

**TYYPIN 1 DIABETEKSEN JA KESTÄVYYSHARJOITTELUN  
VAIKUTUKSET ENERGIAMETABOLIAAN LIITTYVIEN  
GEENIEN ILMENEMISEEN HIIRTEN RAAJALIHAKSISSA**

Mika Silvennoinen

Pro Gradu -tutkielma  
Liikuntafysiologia LFY.312  
Kevät 2004  
Liikuntabiologian laitos  
Jyväskylän yliopisto  
Ohjaaja: Heikki Kainulainen

# TIIVISTELMÄ

**Silvennoinen, Mika 2004. Tyypin 1 diabeteksen ja kestävyysharjoittelun vaikutukset energiametaboliaan liittyvien geenien ilmenemiseen hiirten raajalihaksissa. Jyväskylän yliopisto. Liikuntabiologian laitos. Liikuntafysiologian Pro gradu –tutkielma.**

Tyypin 1 diabetesta eli nuoruusiän diabetesta sairastavan haima ei eritä lainkaan insuliinia, koska sen  $\beta$ -solut ovat tuhoutuneet autoimmuunireaktioiden takia. Insuliinin puute heikentää lihas- ja rasvakudosten glukoosin ottoa ja käyttöä (veren glukoosipitoisuus nousee), vähentää rasvahappojen varastoitumista rasvakudoksiin (veren rasvahappopitoisuus nousee), heikentää proteiinisynteesiä ja lisää proteiinien hajotusta. Diabeteksen aiheuttama krooninen hyperglykemia aiheuttaa pitkällä aikavälillä vakavia komplikaatioita, joita ovat esimerkiksi: sepelvaltimotauti, ääreisverenkiertosairaudet, kardiomyopatia ja neuropatia. Diabeteksen hoidon tärkein tavoite on pitää veren glukoosipitoisuus mahdollisimman normaalina. Diabetesta hoidetaan tavallisesti insuliini-injektioiden avulla. Liikuntaakin voidaan käyttää yhtenä hoitomuotona, sillä se parantaa kudosten insuliiniherkkyyttä, raajalihasten kykyä hapettaa glukoosia ja rasvahappoja sekä ehkäisee sydän- ja verisuonitauteja. Hoitokeinojen kehittelyn kannalta on tärkeää ymmärtää sairauksien ja hoitojen solutason mekanismeja. Diabeteksen ja kestävyysharjoittelun on havaittu muuttavan raajalihaksissa lukuisten geenien mRNA-määriä. Transkription eli mRNA-synteesin säätelyn ajatellaan olevan tärkeä vaikutusmekanismi sekä kestävyysharjoitteluadaptaatioissa että diabeteksessä. Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää millaisia muutoksia hoitamaton diabetes ja kestävyysharjoittelu aiheuttavat raajalihasten energiametaboliaan liittyvien geenien ilmenemiseen. Geenien ilmenemisellä tarkoitettiin tässä tutkimuksessa tietyn geenin mRNA:n määrää.

Tutkimuksessa käytettiin koe-eläiminä NMRI-hiiriuroksia ( $n=60$ ). Osalle hiiristä aiheutettiin tyypin 1 diabetes injektoimalla vatsaonteloon haiman  $\beta$ -solut tuhoavaa streptozotosiinia. Puolet sairaista ja terveistä hiiristä suorittivat kestävyysharjoitteluohjelman, joka kesti ryhmästä riippuen 1, 3 tai 5 viikkoa. Harjoittelun jälkeen harjoitelleet ja niitä vastaavat harjoittelemattomat hiiret lopetettiin ja preparoititiin. Tässä tutkimuksessa käytettiin raajalihaksen mallina pohjekompleksia (gastrocnemius, soleus, plantaris). Pohjekompleksin geenien ilmenemistä selvitettiin käyttäen Affymetrix:in microarray-lastua MG U74Av2. Microarray-menetelmän avulla voitiin selvittää laajassa mittakaavassa, miten eri geenien ilmeneminen lisääntyy tai vähenee diabeteksen ja kestävyysharjoittelun vaikutuksesta. Microarray-tulosten analysointiin käytettiin tietokoneohjelmia Microarray Suite ja GeneSpring. Geenien ilmenemisessä laskettiin olevan ero kahden näytteen välillä, kun muutoksen  $P$ -arvo oli yli 0,9975 tai alle 0,0025 (Wilcoxon's Signed Rank –testi) ja signaalien suhde  $\log_2(\text{näyte1/näyte2})$  oli yli 0,3 tai alle  $-0,3$ .

Diabetes heikensi geenien ilmenismuutosten perusteella lihassolujen glukoosinottokykyä sekä glykolyysiä. Kestävyysharjoittelu saattoi vähentää glukoosinottokyvyn heikkenemistä ja lisätä aerobisen glykolyysin osuutta suhteessa anaerobiseen. Diabetes laski glukoosi-6-fosfataasi-kuljetusproteiini-1:n ilmenemistä, mikä voi vähentää raajalihassolujen glykogeenisynteesiä. Kestävyysharjoittelu lievitti muutosta ja vähensi mahdollisesti näin glykogeenisynteesin heikkenemistä. Lyhytkestoinen diabetes pyrkii parantamaan lipidien hajotuskykyä lisäämällä lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemistä. Pitkäkestoinen diabetes laski em. geenien ilmenemistä, mikä heikensi todennäköisesti raajalihaksen lipidienhajotuskykyä. Kestävyysharjoittelu voi estää pitkäkestoisien diabeteksen aiheuttaman lipidienhajotuskyvyn laskun lisäämällä lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemistä. Diabetes lisäsi ariadne-geenin ilmenemistä, mikä selittää diabeteksessä havaittua proteiinien hajotuksen lisääntymistä, sillä kyseinen geeni lisää ubikitiiniketjujen liittämistä proteiineihin. Voi olla, että kestävyysharjoittelu vähentää proteiinien hajotusta, sillä se vähensi diabeteksen aiheuttamaa ariadne-geenin ilmenemisen nousua. Diabetes vähensi BCKD:n (branched chain ketoacid dehydrogenase) ja BCKDK:n (branched chain ketoacid dehydrogenase kinase) geenien ilmenemistä, mikä vähentää lihassolujen kykyä hapettaa haaraketjuisia aminohappoja. Kestävyysharjoittelu voi vähentää hape-tuskyvyn laskua, sillä se vähensi em. geenien ilmenemisen laskua. Diabetes lisäsi MNK2:n ja PHAS-1:n geenien ilmenemistä, mikä selittää diabeteksessä havaittua proteiinisynteesin heikkenemistä, sillä kyseiset geenit inhiboivat eif-4E-proteiinia, joka osallistuu proteiinisynteesin aloitukseen. Harjoittelu vähensi diabeteksen aiheuttamaa MNK2:n ja PHAS-1:n geenien ilmenemisen kasvua, mikä voi lisätä proteiinisynteesiä. Diabetes laski raajalihaksissa sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä, mikä johti todennäköisesti aerobisen energiantuottokyvyn laskuun. Diabetes voi näin heikentää kaikkien ravintoaineiden hape-tusta ja vähentää niistä saatavaa ATP:n määrää. Kestävyysharjoittelu lisäsi sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä ja mahdollisesti näin myös aerobista energiantuottokykyä.

Tutkimuksessa havaitut geenien ilmenismuutokset selittävät monia diabeteksen aiheuttamia metabolian ilmiöitä. Kestävyysharjoittelu lievitti yleensä ainakin ensimmäisessä aikapisteessä diabeteksen aiheuttamia geenien ilmenemisen muutoksia. Kestävyysharjoittelu voi siis vähentää diabeteksen vaikutuksia raajalihasten energiametaboliaan. Tässä tutkimuksessa selvitettiin geenien ilmenemistä vain mRNA-tasolla. Tämän takia jatkotutkimuksissa tulee selvittää, aiheuttavatko havaitut mRNA-määrän muutokset myös proteiinimäärien ja entsyymiaktiivisuuksien muutoksia.

# SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ .....	1
SANASTO .....	4
1 JOHDANTO .....	5
2 METABOLIAN SÄÄTELY .....	7
2.1 Neuroendokriininen järjestelmä .....	7
2.2 Säätelemekanismit .....	8
2.3 Geenien ilmenemisen säätely .....	9
3 ENERGIAMETABOLIA .....	10
3.1 Energiantuottoreitit .....	10
3.2 Energiantuottoreittien säätely .....	11
3.3 Insuliinisignointi ja ravintoainemetabolian säätely .....	16
3.3.1 Insuliinisignointi .....	16
3.3.2 Insuliinin vaikutukset glukoosimetaboliaan .....	18
3.3.3 Insuliinin vaikutukset rasvahappometaboliaan .....	19
3.3.4 Insuliinin vaikutukset aminohappometaboliaan .....	20
4 DIABETES MELLITUS .....	22
5 LIIKUNTA JA TYYPIN 1 DIABETES .....	25
5.1 Liikunnan yleiset hyödyt ja haitat tyypin 1 diabeteksessa .....	25
5.2 Liikunnan pysyvät vaikutukset raajalihasten energiametaboliaan tyypin 1 diabeteksessa .....	28
6 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESIT .....	32
7 TUTKIMUSMENETELMÄT .....	33
7.1 Koe-eläimet ja niiden hoito .....	33
7.2 Koe-asetelma .....	33
7.3 Hiirten lopetus ja preparointi .....	34
7.4 Seerumin glukoosipitoisuuden ja pohjekompleksin sitraattisyntaasiaktiivisuuden mittaaminen .....	35
7.5 Totaali-RNA:n eristys, laatukontrolli ja näytteen valmistus .....	35
7.6 Microarray-analyysi .....	36
7.7 Microarray-tulosten analysointi .....	38
7.8 Algoritmit ja tilastolliset menetelmät .....	39
7.9 Microarray-analyysin validiteetti ja toistettavuus .....	40

8 TULOKSET .....	41
8.1 Paino.....	41
8.2 Seerumin glukoosipitoisuus .....	42
8.3 Sitraattisyntaasin aktiivisuus ja mRNA:n määrä.....	42
8.4 Energiametaboliaan ja signalointiin liittyvien geenien ilmeneminen mRNA-tasolla	44
8.4.1 Ilmenneiden geenien sekä geenien ilmenemismuutosten lukumäärät eri toiminnallisissa ryhmissä .....	44
8.4.2 Geenien ilmenemismuutosten lukumäärät ja suunnat eri toiminnallisissa ryhmissä .....	45
8.4.3 Geenikohtaiset ilmenemismuutokset .....	48
9 POHDINTA .....	52
9.1 Glukoosimetabolia .....	52
9.2 Lipidimetabolia .....	56
9.3 Proteiinien hajotus.....	58
9.4 ATP:n tuotto.....	60
9.5 Signaaliointi .....	62
10 YHTEENVETO .....	64
11 KIITOKSET .....	67
LÄHTEET .....	68
LIITE 1. Sitraattisyntaasiaktiivisuusmittauksen protokolla.....	76
LIITE 2. Affymetrix:in microarray-protokolla .....	77
LIITE 3. Geenit, joiden ilmenemistä harjoittelu lisäsi terveillä .....	78
LIITE 4. Geenit, joiden ilmenemistä harjoittelu laski terveillä .....	79

# SANASTO

Absorbanssi	= optinen tiheys, valon imeytymistä aineeseen kuvaava luku spektrofotometriassa
AGE	= proteiini johon on liittynyt glukoosin hajoamistuotteita. Näitä syntyy erityisen runsaasti, kun veren glukoosipitoisuus on korkea
AMPK	= adenosinimonofosfaattiriippuvainen proteiinikinaasi
C-terminaalinen pää	= peptidin se pää, jossa aminohapolla on vapaa karboksyyli-ryhmä
Eksitaatio	= atomien virittämistä valon avulla
Elektroforeesi	= menetelmä, jolla erotetaan toisistaan sähköisesti varautuneita molekyylejä niiden erilaisen nopeuden perusteella sähkökentässä
Eluointi	= uuttaminen
Emittoituminen	= tapahtuma, jossa atomien virityksen purkaantumissa syntyy säteilyä
Enhancer-alue	= DNA:ssa oleva sekvenssialue, joka aktivoituessaan lisää promooteri-alueen toimintaa
EST-sekvenssi	= cDNA-kirjastosta peräisin oleva nukleotidisekvenssi. cDNA-kirjastossa on tallennettuna jonkun määrätyn solu- tai kudostyyppin kaikki mRNA-sekvenssit cDNA:ksi käännettynä. EST-sekvensseistä suuri osa on sellaisia, joiden geeninä ei vielä tunneta.
Fibroblasti	= epäkypsä sidekudos solu tai aktiivivaiheessa oleva sidekudossolu
Fluorokromi	= värireaktion aiheuttava aine
Fragmentaatio	= nukleotidijuosteen hajotus pienempiin palasiin
Geenin ilmeneminen	= tässä työssä tietyn geenin lähetti-RNA:n määrä
GLUT4	= tärkein glukoosinkuljetusproteiini
Glykogenolyysi	= glykokeenin entsyymattainen pilkkoutuminen glukoosiksi
G-proteiini	= solukalvon sisäpuolelle kiinnittynyt yhteysproteiini, joka välittää solukalvon reseptorin vastaanottaman viestin solulimaan
Heksoosiamiinireitti	= reaktioreitti, jossa glykolyysin välituotteesta fruktoosi-6-fosfaatista valmistetaan UDP-N-asetyyli-glukoosiamiinia, jota tarvitaan esimerkiksi proteoglykaanien synteesiin
Hybridisaatio	= toisiaan vastaavien (komplementaaristen) nukleiinihapporihmojen yhtyminen kaksijuo-teiseksi emästen pariutumisen kautta
Komplementaarinen ketju	= DNA tai RNA- ketju, jonka sekvenssi on sellainen, että sen nukleotidien emäkset pariutu-vat täydellisesti toisen ketjun kanssa
Konformaatio	= molekyylin tietty kolmiulotteinen rakenne
Kovalenttinen sidos	= kahden atomin välinen voimakas sidos, joka perustuu kahden, neljän tai kuuden elektro-nin jakautumiseen atomien välillä siten, että niistä tulee kummankin atomin yhteisiä
Lysosomi	= pieni solulimassa sijaitseva kalvon ympäröimä soluelin, jonka sisällä olevat hydrolyyttiset entsyymit kykenevät pilkkomaan solulle tarpeettomia makromolekyylejä
MAPK	= mitogeneeniaktivoituproteiinikinaasi
Molaarisuus	= liuoksen tietyn aineen määrä mooleina liuoslitraa kohti
mRNA	= lähetti-RNA
NAD <sup>+</sup>	= nikotiinihappoamidadieniinidinukleotidi, kykenee ottamaan vastaan ja luovuttamaan kaksi elektronia sekä yhden vetyionin
Nefropatia	= munuaissairaus
Neuropatia	= ääreishermostojen sairaus
Nukleotidi	= puriini- tai pyrimidiiniemäksen, pentoosisokerin ja fosfaattiryhmän käsittävä nukleiiniha-pon rakenneyksikkö
Oligonukleotidi	= muutaman nukleotidin pituinen nukleiinihappoketju
Palmitaatti	= palmitiinihapon (rasvahappo) ionimuoto
Palmityyli-coA	= koentsyymi-A-osaan liitetty palmitiinihappo
Polyolireitti	= reaktioreitti, jossa glukoosi muutetaan sorbitoliksi
Promootteri-alue	= DNA:ssa oleva sekvenssialue, joka osallistuu RNA-polymeraasin sitomiseen ja mRNA-synteesin aloitukseen
Proteiinikinaasi-C	= proteiinikinaasi, joka säätelee useiden entsyymien ja transkriptiotekijöiden aktiivisuutta. Aktivoituu hyperglykemiassa.
Retinopatia	= verkkokalvosairaus
Ribosomi	= proteiineista ja RNA:sta koostuva yksikkö, joka syntetisoi mRNA:n ohjeiden perusteella proteiineja
RPM	= kierroksia minuutissa
Sekvenssi	= nukleotidien järjestys RNA:ssa tai DNA:ssa
Superoksidi	= happiradikaali O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , joka kykenee vaurioittamaan hapettamalla elimistölle tärkeitä mole-kyylejä
Triglyseridi	= glyserolin ja kolmen rasvahapon esteriyhdiste, jollaisista neutraalirasvat koostuvat
Ubikitinointi	= ubikitiniketjun liittäminen proteiineihin. Liittyy proteiinien hajotuksen säätelyyn

# 1 JOHDANTO

Tyypin 1 diabeteksen ilmaantuvuus alle 14-vuotiailla lapsilla on Suomessa maailman korkein (Tuomilehto ym. 2000). Tyypin 1 diabetesta eli nuoruusiän diabetesta sairastavan haima ei eritä lainkaan insuliinia, koska sen  $\beta$ -solut ovat tuhoutuneet autoimmuunireaktioiden takia. Sairauden puhkeamisen syitä ei vielä tarkasti tiedetä, mutta siihen voivat vaikuttaa geneettinen alttius sekä autoimmunitettä laukaisevat ympäristön tekijät. Diabetesta sairastavia ihmisiä oli maailmassa 150 miljoonaa vuonna 2000. Vuoteen 2010 mennessä diabeetikkojen määrän uskotaan nousevan 220:een miljoonaan. Diabetesta sairastavien määrän nopea kasvu johtuu pääasiassa tyypin 2 diabeteksen nopeasta yleistymisestä. (Zimmet ym. 2001.) Tyypin 2 diabetes eli aikuisiän diabetes ei johdu insuliinin erityksen häiriöistä vaan lihas-, maksa- ja rasvasolujen insuliinisensitiivisyyden laskusta (Bell & Polonsky 2001). Tyypin 2 diabetesta aiheuttavat geneettiset ja ei-geneettiset tekijät yhdessä. Tärkeimpiä ei-geneettisiä tekijöitä ovat lisääntyvä ikä, ylipaino, keskivartalolihavuus, vähäinen liikunta ja alhainen syntymäpaino (Harris 2000).

Insuliini on tärkeä elimistön metaboliaa säätelevä hormoni. Insuliinin toiminta on molemmissa diabetes-tyypeissä häiriintynyt, mikä aiheuttaa suuria muutoksia elimistön metaboliassa. Vajaa insuliinitoiminta heikentää lihas- ja rasvakudosten glukoosin ottoa ja käyttöä, minkä takia veren glukoosipitoisuus nousee korkeaksi. Insuliini edistää normaalisti rasvahappojen varastoitumista rasvakudoksiin. Diabeteksessa tämä estyy, jolloin veren rasvahappopitoisuus nousee. Insuliini edistää proteiinisynteesiä ja estää proteiinien hajotusta. Diabeteksessa proteiinien synteesi vähenee ja hajotus lisääntyy. (Guyton & Hall 2001, 894-897) Diabetes aiheuttaa pitkällä aikavälillä useita vakavia komplikaatioita, joita ovat sepelvaltimotauti, kardiomyopatia, aivoinfarkti, ääreisverenkiertosairaudet, retinopatiat, nefropatiat, neuropatiat ja ihosairaudet. Krooninen hyperglykemia on komplikaatioiden tärkein syy. Tämän takia diabeteksen hoidon tärkein tavoite on pitää veren glukoosipitoisuus mahdollisimman normaalina. (Nathan 2000.)

