta,  $n=3$  lepomittauksessa,  $n=3$  voimaharjoituksessa)

Veren virtausnopeus kasvoi heti voimaharjoituksen jälkeen ( $6,10 \pm 1,37$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta;  $p=0,007$ ), kun lepomittauksissa samaan aikaan veren virtausnopeus oli  $3,62 \pm 0,84$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta. Toisella mittausjaksolla voimaharjoitusryhmällä veren virtausnopeus pysyi kiihtyneenä ( $5,58 \pm 2,00$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta;  $p=0,009$ ) leporyhmään verrattuna ( $3,96 \pm$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta). Leporyhmällä ensimmäisen ja toisen mittausjakson välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa ( $p=0,495$ ), eikä myöskään voimaharjoitusmittauksessa ilmennyt eroa ( $p=0,460$ ) mittausjaksojen 1 ja 2 välillä.

### 11.3 KERTYMÄ- JA PITOISUUSARVOT

Kolmiollasmalliin tarvittavista muuttujista keskeisimmät ovat valtimo- ja laskimoveren sekä lihaksen fenyylialaniinin kertymäärvot sekä valtimo- ja laskimoveren fenyylialaniinin pitoisuudet (Taulukko 6). Lepomittauksessa mittausjaksolla 1 valtimoveren ja lihaksen kertymäarvo oli tilastollisesti merkitsevästi suurempi ( $p=0,035$ ) kuin mittausjaksolla 2. Maksimivoimaharjoituksen jälkeen valtimon ja laskimon kertymäarvot eivät eronneet mittausjaksojen 1 ja 2 välillä tilastollisesti merkitsevästi. Sen sijaan lihaksen kertymäarvo oli tilastollisesti merkitsevästi ( $p=0,024$ ) suurempi mittausjaksojen 1 ja 2 välillä.

Fenyylialaniinin pitoisuusarvot eivät eronneet lepo- eikä voimaharjoitusmittauksessa mittausjaksojen 1 ja 2 välillä. Mittausjaksolla 1 ei ilmennyt tilastollisesti merkitsevää eroa lepo- ja voimaharjoitusmittauksen välillä. Sen sijaan mittausjaksolla 2 lepo- ja voimaharjoitusmittauksen välillä fenyylialaniinin pitoisuus erosi tilastollisesti merkitsevästi valtimossa ( $p=0.013$ ) ja laskimossa ( $p=0.011$ ). Taulukossa 6 on esitetty mittausjaksojen 1 ja 2 väliset korrelaatiokertoimet lepomittauksessa sekä kaikkien muuttujien variaatiokertoimet.

TAULUKKO 6. Fenyylialaniinin kertymät ja pitoisuudet lepomittauksessa ( $n=4$ ) ja voimaharjoituksen ( $n=4$ ) jälkeen. Lepomittauksen arvot on laskettu 1-näytteistä. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, korrelaatiokerroin =  $r$ , variaatiokerroin =  $CV$ , \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , mittausjaksojen 1 ja 2 välillä, †  $p<0.05$ , lepo- ja voimaharjoituksen välillä)

	LEPO		VOIMA- HARJOITUS	
	Mittausjakso 1	Mittausjakso 2	Mittausjakso 1	Mittausjakso 2
<b>KERTYMÄ</b>				
Valtimo	0,0896 $\pm$ 0,0182*	0,0813 $\pm$ 0,0083	0,0812 $\pm$ 0,0010	0,0832 $\pm$ 0,0010
<b>r</b>	<b>0,451</b>			
<b>CV (%)</b>	20	10	12	12
Laskimo	0,0666 $\pm$ 0,0081	0,0749 $\pm$ 0,0205	0,0679 $\pm$ 0,0066	0,0668 $\pm$ 0,0077
<b>r</b>	<b>0,570 *</b>			
<b>CV (%)</b>	12	27	10	11
Lihäs	0,0423 $\pm$ 0,0020*	0,0361 $\pm$ 0,0055	0,0448 $\pm$ 0,0104	0,0462 $\pm$ 0,0039†
<b>r</b>	<b>0,316</b>			
<b>CV (%)</b>	5	15	23	9
<b>PITOISUUS</b>				
<b>(nmol/ml)</b>				
Valtimo	55 $\pm$ 12	61 $\pm$ 11	50 $\pm$ 6	53 $\pm$ 4†
<b>r</b>	<b>0,866 **</b>			
<b>CV (%)</b>	21	18	11	8
Laskimo	63 $\pm$ 13	65 $\pm$ 10	56 $\pm$ 8	57 $\pm$ 6 †
<b>r</b>	<b>0,872 **</b>			
<b>CV (%)</b>	20	15	14	10

Lepomittausten näytesarjojen väliset kertymä- ja pitoisuusarvot on esitetty taulukossa 7. Taulukon arvot ovat mittausjaksojen 1 ja 2 keskiarvot. Käytännön syistä lihasnäytteitä ei voitu ottaa kuin yksi jokaista mittausjaksoa kohti, joten taulukossa 7 tarkastellaan vain verinäytteistä mitattuja muuttujia. Valtimo- ja laskimoveren kertymäarvot erosivat tilastollisesti merkitsevästi ( $p=0.005$ ;  $p=0.008$ ) näytesarjojen 1 ja 2 välillä. Myös pitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi korkeammat näytesarjassa 1 näytesarjaan 2 verrattuna ( $p=0.001$ ;  $p=0.000$ ). Näytesarjojen variaatiokerroimet on myös taulukossa 7. Näytesarjan 2 variaatiokerroin oli kaikissa muissa tuloksissa pienempi paitsi valtimoveren kertymäarvossa näytesarjaan 1 verrattuna.

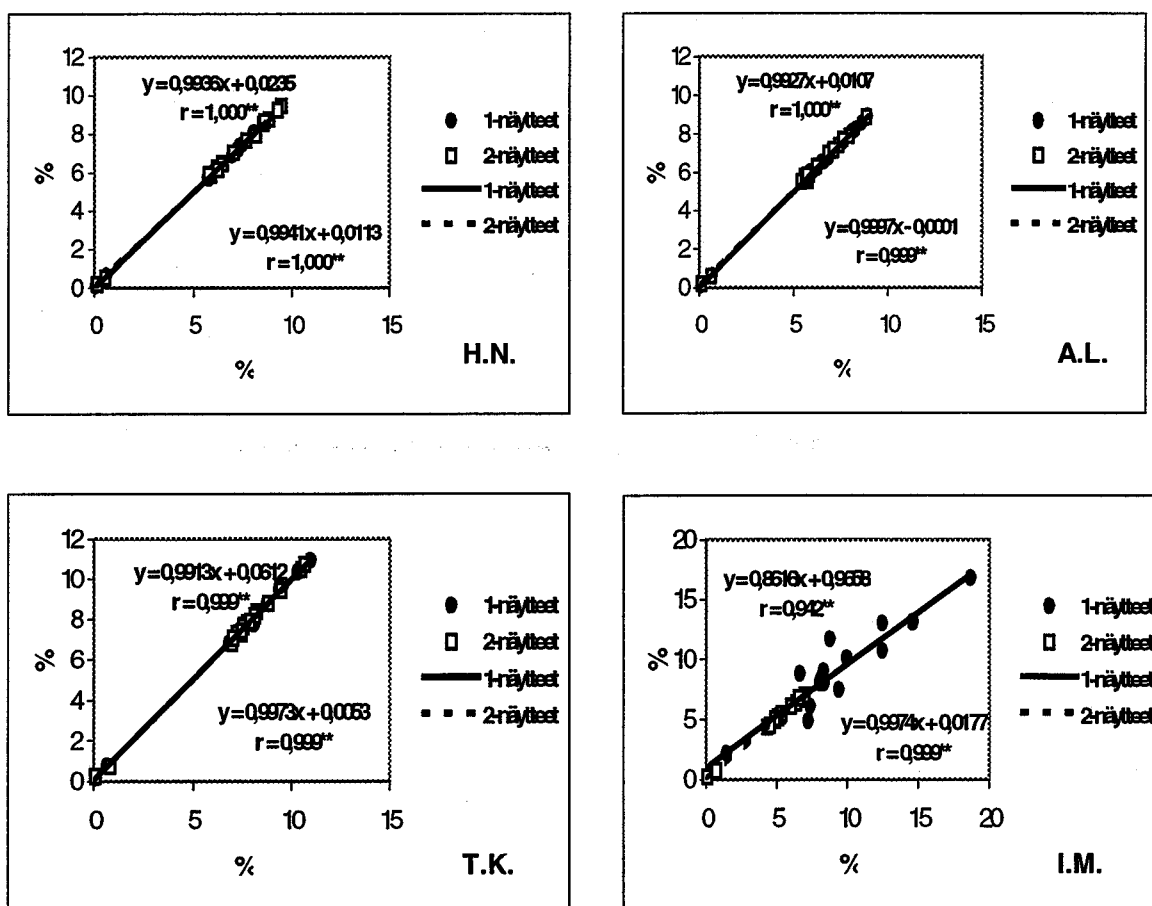
TAULUKKO 7. Näytesarjojen 1 ja 2 kertymät ( $n=4$ ; jokaiselta 4 tulosta) ja pitoisuudet ( $n=4$ , jokaiselta 4 tulosta) valtimo- ja laskimoveressä. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, korrelaatiokerroin= $r$ , Variaatiokerroin= CV, \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ )

	NÄYTESARJA 1	NÄYTESARJA 2
<b>KERTYMÄ</b>		
Valtimo	0,0853 $\pm$ 0,0144 **	0,0758 $\pm$ 0,0149
<b>r</b>	<b>0,351</b>	
CV (%)	17	20
Laskimo	0,0708 $\pm$ 0,0159 **	0,0604 $\pm$ 0,0090
<b>r</b>	<b>-0,158</b>	
CV (%)	23	15
<b>PITOISUUS</b>		
<b>(nmol/ml)</b>		
Valtimo	58 $\pm$ 12 ***	54 $\pm$ 8
<b>r</b>	<b>0,871 **</b>	
CV (%)	20	14
Laskimo	64 $\pm$ 11 ***	60 $\pm$ 8
<b>r</b>	<b>0,904 **</b>	
CV (%)	17	14

## 11.4 GC/MS:LTÄ SAADUT ARVOT

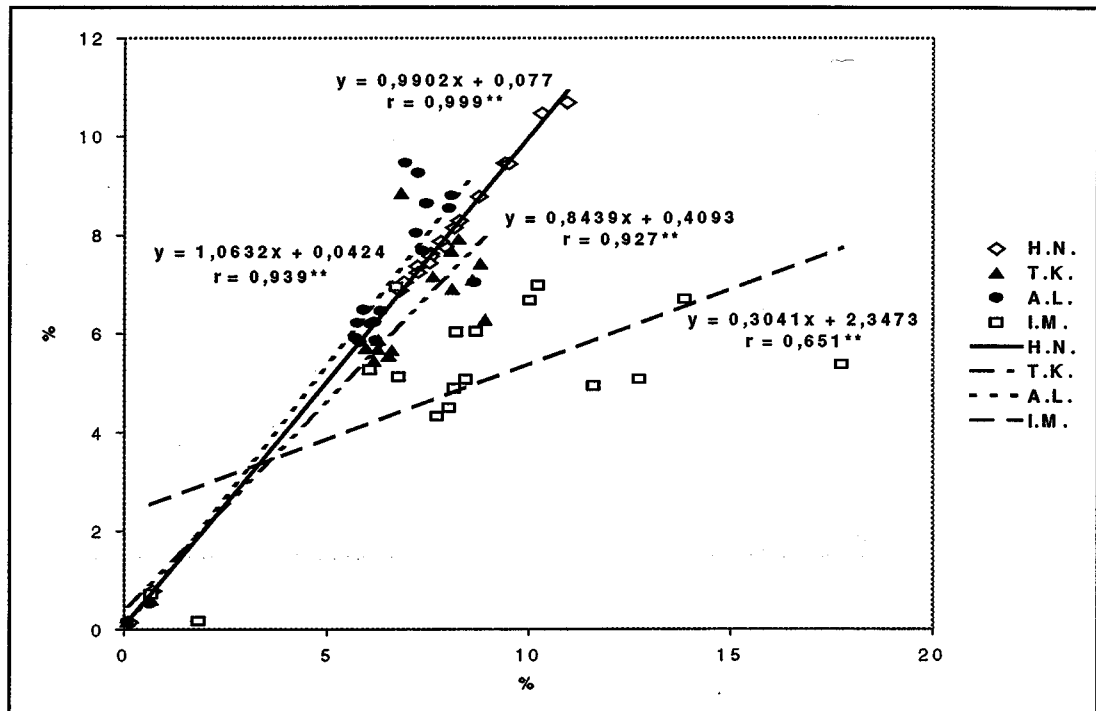
Jokaisesta lepomittauksen verinäytteestä ajettiin kaksi rinnakkaista tulosta. Kaikissa rinnakkaisnäytteissä (n=70 näyteparia) korrelaatiokerroin (r) oli vähintään 0,999, paitsi koehenkilön I.M. 1-näytteiden (n=10 näyteparia) korrelaatiokerroin, joka oli 0,942.

Kuviossa 5 on esitetty rinnakkaisnäytteiden regressioanalyysi kaikilta neljältä koehenkilöltä. Kuvioissa 20, 21 ja 22 sekä taulukoissa 8 ja 9 esitetyt arvot ovat GC/MS:n arvoja, joista ei ole laskettu todellista kertymää korjauskertoimien avulla.



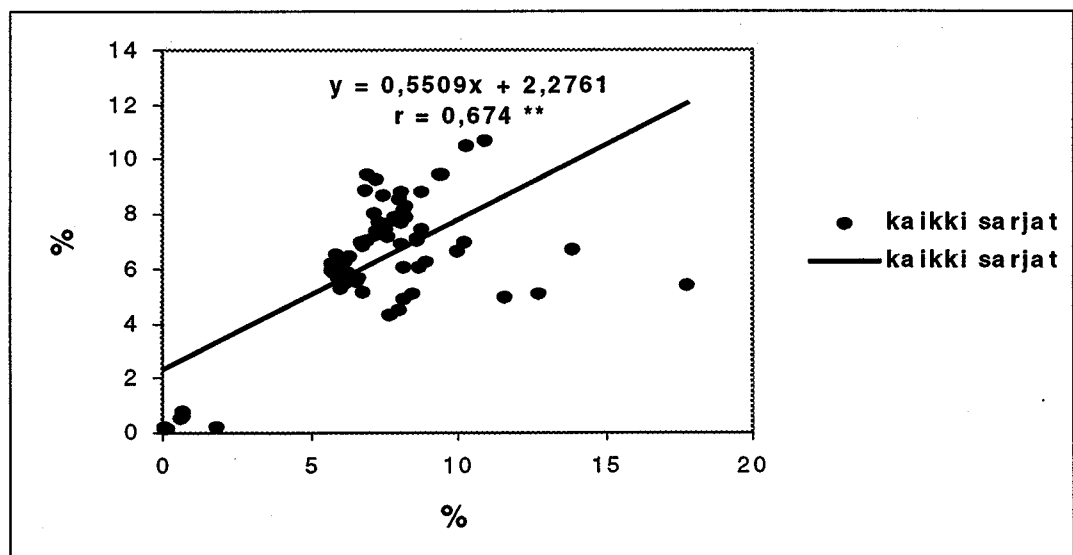
KUVIO 20. Rinnakkaisnäytteiden (n=4; jokaiselta 20 näyteparia) väliset regressioanalyysit. 1-näytteiden regressiosuoran kaava ja korrelaatiokerroin on viivan yläpuolella ja 2-näytteiden kaava ja korrelaatiokerroin viivan alapuolella. (\*\* p<0.01)

Tulosten toistettavuutta mitattiin rinnakkaisten näytesarjojen avulla. Kaikilta neljältä koehenkilöltä analysoitiin rinnakkaiset näytesarjat, joiden regressioanalyysit ovat kuviossa 21. Koehenkilöiden näytesarjojen väliset korrelaatiokertoimet vaihtelivat 0,651 ja 0,999 välillä.



KUVIO 21. Näytesarjojen (n=4; joaiselta 10 näyteparia) välinen regressioanalyysi. (\*\* p<0.01)

Kaikkien koehenkilöiden rinnakkaisten näytesarjojen regressioanalyysi on esitetty kuviossa 22. Regressiosuoran kaava ja korrelaatiokerroin ( $r=0,674$ ) näkyvät pistejoukon yläpuolella.



KUVIO 22. Kaikkien näytesarjojen (n=4; jokaiselta 10 näyteparia) välinen regressioanalyysi. (\*\* p<0.01)



Näytesarjojen variaatiokertoimet on esitetty taulukossa 8. Rinnakkaisnäytteissä näytesarjojen 1 ja 2 variaatiokerroin vaihteli 1 % ja 5 % välillä, paitsi koehenkilön I.M. 1-näytteillä variaatiokerroin oli 12 %. Näytesarjojen välinen korrelaatiokerroin laskettiin kahden rinnakkaisen tuloksen keskiarvosta. Variaatiokerroin oli alle 10 % kaikilla muilla, paitsi koehenkilöllä I.M., jolla variaatiokerroin oli 32 %.

TAULUKKO 8. GC/MS:ltä saatujen verinäytesarjojen (n=4; jokaiselta 10 näyteparia) variaatiokertoimet (%).

KOEHENKILÖ	NÄYTESARJA 1	NÄYTESARJA 2	KAIKKI NÄYTTEET
H.N.	2	5	4
A.L.	2	1	7
T.K.	2	2	9
I.M.	12	2	32

Lihasnäytteistä ajettiin kolme rinnakkaista tulosta, ja niiden keskiarvot, keskihajonnat variaatiokertoimet on taulukossa 9. Kahdella koehenkilöllä mittausjaksojen 1 ja 2 välillä esiintyi tilastollisesti merkitsevä ero (T.K. p=0.000 ja I.M. p=0.013). Lihasnäytteiden variaatiokerroin vaihteli 0 % ja 10 % välillä ja kaikkien näytteiden variaatiokerroin oli 13 %.