Ihon alle annettavat insuliini-injektiot ja tarkka ruokailusuunnitelma ovat perushoidot tyypin 1 diabeteksessa. Tyypin 2 diabeteksen ensisijaisena hoitona ovat sellaiset elämäntapamuutokset kuten painonpudotus, liikunnan lisääminen ja ruokarasvojen vähennys. (LeRoith ym. 2000.) Liikuntaa sopii hyvin tyypin 2 diabeteksen hoitoon, koska se lisää kudos-

ten insuliiniherkkyyttä. Tyypin 1 diabeteksen hoitona liikunta on hieman ongelmallisempi, koska se täytyy sovittaa tarkasti yhteen insuliinihoitojen ja ruokailujen kanssa. Jos näin ei tehdä, liikunta voi aiheuttaa insuliiniherkkyyden lisäyksen kautta hypoglykemiaa. Liikunnalla on kuitenkin useita edullisia vaikutuksia myös tyypin 1 diabetesta sairastaville. Liikunta parantaa raajalihasten heikentyneitä glukoosin ja rasvahappojen hapetuskykyä (Iannuzzo ym. 1974). Liikunta voi ehkäistä makrovaskulaaristen sairauksien kehittymistä (Fuchsjäger-Mayrl ym. 2002; Rigla ym. 2001) sekä parantaa sydämen toimintakykyä (Paulson ym. 1987). Liikunta aiheuttaa diabetesta sairastavilla samanlaisia adaptaatiovaikutuksia kuin terveilläkin. Liikunta voi lisätä esim. aerobista kestävyyttä, anaerobista kestävyyttä sekä lihasvoimaa. (Mandroukas ym. 1984.)

Hoitokeinojen kehittelyn kannalta on hyvin tärkeää ymmärtää sairauksien ja hoitojen solutason mekanismeja. Geenien transkriptionsäätely on tärkeä osa solujen metabolian säätelyä. Diabeteksen on havaittu aiheuttavan laajamittaisia muutoksia hiirten raajalihasten geenien mRNA-määrissä (Yechoor ym. 2002). Pilegaard ym. (2000) totesivat myös, että geenien transkriptionsäätely on raajalihasten harjoitteluadaptaatioiden perusta. Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää millaisia muutoksia hoitamaton diabetes ja kestävyysharjoittelu aiheuttavat raajalihasten geenien ilmenemiseen. Geenien ilmenemisellä tarkoitetaan tässä tutkimuksessa tietyn geenin mRNA:n määrää. Tutkimuksessa käytettiin koe-eläiminä NMRI-hiiriuroksia (Harlan, Hollanti). Osalle hiiristä aiheutettiin kokeellinen tyypin 1 diabetes injektoimalla vatsaonteloon haiman  $\beta$ -solut tuhoavaa streptozotosiinia (Sigma). Puolet sairaista ja terveistä hiiristä suorittivat kestävyysharjoitteluohjelman, joka kesti ryhmästä riippuen 1,3 tai 5 viikkoa. Ohjelman jälkeen harjoitelleet ja niitä vastaavat harjoitteleemattomat hiiret lopetettiin ja preparoitiin. Tässä tutkimuksessa käytettiin raajalihaksen mallina pohjekompleksia (gastrocnemius, soleus, plantaris). Pohjekompleksin geenien ilmenemistä selvitettiin käyttäen Affymetrix:in (USA, Santa Clara) microarray-lastua MG U74Av2. Kyseisellä lastulla voitiin tutkia samalla kertaa noin 6000:n geenin ja 6000:n EST-sekvenssin ilmenemistä. Microarray-menetelmän avulla voitiin näin selvittää laajassa mittakaavassa miten geenien toiminta lisääntyy tai vähenee diabeteksen ja kestävyysharjoittelun (yhdessä ja erikseen) vaikutuksesta.

## 2 METABOLIAN SÄÄTELY

Nisäkkäiden elimistö koostuu erilaisista kudoksista, joilla on kaikilla oma erityinen tehtävänsä. Lihaskudos esimerkiksi mahdollistaa liikkeen, rasvakudos energian varastoinnin ja hermokudos sähkökemiallisten signaalien johtamisen. Kudoksen toiminta perustuu sen solujen yhteistoimintaan. Elimistön toiminta taas perustuu kaikkien sen kudosten ja niiden muodostamien elinten yhteistoimintaan. Yhteistoiminta vaatii monella tasolla tapahtuvaa tiedonvaihtoa ja säätelyä.

### 2.1 Neuroendokriininen järjestelmä

Neuroendokriininen järjestelmä vastaa siitä, että elimistön eri osat toimivat hyvin yhteen. Järjestelmän perusosat ovat keskushermosto, autonominen hermosto sekä sisäeritysrauhaset. Keskushermosto kerää tietoa elimistön eri osien toiminnasta ja olosuhteista. Tietoa saadaan muun muassa sensoristen hermojen kautta sekä veren mukana tulevista signaaliaineista. Saapuneiden tietojen perusteella keskushermosto koordinoi koko elimistön toimintaa. Koordinointi tapahtuu välittäjäaineiden avulla, jotka pystyvät vaikuttamaan solujen toimintaan. Välittäjäaineet kulkevat kohdekudoksiin ja -soluihin veren mukana (hormonit) tai ne eritetään kohteeseen hermopäätteistä (neurotransmitterit). Elimistön toimintaa säätelevät hermopäätteet kuuluvat autonomiseen hermostoon, joka voidaan jakaa sympaattiseen ja parasympaattiseen hermostoon. Näillä kahdella hermostolla on yleensä vastakkaiset vaikutukset kohdesoluihinsa. Veren kautta vaikuttavien välittäjäaineiden eli hormonien eritystä tapahtuu sisäeritysrauhasissa, joita ovat esimerkiksi kilpirauhanen, lisämunuainen, kivekset, haima ja aivolisäke. Sisäeritysrauhasten eri hormonien eritystä säädellään yleensä aivolisäkkeen erittämien trooppisten hormonien avulla. Hypotalamus säätelee keskushermostosta saatujen tietojen perusteella aivolisäkkeen trooppisten hormonien eritystä. Säätely perustuu hypotalamuksen erittämiin vapauttaja-aineisiin. Joidenkin sisäeritysrauhasten eritystä voidaan säädellä suoraan sympaattisten hermojen avulla (esim. lisämunuaisen adrenaliinin eritystä). Neuroendokriinisen järjestelmän solut eivät ole ainoita, jotka erittävät välittäjäaineita. Monet solut erittävät ympäristöönsä välittäjäaineita säädelläkseen omaa tai naapurisolujen aineenvaihduntaa. (Nelson & Cox 2000, 884-896.)



## 2.2 Säätelymekanismit

Välittäjäaineet vaikuttavat soluihin reseptoreiden välityksellä, joihin ne sitoutuvat spesifisesti. Reseptorit voivat sijaita solukalvon pinnalla tai sisällä, sytosolissa sekä tumassa. Proteiini-, peptidi- ja katekoliamiinihormonien reseptorit ovat solukalvolla, steroidihormonien sytosolissa ja kilpirauhashormonien tumassa. Jokaisella solutyypillä on oma hormonireseptorien yhdistelmänsä, joka määrää solun vasteen herkkyyden eri hormoneille. Saman reseptorikoostumuksen omaavilla soluilla ei kuitenkaan välttämättä ole samanlaista vastetta, koska signaalireitit, joihin reseptorit vaikuttavat, voivat olla erilaisia. Signaalireitillä tarkoitetaan niiden molekyylien muodostamaa verkostoa, joiden kautta välittäjäaine aiheuttaa solun vasteet. Tärkeitä signaalireittejä ovat esimerkiksi insuliinin, AMPK:n, MAPK:n sekä G-proteiinien signaalireitit. Näitä reittejä käytetään esimerkiksi solujen energiametabolian säätelyyn. Hormonin sitoutuminen reseptoriin aiheuttaa aluksi kalvopotentialin muutoksen, reseptorientsyymien aktivoitumisen tai toisiolähtien syntymisen. Kaikki kyseiset reaktiot voivat johtaa proteiinikinaasi-entsyymien aktivoitumiseen. Proteiinikinaasit kykenevät fosforyloimaan spesifisti muita kohdeproteiineja. Fosforylaatiossa proteiinin tyrosiini- tai seriiniaminohappoon liitetään fosfaattiryhmä. Fosforylointi yleensä aktivoi tai inhiboi kohdeproteiinin, joka voi olla esimerkiksi jonkun metaboliareitin entsyymi, fosfataasi (poistaa fosfaattiryhmiä eli defosforyloi proteiineja) tai seuraavan tason proteiinikinaasi, joka puolestaan fosforyloi uusia proteiineja. Fosforyloinnin lisäksi entsyymien aktiivisuutta voidaan säädellä allosteerisella mekanismilla. Siinä aktiivinen vaikuttajamolekyyli sitoutuu eikovalenttisesti entsyymiin, mikä aiheuttaa entsyymiaktiivisuuden muutoksen. Välittäjäainereseptorin vaikutuksen alaisista lukuisista entsyymeistä ja muista proteiineista muodostuva signaalikaskadi vahvistaa alkuperäistä signaalia voimakkaasti. Tämän takia reseptoriin vaikuttavan välittäjäaineen pitoisuus voi olla hyvinkin pieni, ja siitä huolimatta se voi aiheuttaa voimakkaita vasteita. Entsyymien säätelyn lisäksi, monet signaalireitit aktivoivat transkriptiotekijöitä, jotka säätelevät tumassa geenien transkriptiota eli mRNA:n synteesiä, mikä johtaa yleensä myös genejä vastaavien proteiinien synteesiin. Syntetisoitavat proteiinit voivat olla entsyymejä, rakenneproteiineja, reseptoreita tai vaikkapa toisten geenien transkriptiotekijöitä. Transkriptioon perustuvan säätelyn vaikutusten ilmeneminen vaatii selvästi enemmän aikaa kuin entsyymien aktiivisuuden säätely fosforyloinnilla tai allosteerisella mekanismilla. (Nelson & Cox 2000, 884-896.)

## 2.3 Geenien ilmenemisen säätely

Geenien ilmenemistä voidaan tutkia mRNA:n tasolla sekä proteiinitasolla. Geenin ilmene- miseen vaaditaan seuraavat vaiheet: geenin aktivointi, transkription aloitus, mRNA:n pro- sessoriointi, mRNA:n kuljetus tumasta sytosoliin sekä translaatio eli proteiinin synteesi. Gee- nien ilmenemistä voidaan säädellä kaikissa edellä mainituissa vaiheissa. Suurimman osan säätelystä ajatellaan kuitenkin tapahtuvan transkription aloitusvaiheessa. Säätelystä vastaa- vat tässä vaiheessa transkriptiotekijät, jotka säätelevät transkription aloitusta sitoutumalla juuri tiettyyn kohtaan DNA:ta. Sitoutumiskohtaa kutsutaan vaste-elementiksi, joka sijaitsee usein geenin promoottori- tai enhancer-alueella. RNA-polymeraasin suorittama transkriptio voi alkaa vasta, kun transkriptiotekijä on sitoutunut vaste-elementtiin. Transkriptiotekijöi- den sitoutumiskykyä säädellään yleensä fosforyloinnin avulla. Fosforylointia ohjataan sig- naalireittien kautta esimerkiksi hormoneilla. (Lewin 2000.)

Translaatiota voidaan kontrolloida spesifien proteiinien tai RNA-molekyylien avulla, jotka sitoutuvat mRNA:han siten, että ribosomit eivät kykene sitoutumaan translaation aloitus- kohtaan. mRNA:han sitoutuvat pienet RNA-molekyylit voivat myös muuttaa mRNA:n konformaation sellaiseksi, että translaatio keskeytyy. Konformaationmuutos voi altistaa mRNA:n myös endonukleaaseille, jotka pilkkovat RNA:ta. mRNA-molekyylien hajotusta voidaan säädellä estämällä destabiloivien elementtien toiminta. Destabiloiva elementti on mRNA:ssa oleva kohta, johon voi sitoutua proteiineja, jotka mahdollistavat molekyylin hajotuksen. Solujen proteiinit tuhotaan pääasiassa proteosomeissa. Proteosomit kykenevät pilkkomaan sellaisia proteiineja, joissa on kiinni ubikitiini. Soluissa merkitään sellaiset proteiinit spesifisti ubikitiinilla, jotka on tarkoitus hajottaa. Proteosomi-ubikitiini- järjestelmän säätelyä ei vielä tarkkaan tunneta. Geenin ilmenemistä voidaan siis säädellä myös kontrolloimalla sekä mRNA:n että proteiinin hajotusta. (Lewin 2000.)

## 3 ENERGIAMETABOLIA

### 3.1 Energiantuottoreitit

Ihmisten ja eläinten solut saavat tarvitsemansa energian hajottamalla ravintoaineita. Solut eivät kykene käyttämään ravinnon sisältämää energiaa suoraan hyväkseen, vaan se pitää ensin sitoa korkeaenergisiiin yhdisteisiin. Tärkein solujen käyttämä korkeaenerginen yhdiste on ATP. Se osallistuu yleensä kovalenttisesti niihin biokemiallisiin reaktioihin, joihin sen sisältämää energiaa käytetään. Reaktioiden aikana ATP hajoaa ADP:ksi ja fosfaatti-ioniksi vapauttaen samalla energiaa, joka mahdollistaa reaktioiden etenemisen tarkoitettuun suuntaan. (Nelson & Cox 2000, 499.)

*ATP:n tuotto rasvahapoista ja glukoosista.* Nisäkkäiden elimistö pystyy valmistamaan ATP:a käyttäen energianlähteenä glukoosia, rasvahappoja tai aminohappoja. ATP:n tuotto rasvahapoista alkaa mitokondrioissa tapahtuvassa  $\beta$ -oksidatiossa, jossa rasvahapot hajotetaan asetyyliryhmiksi, jotka liitetään koentsyymi-A:han. Asetyylikoentsyymi-A hapetetaan sitruunahappokierrossa, joka on yhdeksän entsyymien katalysoima reaktioketju. Sitruunahappokierrossa vapautuu vetyioneja ja elektroneja, jotka yhdistetään mitokondrion sisäkalvolla tapahtuvassa oksidatiivisessa fosforylaatiossa happeen. Reaktiossa vapautuu runsaasti energiaa, jonka avulla ADP:a muutetaan ATP:ksi. Glukoosista voidaan tuottaa ATP:a käyttäen aerobista (vaatii happea) tai anaerobista (ei tarvitse happea) reittiä. Molemmat reitit alkavat sytosolissa tapahtuvalla glykolyysillä, jossa glukoosi pilkotaan 10 entsyymien avulla kahdeksi pyruvaatiksi. Reaktioissa vapautuu myös vetyioneja ja elektroneja sekä syntyy ATP:a. Tämän jälkeen aerobinen ja anaerobinen reitti eroavat toisistaan. Aerobisessa reitissä glykolyysin lopputuotteena saadut pyruvaatti-molekyylit kuljetetaan mitokondrioihin, joissa ne muutetaan asetyylikoentsyymi-A-molekyyleiksi, jotka liitetään sitruunahappokiertoon. Glykolyysissä ja sitruunahappokierrossa vapautuvat vetyionit ja elektronit liitetään oksidatiivisessa fosforylaatiossa happeen, jolloin saadaan runsaasti ATP:a. Anaerobinen glykolyysi ei tarvitse toimiakseen happea, koska glykolyysissä syntyneet elektronit ja vetyionit eivät mene oksidatiiviseen fosforylaatioon, vaan ne liitetään sytosolissa pyruvaattiin. Reaktiossa syntyy maitohappoa. ATP:n tuoton nopeus on anaerobisessa glykolyysissä suurempi kuin aerobisissa reaktioissa, mutta syntyvän ATP:n määrä on paljon pienempi. (Nelson & Cox 2000, 527-690.)

*ATP:n tuotto aminohapoista.* Elimistö käyttää energian tuottoon hyvin vähän aminohappoja verrattuna glukoosin ja rasvahappojen käyttöön. Paaston tai huonosti hoidetun diabeteksen aikana aminohappojenkäyttö voi kuitenkin lisääntyä runsaasti. Tällöin hajotetaan paljon esimerkiksi raajalihasten proteiineja, joista vapautuvat aminohapot voidaan kuljettaa veren mukana maksaan. Maksassa aminohappojen hiilirungoista tuotetaan energiaa tai valmistetaan glukoosia (glukoneogeneesi), jota voidaan vapauttaa vereen ja kuljettaa näin myös muiden elinten kuten lihasten energianlähteeksi. Haaraketjuisia aminohappoja voidaan käyttää suoraan lihas-, munuais-, aivo- ja rasvakudoksen energiantuottoon. (Nelson & Cox 2000, 604-655.)

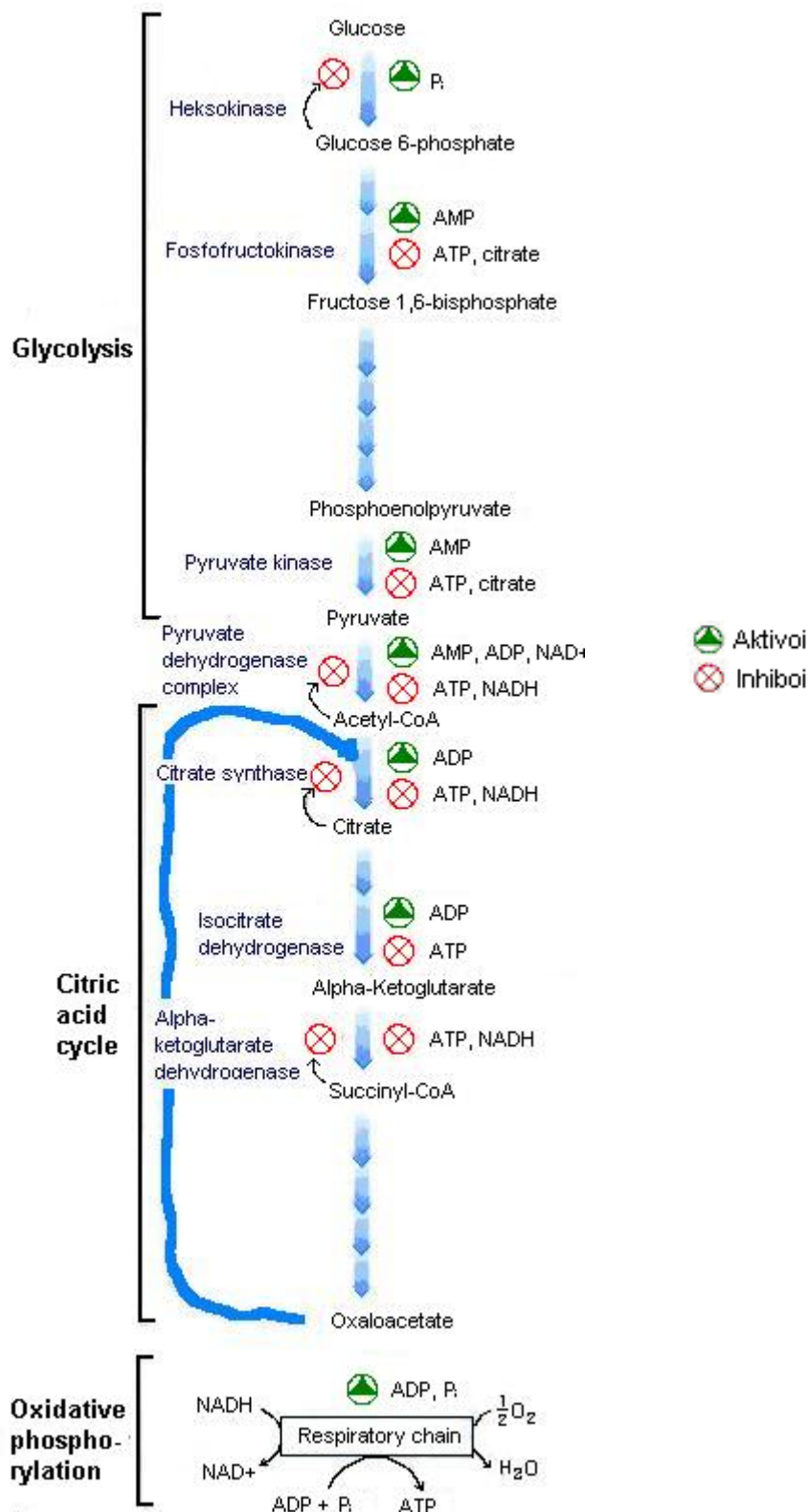
*ATP:n tuotto kreatiinifosfaatin avulla.* Edellä kuvattujen energiantuottoreittien lisäksi ATP:a voidaan valmistaa kreatiinifosfaatin avulla. Kreatiinifosfaatissa on korkeaenerginen sidos, jonka hajotuksessa vapautuvaa energiaa voidaan käyttää suoraan ATP:n uudelleen syntetisointiin. Reaktiota katalysoi kreatiinikinaasi-entsyymi. (Nelson & Cox 2000, 874-875.)

### **3.2 Energiantuottoreittien säätely**

Käytettävien ravintoaineiden suhteet voivat olla hyvin erilaisia eri kudoksissa. Aivot ja silmän verkkokalvo käyttävät energianlähteenään ainoastaan glukoosia, kun taas sydänlihas käyttää pääasiassa rasvahappoja. Suurin osa kudoksista kykenee kuitenkin käyttämään sekä glukoosia, että rasvahappoja. (Guyton & Hall 2001.) Tällaisten kudosten ravintoaineiden käyttö voi vaihdella olosuhteiden mukaan. Raajalihasten ravintoaineiden käyttöön voivat vaikuttaa esimerkiksi hormonit (insuliini), lihaksen glykogeenivarastot, veren glukoosi ja rasvahappopitoisuus sekä lihaksen aktiivisuus. (Spriet & Watt 2003.)

*Säätelymekanismit.* Ravintoaineiden käytön säätely tapahtuu lopullisesti eri energiantuottoreittien aktiivisuutta säätelemällä. Energiantuottoreittien säätely perustuu pääasiassa allosteriseen säätelyyn, jossa reittien välituotteet, lopputuotteet tai spesifit efektorimolekyylit vaikuttavat reittien entsyymien aktiivisuuteen. Joidenkin energiantuottoreittien entsyymien aktiivisuutta voidaan säädellä myös fosforyloimalla. Fosforyloinnista vastaa spesifit proteiinikinaasit, joiden aktiivisuutta säädellään allosterisesti tai signaalireittien avulla. Säätelyn kohteena olevat entsyymit ovat yleensä reitin nopeutta rajoittavia entsyymejä. Jos reitti

on kaksisuuntainen kuten esimerkiksi glykolyysi-glukoneogeneesi-reitti, siinä on yleensä vähintään yksi entsyymi, joka toimii vain toiseen suuntaan. Varsinkin tällaiset entsyymit ovat usein allosteerisen säätelyn alaisia. Näin voidaan säädellä kumpaan suuntaan etenevää reittiä halutaan käyttää. (Nelson & Cox 2000,551-557.)



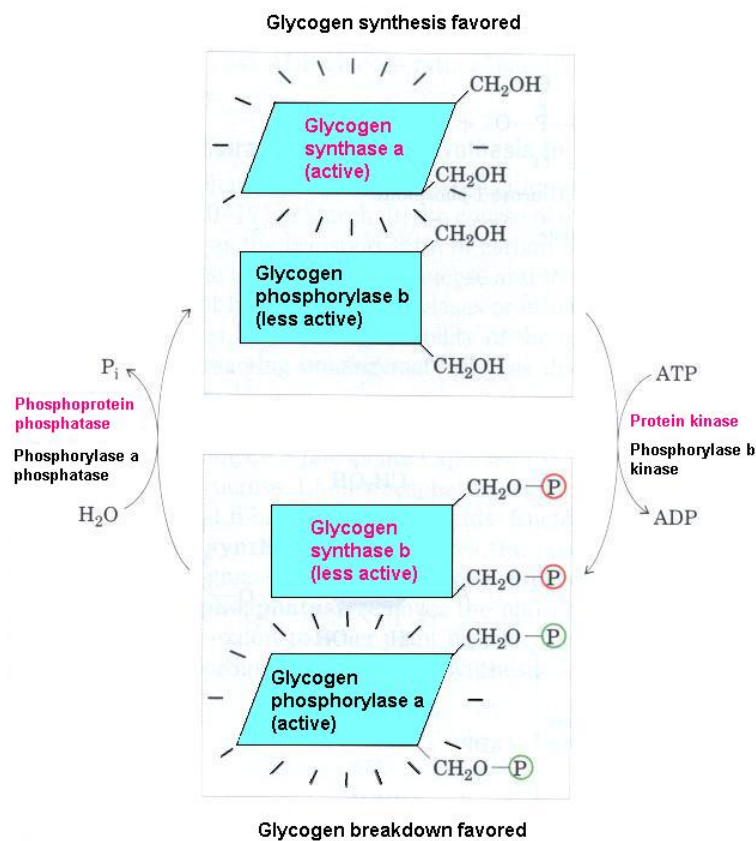
KUVIO 1. Yleiskuva energiantuottoreittien allosteerisesta säätelystä (Nelson & Cox 2000, 688)

*ATP, ADP, AMP ja NADH allosteerisina säätelijöinä.* Kuviossa 1 näkyy, että etenkin ATP ja sen hajoamistuotteet ADP ja AMP säätelevät useita energiantuottoreittien entsyymejä. ATP inhiboi allosteerisesti yleensä sellaisia entsyymejä, jotka mahdollistavat reaktioiden etenemisen kataboliseen eli ravintoaineita hajottavaan suuntaan. Eli jos ATP:a on jo tarpeeksi, sitä ei tuoteta enää lisää. Energian tarpeen ollessa suuri AMP:n ja ADP:n määrä kasvaa. AMP tai ADP aktivoivat yleensä samoja entsyymejä, joita ATP inhiboi, minkä takia reaktiot etenevät ATP:a tuottavaan suuntaan.  $\text{NAD}^+$  on molekyyli, joka muuttuu NADH:ksi sitoessaan vetyionin ja kaksi elektronia. NADH:a syntyy runsaasti sekä glykolyysissä että sitruunahappokierrossa. Solun energiatilanteen ollessa hyvä, NADH:a on runsaasti. NADH inhiboi tällöin ATP:n tavoin useita entsyymejä, jotka katalysoivat kataboliseen suuntaan meneviä reaktioita. NADH:n kumuloituminen voi vaikuttaa entsyymien aktiivisuuteen myös massavaikutuksella. NADH inhiboi näin esimerkiksi isositraatin ja  $\alpha$ -ketoglutarateidehydrogenaasin katalysoimia reaktioita. Nämä sitruunahappokierron entsyymit katalysoivat reaktioita, joissa vapautuu NADH:a. Jos NADH:a on jo ennestään paljon, reaktio ei etene enää NADH:a tuottavaan suuntaan, koska spontaanit kemialliset reaktiot etenevät aina kohti tasapainoa, joka tässä tapauksessa on toisella puolella suuren NADH-pitoisuuden takia. (Nelson & Cox 2000.)

*Glykolyysi- ja glukoneogeenireitin allosteerinen säätely.* Solun asetyylikoentsyymi-A -pitoisuus on tärkeä tekijä säädeltäessä kumpaan suuntaan glykolyysin ja glukoneogeenin osittain yhteistä reittiä edetään. Se aktivoi pyruvaattikarboksylaasia ja inhiboi pyruvaattidehydrogenaasia. Pyruvaattidehydrogenaasi on entsyymikompleksi, joka katalysoi pyruvaatin muuttamista asetyylikoentsyymi-A:ksi. Pyruvaattikarboksylaasi taas on entsyymi, jonka avulla pyruvaattia muutetaan oksaloasetaatiksi. Oksaloasetatti voidaan muuttaa tämän jälkeen fosfoenolipyruvaattikarboksikinaasin katalysoimassa reaktiossa fosfoenolipyruvaatiksi, joka on yksi glykolyysin ja glukoneogeenin reitin välituotteista. Näin voidaan ohittaa pyruvaattikinaasin katalysoima reaktio, joka etenee vain glykolyysin suuntaan. (Nelson & Cox 2000, 723-729.)

Käytettävissä olevan ADP:n määrä säätelee oksidatiivisen fosforylaation nopeutta. Energiatilanteen ollessa hyvä ADP:n pitoisuus on pieni ja ATP:a on runsaasti. Tällöin oksidatiivinen fosforylaatio on vähäistä, mikä nostaa NADH:n pitoisuutta, koska sitä tuotetaan edelleen sitruunahappokierrossa, mutta ei hapeteta oksidatiivisessa fosforylaatiossa. NADH-pitoisuuden nousu inhiboi sitruunahappokiertoa, mikä vähentää asetyylikoentsyymi-A:n hapetusta. Asetyylikoentsyymi-A:n pitoisuus nousee, mikä aktivoi pyruvaattikar-

boksylaasia ja inhiboi pyruvaattidehydrogenaasia. Tämä johtaa glukoneogeenisireitin eli glykolyysille vastakkaisen reitin käyttöön, jossa tuotetaan glukoosia. Glukoosista voidaan edelleen valmistaa maksassa ja lihaksissa glykokeenia, joka on glukoosin varastomuoto. Glykolyysi- ja glukoneogeenisireitin käyttöä säädellään ainakin maksassa myös fruktoosi-2,6-bisfosfaatin avulla. Fruktoosi-2,6-bisfosfaatti aktivoi fosfofruktokinaasi-1:stä ja inhiboi fruktoosi-1,6-bisfosfataasia. Fosfofruktokinaasi-1 katalysoi yhtä glykolyysin reaktioista, joka etenee vain kataboliseen suuntaan. Fruktoosi-1,6-bisfosfataasi katalysoi edellä mainitun reaktion etenemistä vastakkaiseen suuntaan. Fruktoosi-2,6-bisfosfaatti edesauttaa siis glukoosin hajotusta glykolyysissä. Fruktoosi-2,6-bisfosfaatin pitoisuutta säädellään fosfofruktokinaasi-2:n (tuotto) ja fruktoosi-2,6-bisfosfataasin (hajotus) avulla. Kyseiset entsyymit kuuluvat samaan kaksitoimiseen proteiiniin, jonka toimintaa säädellään maksassa glukagoni-hormonin avulla. Glukagoni lisää fruktoosi-2,6-bisfosfataasin aktiivisuutta ja laskee fosfofruktokinaasi-2:n aktiivisuutta. Glukagoni siis lisää glukoneogeeniä ja näin glukoosin tuottoa. (Nelson & Cox 2000, 723-729.)



KUVIO 2. Glykogenolyysin ja glykokeenisynteesin säätely (Nelson & Cox 2000, 739)

*Glykogenolyysin ja glykokeenisynteesin allosteerinen säätely.* Glykokeenisynteesiä ja glykokeenin hajotusta säätelevien entsyymien aktivointia ja inhibointia havainnollistetaan kuviossa 2. Glykokeenin hajotusta katalysoi lihassoluissa glykokeenifosforylaasi, joka

esiintyy aktiivisessa a-muodossa ja passiivisessa b-muodossa. Aktiivinen muoto on fosforyloitu ja passiivinen ei. Entsyymien aktiivisuutta säätelee fosforylaasi-b-kinaasi ja fosforylaasi-a-fosfataasi. Fosforylaasi-b-kinaasi muuttaa b-muodon fosforyloimalla a:ksi, kun taas fosforylaasi-a-fosfataasi muuttaa a-muodon b:ksi. Adrenaliini-hormonin signalointireitti ja kalsium-ionien pitoisuuden nousu kykenevät molemmat erikseen aktivoimaan lihassolujen fosforylaasi-b-kinaasin, mikä lisää näin glykokeenin hajotusta glukoosiksi. Solujen AMP-pitoisuuden nousu aktivoi allosteerisesti fosforylaasin ja lisää näin tehokkaasti glykokeenin hajotusta. (Nelson & Cox 2000, 557.) Glykokeenin synteesiä katalysoi glykokeenisyntaasi, jolla on aktiivinen a-muoto ja passiivinen b-muoto. Aktiivinen muoto on fosforyloimaton ja passiivinen fosforyloitu. Glykokeenisyntaasin aktiivisuutta säädellään fosfoproteiinifosfataasin ja proteiinikinaasin avulla. (Nelson & Cox 2000, 735-739.)

*Rasvahappojen hapetuksen allosteerinen säätely.* Rasvahappojen hapetus tapahtuu solujen mitokondrioissa. Rasvahappojen kuljetus mitokondrioihin on tärkeä vaihe hapetuksen säätelyssä, koska mitokondrioihin päästessä rasvahapot hapetetaan heti  $\beta$ -oksidatiiossa asetyylikoentsyymi-A:ksi. (Nelson & Cox 2000, 612.) Malonyylikoentsyymi-A (coA) säätelee rasvahappojen hapetusta inhiboimalla karnitiinipalmiitintransferaasi-1:stä, joka säätelee rasvahappojen kuljetusta sytosolista mitokondrioihin. Malonyylikoentsyymi-A on rasvahapposynteesissä syntyvä välituote. Solun malonyylikoentsyymi-A:n konsentraatiota voidaan säädellä asetyylikoentsyymi-A-karboksylaasin (ACC) ja malonyylikoentsyymi-A-dekarboksylaasin (MCD) avulla. ACC on coA:n synteesiin osallistuva entsyymi, joka rajoittaa reaktion nopeutta. MCD osallistuu coA:n hajoitukseen. (Ruderman ym. 2003.) Jos solussa on hyvä energiatilanne, NADH:n ja asetyylikoentsyymi-A:n pitoisuus nousee, koska sitruunahappokierto ja oksidatiivinen fosforylaatio ovat tällöin hitaita. Nousevat NADH-pitoisuus inhiboi  $\beta$ -hydroksiasetyylikoentsyymi-A-dehydrogenaasia ja nousut asetyylikoentsyymi-A -pitoisuus tiolaasia. Kyseiset entsyymit ovat  $\beta$ -oksidation entsyymejä, joten hyvässä energiatilanteessa rasvahappojen hapetus estyy. (Nelson & Cox 2000, 612.)

*Energiatilanteen havainnointi AMPK-kaskadin avulla.* Normaalisti toimivissa soluissa ADP:n ja ATP:n suhde ( $ADP:ATP = 10:1$ ) pysyy lähes muuttumattomana, vaikka energian kulutuksessa tapahtuisi suuriakin muutoksia. Tämä johtuu tehokkaasta energiantuottoreittien säätelystä. Energian tuottoreittejä säädellään allosteeristen mekanismien lisäksi myös AMPK-kaskadin avulla. AMPK eli AMP-activated protein kinase on entsyymi, joka säätelee fosforyloimalla useita energiantuottoreittien entsyymejä. AMPK:n aktiivisuus on riippuvainen solussa vallitsevasta energiatilanteesta AMP:n ja ATP:n välisen suhteen kautta.



Energiankulutuksen lisääntyessä AMP:n määrä lisääntyy, koska ATP:a tuotetaan tällöin myös adenylaattikinaasin katalysoimassa reaktiossa:  $ADP + ADP = ATP + AMP$ . Korkea AMP:n pitoisuus aktivoi AMPK:n stabiloimalla sen aktiivista konformaatiota. ATP stabiloi AMPK:n inaktiivista konformaatiota. AMP aktivoi myös AMPKK:n, joka fosforyloi AMPK:n, mikä nostaa AMPK:n aktiivisuuden 50-100-kertaiseksi. AMP sopii erittäin hyvin energiatilanteen muutosten havainnointiin, koska sen ja ATP:n suhde muuttuu paljon herkemmin kuin ADP:n ja ATP:n suhde. ADP:n ja ATP:n suhteen muuttuessa viisinkertaiseksi, AMP:n ja ATP:n suhde muuttuu kaksikymmentäviisikertaiseksi. (Hardie & Hawley 2001.)