TAULUKKO 9. GC/MS:ltä saadut lihasnäytteiden (n=4; jokaiselta 3 rinnakkaista tulosta) arvot ja variaatiokertoimet. (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, variaatiokerroin=CV, \* p<0.05, \*\*\* p<0.001)

KOEHENKILÖ	MITTAUS- JAKSO 1	MITTAUS- JAKSO 2	KAIKKI NÄYTTEET
H.N.	4,45 $\pm$ 0,29	3,91 $\pm$ 0,07	4,18 $\pm$ 0,35
CV (%)	7	2	8
A.L.	4,03 $\pm$ 0,41	3,68 $\pm$ 0,29	3,86 $\pm$ 0,37
CV (%)	10	8	10
T.K.	4,35 $\pm$ 0,19 ***	2,82 $\pm$ 0,21	3,58 $\pm$ 0,86
CV (%)	4	8	24
I.M.	4,08 $\pm$ 0,02 *	4,03 $\pm$ 0,02	4,05 $\pm$ 0,03
CV (%)	0	0	1

## 12 POHDINTA

Tämän työn tarkoituksena oli tutkia proteiiniaineenvaihdunnan mittaamiseen käytettävän isotooppimenetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta sekä osoittaa hypertrofisen maksimivoimaharjoituksen aiheuttavan muutoksia proteiiniaineenvaihdunnassa isotooppi-infusio -menetelmällä mitattuna. Verinäytteiden tarkkuutta ja toistettavuutta mitattiin GC/MS:n rinnakkaisista tuloksista sekä rinnakkaisista näytesarjoista, jotka käsiteltiin laboratoriossa kahdesti. Lihasnäytteistä tarkasteltiin vain GC/MS:n rinnakkaistuloksia, koska koehenkilöitä ei voitu kuormittaa liian monella lihasbiopsialla.

### 12.1 INFUUSION TOTEUTTAMINEN

Isotooppimenetelmä perustuu A-V-malliin, joka kuvaa aminohappojen liikettä valtimon ja laskimon välillä. Tähän malliin on lisätty kolmas yksikkö, lihas, jolloin saadaan selville lihaksen intrasellulaaritalan aminohappojen pitoisuudet. Tämän perusteella voidaan arvioida myös lihaksen vapaasta aminohappoaltaasta proteiinisynteesiin käytettävien aminohappojen osuudet ja päinvastoin lihasproteiinien hajoamisesta vapautuneiden aminohappojen ilmestyminen takaisin lihaksen intrasellulaaritalaan. Kolmiallasmalliksi kutsutussa menetelmässä huomioidaan myös aminohappojen suora virtaus valtimosta laskimoon.

Isotooppimenetelmässä infusoidaan jonkin alkuaineen isotoopilla leimattua aminohappoa verenkiertoon. Alkuaineen valinnan (H, C, N, O) perusteella päätetään, mistä näytteitä kerätään. Kaikissa tapauksissa valtimo- ja laskimoverestä sekä lihaksesta voidaan ottaa näytteet. Hiilen isotooppia voidaan analysoida hengityskaasuista hiilidioksidin muodossa ja typen isotooppi löytyy virtsasta. Isotoopin valinta liittyy läheisesti myös käytettävän aminohapon valintaan. Välttämättömillä ja ei-välttämättömillä aminohapoilla on erilaiset aineenvaihduntareitit, joiden näkökulmasta tuloksia tarkastellaan. Ei-välttämättömien aminohappojen ilmestyminen intrasellulaaritalaan kuvaa proteiinien hajoamista ja/tai aminohappojen synteesiä, kun välttämättömillä sama arvo kuvaa pelkästään proteiinien hajoamisen tasoa (Biolo et al., 1995a). Leusiinia hapetetaan lihaksessa, jolloin sen käyttöä energiaksi tulee mitata.

Leusiini leimaataankin useimmiten hiilen isotoopilla (Biolo et al., 1995b), jolloin hapetetun leusiinin määrä saadaan selville mittaamalla hiilidioksidista isotoopin määrä. Tässä tutkimuksessa käytetty  $^2\text{H}_5$ -fenyyialaniini kuuluu välttämättömiin aminohappoihin, jolloin lihaksen intrasellulaaritalan aminohappojen liike kuvaa suoraan proteiinisynteesin ja proteiinien hajoamisen määrää. Merkkiaineena  $^2\text{H}_5$  voidaan tarkastella veri- ja lihasnäytteistä, jolloin mittauslaitteena on GC/MS. Hiilellä leimattua leusiinia käytettäessä hiilidioksidin mittaamiseen tarvitaan IRMS, jolloin kustannukset nousevat huomattavasti muutenkin melko kalliissa menetelmässä.

Alkuannoksen suuruuden, infuusioliuoksen ja infuusionopeuden määrittäminen on perustana onnistuneelle mittaukselle. Kaikkien näiden toimenpiteiden tarkoituksena on saavuttaa steady state –tila mahdollisimman nopeasti, kuitenkin häiritsemättä luontaista proteiinien aineenvaihduntaa (Wolfe, 1992, 126-130). Alkuannoksen ja merkkiaineen määrä lasketaan tarkasti koehenkilön painon mukaan (Liite 4). Infuusionopeus säädetään aminohappoaltaan koon mukaan. Tässä tutkimuksessa käytetyn fenyyialaniinin kiertokulun nopeus aminohappoaltaansa on  $0,5 \pm 0,1$  tuntia (Biolo et al. 1995a), jolloin infuusionopeuden ollessa  $0,05 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$  steady state –tilan saavuttamiseen kuluu aikaa noin kaksi tuntia (Biolo et al., 1995b). Tutkituilla koehenkilöillä infuusionopeus oli  $0,049967 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$ , jolloin tavoitearvo ( $0,05 \mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$ ) saavutettiin. Alkuannoksen suuruus ( $2 \mu\text{mol}/\text{kg}$ ) laskettiin aikaisempien tutkimuksien perusteella (esim. Tipton et al., 1999; Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1995a ja 1995b). Ensimmäiset näytteet otettiin aikaisintaan 2 tunnin ja 15 minuutin kuluttua infuusion aloittamisesta. Näiden tekijöiden valossa voidaan sanoa, että aminohapon infuusio ei ole häirinnyt luontaista proteiiniaineenvaihduntaa ja näytteitä on kerätty steady state –tilassa, joten tulosten mahdolliset vaihtelut eivät johdu ainakaan infuusion epäonnistumisesta.

## 12.2 PROTEIINIEN SYNTEESI JA HAJOAMINEN

Kolmiollasmallin perusteella lasketuista proteiiniaineenvaihdunnan muuttujista tarkasteltiin ensisijaisesti proteiinisynteesin, proteiinien hajoamisen ja nettotilanteen arvoja. Lepomittauksessa arvot saatiin kahdesta eri mittausjaksosta, jotka olivat 165 ja 300 minuuttia infuusion aloittamisesta. Ajankohdat määritettiin lihasbiopsian ottamisajan mukaan. Absoluuttiset synteesin ja hajoamisen arvot (Kuvio 16) ovat Biolo

et al. (1995b) tuloksiin verrattuna hieman korkeampia, mutta nettotilanteessa arvot ovat lähes samat. Volpin et al. (1998) artikkelissa vanhuksilla mitatut synteessin ja hajoamisen arvot olivat lähes kaksinkertaisia tähän tutkimukseen verrattuna. Biolon et al. (1995b) tutkimuksen koehenkilöt olivat samanikäisiä kuin tämän tutkimuksen koehenkilöt (24-26 v.), jolloin niihin arvoihin vertaaminen on kertoo enemmän mittausten onnistumisesta. Mittausjaksojen 1 ja 2 arvot eivät poikenneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi, mikä fysiologisestikin on ennakoitavissa. Koehenkilöt olivat koko mittausjakson vuodelevossa paastonneena, jolloin muutoksia proteiiniaineenvaihdunnassa ei pitäisi olla fyysisen aktiivisuuden muutoksen suhteen. Toisen jakson suuri keskihajonta kertoo ehkä koehenkilöiden yksilöllistä vasteesta pitkään paastoon. Mittaushetkellä koehenkilöiden paasto oli kestänyt yli 16 tuntia, mikä saattaa vaikuttaa vaihtelevasti proteiiniaineenvaihduntaan yksilöiden välillä.

Yleisesti ottaen paastotila on edellytyksenä menetelmän onnistumiselle (Biolo et al., 1995b). Jos mittauksen aikana nautitaan ravintoa, proteiinit ja aminohapot vaikuttavat aminohappoaltaiden aminohappopitoisuuksiin ja steady state -tilaa ei saavuteta. Menetelmään vaadittava pitkä paastokaan ei ole elimistön 'normaalitila', mutta sen ongelmattomuus menetelmän suhteen asettaa paaston etusijalle. Paastotilassa proteiinien hajoaminen on suurempaa kuin niiden synteesi, jolloin nettotilanne on negatiivinen. Elimistö on siis katabolisessa tilassa.