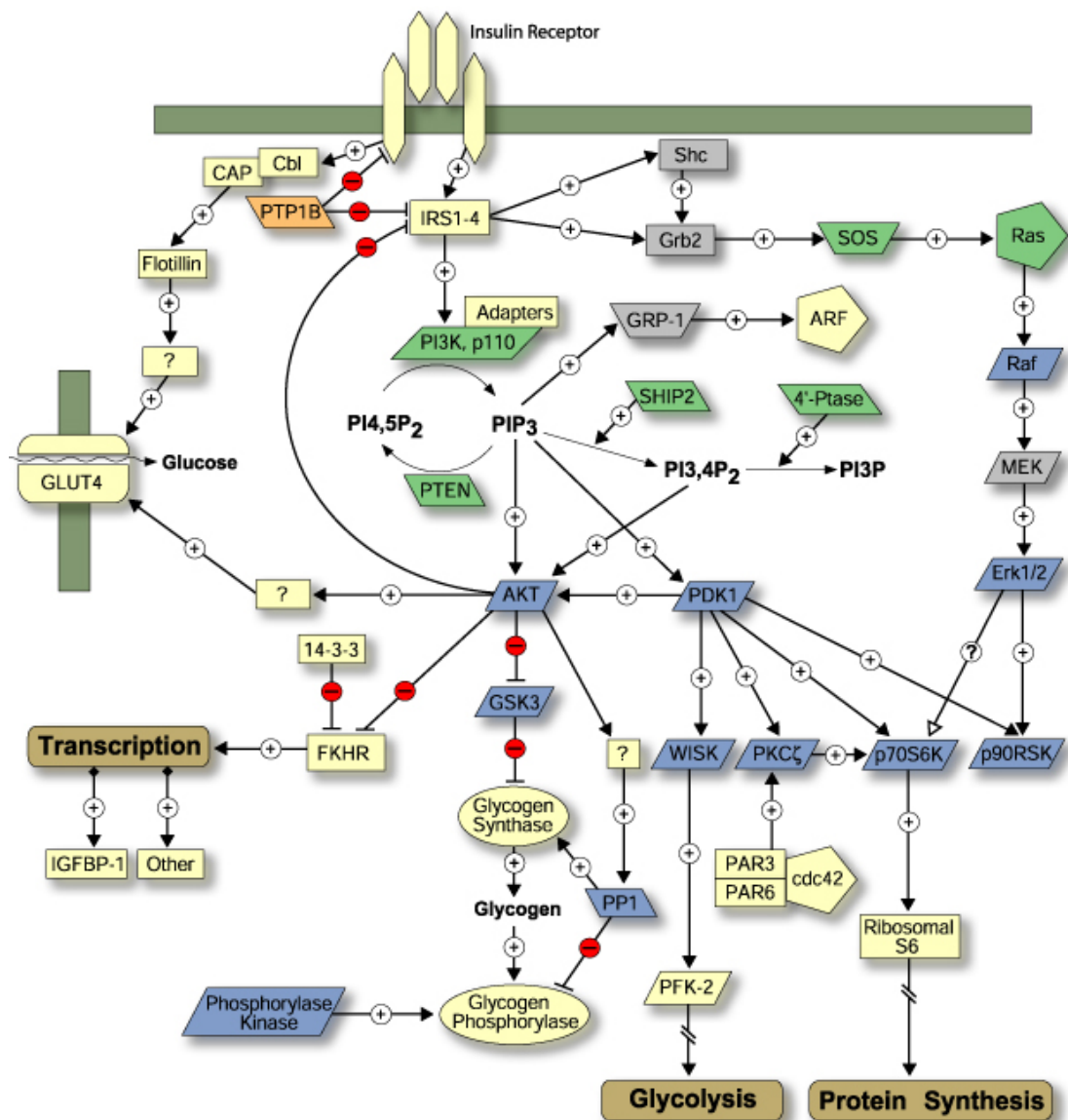
*Energiatasapainon säätely AMPK-kaskadin avulla.* AMPK-kaskadi säätelee anabolisten ja katabolisten reaktioiden tasapainoa. Aktiivinen AMPK inhiboi akuutisti rasvahappojen, triglyseridien ja sterolien synteesiä. Se kykenee pidemmällä aikavälillä myös vähentämään rasvahapposynteesin ja glukoneogeenin entsyymien geenien ilmenemistä. Aktiivinen AMPK edistää akuutisti kataboliaa muun muassa lisäämällä solun glukoosinottoa, glykolyysiä ja rasvahappojen hapetusta. Glukoosinoton lisääntyminen perustuu siihen, että AMPK lisää signaalireittinsä kautta glukoosinkuljitusproteiini-GLUT4:n siirtymistä solukalvolle. Glykolyysiä AMPK lisää aktivoimalla fosfofruktokinaasi-2:sta. Rasvahappojen hapetusta AMPK lisää inhiboimalla asetyylikoentsyymi-A-karboksylaasin. AMPK edistää lihassolujen katabolisia reaktioita myös kasvattamalla lihassoluissa GLUT4:n, heksokinaasin, sitruunahappokierron entsyymien ja hengitysketjun entsyymien geenien ilmenemistä. (Hardie & Hawley 2001.)

### **3.3 Insuliinisignalointi ja ravintoainemetabolian säätely**

#### **3.3.1 Insuliinisignalointi**

Insuliini-hormoni on ravintoainemetabolian tärkein säätelijä. Insuliinia erittyy haiman Langerhansin saarakkeiden  $\beta$ -soluista. Se vaikuttaa kohdesoluihinsa insuliinireseptorin kautta. Insuliinireseptori on solukalvolla oleva proteiini, joka koostuu kahdesta solukalvon ulkopuolella olevasta  $\alpha$ -alaysiköstä ja kahdesta solukalvon läpi ulottuvasta  $\beta$ -alaysiköstä. Alaysiköt toimivat allosteerisina entsyymeinä. Insuliini sitoutuu  $\alpha$ -alaysiköihin aiheuttaen konformaatiomuutoksen, joka aktivoi  $\beta$ -alaysiköiden tyrosiini-

kinaasin. Tämä johtaa autofosforylaatioon, jossa tyrosiinikinaasi fosforyloi useita  $\beta$ -alaysiköihin kuuluvia tyrosiinitähteitä. Autofosforyloituminen aktivoi  $\beta$ -alaysiköiden katalyyttisen osan, joka kykenee fosforyloimaan useita solun proteiineja, joita ovat esimerkiksi insuliinireseptorisubstraatit (IRS-1,-2,-3 ja -4), Cbl, Gab-1 ja Shc:n eri muodot. Fosforyloinnin jälkeen nämä proteiinit vaikuttavat muihin signaalimolekyyleihin SH2-osansa välityksellä. Toisiinsa vaikuttavat proteiinit muodostavat signaalireittejä, jotka vaikuttavat vesikkelien kuljetukseen, proteiinien synteesiin, entsyymien aktivointiin ja inaktivointiin sekä glukoosi-, lipidi- ja proteiinimetaboliaan vaikuttavien geenien ilmenemiseen. Insuliinin signaalireitit näkyvät kuviossa 3. (Saltiel & Kahn 2001.)



KUVIO 3. Insuliinin signaalireitit

([www.signaling-gateway.org/molecule/maps/insulin.html](http://www.signaling-gateway.org/molecule/maps/insulin.html))

### 3.3.2 Insuliinin vaikutukset glukoosimetaboliaan

Veren glukoosipitoisuuden säätely on erittäin tärkeää. Liian suuri veren glukoosipitoisuus aiheuttaa kudovaurioita, elimistön ja solujen dehydraatiota sekä elektrolyyttitasapainon häiriöitä. Liian pieni glukoosipitoisuus voi vaurioittaa aivoja, verkkokalvoa sekä sukupuolirauhasia, koska ne kaikki käyttävät energiansa tuottamiseen pääasiassa vain glukoosia. (Guyton & Hall 2001, 893-894.) Insuliini on veren glukoosipitoisuuden tärkein säätelijä. Toisaalta veren glukoosipitoisuus säätelee insuliinin eritystä. Ruokailun jälkeen veren glukoosipitoisuus nousee, mikä lisää insuliinin eritystä. Veren insuliinipitoisuuden kasvaminen laskee veren glukoosipitoisuutta, koska insuliini lisää rasva- ja lihaskudosten glukoosinottoa sekä vähentää glukoosin vapautumista maksasta. Rasva- ja lihassolujen glukoosinotto kasvaa, koska insuliini lisää glukoosinkuljetusproteiinien (GLUT4) siirtymistä solukalvoille. Lihasten glukoosinotto lisääntyy myös sen takia, että insuliini lisää lihaksissa glykogeenisynteesiä sekä glukoosin hapetusta. (Flakoll ym. 2000, 148-151.) Insuliini vähentää glukoosin vapautumista maksasta, koska se lisää maksassa glykogeenisynteesiä ja estää glykogenolyysiä sekä glukoneogeneesiä. Maksan glykogeenisynteesi kasvaa, koska insuliini lisää signalointireittiensä kautta glykogeenisyntaasin aktiivisuutta. Glukoneogeneesin väheneminen perustuu insuliinin suoraan ja epäsuoraan vaikutukseen. Suorassa vaikutuksessa insuliini vähentää glukoneogeneesiin vaadittavien entsyymien aktiivisuutta vähentämällä kyseisten geenien ilmenemistä. Epäsuorassa vaikutuksessa insuliini vähentää veren rasvapitoisuutta ja aminohappopitoisuutta. Aminohappoja ja rasvoista saatavaa glyserolia käytetään glukoneogeneesin lähtöaineina. (Saltiel & Kahn 2001.)

Veren glukoosipitoisuuden laskiessa esimerkiksi paaston aikana, haiman insuliinin erityks laskee, mikä vähentää glukoosinottoa insuliinisensitiivisiin kudoksiin. Insuliini inhiboi glukagoni-hormonin eritystä haiman langerhansin saarekkeiden  $\alpha$ -soluista. Kun insuliinin erityks alhaisen glukoosipitoisuuden aikana laskee, glukagonin erityksen inhibitio vähenee, mikä lisää glukagonin eritystä. Veren glukoosipitoisuus on tärkein glukagonin eritystä säätelevä tekijä. Kun veren glukoosipitoisuus laskee glukagonin erityks lisääntyy. Kun glukoosipitoisuus nousee, glukagonin erityks vähenee. Glukagoni lisää maksasolujen glykogenolyysiä ja glukoneogeneesiä, mikä lisää maksasta vereen vapautuvan glukoosin määrää. Glukagonin vaikutus ilmenee ja poistuu nopeasti. (Jiang & Zhang 2003.)

### 3.3.3 Insuliinin vaikutukset rasvahappometaboliaan

Verenkierrossa tulee jatkuvasti olla sopiva määrä rasvahappoja elimistön eri kudosten tarpeisiin. Rasvahappoja käytetään mm. energian tuottoon, energian varastointiin ja fosfolipidien synteesiin. Fosfolipidit ovat välttämätön osa solujen kalvorakenteita. (Nelson & Cox 2000, 363.) Elimistö saa rasvahappoja ravinnosta sekä syntetisoimalla niitä itse maksassa. Raajalihakset, sydänlihas sekä maksa ovat tärkeimpiä kudoksia, jotka käyttävät rasvahappoja energian tuottoon. Insuliini on veren rasvahappopitoisuuden tärkein säätelijä. Se lisää rasvahappojen synteesiä maksassa, edesauttaa rasvahappojen varastoitumista rasvasoluihin sekä vähentää rasvahappojen hapetusta lihassoluissa. (Guyton & Hall 2001, 887-891.) Maksan rasvahapposynteesi lisääntyy, koska insuliini lisää rasvahapposynteesin entsyymien aktiivisuutta ja geenien ilmenemistä. (Saltiel & Kahn 2001.) Insuliini lisää veren rasvahappojen varastoitumista rasvaan aktivoimalla verisuonten lipoproteiinilipaasi -entsyymien, joka vapauttaa rasvahapot triglyserideistä. Tämä mahdollistaa rasvahappojen oton rasvasoluihin. Rasvahappojen varastoituminen rasvasoluihin paranee myös sen takia, että insuliini lisää rasvasolujen glukoosinottoa. Rasvahapot varastoidaan rasvasoluihin triglyserideinä, joiden glyseroliosan valmistukseen tarvitaan glukoosia. (Guyton & Hall 2001, 887-891.) Insuliini estää rasvahappojen vapautumista rasvasoluista vereen inhiboimalla hormonisensitiivistä lipaasi-entsyymiä sekä parantamalla triglyserideistä vapautuvien rasvahappojen uudelleenesteröintiä (triglyseridin muodostus). Rasvahappojen hapetuksen väheneminen kudoksissa insuliinin vaikutuksesta johtuu todennäköisesti siitä, että insuliini laskee veren rasvahappopitoisuutta. (Flakoll ym. 2000, 151-154.)

Energiametaboliaan vaikuttavat insuliinin lisäksi myös monet muut hormonit. Kasvuhormoni ja kortisoli estävät solujen glukoosin käyttöä ja lisäävät rasvojen käyttöä. Vaikutuksen täydellinen kehittyminen on hidasta ja voikin kestää useita tunteja. Lisääntynyt adrenaliinin erityys lisää kudosten rasvojen käyttöä esimerkiksi sellaisissa stressitilanteissa, kuten liikunta ja ahdistuneisuus. Adrenaliinin vaikutus perustuu sen kykyyn aktivoida rasvasolujen hormonisensitiivinen lipaasi, joka aiheuttaa rasvahappojen vapautumista vereen. (Guyton & Hall 2001, 887-891.)

### 3.3.4 Insuliinin vaikutukset aminohappometaboliaan

Proteiinit ovat elimistön yleisimpiä makromolekyylejä. Ne muodostuvat ketjuista, joissa aminohapot ovat peptidisidoksilla kiinni toisissaan. Erilaisia aminohappoja on proteiineissa 20. Näistä aminohapoista 10 ovat sellaisia, joita on pakko saada ravinnosta, koska elimistö ei kykene itse syntetisoimaan niitä riittävästi. Proteiinin aminohapposekvenssi määrää sen, minkälainen proteiinista tulee toiminnaltaan. Käytettävissä olevista eri aminohapoista voidaan muodostaa lukematon määrä erilaisia proteiineja. Proteiineja ovat esimerkiksi entsyymit, monet hormonit, vasta-aineet, kuljetusproteiinit sekä rakenneproteiinit. (Nelson & Cox 2000, 115.)

Veren aminohappopitoisuutta pitää säädellä, jotta veressä on aina sopivasti kaikkia aminohappoja eri kudosten tarpeisiin. Aminohappojen määrä veressä ei saa nousta liian korkeaksi, koska tällöin veren osmoottinen paine nousee, mikä häiritsee veren ja kudosten välistä nesteiden vaihtoa. Munuaisten aktiiviset aminohappojensiirtoproteiinit estävät normaalisti aminohappojen erittymisen virtsaan. Kun aminohappojen pitoisuus nousee tarpeeksi suureksi, munuaisten aminohappojensiirtokapasiteetti ylittyy, minkä takia aminohappoja erittyy virtsaan. Munuaisten toiminta estää siis veren aminohappopitoisuuden nousun liian korkeaksi. Veren aminohappopitoisuus ei normaalisti nouse korkeaksi edes ruokailun jälkeen, koska ruuansulatuselimistö pilkkoo proteiineja melko hitaasti, ja verenkiertoon päässeet aminohapot otetaan nopeasti solujen käyttöön. Soluissa aminohapoista syntetisoidaan nopeasti proteiineja. Vapaita aminohappoja soluissa on hyvin vähän. Osa solujen proteiineista voidaan hajottaa nopeasti aminohapoiksi. Maksassa, suolen limakalvoissa ja munuaisissa on soluja, joissa on runsaasti tällaisia nopeasti hajotettavissa olevia proteiineja. Elimistön aminohappometaboliassa vallitsee normaalisti seuraavanlainen tasapaino; Kun joku solu jossakin osassa elimistöä tarvitsee aminohappoja proteiinisynteesiin, se ottaa niitä verenkierrosta. Verestä poistuneet aminohapot korvataan hajottamalla toisten solujen (esim. maksasolujen) proteiineja. Soluilla on rajallinen kyky varastoida aminohappoja proteiineina. Kun elimistön solujen aminohappotarve on tyydytetty, veren ylimääräiset aminohapot muutetaan toisiksi aineiksi tai hapetetaan energiaksi. Aminohapoista voidaan valmistaa maksassa esimerkiksi glukoosia, glykogeeniä ja rasvahappoja. (Guyton & Hall 2001, 791-793.)

Monien hormonien on havaittu säätelevän kudospoteiinien ja verenkierron aminohappojen välistä tasapainoa. Insuliini vähentää raajalihaksen, sydänlihaksen sekä maksan proteo-

lyysiä eli proteiinien hajotusta. Insuliinin on havaittu stabiloivan lihassoluissa lysosomien kalvorakenteita, mikä saattaa vähentää solurakenteiden lysosomaalista hajotusta. Insuliinin puutoksen taas on havaittu lisäävän raajalihassoluissa lysosomien aktiivisuutta ja proteolyysiä. Maksasoluissa insuliini stabiloi lysosomien kalvorakenteita sekä laskee lysosomien määrää. Vähäinen insuliinipitoisuus ei lisää proteolyysiä sisäelimissä yhtä paljon kuin raajalihaksissa. Insuliini vähentää koko elimistössä tapahtuvaa proteolyysiä noin 40:llä prosentilla. Insuliini vaikuttaa myös proteiinisynteesiin. Insuliini lisää lihassoluissa ribosomien määrää sekä translaatiotehokkuutta. Insuliini estää lihassoluissa eIF-4E-translaationaloitusfaktorin inhibitiota, mikä saattaa olla yksi syy translaatiotehokkuuden paranemiseen. Insuliini lisää myös joidenkin aminohappojen ottoa maksasoluihin, lihassoluihin ja fibroblasteihin. Lihassoluissa insuliini lisää erityisesti haaraketjuisten aminohappojen ottoa. Lisääntynyt aminohappojenotto saattaa olla yksi proteolyysiä vähentävistä tekijöistä. Insuliini lisää kudosten aminohappojen ottoa, mutta vähentää samalla aminohappojen hapetusta. Tämän uskotaan johtuvan insuliinin proteolyysiä estävästä vaikutuksesta, mikä vähentää vereen vapautuvien aminohappojen määrää. (Flakoll ym. 2000, 154-159.)

Muita veren aminohappopitoisuuteen vaikuttavia hormoneja ovat kasvuhormoni, testosteroni, tyroksiini sekä kortisoli. Kasvuhormoni lisää proteiinisynteesiä parantamalla solujen aminohappojen kuljetusta, transkriptiota sekä translaatiota. Testosteroni lisää erityisesti lihasten proteiinisynteesiä. Vaikutuksen mekanismia ei tunneta. Tyroksiini nopeuttaa metaboliaa, minkä takia tyroksiini lisää proteiinisynteesiä, kun elimistössä on hyvä ravitsemustilanne. Jos ravitsemustilanne on huono, tyroksiini lisää proteolyysiä. Kortisoli lisää kaikkien kudosten, paitsi maksan, proteolyysiä. Tämä mahdollistaa sen, että maksa voi syntetisoida runsaasti omia proteiinejaan sekä plasmaproteiineja. (Guyton & Hall 2001, 791-793.)

## 4 DIABETES MELLITUS

*Määritelmät.* Diabetes mellitus on ryhmä sairauksia, joille on tyypillistä glukoositasapainon häiriintyminen. Hoitamaton diabetes nostaa veren glukoosipitoisuuden selvästi normaalia suuremmaksi. Insuliini-hormoni on keskeisin tekijä sairauden patofysiologiassa. Tyypin 1 diabetesta eli nuoruusiän diabetesta sairastavan haima ei eritä lainkaan insuliinia, koska sen  $\beta$ -solut ovat tuhoutuneet autoimmuunireaktioiden takia. Autoimmuunireaktioissa elimistön tuottamat immunosyytit ja vasta-aineet tuhoavat elimistön omia soluja. Tyypin 2 diabetes eli aikuisiän diabetes ei johdu insuliinin erityksen häiriöistä vaan lihas-, maksa- ja rasvasolujen insuliinisensitiivisyyden laskusta. Haiman  $\beta$ -solut pyrkivät kompensoimaan insuliinisensitiivisyyden laskua erittämällä normaalia enemmän insuliinia. Tämä ei kuitenkaan riitä ylläpitämään glukoositasapainoa. (Bell & Polonsky 2001.)

*Yleisyys ja syyt.* Diabetesta sairastavia ihmisiä oli maailmassa 150 miljoonaa vuonna 2000. Tyypin 2 diabetesta sairastaa näistä noin 90 %. Vuoteen 2010 mennessä diabeetikkojen määrän uskotaan nousevan 220:een miljoonaan ja vuoteen 2025 mennessä 300:aan miljoonaan. Lukumäärien suuri kasvu tulee johtumaan tyypin 2 diabeteksen nopeasta yleistymisestä. Tyypin 1 diabetes on lasten yleisin krooninen sairaus. Tyypin 2 diabeteksen odotetaan kuitenkin kasvavan lähitulevaisuudessa sitä yleisemmäksi. Näin on käynyt jo esimerkiksi Japanissa. (Zimmet ym. 2001.) Länsimaissa jo 5-10 prosenttia yli 40 vuotiaista ihmisistä sairastaa tyypin 2 diabetesta (Beck-Nielsen & Hother-Nielsen 2000). Tyypin 2 diabetesta aiheuttavat geneettiset ja ei-geneettiset tekijät yhdessä. Tiettyjä tautiin altistavia genejä ei vielä varmuudella tunneta, mutta ne liittyvät todennäköisesti haiman kehitykseen, insuliinin eritykseen, glukoosimetaboliaan sekä lihavuustaipumukseen. (Silver & Shuldiner 2000.) Ei-geneettisiin tekijöihin kuuluvat lisääntyvä ikä, ylipaino, keskivartalolihavuus, vähäinen liikunta ja alhainen syntymäpaino (Harris 2000). Tyypin 1 diabeteksen ilmaantuvuus alle 14-vuotiailla lapsilla on Suomessa maailman korkein. Ilmaantuvuus oli vuonna 1996 45 tapausta per 100000. (Tuomilehto ym. 2000.) Muualla Euroopassa ja Yhdysvalloissa ilmaantuvuus on 10-15 ja Aasiassa 0,5 tapausta vuodessa sataa tuhatta ihmistä kohti. (Harris 2000.) Sairauden puhkeamiseen voivat vaikuttaa geneettinen alttius sekä autoimmunteettiä laukaisevat ympäristön tekijät. Laukaiseviksi tekijöiksi on ehdotettu esim. virusinfektioita, maitotuotteita, aikaista siirtymistä äidinmaidosta lehmänmaitoon, ruuan nitraatteja ja nitriittejä sekä streptomyces tokssiineja. (Zimmet ym. 2001.)

*Tyypin 1 diabeteksen hoito.* Tyypin 1 diabeteksen kehittymistä voidaan ennustaa etsimällä tiettyjä merkkigeenejä, mittaamalla verestä  $\beta$ -solujen tuhoamiseen osallistuvien vasta-aineiden pitoisuuksia sekä suorittamalla glukoosinsietokoe (Park & Eisenbarth 2000). Sairauden puhkeamista ei vielä toistaiseksi pystytä estämään, mutta tulevaisuudessa se voi olla mahdollista esimerkiksi rokotteen avulla (Skyler 2000). Ihon alle annettavat insuliini-injektiot ja tarkka ruokailusuunnitelma ovat perushoidot tyypin 1 diabeteksessa. Hyvin suunniteltu ruokailu parantaa glukoositasapainoa. Glukoositasapainon kannalta on edullista käyttää hitaasti imeytyviä hiilihydraatteja, joita nautitaan pieninä annoksina pitkin päivää. Ruokailusuunnitelman laatimisessa käytetään apuna veren glukoosipitoisuuden mittauksia, joita tehdään useita kertoja päivässä. (Beebe 2000.) Glukoosipitoisuudenmittaukset ovat välttämättömiä myös silloin, kun pyritään löytämään sopiva insuliinihoito. Muuttujia ovat tällöin insuliinin tyyppi (lyhyt- vai pitkävaikutteinen), annos, injektioipaikka ja injektion ajankohta. Insuliinihoito on jatkuvasti sovitettava elämäntyyliin, ruokailuihin sekä fyysisen aktiivisuuden määrään. Fyysinen aktiivisuus lisää insuliiniherkkyyttä ja vähentää näin tarvittavan insuliinin määrää. (Brink 2000.) Liika insuliini aiheuttaa hypoglykemiaa. Jos hypoglykemia on vakava, aivot eivät saa enää tarpeeksi glukoosia, mikä voi johtaa koomaan. Liian vähäinen insuliini aiheuttaa hyperglykemiaa ja ketoasidoosia. Vakava ketoasidoosi voi johtaa hoitamattomana koomaan ja kuolemaan. (Guyton & Hall 2001, 894-897.)

*Tyypin 2 diabeteksen hoito.* Tyypin 2 diabeteksen kehittymisen seurantaan käytetään yleisesti glukoosinsietokoea. Insuliiniresistenssin havaitsemisen jälkeen tyypin 2 diabeteksen todennäköisyyttä voidaan arvioida siitä, kuinka hyvin insuliinin lisäeritys pystyy kompensoimaan resistenssiä. (Bennet 2000.) Tyypin 2 diabetesta voidaan ehkäistä puuttamalla riskitekijöihin. Tehokkaita ehkäisykeinoja ovat muun muassa sellaiset elämäntapamuutokset kuten painonpudotus, liikunnan lisääminen ja ruokarasvojen vähennys. Edellä mainittuja elämäntapamuutoksia voidaan käyttää myös sairauden hoidossa. Hoidossa voidaan käyttää myös  $\alpha$ -glukosidaasi inhibiittoreita, insuliiniherkisteitä, insuliinierityksen vahvistajia sekä insuliinia ja sen johdannaisia. (LeRoith ym. 2000, 746-803.)

*Diabeteksen vaikutus energiametaboliaan.* Tyypin 1 ja 2 diabetekselle on yhteistä se, että niissä molemmissa insuliinivälitteinen metaboliainsäätely on häiriintynyt. Hoitamattomassa diabeteksessa veren glukoosipitoisuus nousee hyvin korkeaksi (hyperglykemia), koska rasva- ja lihaskudosten glukoosin otto ja käyttö laskee ja glukoosin vapauttaminen maksasta lisääntyy. Insuliinisignaalin vajauksen takia rasvan varastoimista edistävät vaikutukset



katoavat, minkä takia vereen vapautuu runsaasti rasvahappoja ja glyserolia. Suurin syy tähän on hormonisensitiivisen lipaasin aktivoituminen. Veren korkea rasvahappopitoisuus ja glukoosinoton heikentyminen lisäävät kudosten rasvojen käyttöä. Puutteellinen glukoosinkäyttö ja lisääntynyt rasvojenkäyttö johtavat runsaaseen ketohappojen tuottoon. Kun ketohappojentuotto on nopeampaa kuin niiden hapetus kudoksissa, ketohappojen määrä nousee veressä niin korkeaksi, että veren pH laskee. Tätä tilaa kutsutaan ketoasidoosiksi. Veren korkea rasvahappopitoisuus lisää myös maksan fosfolipidi- ja kolesterolituotantoa. Nämä muodostavat yhdessä triglyseridien kanssa lipoproteiineja, jotka vapautuvat vereen. Insuliinitoiminnan vajauksessa veren lipoproteiinipitoisuus voi nousta jopa kolme kertaa suuremmaksi kuin normaalisti, mikä voi johtaa nopeaan ateroskleroosin kehittymiseen. Huonossa tasapainossa olevassa diabeteksessä proteiinien hajotus lisääntyy ja proteiinien synteesi vähenee. Tämä johtaa veren aminohappopitoisuuden selvään nousuun. Aminohappoja käytetään suoraan energian tuottoon tai niistä valmistetaan glukoneogeenissä glukoosia. Aminohappojen lisääntyneen hajotuksen takia lisääntyy myös urean erityös. Proteiinien lisääntynyt hajotus on yksi diabeteksen vakavimmista vaikutuksista, koska se voi johtaa äärimmäiseen heikkouteen ja elimien toiminnan häiriintymiseen. (Guyton & Hall 2001, 894-897.)

*Diabeteksen aiheuttamat komplikaatiot.* Veren korkea glukoosipitoisuus aiheuttaa nopeasti diabeteksen klassiset oireet, joita ovat runsas virtsan erityös ja jano. Virtsan erityös lisääntyy, koska veren korkean glukoosipitoisuuden takia munuaistubulusten glukoosinsiirtojärjestelmät eivät kykene poistamaan kaikkea glukoosia alkuvirtsasta. Virtsaan jäävä glukoosi sitoo nestettä ja lisää näin erittyvän virtsan määrää. Runsa nesteen menetys aiheuttaa janon tunteen, joka on yksi elimistön keinoista ehkäistä kuivuminen. (Guyton & Hall 2001, 894-897.) Diabetes aiheuttaa pitkällä aikavälillä useita vakavia komplikaatioita, joita ovat mm. retinopatiat, nefropatiat, neuropatiat, ateroskleroosi ja ihosairaudet. Krooninen hyperglykemia on komplikaatioiden tärkein syy. Tämän takia diabeteksen hoidon tärkein tavoite on pitää veren glukoosipitoisuus mahdollisimman normaalina. (Nathan 2000.) Hyperglykemian ajatellaan aiheuttavan komplikaatioita mekanismeilla, jotka perustuvat lisääntyneeseen AGE-tuotantoon, proteiinikinaasi-C:n aktivoitumiseen, lisääntyneeseen polyolireitin käyttöön tai lisääntyneeseen heksoosiamiinireitin käyttöön. Hyperglykemia aiheuttaa elektroniensiertoketjuissa superoksidien liikatuotantoa, mikä lisää komplikaatioita aiheuttavien mekanismien toimintaa. (Brownlee 2001.)

## 5 LIIKUNTA JA TYYPIN 1 DIABETES

### 5.1 Liikunnan yleiset hyödyt ja haitat tyypin 1 diabeteksessa

Ruokavalio ja liikunta olivat tyypin 1 diabeteksen tärkeimmät hoitokeinot ennen insuliinihoidon keksimistä. Liikuntaa rajoittivat kuitenkin sellaiset diabeteksen aiheuttamat oireet kuten lihasatrofia, dehydraatio ja ketoasidoosi. Insuliinihoidon keksiminen vähensi näitä oireita ja teki näin raskaan liikunnan mahdolliseksi myös diabetesta sairastaville. Diabetesta sairastavien liikunta ei ole vielä kuitenkaan aivan ongelmatonta. Liikunta lisää lihaskudosten insuliiniherkkyyttä, mikä saattaa johtaa akuuttiin tai viivästyneeseen hypoglykemiaan, jos injektoitavan insuliinin määrää ei lasketa sopivasti ennen liikuntaa. Liikunta voi aiheuttaa huonon metabolisen kontrollin omaaville myös ketoasidoosia. Liikunnan aiheuttama hyperglykemia johtuu pääasiassa siitä, että liikunta lisää adrenaliinin erittymistä vereen. Adrenaliini lisää glukoosin vapautumista maksasta. Jos insuliinivaikutus on heikompi kuin adrenaliinin, veren glukoosipitoisuus alkaa nousta. Erittäin raskas liikunta voi aiheuttaa hyperglykemiaa myös hyvässä metabolisessa kontrollissa oleville. Ennen liikuntaharrastuksen aloittamista diabeetikkojen kannattaa käydä lääkärissä selvittämässä onko diabetes aiheuttanut komplikaatioita. Liikunta saattaa nimittäin pahentaa joitakin komplikaatioita. Sepelvaltimosairautta sairastaville liikunta voi aiheuttaa rasisrintakivun, infarktin, rytmihäiriöitä tai äkillisen kuoleman. Retinopatiaa sairastaville liikunta saattaa aiheuttaa verkkokalvon irtoamista sekä verenpurkauksia verkkokalvossa ja lasiaisessa. Neuropatiasta kärsivät saavat helposti pehmytkudos- ja nivelvammoja. (Horton 2000.)

Aikaisemmin on ollut hyvin yleistä, että diabeetikkoja on kielletty liikunnan aiheuttamien riskien takia osallistumasta liikuntaan (Horton 2000). Laporte ym. (1986) tutkivat miten nuoruusiän fyysinen aktiivisuus vaikuttaa terveyteen. He tulivat siihen tulokseen, että liikunnasta ei ole haittaa terveydelle. Tutkimuksessa havaittiin myös, että liikunta saattaa laskea makrovaskulaaristen sairauksien ja kuoleman riskiä. (Laporte ym. 1986.) Nykyään pyritään siihen, että kaikki liikunnasta kiinnostuneet diabeetikot voisivat harrastaa liikuntaa turvallisesti. Tätä varten diabeetikoille järjestetään esim. kursseja, joissa opetetaan miten on mahdollista ylläpitää hyvä metabolinen kontrolli liikunnan aikana ja sen jälkeen, sekä miten pystytään välttämään komplikaatioita. (Horton 2000.)

*Liikunnan vaikutus diabeetikkojen glukoositasapainoon.* Liikunnan vaikutuksista glukoositasapainoon ollaan montaa mieltä. Joissakin tutkimuksissa liikunta näyttää parantavan diabeetikkojen glukoositasapainoa, kun taas toisissa muutosta ei ole havaittavissa. Ihmisillä glukoositasapainon on havaittu paranevan seuraavissa tutkimuksissa: Costill ym. (1976), Marrero ym. (1988) ja Stratton ym. (1987). Vaikutusta eivät havainneet: Ebeling ym. (1995), Mandroukas ym. (1984) sekä Rigla ym. (2000). Rotille tehdyissä tutkimuksissa tilanne on samanlainen. Liikunta paransi diabetesta sairastavien rottien glukoositasapainoa Dall'Aglio:n ym. (1983) sekä Nakai:n ym. (2002) tutkimuksissa. Goodyear ym. (1988), Kainulainen ym. (1994a), Midaoui ym. (1996) ja Noble & Ianuzzo (1985) eivät havainneet liikunnan positiivista vaikutusta glukoositasapainoon. Tutkimustulosten eroja aiheuttivat todennäköisesti erot harjoitusmuodoissa, harjoitusohjelmissa, diabeteksen voimakkuudessa, mittauksista edeltävissä ruokailuissa sekä mittausajankohdissa. Liikunta voi lisätä kudosten glukoosinottoa sekä insuliiniriippuvaisella että insuliinista riippumattomalla mekanismilla (Khayat ym. 2002). Tämän takia on ajateltu, että liikunta voisi lisätä myös tyypin 1 diabeetikkojen kehon (erityisesti lihasten) glukoosinottoa, vaikka insuliinin erityis on häiriintynyt. Joissakin tutkimuksissa liikunnan onkin havaittu parantavan diabeetikkojen heikentynyttä glukoosinottoa. (Mandroukas ym. 1984; Tancrede ym. 1982.) Liikunnalla ei näytä kuitenkaan olevan merkittävää diabeetikkojen glukoositasapainoa parantavaa vaikutusta, sillä missään em. tutkimuksista ei havaittu glukoositasapainon paranemista, kun mitaukset suoritettiin myöhemmin kuin 48 tuntia viimeisen harjoituskerran jälkeen. Täten vaikka liikunnalla olisikin positiivinen vaikutus glukoositasapainoon, vaikutus on lyhykestoinen.

*Liikunnan vaikutukset diabeetikkojen fyysiseen kuntoon.* Larsson:in ym. (1964) tutkimuksessa vähän liikuntaa harrastavilla diabetesta sairastavilla ihmisillä oli matalampi maksimaalinen hapenottokyky kuin vastaavilla terveillä ihmisillä. Tämän ei ajatella johtuvan suoraan itse diabeteksestä, vaan vähemmästä fyysisestä aktiivisuudesta ennen tutkimusta. Tätä ajatusta tukee se, että Veves ym. (1997) eivät löytäneet samanlaista eroa fyysisesti aktiivisilta ihmisiltä. Kestävyysharjoittelu lisää diabetesta sairastavien ja terveiden ihmisten maksimaalista hapenottokykyä yhtä paljon (Costill ym. 1976). Mandroukas:in ym. (1984) tutkimuksessa liikuntaohjelma laski diabeetikkojen leposykettä sekä sykettä määrättyllä submaksimaalisella kuormituksella. Tämän lisäksi liikuntaohjelma lisäsi laktaatin huippukonsentraatiota maksimaalisen kuormituksen jälkeen, isometrasta voimaa ja kestävyttä, dynaamista voimaa ja kestävyttä sekä nopeiden lihassolujen keskimääräistä alaa.

Liikuntaohjelman jokainen harjoituskerta sisälsi intervalliharjoittelua (80-90 % VO<sub>2</sub>max) sekä jalkojen, käsien ja vatsan staattista ja dynaamista voimaharjoittelua.

*Liikunnan vaikutukset diabeetikkojen sydän- ja verenkiertoelimistöön.* Makrovaskulaariset sairaudet ovat diabeetikoilla yleisimpiä vakavan sairastumisen ja kuoleman aiheuttajia. Makrovaskulaarisia sairauksia ovat mm. sepelvaltimotauti, aivoinfarkti sekä ääreisverenkiertosairaudet. (Howard & Magee 2000.) Liikunnalla on todettu olevan monia vaikutuksia, jotka mahdollisesti hidastavat makrovaskulaaristen sairauksien kehittymistä diabeetikoille. Diabetes aiheuttaa ihmisillä verisuonten endoteelin toiminnan häiriöitä. Endoteelin toiminnan häiriöiden on todettu liittyvän ateroskleroosiin, ja siksi niitä pidetään yhtenä sydän- ja verisuonitautien riskitekijöistä. Säännöllisen kestävyysharjoittelun on havaittu parantavan diabeetikoilla endoteelin toiminnan häiriöitä. (Fuchsjäger-Mayrl ym. 2002; Rigla ym. 2001.) Lipoproteiinimetabolia on keskeinen tekijä sepelvaltimotaudin kehittymisessä. Korkea veren HDL/LDL-suhde laskee taudin kehittymisen riskiä. (Guyton & Hall 2001.) Kestävyysharjoittelu lisäsi Rigla:n ym. (2000) tutkimuksessa diabetesta sairastavien ihmisten veren HDL-pitoisuutta. Harjoittelu laski veren lipoproteiini-A-pitoisuutta niillä henkilöillä, joilla pitoisuus oli yli 300 mg/l. LDL:n pitoisuus ei muuttunut harjoittelun vaikutuksesta. Harjoittelu kuitenkin muutti LDL:a terveydelle edullisempaan muotoon. (Rigla ym. 2000.) Diabeetikoilla on usein normaalia korkeammat veren triglyseridipitoisuudet. Kestävyysharjoittelu laskee veren triglyseridipitoisuutta sekä terveillä että diabeettisilla ihmisillä. (Costill ym. 1976.) Kardiomyopatiat eli sydänlihassairaudet ovat hyvin yleisiä diabeetikoilla. Kardiomyopatiassa sydänlihaksen toiminta on epänormaalia. Kardiomyopatian kehittyminen ei vaadi ateroskleroosia. (Tahiliani & McNeill 1986.) Paulson:in ym. (1987) tutkimuksessa diabetesta sairastavien rottien sydänten toiminta oli heikentynyt verrattuna terveiden rottien sydämiin. Sydämissä oli huonompi sepelvaltimoiden virtaus, aortan virtaus, iskutilavuus sekä minuuttitulavuus. Erot olivat selvimpiä korkeimmilla vasemman eteisen täyttöpaineilla. Kestävyysharjoittelu normalisoi edellä mainittuja toiminnan häiriöitä. Kestävyysharjoittelu saattaa siis lievittää kardiomyopatiaa. (Paulson ym. 1987.) Kaikki edellä olevat kestävyysharjoittelun aiheuttamat muutokset, viittaavat siihen, että liikunnalla on sydän- ja verisuonitauteja ehkäisevä vaikutus.