Neljältä koehenkilöltä kerättiin lepomittauksessa rinnakkaiset verinäyttesarjat, jotka molemmat analysoitiin. Rinnakkaisissa näyttesarjoissa ei syntynyt tilastollista eroa proteiinien synteessissä, hajoamisessa tai nettotilanteessa. Kaikissa muuttujissa näyttesarjojen välillä oli vähintään heikko positiivinen korrelaatio ( $r=0,546-0,838$ ). Korrelaatiokertoimen avulla laskettu selitysosuus on synteessin ja hajoamisen osalta 67 % ja 70 % eli lähes 70 % varmuudella rinnakkaiset näyttesarjat vastaavat toisiaan. Nettotilanteessa selitysosuus on vain 30%, mikä on hieman yllättävää. Alhainen selitysosuus lienee peräisin 2-näytteiden suuremmasta keskihajonnasta, mikä kertonee koehenkilöiden yksilöllisestä vasteesta paastotilaan. Myös synteessin, hajoamisen ja nettotilanteen variaatiokerroimet olivat melko korkeita, mikä johtuu suuresta keskihajonnasta. Ainoastaan mittausjaksolla 1 proteiiniaineenvaihdunnan muuttujien variaatiokerroimet jäivät alle 10 %. Mittausjaksolla 2 havaittu suuri keskihajonta vaikutti myös variaatiokerroimeen ja synteessin osalta variaatiokerroin oli peräti 70 %. Näyttesarjoissa 1 ja 2 variaatiokerroin vaihteli 11-45 %. Suureen vaihteluun lienee syynä

koehenkilöiden vähäinen määrä tämäntyyppisessä vertailussa. Toisaalta tässä menetelmässä variaatiokertoimet nousevat helposti melko korkeiksi, koska koehenkilöiden määrä on vähäinen ja proteiiniaineenvaihdunnan suhteen homogeenistä ryhmää ei voida arvioida muiden mittarien avulla. Kahden mittausjakson ja rinnakkaisten näytteiden perusteella proteiinien synteesin, hajoamisen ja nettotilanteen absoluuttiset arvot ovat olemassa olevan kirjallisuuden mukaisia. Korrelaatiokertoimien ja niiden selitysosuuksien mukaan rinnakkaiset näytesarjat ovat lähellä toisiaan, mikä myöskin kertoo menetelmän toistettavuudesta. Ainoastaan variaatiokertoimen mukaan proteiinien synteesin, hajoamisen ja nettotilanteen arvot antavat aihetta kritiikkiin, mutta koehenkilöiden vähäisen lukumäärän ja heidän yksilöllisten erojensa takia variaatiokertoimet nousivat hyvin suuriksi.

Hypertrofisessa maksimivoimaharjoituksessa proteiinien synteesi ja hajoaminen erosivat lepoarvoista tilastollisesti merkitsevästi ( $p < 0.05$ ) mittausjaksolla 1. Myös Biolo et al. (1995b) raportoivat samanlaisia tuloksia. Absoluuttisissa arvoissa tarkasteltuna tämän tutkimuksen lepo- ja voimaharjoitusarvot olivat hieman korkeampia kirjallisuuteen verrattuna, mutta muutoksen suhde on samansuuruinen, jolloin tilastollinen ero ilmenee. Biolon et al. (1995b) mukaan myös nettotilanne muuttui vähemmän negatiiviseksi voimaharjoituksen jälkeen. Tässä tutkimuksessa nettotilanteessa ei tapahtunut tilastollisesti merkitsevää muutosta. Toisella mittausjaksolla voimaharjoituksen jälkeen proteiinien synteesi, hajoaminen ja nettoarvo olivat absoluuttisesti tarkasteltuna korkeampia kuin lepoarvot, mutta tilastollista eroa ei ilmennyt. Voimaharjoitusryhmän keskihajonta oli sen sijaan melko suuri. Tämä kertonee koehenkilöiden erilaisesta kuormitusvasteesta. Voimaharjoitus oli tyypillinen lihasmassaa kasvattava maksimivoimaharjoitus, jonka uskottiin aiheuttavan selvän muutoksen proteiiniaineenvaihdunnassa. Jalkojen isometrisen voluntäärisen ojennusvoimatuloksien mukaan kuormitusvaste jäi toivottua alhaisemmaksi, jolloin selviä ja pitempiaikaisia proteiiniaineenvaihdunnan muutoksia ei tullut esille. Alhaiseen kuormitusvasteeseen saattoi olla syynä myös pitkä paasto. Maksimivoimaharjoituksen alkaessa paasto oli kestänyt noin 12 tuntia, jolloin välittömät energiavarastot ovat tyhjentyneet (McArdle, 1996, 230). Energiavajeen takia todellista maksimaalista suorituskykyä ei saavutettu. Voimaharjoituksen tulisi kiihdyttää proteiinisynteesiä siten, että vaikutus kestäisi ainakin 48 tuntia (Lemon, 1998). Tässä tutkimuksessa kiihtynyt proteiinien synteesi ja hajoaminen havainnoitiin ainoastaan heti voimaharjoituksen jälkeen, jossa synteesiarvo nousi 56 % ja hajoaminen 44 % lepoarvoihin verrattuna.

Toisella mittausjaksolla muutosprosentti oli synteessin osalta 76 % ja hajoamisessa 64 %, vaikka tilastollista merkitsevyyttä ei ilmennyt. Biolon et al. (1995b) tutkimuksessa synteesi nousi 100 % ja hajoaminen 50 %, vaikka mittausjakso oli noin kolme tuntia voimaharjoituksen päättymisestä. Heidän tutkimuksessaan vaste olisi saattanut olla vieläkin huomattavampi, jos mittaus olisi ajoitettu heti voimaharjoituksen jälkeen.

### 12.3 VEREN VIRTAUSNOPEUS

Voimaharjoitus lisää proteiinien kiertokulkua ja aminohappojen kuljetusta, mihin veren virtausnopeus suuresti vaikuttaa. Tässäkin tutkimuksessa voimaharjoituksen jälkeen veren virtausnopeus oli tilastollisesti merkitsevästi kiihtynyt ( $p < 0.05$ ) molemmilla mittausjaksoilla leporyhmään verrattuna. Mittausjaksojen 1 ja 2 kiihtynyt veren virtaus saattoi aiheuttaa sen, että myös proteiinien synteesi ja hajoaminen olivat kiihtyneitä, vaikka toisella mittausjaksolla tilastollista eroa ei ilmennytäkään. Vähäinen virtauksen aleneminen mittausjaksojen 1 ja 2 välillä saattoi johtaa siihen, että aminohappojen virtaus ei ollut enää niin vilkasta, jolloin kudosten tarvitsemia rakennusaineita ei ole saatavilla. Aminohappojen saatavuus kiihdyttää proteiinisynteesiä, mikä on havaittu aminohappoinfuusiokokeilla (Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1997) sekä suun kautta nautituilla aminohappovalmisteilla (Rasmussen et al., 2000; Tipton et al., 1999b).

Leporyhmällä veren virtausnopeus oli  $3,62 \pm 0,84$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta, mikä on korkeampi verrattuna Biolon et al. (1997 ja 1995b) tutkimuksiin, mutta esim. Jorfeldt & Wahren (1971) ja Biolo et al. (1995a) raportoivat nopeuksia 3,53 – 3,90 ml/min/100 ml jalan tilavuudesta. Voimaharjoituksen jälkeinen veren virtauksen arvo oli  $6,10 \pm 1,37$  ml/min/100 ml jalan tilavuudesta. Aikaisemmissa julkaisuissa (Rasmussen et al., 2000; Tipton et al., 1999a; Biolo et al., 1995b) virtausnopeudeksi on raportoitu 3,8 – 5,6 ml/min/100 ml jalan tilavuudesta, jolloin tämän tutkimuksen arvot ovat hieman korkeampia. Keskihajonnan perusteella yksittäisen koehenkilön tulokset saattavat nostaa koko ryhmän keskiarvoa. Menetelmän toistettavuutta Jorfeldt & Wahren (1971) pitivät hyvänä, sillä variaatiokerroin (4 %) ja keskihajonta (0,7) olivat verrattain pieniä. Samoin menetelmän validiteetti oli hyvä, sillä kuormituksessa veren virtausnopeus korreloi hapenottoon ( $r=0,98$ ) ja työskentelykuormaan ( $r=0,98$ ) (Jorfeldt & Wahren 1971). Rådegranin (1999) mukaan veren virtausnopeuden mittaamisessa indosyaniini-väriaine -menetelmä on yksi parhaimpia. Sitä voidaan käyttää levossa,

submaksimaalisissa kuormituksissa sekä niissä maksimaalisissa kuormituksissa, joissa suoritetaan vain tiettyjä liikeratoja. Menetelmän heikkoutena on sen invasiivisuus ja väriaineen kustannukset (Rådegran, 1999).

#### 12.4 KOLMIALLASMAALLIIN TARVITTAVIEN VERINÄYTTEIDEN TULOSTEN TOISTETTAVUUS

Kolmiallasmalliin tarvittavat arvot saadaan GC/MS-mittauksista. GC/MS:n arvoista lasketaan merkkiaineen kertymät valtimossa, laskimossa ja lihaksessa sekä pitoisuudet valtimo- ja laskimoveressä, joiden avulla päästään lopullisiin proteiiniaineenvaihdunnan arvoihin. Näiden osavaiheiden tuloksia on raportoitu lopullisten muuttujien yhteydessä (Rasmussen et al., 2000; Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1995a ja b). Kertymäarvot noudattivat raportoituja arvoja levossa (Volpi et al., 1998; Biolo et al., 1995b) ja kuormituksessa (Rasmussen et al., 2000). Vaikka mittausjaksojen välillä oli tilastollisesti merkitsevää vaihtelua, samantyyppistä vaihtelua on esim. Rasmussen et al. (2000) raportoinut. Muuttujien variaatiokerroinkin vaihteli jonkin verran ( $CV=5 - 27\%$ ), mutta kaikkien muuttujien variaatiokertoimia tarkastellessa noin  $20\%$  kerrointa voidaan pitää jo hyvänä. Alle  $10\%$  tuloksiin on vaikea päästä. Lepomittauksessa mittausjaksot 1 ja 2 eivät korreloineet toisiinsa nähden ( $r=0,316-0,570$ ). Vaikka positiivista korrelaatiota ei ollut, tämä ei vaikuttanut suuresti lopullisiin proteiiniaineenvaihdunnan muuttujiin, sillä niistä katsottuna tulokset ovat kirjallisuuden mukaisia.