## 5.2 Liikunnan pysyvät vaikutukset raajalihasten energiametaboliaan tyypin 1 diabeteksessa

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset raajalihasten energiantuottoon.* Ianuzzo ym. (1974) tutkivat in vitro miten diabetes ja kestävyysharjoittelu vaikuttavat rotan raajalihasten kykyyn hapettaa palmitaattia ja pyruvaattia. Diabetes laski lihasten kykyä hapettaa palmitaattia ja pyruvaattia. Kestävyysharjoittelu palautti hapetuskyvyn normaaliksi. Tutkimuksessa havaittiin myös, että diabetes laski ja harjoittelu nosti lihaksen myoglobiinipitoisuutta. Costill'in ym. (1976) tutkimuksessa liikunta nosti diabetesta sairastavien ihmisten raajalihasten kyvyn hapettaa palmityylikoentsyymi-A:ta (in vitro) yli kaksinkertaiseksi verrattuna harjoittelemattomiin. Lihasten palmityylikoentsyymi-A:n hapetuskyky kasvoi diabetesta sairastavilla harjoitelleilla rotilla jopa suuremmaksi kuin terveillä harjoitelleilla. (Costill ym. 1976.) Diabetesta sairastavien ihmisten ja rottien raajalihasten oksidatiivinen kapasiteetti on huonompi kuin terveillä. Tämän takia kuormituksen aikana joudutaan tuottamaan energiaa normaalia enemmän anaerobisesti glykolyysin kautta. (Challis ym. 1989, Crowther ym. 2003.) Diabetes laskee rottien raajalihasten mitokondrioiden ATP:n tuottonopeutta noin 21 %, kun se suhteutetaan mitokondrioiden proteiinin määrään. Liikunnan vaikutusta ei tällöin havaittu. Jos ATP:n tuottonopeus suhteutettiin lihaksen proteiinimäärään, ATP:n tuottonopeus oli harjoitelleilla suurempi kuin harjoittelemattomilla. Diabetesta sairastavien ja terveiden ryhmien välillä ei tällä tavalla laskien ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. (Midaoui ym. 1996.)

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset raajalihasten glukoosinottoon.* Diabetes laski Kainulaisen ym. (1994a) tutkimuksessa soleuksen ja lisäsi gastrocnemiuksen valkoisen osan glukoosin ottoa. Diabetes näyttää siis vaikuttavan eri tavalla eri lihassolukoostumuksen omaaviin lihaksiin. Soleus koostuu pääasiassa tyypin I lihassoluista, kun taas gastrocnemiuksen valkoinen osa koostuu tyypin IIa ja IIb lihassoluista. Harjoittelu ei vaikuttanut lihasten glukoosinottoon. (Kainulainen ym. 1994a.) Diabetes laski Nakai:n ym. (2002) tutkimuksessa gastrocnemiuksen lihassolukalvojen GLUT4-konsentraatiota. Liikunta nosti diabeetikkojen GLUT4-konsentraatiota. Diabetesta sairastavilla urheilijoilla oli Ebeling'in ym. (1995) tutkimuksessa vastus lateraliksessa korkeampi GLUT4-pitoisuus kuin vähän liikuntaa harrastavilla. GLUT4:n mRNA:n määrissä ei havaittu eroja ryhmien välillä. (Ebeling ym. 1995.)

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset glykolyyttisten entsyymien aktiivisuuteen raajalihaksissa.* Diabetes laskee ja harjoittelu nostaa *heksokinaasin* aktiivisuutta raajalihaksissa. Ihmisillä tämä on havaittu gastrocnemiuksessa (Wallberg-Henriksson ym. 1984) ja rotilla gastrocnemiuksessa (pun. ja valk.), plantariksessa sekä soleuksessa (Noble & Ianuzzo 1985). Diabetes laskee rotilla gastrocnemiuksen valkoisen osan ja soleuksen *fosfofruktokinaasiaktiivisuutta*. Gastrocnemiuksen punaisessa osassa ja plantaariksessa aktiivisuus ei muuttunut. Liikunta lisäsi diabeetikoilla fosfofruktokinaasin aktiivisuutta vain soleuksessa. (Noble & Ianuzzo 1985.) Ihmisillä diabetes ja siihen yhdistetty kestävyys harjoittelu eivät vaikuttaneet gastrocnemiuksen fosfofruktokinaasiaktiivisuuteen. Diabetes ja harjoittelu eivät vaikuttaneet myöskään *glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasin* aktiivisuuteen. (Wallberg-Henriksson ym. 1984.) Kainulaisen ym. (1994a) tutkimuksessa diabetes laski *pyruvaattikinaasin* aktiivisuutta rottien soleuksessa sekä gastrocnemiuksen ja quadriceps femoriksen valkoisessa osassa. Quadriceps femoriksen ja gastrocnemiuksen punaisen osan pyruvaattikinaasiaktiivisuuteen diabeteksella ei ollut vaikutusta. Liikunta ei vaikuttanut diabeetisilla edellä mainittujen lihasten pyruvaattikinaasiaktiivisuuteen. (Kainulainen ym. 1994a.) Diabeteksen ja kestävyys harjoittelun aiheuttamat energiametabolian entsyymien aktiivisuusmuutokset on kerätty taulukkoon 1.

TAULUKKO 1. Diabeteksen ja kestävyys harjoittelun vaikutukset energiametabolian entsyymien aktiivisuuteen.

Tutkimus	Ihm./rotta	Lihäs	HK		6-FFK		PK		LDH		PDH		LPL		CPT		HADH		CS		SDH		CytOx	
			D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT	D	DT
Wallberg ym. 1984	Ihminen	gastro.	↓	↑	EM	EM			↑	EM							EM	EM	EM	↑	EM	↑		
Costill ym. 1976	Ihminen	gastro.	EM	↑									EM	↑	↑	↑			EM	↑	EM	↑		
Mandroukas ym. 1984	Ihminen	vastus l.		↑					↑					EM				↑		↑				
Ianuzzo ym. 1974	Rotta	gastro.																	EM	↑	↓	↑		
Kainulainen ym. 1994a	Rotta	Soleus					↓	EM											EM	↑	↓	↑	↓	↑
Kainulainen ym. 1994a	Rotta	gastro. pun.					EM	EM											EM	↑	↓	↑	EM	↑
Kainulainen ym. 1994a	Rotta	gastro. valk.					↓	EM											EM	↑	EM	EM	↓	↑
Kainulainen ym. 1994a	Rotta	MQF pun.					EM	EM											↓	↑	EM	↑	EM	↑
Kainulainen ym. 1994a	Rotta	MQF valk.					↓	EM											EM	EM	↓	EM	↓	EM
Noble & Ianuzzo 1985	Rotta	gastro. pun.	↓	↑	EM	EM											EM	↑	EM	↓	↓	EM		
Noble & Ianuzzo 1986	Rotta	gastro. valk.	↓	↑	↓	EM												EM	↑	EM	↑	EM	↑	
Noble & Ianuzzo 1987	Rotta	plantaris	↓	↑	EM	EM												EM	↑	↓	↑	↓	↑	
Noble & Ianuzzo 1988	Rotta	soleus	↓	↑	↓	↑												EM	↑	↓	↑	EM	↑	
Nakai ym. 2002	Rotta	gastro.								↓	↑													
Goodyear ym. 1988	Rotta	triceps f.																	EM	↑				

EM = ei muutosta, ↑ = lisää, ↓ = laskee, D = diabetes vs. kontrolli, DT = harjoitelleet diabeetikot vs. harjoittelemattomat diabeetikot, HK = heksokinaasi, 6-PFK = fosfofruktokinaasi, PK = pyruvaattikinaasi, LDH = laktaattidehydrogenaasi, PDH = pyruvaattidehydrogenaasi, LPL = lipoproteiinilipaasi, HADH = 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase CS = sitraattisyntaasi, SDH = sukkiinaattidehydrogenaasi, CytOx = sytokromioksiidaasi

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset raajalihasten laktaattidehydrogenaasi- ja pyruvaattidehydrogenaasiaktiivisuuteen.* Pyruvaattidehydrogenaasi toimii porttina pyruvaatin pilkkomiselle aerobisissa reaktioissa. Laktaattidehydrogenaasi ohjaa pyruvaatin pois aerobisel-

ta reitiltä ja edistää anaerobista energiantuottoa. (Nelson & Cox 2000.) Diabetes laski Nakai:n ym. (2002) tutkimuksessa rottien gastrocnemiuksen *pyruvaattidehydrogenaasin* kokonaismäärää sekä aktiivisen muodon määrää. Kestävyys harjoittelu lisäsi diabeetikoilla sekä entsyymien kokonaismäärää että aktiivisen muodon määrää. (Nakai ym. 2002.) Diabetes nosti Wallberg-Henrikssonin ym. (1984) tutkimuksessa koehenkilöiden gastrocnemiuksen laktaattidehydrogenaasiaktiivisuutta. Harjoittelu ei vaikuttanut diabeetikoilla entsyymien aktiivisuuteen. (Wallberg-Henrikssonin ym. 1984.) Harjoittelun on kuitenkin havaittu nostavan diabetesta sairastavilla ihmisillä vastus lateraalisen *laktaattidehydrogenaasiaktiivisuutta*, kun harjoitusohjelma sisältää intervalli- ja voimaharjoittelua (Mandroukas ym. 1984).

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset sitruunahappokierron entsyymien aktiivisuuteen.* Diabetes laski Kainulaisen ym. (1994a) tutkimuksessa rottien quadriceps femoriksen punaisen osan *sitraattisyntaasiaktiivisuutta*. Gastrocnemiuksen (pun. ja valk.), quadriceps femoriksen (valk.) ja soleuksen sitraattisyntaasiaktiivisuuksiin diabetes ei vaikuttanut. Kestävyys harjoittelu nosti diabetesta sairastavilla rotilla kaikkien tutkittujen lihasten paitsi quadriceps femoriksen sitraattisyntaasiaktiivisuutta. (Kainulainen ym. 1994a.) Noble:n & Ianuzzo:n (1985) tutkimuksessa diabetes laski rottien gastrocnemiuksen (pun.), plantariksen ja soleuksen sitraattisyntaasiaktiivisuutta. Gastrocnemiuksen valkoisen osan sitraattisyntaasiaktiivisuuteen diabetes ei vaikuttanut. Kestävyys harjoittelu lisäsi sitraattisyntaasiaktiivisuutta kaikissa tutkituissa lihaksissa. (Noble & Ianuzzo 1985.) Kestävyys harjoittelu lisää raajalihasten sitraattisyntaasiaktiivisuutta myös diabetesta sairastavilla ihmisillä. Aktiivisuuden lisäys on todettu gastrocnemiuksessa (Costill ym. 1976, Wallberg-Henriksson ym. 1984) sekä vastus lateraaliksessa (Mandroukas ym. 1984). Diabetes laski Kainulaisen ym. (1994a) tutkimuksessa soleuksen, gastrocnemiuksen (pun.) ja quadriceps femoriksen (valk.) *sukkinaattidehydrogenaasiaktiivisuutta*. Gastrocnemiuksen valkoisen osan ja quadriceps femoriksen punaisen osan sukkinaattidehydrogenaasiaktiivisuuteen diabetes ei vaikuttanut. Kestävyys harjoittelu lisäsi diabeetikoilla entsyymien aktiivisuutta soleuksessa, gastrocnemiuksessa (pun.) ja quadriceps femoriksessa (pun.). Harjoittelu ei vaikuttanut entsyymien aktiivisuuteen gastrocnemiuksen ja quadriceps femoriksen valkoisissa osissa. (Kainulainen ym. 1994a.) Noblen & Ianuzzon (1985) tutkimuksessa diabetes laski sukkinaattidehydrogenaasin aktiivisuutta gastrocnemiuksessa (pun.) ja plantaariksessä, mutta ei gastrocnemiuksen valkoisessa osassa eikä soleuksessa. Harjoittelu lisäsi entsyymien aktiivisuutta kaikissa muissa tutkituissa lihaksissa paitsi gastrocnemiuksen punaisessa osassa. (Noble & Ianuzzo 1985.) Diabetes ei näytä vaikuttavan ihmisillä gastrocnemiuksen

sukkinaattidehydrogenaasiaktiivisuuteen. Kestävyysharjoittelu lisää diabetesta sairastavilla ihmisillä gastrocnemiuksen sukkinaattidehydrogenaasiaktiivisuutta. Diabetes ja siihen yhdistetty kestävyysharjoittelu eivät kumpikaan vaikuta gastrocnemiuksessa *malaattidehydrogenaasin* aktiivisuuteen. (Costill ym. 1976; Wallberg-Henriksson ym. 1984.)

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutus rasvahappometabolian entsyymien aktiivisuuteen.* Diabetes ei vaikuta ihmisillä gastrocnemiuksen *lipoproteiinilipaasiaktiivisuuteen*. Kestävyysharjoittelu nostaa diabeettisilla entsyymien aktiivisuutta gastrocnemiuksessa. (Costill ym. 1976.) Intervalli- ja voimaharjoittelu eivät nostaneet lipoproteiinilipaasin aktiivisuutta diabetesta sairastavien ihmisten vastus lateraliksessa (Mandroukas ym. 1984). Diabetes ja diabetesta sairastavien kestävyysharjoittelu lisäävät molemmat *karnitiinipalmiitintransfeeraasin* aktiivisuutta ihmisten vastus lateraliksessa (Costill ym. 1976). Diabetes ei vaikuta rottien raajalihasten *HADH(3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)*-aktiivisuuteen. Kestävyysharjoittelu lisäsi diabeetikoilla entsyymien aktiivisuutta. (Noble & Ianuzzo 1985.) Diabetes ja diabeetikkojen kestävyysharjoittelu eivät kumpikaan vaikuta ihmisten gastrocnemiuksen HADH-aktiivisuuteen (Wallberg-Henriksson ym. 1984). Intervalli- ja voimaharjoittelu lisäsi kuitenkin vastus lateraloksen HADH-aktiivisuutta diabeettisilla koehenkilöillä (Mandroukas ym. 1984).

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset raajalihasten sytokromioksidaasiaktiivisuuteen.* Diabetes laski Kainulaisen ym. (1994a) tutkimuksessa sytokromioksidaasin (elektroninsiirtoketjun entsyymi) aktiivisuutta rottien soleuksessa, gastrocnemiuksessa (valk.) sekä quadriceps femoriksessa (valk.). Aktiivisuus ei muuttunut gastrocnemiuksen ja quadriceps femoriksen punaisissa osissa. Kestävyysharjoittelu lisäsi entsyymien aktiivisuutta kaikissa muissa lihaksissa paitsi quadriceps femoriksen valkoisessa osassa. (Kainulainen ym. 1994a.)

*Liikunnan ja diabeteksen vaikutukset glykogeenimetabolian entsyymien aktiivisuuteen.* Diabetes laski Noble:n & Ianuzzo:n (1985) tutkimuksessa rottien plantaroksen *glykogeenifosforylaasiaktiivisuutta*. Diabetes ei vaikuttanut entsyymien aktiivisuuteen gastrocnemiuksessa (pun. ja valk.) eikä soleuksessa. Kestävyysharjoittelu ei vaikuttanut diabeetikoilla glykogeenifosforylaasin aktiivisuuteen missään tutkituista lihaksista. (Noble & Ianuzzo 1985.) Diabetesta sairastavilla urheilijoilla on havaittu olevan vastus lateraliksessa korkeampi *glykogeenisyntaasiaktiivisuus* kuin vähän liikuntaa harrastavilla diabeetikoilla. Glykogeenisyntaasin lähetti-RNA:n määrissä ei ollut ryhmien välillä eroa. (Ebeling ym. 1995.)



## 6 TUTKIMUSONGELMAT JA HYPOTEESEIT

### Tutkimusongelmat:

1. Minkälaisia muutoksia tyypin 1 diabetes aiheuttaa energiametaboliaan liittyvien geenien ilmenemiseen hiirten raajalihaksissa?
2. Minkälaisia muutoksia säännöllinen kestävyysharjoittelu aiheuttaa energiametaboliaan liittyvien geenien ilmenemiseen diabetesta sairastavien hiirten raajalihaksissa?

### Hypoteesit:

1. Diabetes laskee GLUT4:n, glykolyysin, pyruvaattidehydrogenaasikompleksin, sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Diabetes lisää laktaattidehydrogenaasin geenin ilmenemistä. Beta-oksidaation geenien ilmenemiseen diabetes ei vaikuta.
2. Diabetesta sairastavien hiirten kestävyysharjoittelu joko lisää tai ei vaikuta glykolyysin ja laktaattidehydrogenaasin geenien ilmenemiseen. Harjoittelu lisää GLUT4:n, pyruvaattidehydrogenaasikompleksin, sitruunahappokierron, beta-oksidaation ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä.