Lepomittauksessa valtimon ja laskimon pitoisuuksissa ei ollut tilastollista eroa mittausjaksojen 1 ja 2 välillä. Mittausjaksojen välillä vallitsi positiivinen korrelaatio ( $r=0,87$ ). Variaatiokerroin oli vaihteli kaikissa pitoisuusarvoissa ( $CV=15 - 21\%$ ), mikä johtuu suuresta keskihajonnasta koehenkilöiden välillä. Fenyylialaniinin pitoisuudet valtimossa ja laskimossa kertovat steady state -tilan pysymisestä. Laskimon fenyylialaniinin pitoisuus on korkeampi kuin valtimon pitoisuus, mikä on edellytyksenä kolmiallasmallin laskujen onnistumiselle. Se osoittaa myös sen, että proteiineja hajotetaan enemmän kuin niitä syntetisoidaan, mikä tukee edellä mainittuja tuloksia. Pitoisuudet eivät eronneet mittausjaksojen 1 ja 2 välillä mittausten sisällä. Ainoastaan lepo- ja voimaharjoituksen väliset laskimoarvot erosivat tilastollisesti merkitsevästi

molemmilla mittausjaksoilla. Tähän lienee syynä proteiinien kiihtynyt synteesi ja hajoaminen voimaharjoituksen jälkeen. Myös Biolo et al. (1995b) havaitsivat laskimon fenyylialaniinin pitoisuuden alenevan tilastollisesti merkitsevästi voimaharjoituksen jälkeen.

Näytesarjat 1 ja 2 erosivat toisistaan tilastollisesti merkitsevästi kaikkien laskettujen muuttujien osalta (Taulukko 3). Näytesarjojen välistä korrelaatiota ei esiintynyt kertymäärvoissa, mutta valtimon ja laskimon pitoisuusarvot korreloivat tilastollisesti merkitsevästi. Muuttujien variaatiokerroin oli alimmillaan 14 % ja korkeimmillaan 23 %. Koska näytesarjan 1 kaikki arvot olivat tilastollisesti merkitsevästi suuremmat, on kysymyksessä systemaattinen virhe. Systemaattinen virhe koskee lähinnä näytteiden laboratorioskäsitelyä, sillä näytteet otettiin saman mittauspäivän aikana ja GC/MS:n ajo-olosuhteet pysyivät muuttumattomina. Ilmiö on näkyvä myös kuviossa 2, jossa näytesarjan 2 proteiiniaineenvaihdunnan arvot ovat korkeampia. Lopullisissa arvoissa tilastollista eroa ei kuitenkaan esiinny. Vaikka välivaiheiden toistettavuutta kuvaavat arvot eivät ole hyviä, virhe häviää lopullisissa arvoissa. Kertymä- ja pitoisuusarvojen perusteella menetelmää ei voi pitää toistettavana, mutta lopullisten arvojen merkitys lienee vahvempi. Näiden perusteella tuloksia kannattaa tarkastella kriittisesti virhelähteet huomioiden, mutta muiden tekijöiden (hormonit, vapaat aminohapot) lisääminen menetelmään antaisi varmuutta menetelmän onnistumiselle.

Rinnakkaisten tulosten toistettavuus on tämän tutkimuksen perusteella hyvä. Toistettavuudella tässä tapauksessa tarkoitetaan laitteen (GC/MS) toistettavuutta erotuksena laboratorioanalyysien toistettavuudesta, mikä on kuvattu edellä. Korrelaatiokerroin oli alimmillaan 0,942, jonka mukaan selitysosuus on 89 %. Kolmella koehenkilöllä korrelaatiokerroin oli 0,999 tai 1,000, jolloin selitysosuudeksi tulee 100 % ja korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä. Rinnakkaisten tulosten erinomainen toistettavuus kertoo GC/MS:n tarkkuudesta. Van Eijk et al. (1999), Calder (1999) ja Patterson et al. (1997) päätyivät samanlaisiin tuloksiin. Van Eijkin et al. (1999) tutkimuksessa rinnakkaisten veri- ja plasmanäytteiden korrelaatiokerroin vaihteli 0,9984-0,9997 ja Calderin et al. (1999) ja Pattersonin et al. (1997) tutkimuksessa korrelaatiokerroin oli 0,9999. Näiden tulosten perusteella selitysosuudeksi tulee 100 %. Van Eijk et al. (1999) ja Calder et al. (1999) päättelivät GC/MS:n tarkkuuden olevan hyvä näytteiden ollessa väkeviä. Heidän tutkimuksissaan näytteet olivat huomattavasti väkevempiä kuin tässä tutkimuksessa. Siitä huolimatta tässä tutkimuksessa saavutettiin



lähes yhtä hyviä tuloksia. Pattersonin et al. (1997) tutki myös näyttekoon merkitystä tuloksiin. Näytekoolla ei ole merkitystä, kun injektoidaan 0,1 – 2,0 nmol näytettä. Tässä tutkimuksessa näytteen injektioi automaatti, johon oli säädetty vakio näytekooko 0,5 µl. Automaattinen injektorin varmistaa myös sen, että näytettä injektoidaan sama määrä joka kerta, jolloin virhemahdollisuus on olematon.

Yhden koehenkilön (I.M.) alhainen korrelaatiokerroin johtunee GC/MS:n epätarkkuudesta. Näytteet analysoitiin varhain syksyllä, jolloin käytössä oli vanhempi GC/MS. Koska GC/MS on erittäin herkkä, pienetkin epäpuhtaudet saattavat häiritä tämän tutkimuksen näytteiden mittaamista. GC/MS oli tuolloin ahkerassa käytössä ja sillä mitattiin paljon muitakin näytteitä kuin tämän tutkimuksen verinäytteet. Muista näytteistä on jäänyt likaa laitteen eri osiin, mikä aiheutti satunnaisvirhettä koehenkilön I.M. näytesarjaan. Toinen selittävä tekijä alhaiselle korrelaatiokertoimelle voi olla tottumattomuus keräys- ja analysointitilanteessa. Koehenkilön I.M. mittaus tapahtui mittausten alussa toisena mittauspäivänä, jolloin näytteiden käsittely mittauspäivänä saattoi olla vaihtelevaa ja virheitä aiheuttavaa. Muut mittaukset ja analyysit suoritettiin huomattavasti myöhemmin, jolloin mittaajat ja näytteiden käsittelijät olivat rutinoituneita.

Näytesarjojen väliset korrelaatiokertoimet olivat 0,651-0,999, jotka kaikki olivat tilastollisesti merkitseviä. Kaikkien näytteiden yhteenlaskettu korrelaatiokerroin oli 0,674, joka myös oli tilastollisesti merkitsevä. Yhteenlaskettujen näytteiden korrelaatiokertoimen perusteella selitysosuudeksi tulee 45 %. Selitysosuutta alentaa koehenkilön I.M. poikkeava tulos, sillä muilla koehenkilöillä selitysosuus on 86 –100 %. Koehenkilön I.M. poikkeavaa tulosta voidaan selittää edellä mainitulla mittaajien tottumattomuudella ja laitteen epätarkkuudella.

Variaatiokertoimien vaihtelu osoittaa koehenkilöiden väliset yksilölliset erot analyyseissä. Koehenkilöllä I.M. näytesarjan 1 variaatiokerroin oli 12, joka aiheuttaa keskiarvoisen variaatiokertoimen nousun 32 %. Muilla koehenkilöillä variaatiokerroin ei ylittänyt 10 %. Näiden lukujen pohjalta voidaan todeta mittauksen, verinäytteiden käsittelyn ja analyysin olevan toistettava ja luotettava prosessi.