Hypoteesit laadittiin proteiinitasolla aiemmin havaittujen muutosten perusteella (ks. kappale 5.2)

## 7 TUTKIMUSMENETELMÄT

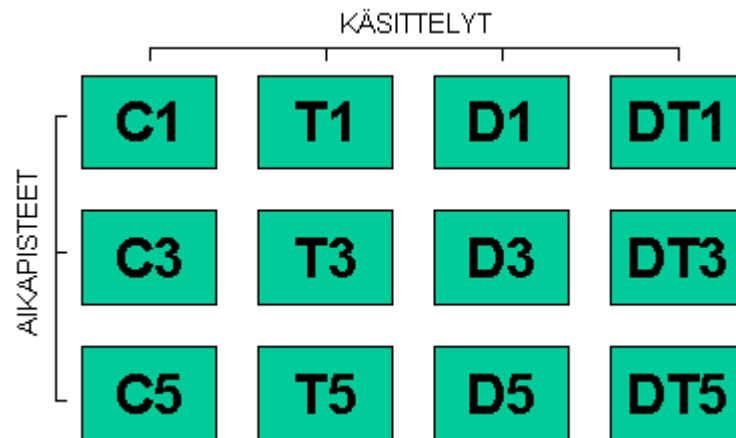
### 7.1 Koe-eläimet ja niiden hoito

Tutkimuksessa käytettiin koe-eläiminä 10-15 viikon ikäisiä NMRI-hiiriä (Harlan, Hollandi), jotka olivat sukupuoleltaan uroksia ja painoivat kokeen alussa keskimäärin  $40,9 \pm 3,7$  grammaa. NMRI-hiiret ovat ulkosiittoisia hiiriä, minkä takia niiden perintötekijöissä on runsaasti vaihtelua kuten ihmisilläkin. Koe-eläimenä käytettiin hiirtä, koska sen genomi on erittäin hyvin tunnettu. Hiirten käyttöön saatiin lupa Jyväskylän yliopiston koe-eläintoimikunnalta. Jokaiselle kokeeseen osallistuneelle hiirelle tehtiin väriraitakoodi häntään, jotta hiiret voitiin tunnistaa yksilöinä kokeen alusta loppuun. Hiiriä säilytettiin Jyväskylän yliopiston koe-eläintilojen huoneessa, jossa lämpötila oli 20 celsius-astetta ja ilman kosteus keskimäärin noin 75%. Huoneen ilman kosteutta ei pystytty säätämään. Ilmanvaihdon tehokkuus oli 15 kertaa / tunti. Huoneen valaistus säädettiin siten, että kello 08.00-20.00 oli valoisaa ja kello 20.00-08.00 pimeää. Hiiret elivät läpinäkyvissä polykarbonaattilaatikoissa (Makrolon 3), joiden koko oli 425 x 226 x 150 millimetriä. Samoissa laatikoissa pidettiin enimmillään viittä hiirtä kerrallaan. Aggressiiviset muita hiiriä vahingoittavat hiiret eristettiin omiin laatikkoihinsa. Laatikoiden pohjien kuivikkeena käytettiin haapalastua (TAPVEI®). Hiirille oli tarjolla rajoittamattomasti vettä ja ruokaa (Labfor R36).

### 7.2 Koe-asetelma

Tutkimukseen osallistuneet hiiret (60 kpl) jaettiin kokeen alussa diabetesta sairastaviin ja terveisiin hiiriin. Diabeetikoryhmän hiirille aiheutettiin tyypin 1 diabetes injektoimalla hiirten vatsaonteloon haiman  $\beta$ -solujen tuhoavaa streptozotosiinia 180 mg/kg (hiiren paino). Streptozotosiini (Sigma) injektoitiin liuotettuna 0,1 molaariseen natriumsitraattipuskuriin, jonka pH oli 4,5. Liuotus tapahtui juuri ennen injektiota. Terveille hiirille injektoitiin streptozotosiini-injektiota vastaava tilavuus pelkkää sitraattipuskuria. Hiiret punnittiin injektioiden yhteydessä ja tämän jälkeen viikon välein. Kolmen päivän päästä injektioiden suorittamisesta diabeettisiksi tarkoitetuilta hiiriltä mitattiin virtsan glukoosipitoisuudet diabeteksen varmistamiseksi. Glukoosipitoisuuden tuli olla yli 200 mg/dl. Virtsan glukoosipitoisuus mitattiin myös viideltä satunnaisesti valitulta terveeltä hiireltä. Glukoosipitoisuuden

mittaukseen käytettiin Glukotest®-indikaattoritikkuja (Roche, Saksa). Terveet ja diabetesta sairastavat hiiret jaettiin 1, 3 ja 5 viikkoa harjoitteleviin ja näiden kontrolliryhmiin, jotka eivät harjoitelleet (kuvio 4). Jokaiseen ryhmään valittiin satunnaisesti viisi hiirtä. Harjoittelevia hiiriä juoksumatettiin juoksumatolla, jonka kaltevuus oli noin +3°. Ensimmäisellä harjoituskerralla hiiriä totutettiin juoksumattoon. Totuttelussa hiiriä juoksumatettiin ensin 10 minuuttia nopeudella 10,5 m/min ja sitten toiset 10 minuuttia nopeudella 14 m/min. Totuttelukerran jälkeen juoksumaton nopeus nostettiin 21:een metriin minuutissa. Hiiret juoksimat tällä nopeudella tunnin viisi kertaa viikossa. Harjoittelu tapahtui hämärässä huoneessa kello 7.00-8.00, koska hiiret ovat yöeläiminä tällöin aktiivisempia kuin päivällä.



KUVIO 4. Hiiriryhmät (n = 5). Kirjainten merkitykset: C = kontrollit, T = terveet harjoittelijat, D = diabetesta sairastavat ja DT = diabetesta sairastavat harjoittelijat. Numerot kertovat käsittelyn keston viikoissa.

### 7.3 Hiirten lopetus ja preparointi

Harjoitelleet ja niitä vastaavat harjoittelemattomat hiiret lopetettiin ja preparoitiin 24:n tunnin kuluttua viimeisestä harjoituksesta. Lopetus tapahtui niskamurrolla, minkä jälkeen hiireltä irrotettiin pää preparointisaksilla leikkaamalla. Pähän kulkevista verisuonista valua veri kerättiin koeputkeen. Koeputki merkittiin ja asetettiin jälle preparointien ajaksi. Seuraavaksi hiireltä preparoitiin sydän, maksa, lisäkiivesten rasva, pohjekompleksit (gastrocnemius, soleus ja plantaris) sekä nelipäiset reisilihakset. Tässä tutkimuksessa ovat mukana vain vasemman ja oikean takajalan pohjekompleksit. Preparoinnin jälkeen lihakset huuhdeltiin fysiologisessa suolaliuoksessa (0,9 % NaCl), kuivattiin, punnittiin ja säilöttiin väliaikaisesti nestemäiseen tyypeen. Kun kaikki päivän preparoinnit oli suoritettu, lihas-

näytteet siirrettiin nestemäisestä tuesta pakasteeseen, jonka lämpötila oli  $-80$  Celsius-astetta. Tämän jälkeen verinäytteet otettiin jäältä ja laitettiin sentrifugiin ( $-4^{\circ}\text{C}$ ), jossa niitä pyöritettiin 3000:n RPM:n nopeudella 10 minuuttia. Näin veren solut ja hyytymistekijät saatiin painumaan koeputken pohjalle ja seerumi voitiin kerätä pinnalta talteen. Kerätty seerumi laitettiin pakasteeseen ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

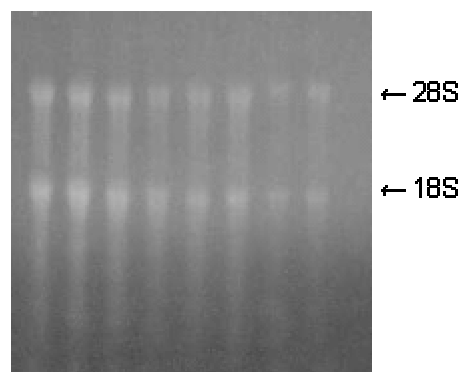
#### **7.4 Seerumin glukoosipitoisuuden ja pohjekompleksin sitraattisyntaasiaktiivisuuden mittaaminen**

Tutkimuksessa mitattiin hiirten seerumin glukoosipitoisuus, koska haluttiin tietoa eri käsittelyjen vaikutuksista glukoositasapainoon. Mittaus suoritettiin HemoCue B-glucose analyzer-laitteella (HemoCue, Ruotsi). Harjoitusvaikutusten todentamiseksi hiirten oikean pohkeen proksimaalisesta päästä otetusta näytteestä mitattiin sitraattisyntaasiaktiivisuus. Mittausmenetelmän protokolla on liitteessä 1. Sitraattisyntaasiaktiivisuus suhteutettiin lihashomogenaattiin liuenneiden proteiinien pitoisuuteen, joka mitattiin Bio-Rad:in (USA) protein assay -menetelmällä.

#### **7.5 Totaali-RNA:n eristys, laatu- ja näytteen valmistus**

Hiirten vasemman takajalan pohjekompleksista eristettiin totaali-RNA käyttäen TRIzol® reagenssia (Invitrogen-Life Technologies). Menetelmässä lihasnäyte homogenoidaan TRIzol®-reagenssiin, joka stabiloi RNA-molekyylejä, hajottaa soluja ja liuottaa solujen komponentteja. Kun saatuun homogenaattiin lisätään kloroformia, liuos jakaantuu sentrifugoitessa kahteen faasiin: vesifaasiin ja orgaaniseen faasiin. Vesifaasi kerätään talteen, koska RNA-molekyylit ovat kerääntyneet siihen. RNA saostetaan liuoksesta isopropyylin avulla ja liuotetaan pieneen määrään RNAasi-vapaata vettä. Proteiini- ja DNA-jäämien poistamiseksi, eristetty totaali-RNA puhdistettiin vielä eristyssarjalla RNeasy® mini (Qiagen). Tässä menetelmässä totaali-RNA-näyte ajetaan silikageelipylvään läpi, joka sitoo vain RNA-molekyylejä. Pesuvaiheiden jälkeen RNA eluoidaan RNAasi-vapaalla vedellä irti pylväästä. RNA-näytteiden konsentraatio ja puhtaus määritettiin mittaamalla spektrofotometrillä absorbanssit aallonpituuksilla 260 ja 280 nanometriä. Konsentraatio laskettiin kaavalla:  $A_{260\text{nm}} * 40 \mu\text{g/ml}$  ja puhtaus suhteesta  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . RNA-näytteiden konsentraation tuli

olla ryhmissä keskimäärin yli 0,5 µg/ml ja puhtauden yli 1,9. RNA-näytteiden eheys tarkastettiin elektroforeettisesti agarosi-formaldehydi-geelissä (1,2%). Kun näytteen RNA on ehjää, etidiumbromidilla värjättyllä geelillä näkyy UV-valossa kaksi juovaa (kuvio 5). Ylemmän juovan kohdalle on kerääntynyt 28S ribosomaalinen RNA ja alemman juovan kohdalle 18S ribosomaalinen RNA. Jos geelillä ei näkynyt juovia, näyte hylättiin. RNA-näytteitä säilytettiin -80°C:ssa. Ennen Affymetrix:in microarray-analyysiä samaan ryhmään kuuluvien hiirten RNA-näytteet yhdistettiin yhdeksi näytteeksi siten, että jokaista näytettä tuli yhdistelmään yhtä suuri määrä. Yhdistelmänäytteille tehtiin samat määrittelykset kuin yksittäisille näytteillekin (konsentraatio, puhtaus ja eheys).



KUVIO 5. Geelikuva totaali-RNA-näytteistä

## 7.6 Microarray-analyysi

Microarray-analyysit suoritettiin Turun biotekniikakeskuksen kansallisessa microarray-keskuksessa. RNA-näytteiden analysointiin käytettiin Affymetrix:in (USA, Santa Clara) microarray-lastua MG U74Av2, jolla voidaan tutkia noin 6000:n geenin ja 6000:n EST-sekvenssin ilmenemistä. EST-sekvensseiksi kutsutaan cDNA-kirjastoista peräisin olevia sekvenssejä. cDNA-kirjastossa on tallennettuna jonkun määrätyn solu- tai kudostyyppin kaikki mRNA-sekvenssit cDNA:ksi käännettynä. EST-sekvensseistä suuri osa on sellaisia, joiden geeniä ei vielä tunneta. Affymetrix:in microarray-lastu on pieni (1cm \* 1cm) lasilevy, jossa on kiinni eri RNA-molekyylejä spesifisti sitovia koetinsarjoja. Koetinsarja koostuu 16:sta oligonukleotidiparista. Parista toisen sekvenssi on täydellisesti komplementaarinen (PM = perfect match), kun taas toisessa oligonukleotidissa on keskellä yksi ei pariutuva nukleotidi. Tämän ei täydellisesti pariutuvan oligonukleotidin (MM = miss match) avulla voidaan poistaa virhettä, joka aiheutuu epäspesifisestä sitoutumisesta. Eri oligonukleotideilla on lastulla oma tarkka sijaintinsa. Sijaintialuetta kutsutaan soluksi. Solussa on oligo-

nukleotidista miljoonia kopioita. Affymetrix:in microarray-lastuissa oligonukleotidit syntetisoidaan suoraan omiin soluihinsa käyttäen fotolitografiaan perustuvaa menetelmää. (Affymetrix 2003b.)

Microarray-analyysissä totaali-RNA käännetään aluksi cDNA:ksi. Tämän jälkeen cDNA käännetään cRNA:ksi. Reaktiossa käytetään biotinyloituja ribonukleotidejä. Ennen hybridisaatiota cRNA fragmentoidaan, koska se parantaa menetelmän herkkyyttä. Affymetrix:in microarray-tekniikassa jokainen näyte hybridisoidaan eri lastulle. Hybridisaatioissa cRNA-molekyylit sitoutuvat microarray-lastulla oleviin koettimiinsa. Hybridisaation jälkeen sitoutumattomat cRNA:t poistetaan pesemällä pois lastulta. Pesuvaiheen yhteydessä näyte värjätään streptavidini-fykoerytriinillä, joka sitoutuu cRNA -molekyylien biotiiniin. Pesujen ja värjäysten jälkeen lastu luetaan käyttäen Gene Array Scanner:ia, joka perustuu epi-fluorosenssikonfokaalimikroskopiaan. Laite eksitoi fluorokromeja (fykoerytriini) argonioni-laserilla, jonka valon aallonpituus on 488 nm. Samalla laite mittaa sellaisen emittoituvan valon määrää, jonka aallonpituus on 570 nm. Lastun eri kohdista emittoituvan valon määrä on suoraan verrannollinen siihen kohtaan lastua sitoutuneen c-RNA:n määrään. Lastun lukemisen tuloksena saadaan kuva, jossa lastun eri kohdista emittoituneen valon määrää kuvaa kuvassa näkyvien pisteiden intensiteetti (kuvio 6). Hybridisaatiot, pesut ja värjäykset suoritetaan automatisoidulla laitteella, jota ohjataan tietokoneohjelmalla (Microarray Suite version 5.0). Tällä ohjelmalla ohjataan myös Gene Array Scanner:ia ja aloitetaan tulosten analysointi. Microarray -analyysin protokolla on työn liitteenä 2. (Affymetrix 2003b)



KUVIO 6. Osa microarray-analyysin tuloksena saatavasta kuvasta

## 7.7 Microarray-tulosten analysointi

Microarray-analyysin tuloksena saadusta kuvasta määritettiin Microarray suite -ohjelmalla jokaiselle lastun solulle oma intensiteetti-arvo. Koetinsarjan solujen intensiteetti-arvojen perusteella laskettiin kohteena olleelle mRNA:lle havainnon  $P$ -arvo, havainto ja signaali. Havainnon  $P$ -arvo kertoo sen todennäköisyyden, jolla kohteen läsnäolo johtuu sattumasta. Havainto määrittyy  $P$ -arvosta asetettujen raja-arvojen mukaan. Jos  $P$ -arvo on alle 0,04, havainto on läsnä. Jos  $P$ -arvo on yli 0,06, havainto on poissa.  $P$ -arvon jäädessä näiden raja-arvojen väliin, havainto on marginaalinen. Signaali on lukuarvo, joka kuvaa kohteen suhteellista määrää näytteessä. Ennen eri lastujen ja näin siis samalla eri näytteiden tulosten vertaamista lastujen signaalit skaalattiin käyttäen globaalia skaalausta. Tässä metodissa lastun signaalit kerrotaan sellaisella skaalaustekijällä, että kaikkien signaalien keskiarvoksi saadaan joku itsemäärätty luku. Tässä tutkimuksessa kaikkien lastujen skaalaukseen käytettiin lukua 50. Skaalauksella poistetaan sellaisia vertailuun vaikuttavia tekijöitä kuten erot hybridisaatiotehokkuuksissa, pesuissa, värjäyksissä ja pipetointivirheissä. Ennen näytteiden vertailuanalyysien suorittamista tarkastettiin analysointiohjelman näytekohtaisista raporteista näytteen laadusta kertovat lukuarvot, kuten tausta, hybridisaatiokontrollit sekä GAPDH:n ja  $\beta$ -aktiinin 5'-3'-suhteet. Hybridisaatiokontrollien tulee olla läsnä, koska ne lisättiin analysoitaviin näytteisiin ennen hybridisaatioita. GAPDH ja  $\beta$ -aktiini ovat näytteen sisäisiä kontrolligeenejä, joiden 5'-3'-suhteet kertovat analysoitujen näytteiden eheydestä. Vertailun yhteydessä lastujen skaalatuille signaaleille tehtiin robust-normalisointi, joka korjaa globaalin skaalauksen aiheuttamia virheitä, jotka johtuvat koettimien välisistä eroista sitomiskyvyssä ja lineaarisuudessa. (Affymetrix 2003a.)

Skaalausten ja normalisointien jälkeen suoritettiin näytteiden vertailuanalyysit, joissa verrattiin aina kahta näytettä kerrallaan toisiinsa. Kaikista aikapisteistä suoritettiin seuraavat vertailut: C vs. T, C vs. D, C vs. DT ja D vs. DT. Vertailussa toinen näytteistä määritetään perustasoksi, johon toista koenäytettä verrataan. Analyysin tarkoituksena on havaita ja määrittää geenien ilmenemisessä tapahtuneet muutokset. Tuloksena saadaan kaikille eri geeneille ja EST-sekvensseille muutoksen  $P$ -arvo, muutos sekä signaalien logaritminen suhde. Muutoksen  $P$ -arvo kertoo muutoksen todennäköisyydestä ja suunnasta. Muutos voi olla kasvanut, marginaalisesti kasvanut, ei muutosta, marginaalisesti laskenut ja laskenut. Muutos riippuu  $P$ -arvosta ja sen raja-arvoista. Kun  $P$ -arvo on lähellä arvoa 0,0, on kohteena olevan mRNA:n määrä kasvanut verrattuna perustasoon.  $P$ -arvon ollessa lähellä arvoa 1,0, voidaan sanoa, että kohteena olevan mRNA:n määrä on laskenut koenäytteessä verrat-

tuna perustasoon. Kun  $P$ -arvo on lähellä 0,5:ttä, on hyvin epätodennäköistä, että kyseisen mRNA:n määrissä olisi näytteiden välillä eroa. Signaalien logaritminen suhde kertoo muutoksen suuruudesta ja suunnasta. (Affymetrix 2003a.)