## 12.5 KOLMIALLASMALLIIN TARVITTAVIEN LIHASNÄYTTEIDEN TULOSTEN TOISTETTAVUUS

Lihasnäytteistä voitiin tarkastella vain GC/MS:ltä saatuja rinnakkaistuloksia. Mittausjaksojen välillä tapahtui lievää vaihtelua, joka kahdella koehenkilöllä oli tilastollisesti merkitsevää. Variaatiokerroin oli 1 – 24 %, mikä on hyvä verrattuna verinäytteiden variaatiokertoimiin. Wagenmakers (1999) kritisoi voimakkaasti menetelmää juuri lihasnäytteiden osalta. Laboratoriokäsittelyn tarkoituksena on poistaa veri, rasva ja sidekudos, mutta huonoimmassa tapauksessa näitä ei pystytä poistamaan ja lihasproteiinin osuudeksi jää vain 50 %. Silloin GC/MS:n kertymäarvot jäävät alhaisiksi, mikä vaikuttaa lopullisiin proteiiniaineenvaihdunnan tuloksiin. Tässä tutkimuksessa koehenkilöt olivat nuoria ja lihaksikkaita mieskuntoilijoita. Heidän BMI-arvonsa oli 25, jolloin rasvan osuus kudoksessa ei voi olla kovin suuri. Sen perusteella koehenkilöiden lihasnäytteet olivat valmiiksi melko puhtaita, mikä saattaa olla syynä alhaiseen variaatiokertoimeen. Kaikkien lihasnäytteiden laboratoriokäsittely ja GC/MS:n ajo-olosuhteet olivat vakiot. Mittausjaksojen väliset erot saattoivat syntyä näytteen vähäisyydestä. Vaikka GC/MS pystyy erottelemaan hyvinkin pienistä näytemääristä (Patterson et al., 1997), näytteen vähäinen määrä vaikeuttaa laboratoriokäsittelyä.

Lihaksen isotooppikertymää A-V -eron yhteydessä on mitattu ihmisellä vasta 1990-luvulta alkaen. Ensimmäisen tutkimuksen julkaisi Biolo et al. (1995a), jonka jälkeen menetelmä kehittynyt ainakin laboratoriotyövaiheiden osalta. Vaikka lihasnäytteiden käsittely on tunnustettu ongelmalliseksi, menetelmä lienee tällä hetkellä paras mahdollinen. Nykyään menetelmän luotettavuutta lisätään infusoimalla useampia isotoopilla leimattuja aminohappoja (Volpi et al., 1998), jolloin saadaan proteiiniaineenvaihdunnan muuttujat niin monelta aminohapolta kuin on infusoitu. Tämä lisää kaikkien näytteiden tulosten luotettavuutta, koska muutoksien pitäisi näkyä kaikilla leimatuilla aminohapoilla, tietenkin huomioiden niiden aineenvaihduntareitit. Proteiiniaineenvaihdunnan tulosten tulkitseminen on parantunut vuosien varrella. Veren virtausnopeuden mittaaminen tuli osaksi menetelmää Biolon et al. (1995a) tutkimuksen pohjalta. Sen jälkeen lisättiin hormonianalyysit mukaan mittausprosessiin. Pitkän mittauspäivän aikana tapahtuvia muutoksia tulkitaan myös insuliinin pitoisuuksien muutoksilla. Tämä on tarpeellista erityisesti suun kautta nautittujen

aminohappo- ja/tai hiilihydraattivalmisteiden tutkimisessa. Hiilihydraatti kohottaa veren insuliinipitoisuutta, mikä kiihdyttää proteiinisynteesiä (Rasmussen et al., 2000). Missään tutkimuksessa ei ole kuitenkaan mitattu muiden anabolisten tai katabolisten hormonien yhteyttä proteiiniaineenvaihduntaan. Tältä osa-alueelta saattaisi löytyä tukea tämän menetelmän onnistumiselle. Vapaiden aminohappojen pitoisuudet veressä ja lihaksessa kuvaavat aminohappoaltaan sen hetkistä tilannetta. Niiden pitoisuuksien muutoksista voidaan myös hakea luotettavuutta perinteisen kolmiollasmallin tuloksille. Koska kolmiollasmalli pyrkii kuvaamaan proteiiniaineenvaihduntaa dynaamisena prosessina, myös lyhyin väliajoin otetut vapaiden aminohappojen pitoisuudet tukevat proteiiniaineenvaihdunnan muutosprosesseja.

## 12. 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Isotooppimenetelmän etuina ovat sen nopeus ja luonnollisesti esiintyvien aminohappojen käyttö (Biolo et al., 1995a). Fenyylialaniinin käyttö vaatii ainoastaan kahden tunnin infuusion ja sen jälkeen synteesiä ja hajoamista voidaan mitata (Biolo et al., 1995a). Aikaisempiin menetelmiin verrattuna (3-metyylihistidiini ja tyypitase) mittaus on huomattavasti nopeampi. Fenyylialaniini on luonnollisesti elimistössä esiintyvä välttämätön aminohappo (Campbell, 1995, 73). Menetelmässä oletetaan, että isotoopilla leimattu fenyylialaniini jäljittelee luonnollisen fenyylialaniinin aineenvaihduntaa, eikä häiritse aminohappojen kinetiikkaa (Rasmussen et al., 2000). Tämän oletuksen todistaminen lienee metodologisesti mahdotonta, mutta fysiologisesti ja biokemiallisesti oletukset ovat uskottavia.

Proteiiniaineenvaihdunnan mittaamiseen käytettävää isotooppi-infuusio –menetelmää voidaan pitää päätulosten (synteesi, hajoaminen, netto) mukaan toistettavana. Lisäksi rinnakkaisten verinäytesarjojen ja GC/MS:n tulosten korrelaatio oli hyvä. Näiden mukaan hypoteesi ( $H_1$ ) jää voimaan. Maksimivoimaharjoitus kiihdytti proteiinisynteesiä ja proteiinien hajoamista heti voimaharjoituksen jälkeen. Sen mukaan myös hypoteesi ( $H_2$ ) jää voimaan.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää isotooppimenetelmän toistettavuutta ja tarkkuutta proteiiniaineenvaihdunnan tutkimisessa sekä osoittaa hypertrofisen maksimivoimaharjoituksen aiheuttavan muutoksia proteiiniaineenvaihdunnassa. Vaikka välivaiheiden muuttujissa (kertymä ja pitoisuus) esiintyi systemaattista ja satunnaisvirhettä, synteesin, hajoamisen tai nettotilanteen arvot eivät eronneet mittausjaksojen tai näytesarjojen kesken. Voimaharjoitus kiihdytti proteiinien synteesiä ja hajoamista heti maksimivoimaharjoituksen jälkeen mitattuna. Näiden päätulosten perusteella menetelmä on toistettava ja menetelmä mittaa muutoksen, jonka maksimivoimaharjoitus aiheuttaa proteiiniaineenvaihdunnassa.

## LÄHTEET

- Aro, A., Mutanen, M. & Uusitupa, M. 1999. Ravitsemustiede. Hämeenlinna: Karisto.
- Biolo, G., Fleming, R.Y.D., Maggi, S.P. & Wolfe, R.R. 1995a. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 268, E75-E84.
- Biolo, G., Maggi, S.P., Williams, B.D., Tipton, K.D. & Wolfe, R.R. 1995b. Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *American Journal of Physiology* 268, E514-E520.
- Biolo, G., Zhang, X.-J. & Wolfe R.R. 1995c. Role of membrane transport in interorgan amino acid flow between muscle and small intestine. *Metabolism* 44(6), 719-724.
- Biolo, G., Tipton, K.D., Klein, S. & Wolfe, R.R. 1997. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *American Journal of Physiology* 273, E122-E129.
- Calder, A.G., Garden, K.E., Anderson, S.E. & Lobley, G.E. 1999. Quantitation of blood and plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass spectrometry with U-(13)C amino acids as internal standards. *Rapid Communications on Mass Spectrometry* 13(21), 2080-2083.
- Campbell, M.K. 1995. *Biochemistry*. 2. painos. Orlando: Saunders.
- Carraro, F., Hartl, W., Stuart, C., Layman, D.K., Jahoor, F. & Wolfe, R.R. 1990a. Whole body and plasma protein synthesis in exercise and recovery in human subjects. *American Journal of Physiology* 259, E821-E831.

- Carraro, F., Stuart, C., Hartl, W., Rosenblatt, J. & Wolfe, R.R. 1990b. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. *American Journal of Physiology* 259, E470-E470.
- Carraro, F., Naldini, A. Weber, J.-M. & Wolfe, R.R. 1994. Alanine kinetics in humans during low- intensity exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 26(3), 348-353.
- Castellino, P., Luzi, L., Simonson, D.C., Haymond, M. & DeFronzo, R.A. 1987. Effect of insulin and plasma amino acid concentrations on leucine metabolism in man. *Journal of Clinical Investigation* 80, 1784-1793.
- Chesley, A., MacDougall, J.D., Tarnopolsky, M.A., Atkinson, S.A. & Smith, K. 1992. Changes in human muscle protein synthesis after resistance exercise. *Journal of Applied Physiology* 73(4), 1383-1388.
- Chinkes, D.L., Rosenblatt, J. & Wolfe, R.R. 1993. Assessment of the mathematical issues involving in measuring the fractional synthetic rate of protein using the flooding dose technique. *Clinical Science* 84, 177-183.
- Dohm, G.L., Kasperk, G.J., Tapscott, E.B. & Beecher, G.R. 1980. Effect of exercise on synthesis and degradation of muscle protein. *Journal of Biochemistry* 188, 255-262.
- Dohm, G.L., Tapscott, E.B. & Kasperk, G.J. 1987. Protein degradation during endurance exercise and recovery. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 19 (5), S166-S171.
- Van Eijk, H.M., Rooyackers, D.R. & Soeters, P.B. 1999. Determination of amino acid isotope enrichment using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 271(1), 8-17.
- Evans, W.J. & Cannon, J.G. 1991. The metabolic effects of exercise-induced muscle damage. *Exercise Sport Science Review* 19, 99-125.

- Guyton, A.C. 1996. Textbook of medical physiology. 9. painos. Philadelphia (Pa.): Saunders.
- Halliday, D. & McKeran, R.O. 1975. Measurement of muscle protein synthetic rate from serial muscle biopsies and total body protein turnover in man by continuous intravenous infusion of L-[ $\alpha$ - $^{15}$ N]lysine. *Clinical Science and Molecular Medicine* 49, 581-590.
- Hargreaves M. (toim.) 1995. Exercise metabolism. Champaign (IL): Human Kinetics cop.
- Houston, M.E. 2001. Biochemistry primer for exercise science. Champaign (IL): Human Kinetics cop.
- Jones, P.R.M. & Pearson, J. 1969. Anthropometric determination of leg fat and muscle plus bone volumes in young male and female athletes. *Journal of Physiology of London* 204, 63P-66P.
- Jorfeldt, L. & Wahren, J. 1971. Leg blood flow during exercise in man. *Clinical Science* 41, 459-473.
- Knapik, J., Meredith, C, Jones, B., Fielding, R., Young, V. & Evans, W. 1991. Leucine Metabolism during fasting and exercise. *Journal of Applied Physiology* 70(1), 43-47.
- Kreider, R.B., Miriel, V. & Bertun, E. 1993. Amino acid supplementation and exercise performance. *Sports Medicine* 16(3), 190-209.
- Lahti, Kaisa. 2000. Aminohapot proteiinisynteesitutkimuksessa. Pro gradu –tutkielma. Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, Soveltavan kemian osasto.
- Lamont, L., Patel, D.P. & Kalhan, S.C. 1990. Leucine kinetics in endurance-trained humans. *Journal of Applied Physiology* 69(1), 1-6.

- Lemon, P.W.R. 1998. Effects of exercise on dietary protein requirements. *International Journal of Sport Nutrition* 8, 426-447.
- Macdonald, I.A. 1999. Arterio-venous differences to study macronutrient metabolism: introduction and overview. *Proceedings of the Nutrition Society* 58(4), 871-875.
- McArdle, W.A. 1996. *Exercise physiology: energy, nutrition and human performance*. 4. painos. Baltimore: Williams & Wilkins cop.
- Millward, D.J. & Waterlow, J.C. 1978. Effect of nutrition on protein turnover in skeletal muscle. *Federation Proceedings* 37(9), 2283-2290.
- Pangborn, J.B. 1987. *Flowchart of amino acid metabolism*. Bionostics Inc.
- Patterson, B.W., Zhang, X.-J., Chen, Y., Klein, S. & Wolfe, R.R. 1997. Measurement of very low stable isotope enrichment by gas chromatography/mass spectrometry: application to measurement of muscle protein synthesis. *Metabolism* 46(8), 943-948.
- Phillips, S.M., Atkinson, S.A., Tarnopolsky, M.A. & MacDougall, J.D. 1993. Gender differences in leucine kinetics and nitrogen balance in endurance athletes. *Journal of Applied Physiology* 75(5), 2134-2141.
- Phillips, S.M., Tipton, K.D., Ferrando, A.A. & Wolfe, R.R. 1999. Resistance training reduces the acute exercise-induced increase in muscle protein turnover. *American Journal of Physiology* 276, E118-E124.
- Russell-Jones, D.L. & Umpleby, M. 1996. Protein anabolic action of insulin, growth hormone and insulin-like growth factor I. *European Journal of Endocrinology* 136, 631-641.
- Rådegran, G. 1999. Limb and muscle flow measurements at rest and during exercise in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society* 58(4), 887-898.



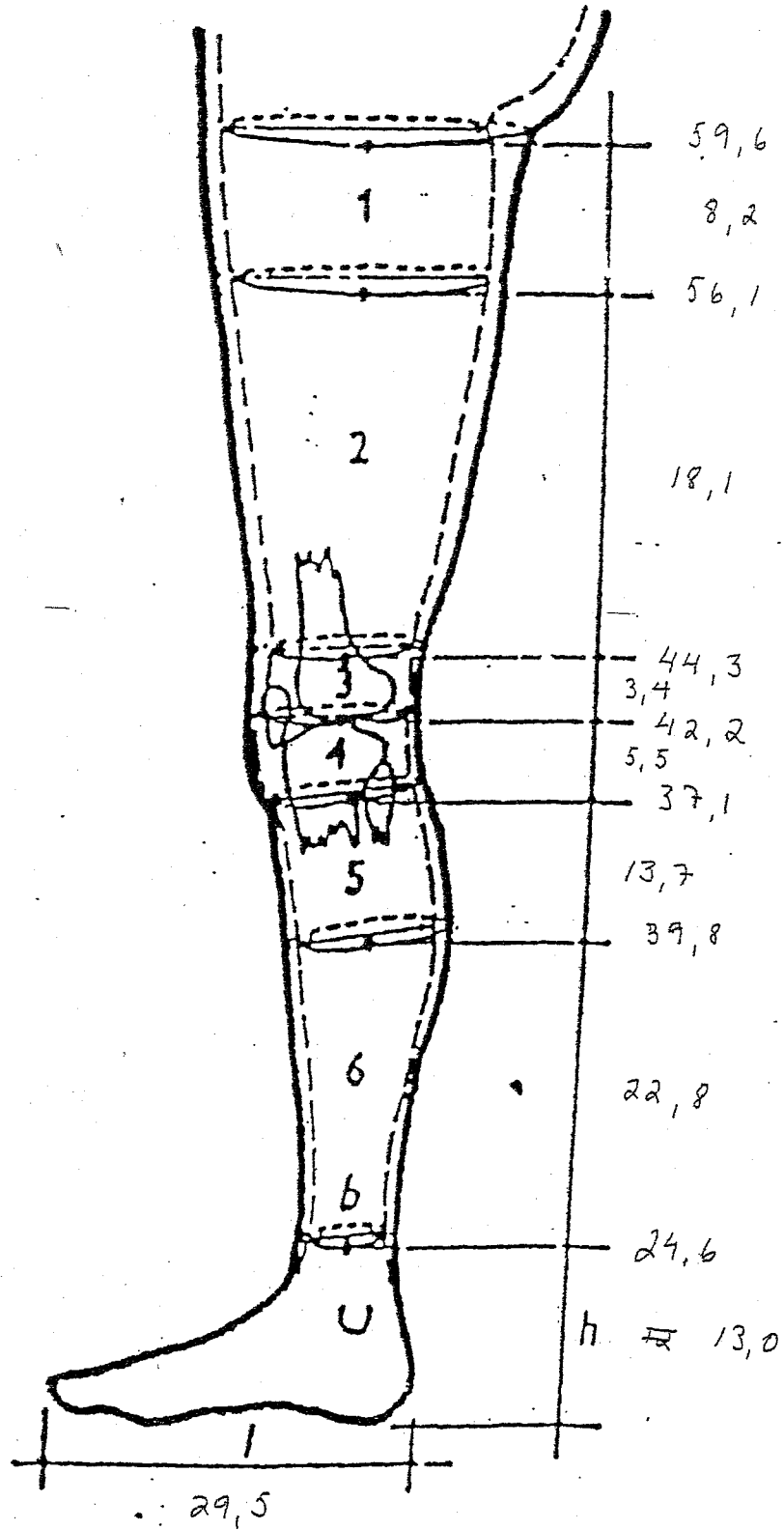
- Stein, T.P., Hoyt, R.W., O'Toole, M., Leskiw, M.J., Schluter, M.D., Wolfe, R.R. & Hiller, W.D.B. 1989. Protein and energy metabolism during prolonged exercise in trained athletes. *International Journal of Sports Medicine* 10(5), 311-316.
- Tarnopolsky, M.A., Atkinson, J.D., MacDougall, J.D., Senior, B.B., Lemon, P.W.R. & Schwarcz, H. 1991. Whole body leucine metabolism during and after resistance exercise in fed humans. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 23(3), 326-333.
- Tipton, K.D., Ferrando, A.A., Williams, B.D. & Wolfe, R.R. 1996. Muscle protein metabolism in female swimmers after a combination of resistance and endurance exercise. *Journal of Applied Physiology* 81(5), 2034-2038.
- Tipton, K.D., Gurkin, B.E, Matin, S. & Wolfe, R.R. 1999a. Nonessential amino acids are not necessary to stimulate net muscle protein synthesis in healthy volunteers. *Journal of Nutrition Biochemistry* 10, 89-95.
- Tipton, K.D., Ferrando, A.A., Phillips, S.M., Doyle, D.Jr. & Wolfe, R.R. 1999b. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *American Journal of Physiology* 276, E628-E634.
- Tipton, K.D. & Wolfe, R.R. 1998. Exercise-induced changes in protein metabolism. *Acta Physiologica Scandinavica* 162, 377-387.
- Viru, A. 1996. Postexercise recovery period: carbohydrate and protein metabolism. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* 6, 2-14.
- Volpi, E., Ferrando, A.A., Yeckel, C.W., Tipton, K.D. & Wolfe, R.R. 1998. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *Journal of Clinical Investigation* 101, 2000-2007.

- Wagenmakers, A.J.M. 1999. Tracers to investigate protein and amino acid metabolism in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society* 58(4), 987-1000.
- Wolfe, R.R. 1992. *Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine. Principles and practice of kinetic analysis.* New York: Wiley-Liss.

## Mittausaikataulu

## LIITE 1.

min.	kello	tapahtuma	vastuuhenkilö
-75	7.45	0-verinäytteet, sylkinäyte	Risto
-45		jalan tilavuuden mittaaminen	Janne
-30	8.30	kyynärvarren kanyyli (vasen)	
-15	8.35	0-verinäytteet, 16 ml (3-allas, verenvirtaus)	sairaanhoitaja
-5		2H5-phe -alkuannos 2 µmol/kg	sairaanhoitaja
0	9.00	2H5-phe -infuusion aloitus, infuusionopeus <b>9,4 ml/h</b> /ruisku	sairaanhoitaja
55	9.55	<i>voimaharjoitus alkaa</i>	Niina
105	10.45	<i>voimaharjoitus loppuu</i>	Niina
110	10.50	reisivaltimon ja -laskimon kanylointi alkaa	Olavi
120		kyynärvarren kanyyli (oikea)	sairaanhoitaja
125		ICG-infuusion aloitus infuusionopeus <b>60 ml/h</b>	sairaanhoitaja/ Tarja
135	11.15	verinäytteet, 25a+5v, 2+2VV	sairaanhoitajat/ Olavi/
145		verinäytteet, 4a+4v, 2+2VV	Tarja
155		verinäytteet, 4a+4v, 2+2VV	
165		verinäytteet, 25a+5v, 2+2VV	
	11.45	lihasbiopsia	Markku/Risto
170		ICG-infuusion lopetus	sairaanhoitaja
260	13.20	ICG-infuusion aloitus infuusionopeus <b>60 ml/h</b>	sairaanhoitaja
270	13.30	verinäytteet, 25a+5v, 2+2VV	sairaanhoitajat/ Olavi/
280		verinäytteet, 4a+4v, 2+2VV	Tarja
290		verinäytteet, 4a+4v, 2+2VV	
300		verinäytteet, 25a+5v, 2+2VV	
	14.00	lihasbiopsia	Markku/Risto
305		infuusioiden lopetus, kanyyleiden poisto, kh:n jälkitoimenpiteet	Olavi/ sairaanhoitajat



## LIITE 3.

### INFUUSIOLIUKSEN JA ALKUANNOKSEN LASKEMINEN

Isotoopin määrä lasketaan koehenkilön kehon painon, infuusioajan ja infuusionopeuden avulla. Jos isotoopin infuusionopeus on esimerkiksi 0,05  $\mu\text{mol/kg/min}$ , aika 300 minuuttia ja koehenkilön paino 60 kilogrammaa, lasketaan tarvittava määrä

$$\begin{aligned}\text{Isotoopin määrä} &= \text{kehon paino} \times \text{infuusioaika} \times \text{infuusionopeus} \\ &= 60 \text{ kg} \times 300 \text{ min.} \times 0,05 \mu\text{mol/kg/min} \\ &= 900 \mu\text{mol}\end{aligned}$$

Koska infuusionopeuden yksikkö ilmoitetaan  $\mu\text{mol/kg/min}$ , täytyy isotoopin määrä muuttaa punnittavaan muotoon. Isotoopin rakenteen perusteella lasketaan yhdisteen molekyyliainepaino, joka kerrotaan tilavuudella. Tarvittaessa tehdään vielä korjauksia, jotta yksiköt ovat sopivia isotoopin punnitsemiseen.

Isotoopin punnitseminen tapahtuu tarkalla vaa'alla ja steriileillä työvälineillä. Myös työskentelytavoissa steriiliyteen on kiinnitettävä erityistä huomiota. Isotooppi annostellaan purkista tiputtelemalla steriiliin mitta-astiaan laskettu määrä. Todellinen isotoopin määrä merkitään muistiin. Sen jälkeen astiaan lisätään steriiliä suolaliuosta, ja isotooppi liuotetaan joko käsin ravistelemalla tai sekoittajan avulla. Kun isotooppi on liuennut kunnolla suolaliuokseen, liuos imetään ruiskuun. Ruisku tyhjennetään nollatulla vaa'alla olevaan mitta-astiaan. Kun tiedetään isotoopin ja isotooppia sisältävän liuoksen tarkka määrä sekä koehenkilön paino mittauspäivänä, voidaan laskea infuusiopumpun nopeus (ml/min), jotta todellinen infuusionopeus ( $\mu\text{mol/kg/min}$ ) olisi oikea.

Alkuannoksen suuruus on myöskin riippuvainen aminohappoaltaiden koosta, joka on suhteessa koehenkilön painoon. Alkuannos punnitaan samalla tavalla kuin infuusiota varten ja liuotetaan suolaliuokseen. Liuos imetään ruiskuun, josta se injektoidaan verenkiertoon katetrien ja avulla.

**Bovine Colostrum**

**Blood Flow**

**Subject** 14-Nov  
**Date** ICG(indocyanine green)  
**Infusate** 60ml/h  
**Infusion rate** 82.80  
**Dilution factor** 0.42  
**Hematocrit** 0.42  
**Leg volume(L)** 12.056

Standard	Weight of Smp	Weight of ICG	Absorbance @ 805	DF=(ICG wt+serum wt)/ICG wt
1.	1.0061	0.0123	1.574	82.80
2.				

Sample	Absorbance @ 805			Plasma Flow ml/min	HCR	Blood Flow ml/min	Leg volume L	Blood Flow ml/min/100ml legVol
	FV	PV	FV - PV					
PD 1								
135	0.425					0.00		
145	0.502	0.129	0.373	349.40	0.42	602.42	12.056	5.00
155	0.545	0.151	0.394	330.78	0.42	570.31	12.056	4.73
165	0.515	0.166	0.349	373.43	0.42	643.85	12.056	5.34
PD 2								
270			0			0.00		
280	0.739	0.193	0.546	238.69	0.42	411.54	12.056	3.41
290	0.617	0.19	0.427	305.22	0.42	526.23	12.056	4.36
300	0.541	0.216	0.325	401.01	0.42	691.39	12.056	5.73

	n	mean	std
PD 1	3	5.02	0.31
PD 2	3	4.50	1.17

## LIITE 5.

### TYÖOHJE SSA-PUTKIEN (kolmiallasmalli) VALMISTUKSEEN

Tarja Nykänen

#### TARVIKKEET:

7 ml korkillisia koeputkia, sulfosalisylihappoa (SSA 15 %), sisäistä standardia (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ring-fenyylialaniinia; C= 50 µl/ml), 2 pipettiä (2 ml ja 200 µl) ja pipetin kärkiä, vaaka, jäätä

1. Punnitse koeputki ja kirjaa paino ylös.
2. Ota korkki pois ja nollaa vaaka.
3. Lisää 2 ml sulfosalisylihappoa koeputkeen ja kirjaa paino ylös.
4. Nollaa vaaka. Lisää 200 µl sisäistä standardia ja kirjaa paino ylös.
5. Sulje koeputki huolellisesti.

## TYÖOHJE ICG-NÄYTTEIDEN(verenvirtaus) ANALYYSIIN

Tarja Nykänen

### TARVIKKEET:

spektrofotometri, musta kyvetti, 5-40 µl pipetti ja kärki, ICG-liuosta, Eppendorf-putki, parafilmiä, vaaka, pesunestettä, tislattua vettä, imu kyvetin puhdistukseen, ohut kärki imuun, kertakäyttöpipettejä, verinäytteet

### ESITYÖT

1. Kytke spektrofotometriin virta. Kokoa tarvikkeet työpöydälle spektrofotometrin viereen.
2. Mittaa Eppendorf-putkeen n. 2 ml ICG-liuosta.
3. Aseta spektrofotometriin aallonpituudeksi 805 nm ja *data print 'yes'*. Toiminnot löytyvät päävalikon *photometric*-mittauksen alta.

### LAIMENNUSKERTOIMEN MITTAAMINEN

4. Punnitse kyvetti ja nollaa vaaka. Kaada taustanäyte kyvettiin ja kirjaa näytteen paino ylös. Laita näyte spektrofotometriin ja paina *auto zero*.
5. Nollaa kyvetti, jossa on ICG-liuosta. Lisää 12 µl ICG-liuosta kyvettiin ja kirjaa ICG:n paino ylös. Sekoita ICG plasmaan peittämällä kyvetti parafilmillä ja peukalolla ja kääntelemällä ylösalaisin. Mittaa liuoksen absorbanssi, paina *start* ja kirjaa se ylös.
6. Puhdista kyvetti imulla, laita kertakäyttöpipetillä pesunestettä, ime se pois ja huuhtelee vielä tislattulla vedellä. Kuivaa kyvetti huolellisesti imulla.

### NÄYTTEIDEN MITTAAMINEN

7. Kaada näyte (135 FV, 135 PV, 145 FV jne.) kyvettiin, paina *start* ja kirjaa absorbanssi ylös. Pese kyvetti kohdan 6 tavoin.

### LAIMENNUSKERTOIMEN MITTAAMINEN

8. Tee samoin kuin kohdissa 4, 5 ja 6, paitsi ICG:n määrä on 18 µl.
9. Lopetettuasi työskentelyn, vie tiskit altaaseen ja siivoa jälkesi. Sulje spektrofotometri palattuasi perustilaan (paina *return ja mode*).