Tulosten analysointia jatkettiin käyttäen GeneSpring-analysointiohjelmaa (Silicon genetics). Analysoinnin pohjana toimi Microarray Suite:lla tehdyt vertailuanalyysit. Jokaisen näytteen geenien ilmenemistä tarkasteltiin ohjelmassa suhteessa kyseisen aikapisteen kontrollinäytteen vastaavien geenien ilmenemiseen. GeneSpring:illä valmistettiin vertailuanalyysien pohjalta listat niistä geneistä, joissa havaittiin geenien ilmenemisessä merkittäviä muutoksia. Merkittäviksi laskettiin sellaiset muutokset, joissa muutoksen  $P$ -arvo oli yli 0,9975 tai alle 0,0025 ja  $\log_2(\text{näyte1/näyte2})$  oli yli 0,3 tai alle  $-0,3$ . Geenilistoista poistettiin sellaiset geenit, jotka eivät ilmenneet vähintään kolmessa näytteessä. Listan ulkopuolelle jääneet geenit jätettiin jatkoanalyysien ulkopuolelle. Analysointiohjelmaan syötettiin jo alussa kaikki perustiedot mikrolastun sisältämistä geneistä ja EST-sekvensseistä. Näiden tietojen ja kirjallisuuden avulla lastun geneistä valittiin ne geenit, joiden tarkasteluun haluttiin erityisesti keskittyä. Tämän tutkimuksen tarkastelussa ovat mukana sellaiset geenit, jotka kuuluvat seuraaviin toiminnallisiin ryhmiin: glukoosimetabolia, lipidimetabolia, proteiinimetabolia, ATP:n tuotto, insuliini-, MAPK- ja G-proteiinisygnalointi.

## 7.8 Algoritmit ja tilastolliset menetelmät

Verrattaessa eri hiiriryhmien painoja, seerumien glukoosipitoisuuksia ja pohjekompleksien sitraattisyntaasiaktiivisuuksia käytettiin kaksisuuntaista  $t$ -testiä. Microarray-analyysissä laskettiin yhtenä muuttujana havainnon  $P$ -arvo, jonka laskuun käytettiin yksisuuntaista Wilcoxon Signed Rank -testiä. Testi käyttää hyväkseen koetinpareille laskettuja erotuspisteiden etäisyyksiä Tau-arvosta (ennalta määrätty vakio). Erotuspisteet kuvaavat kuinka suuri osa koetinparin sitomista kohteista on sitoutunut täydellisesti komplementaarisiiin oligonukleotideihin. Lähetä-RNA:n suhteellista määrää kuvaavan signaalin arvon laskeminen aloitettiin laskemalla jokaiselle koetinsarjan koetinpareista erotus PM-MM. Lopullinen signaali saatiin, kun erotusten logaritmeista laskettiin painotettu keskiarvo käyttäen menetelmää One-step Tukey's Biweight Estimate. Muutoksen  $P$ -arvon laskemiseen käytettiin Wilcoxon's Signed Rank -testiä. Muutokselle laskettiin aluksi kolme  $p$ -arvoa käyttäen eri lähtöarvoja, joita olivat PM:n ja MM:n välinen ero, PM ja tausta. Lopullinen muutoksen  $P$ -arvo saatiin yhdistämällä nämä kolme eri  $P$ -arvoa. Signaalien logaritminen suhde laskettiin



siten, että ensin laskettiin verrattavien näytteiden samojen koetinparien PM-MM -erotusten suhde. Tämän jälkeen laskettiin suhteiden kaksikantaisten logaritmien painotettu keskiarvo käyttäen menetelmää One-step Tukey's Biweight Estimate. (Affymetrix 2003a.)

## 7.9 Microarray-analyysin validiteetti ja toistettavuus

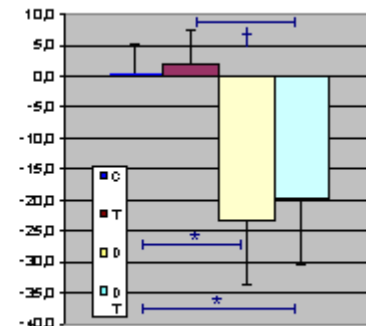
Affymetrix:in microarray-menetelmällä on hyvä validiteetti. Sillä saadaan hyvin samanlaisia tuloksia kuin standardina pidetyllä RT-PCR-menetelmällä. Keen ym. (2004) varmistivat omassa tutkimuksessaan microarray:n (MG U74Av2) tuloksia mittaamalla 39:n geenin ilmenemistä myös RT-PCR-menetelmällä. Eri menetelmillä saadut tulokset korreloivat hyvin ( $R^2 = 0,86$ ,  $P < 0,001$ ) keskenään. (Keen ym. 2004.) Bakay:n ym. (2002) tutkimuksen mukaan Affymetrix:in microarray-lastulla (MG U74Av2) tehtyjen mittausten toistettavuus on hyvä, sillä rinnakkaisanalyysien tulokset korreloivat erittäin hyvin ( $R^2 = 0,978$ ) keskenään (Bakay ym. 2002). Tässä tutkimuksessa tulosten luotettavuutta ei varmistettu rinnakkaismittauksilla tai RT-PCR-menetelmällä. Tulosten luotettavuutta parannettiin ottamalla tuloksiin mukaan pääasiassa vain ne geenit, joiden ilmeneminen muuttui diabeteksen vaikutuksesta kaikissa aikapisteissä samaan suuntaan. Luotettavuutta lisättiin myös poistamalla alhaisen ilmenemistason geenit tuloksista (ei ilmennyt vähintään kolmessa näytteessä) ja asettamalla muutoksen suuruudelle vähimmäisrajat ( $\log_2(\text{näyte1}/\text{näyte2})$  yli 0,3 tai alle -0,3).

## 8 TULOKSET

### 8.1 Paino

Hiirten alkupainoissa ei ollut ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevää eroa. Diabeteshiirten (D) paino laski kokeen aikana  $23,4 \pm 10,2$  % ja harjoitelleiden diabeteshiirten (DT)  $19,7 \pm 10,6$  %. Näiden ryhmien painonmuutos erosi merkitsevästi ( $P < 0,001$ ) kontrolliryhmän (C) painonmuutoksesta  $+0,1 \pm 5,1$  %. Erot olivat yleisesti merkitseviä ( $P < 0,05$ ) myös tarkasteltaessa aikapisteitä erikseen. Viikon harjoitelleen diabetesryhmän (DT1) painonmuutos ei kuitenkaan eronnut merkitsevästi saman aikapisteen kontrolliryhmän painonmuutoksesta. Ryhmän DT1 painonmuutos oli kokeen aikana  $-12,4 \pm 11,0$  %. Tämä oli merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) pienempi painonmuutos kuin ryhmässä D1 ( $-19,6 \pm 7,8$  %). Samanlaista eroa ei havaittu muissa aikapisteissä eikä yhdistetyissä ryhmissä. Harjoittelu ei vaikuttanut terveiden hiirten painoon. Kaikkien ryhmien alkupainot, loppupainot ja painonmuutokset näkyvät kuviossa 7.

Ryhmä	Paino alussa (g)		Paino lopussa (g)		Muutos (%)		TME
	KA	KH	KA	KH	KA	KH	
C1	42,7	3,6	42,4	3,0	-0,5	3,7	
T1	42,1	3,5	41,3	3,3	-2,0	4,6	
D1	41,8	3,5	33,4	1,3	-19,6	7,8	*
DT1	42,0	5,1	36,5	3,1	-12,4	11,0	‡
C3	42,0	2,9	42,6	1,4	1,9	5,9	
T3	39,2	3,2	41,1	4,2	4,8	4,6	
D3	40,5	4,1	27,4	5,2	-32,4	10,6	* 5
DT3	37,2	3,6	28,7	3,3	-22,7	5,3	* †
C5	41,3	2,7	40,8	3,4	-1,2	6,1	
T5	41,0	2,7	42,2	3,9	3,1	5,7	
D5	41,2	5,9	33,5	3,4	-18,1	6,0	* 3
DT5	38,7	2,6	29,1	3,8	-24,5	11,1	* †
C	42,0	2,9	41,9	2,7	0,1	5,1	
T	40,8	3,2	41,5	3,6	1,9	5,5	
D	41,1	4,3	31,4	4,5	-23,4	10,2	*
DT	39,4	4,2	31,6	4,9	-19,7	10,6	* †



TME = tilastollisesti merkitsevä ero, KA = keskiarvo, KH = keskihajonta

\* =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen kontrolliryhmään ( C )

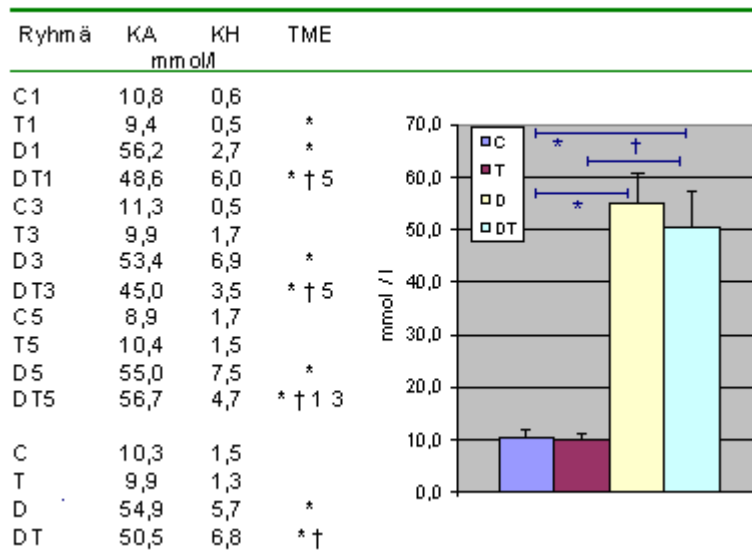
‡ =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen diabetesryhmään ( D )

† =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen terveiden harjoittelijoiden ryhmään ( T )

Nro. =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman käsittelyn toiseen aikapisteeseen ( nro. )

KUVIO 7. Keskimääräiset painon muutokset (%) eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Eri aikapisteet on yhdistetty ryhmissä C, T, D ja DT.

## 8.2 Seerumin glukoosipitoisuus



TME = tilastollisesti merkitsevä ero, KA = keskiarvo, KH = keskihajonta

\* =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen kontrolliryhmään ( C )

† =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen terveiden harjoittelijoiden ryhmään ( T )

Nro. =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman käsittelyn toiseen aikapisteeseen ( nro. )

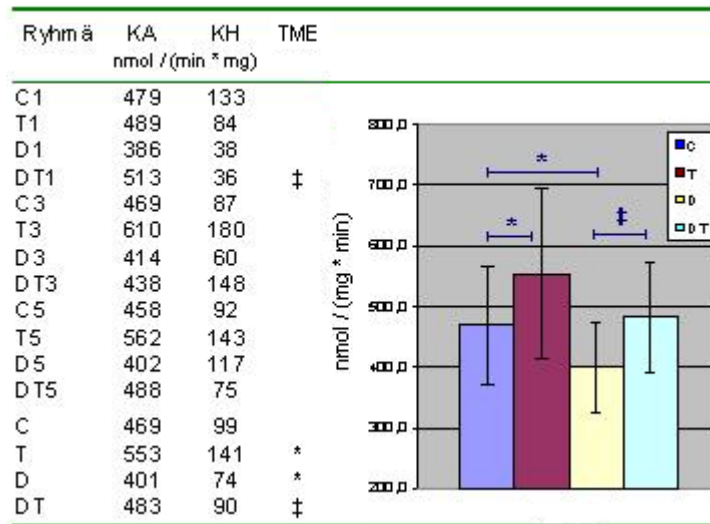
KUVIO 8. Seerumin glukoosipitoisuus eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Eri aikapisteet on yhdistetty ryhmissä C, T, D ja DT.

Ryhmiä D ja DT seerumin glukoosipitoisuudet olivat merkitsevästi ( $P < 0,001$ ) suurempia kuin ryhmissä C ja T ( $54,9 \pm 5,7$  ja  $50,5 \pm 6,8$  vs.  $10,3 \pm 1,5$  ja  $9,9 \pm 1,3$  mmol/l). Samanlaiset merkitsevät erot havaittiin tarkasteltaessa kaikkia aikapisteitä erikseen. Diabetesta sairastavilla harjoitelleilla hiirillä oli hieman matalampi seerumin glukoosipitoisuus kuin harjoittelemattomilla ( $50,5 \pm 6,8$  vs.  $54,9 \pm 5,7$  mmol/l). Ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ( $P = 0,07$ ). Merkitseviä eroja ei havaittu myöskään aikapisteittäisessä tarkastelussa. Ryhmässä DT5 seerumin glukoosipitoisuus oli merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) korkeampi kuin ryhmissä DT1 ja DT3 ( $56,7 \pm 4,7$  vs.  $48,6 \pm 6,0$  ja  $45,0 \pm 3,5$  mmol/l). Kaikkien ryhmien seerumin glukoosipitoisuudet näkyvät kuviossa 8.

## 8.3 Sitraattisyntaasin aktiivisuus ja mRNA:n määrä

Ryhmän D hiirten pohjekompleksin sitraattisyntaasiaktiivisuus oli kokeen lopussa merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) matalampi kuin ryhmällä C ( $401 \pm 74$  vs.  $469 \pm 99$  nmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>). Samanlainen ilmiö havaittiin tarkasteltaessa aikapisteitä erikseen. Erot eivät kuitenkaan olleet tilastollisesti merkitseviä. Sitraattisyntaasiaktiivisuus oli ryhmässä DT merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) suurempi kuin ryhmässä D ( $483 \pm 90$  vs.  $401 \pm 74$  nmol x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>). Saman-

lainen ero havaittiin kaikissa aikapisteissä. Ero oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä ( $P < 0,05$ ) vain ensimmäisessä aikapisteessä. Terveillä harjoitelleilla hiirillä oli merkitsevästi ( $P < 0,05$ ) korkeampi sitraattisyntaasiaktiivisuus kuin kontrollihiirillä ( $553 \pm 141$  vs.  $469 \pm 99$  nmol  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  mg<sup>-1</sup>). Ero havaittiin kaikissa aikapisteissä, mutta erot eivät olleet niissä tilastollisesti merkitseviä. Kaikkien ryhmien sitraattisyntaasiaktiivisuudet näkyvät kuviossa 9.



TME = tilastollisesti merkitsevä ero, KA = keskiarvo, KH = keskihajonta

\* =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen kontrolliryhmään ( C )

‡ =  $P < 0,05$ , verrattaessa saman aikapisteen diabetesryhmään ( D )

KUVIO 9. Pohjekompleksin sitraattisyntaasiaktiivisuudet eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Eri aikapisteet on yhdistetty ryhmissä C, T, D ja DT.

Sitraattisyntaasin mRNA:n määrä oli kaikissa aikapisteissä diabetesryhmillä merkitsevästi ( $P > 0,9975$ ) matalampi kuin saman aikapisteen kontrolliryhmissä (taulukko 2). Ryhmissä DT1 ja DT5 mRNA:n määrä oli merkitsevästi ( $P < 0,0025$ ) suurempi kuin saman aikapisteen harjoitteleemattomissa ryhmissä (D1 ja D5). Viikon harjoitelleilla terveillä hiirillä oli pohjekompleksissaan sitraattisyntaasin mRNA:ta merkitsevästi ( $P < 0,0025$ ) enemmän kuin kontrolliryhmän hiirillä. Diabetesta sairastavilla hiirillä oli lihaksissaan kaikissa aikapisteissä pienempi sitraattisyntaasin aktiivisuus ja mRNA:n määrä kuin saman aikapisteen kontrollihiirillä. Aktiivisuuserot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Ryhmässä DT1 oli merkitsevästi suurempi sitraattisyntaasin aktiivisuus ja mRNA:n määrä kuin ryhmässä D1. Viikon harjoittelu lisäsi terveillä merkitsevästi sitraattisyntaasin mRNA:n määrää, mutta ei aktiivisuutta. Aktiivisuus nousi vasta kolmen ja viiden viikon harjoittelun jälkeen, mutta ei tilastollisesti merkitsevästi.

TAULUKKO 2. Sitraattisyntaasin aktiivisuudet ja mRNA:n määrät eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Aktiivisuudet ja mRNA-määrät on suhteutettu saman aikapisteen kontrolliryhmään.

<span style="color: orange;">■</span> Kasvanut tilastollisesti merkitsevästi suhteessa saman aikapisteen kontrolliin	<span style="color: orange;">■</span> Suhde saman aikapisteen kontrolliin $\geq 1,1$
<span style="color: green;">■</span> Laskenut tilastollisesti merkitsevästi suhteessa saman aikapisteen kontrolliin	<span style="color: green;">■</span> Suhde saman aikapisteen kontrolliin $\leq 0,9$
<span style="color: yellow;">■</span> Kasvanut tilastollisesti merkitsevästi vertailussa DT vs. D	

	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
Aktiivisuus	0,81	0,88	0,88	1,07	0,93	1,06	1,02	1,30	1,22
mRNA:n määrä	0,73	0,80	0,75	0,97	0,90	0,96	1,31	1,07	0,98

## 8.4 Energiametaboliaan ja signaalointiin liittyvien geenien ilmeneminen mRNA-tasolla

### 8.4.1 Ilmenneiden geenien sekä geenien ilmenemismuutosten lukumäärät eri toiminnallisissa ryhmissä

Käytetyllä mikrolastulla (Affymetrix MG U74v2) oli 12488 koetinsarjaa. Näistä 5531 havaitsi (läsnä/ilmeni vähintään kolmessa näytteessä) kohteena olleen mRNA-molekyylin (taulukko 3). Geenien ilmeneminen muuttui 3044:ssä geenissä. Geenien ilmenemisen laskettiin muuttuneen, kun jossakin suoritetuista vertailuista oli muutos, jonka *P*-arvo oli yli 0,9975 tai alle 0,0025 ja  $\log_2(\text{näyte1/näyte2})$  oli yli 0,3 tai alle -0,3. Lastun koetinsarjoista 870 mittasi energiametaboliaan liittyvien geenien ilmenemistä. Näistä geneistä ilmeni 412. Geenien ilmeneminen muuttui 276:ssa kohteessa. Energiametaboliaan liittyvät geenit jakautuivat seuraaviin toiminnallisiin pääryhmiin: glukoosimetabolia, lipidimetabolia, proteiinimetabolia ja ATP:n tuotto. Mikrolastun koetinsarjoista otettiin tarkasteluun 89 koetinsarjaa, jotka tunnistivat glukoosimetabolian geenien mRNA-molekyylejä. Näistä ilmeni 50 geeniä. Ilmeneminen muuttui 38:ssa eri geenissä. Lipidimetabolian geenien mRNA-molekyyleistä ilmeni 65/145, joista 44:n ilmeneminen muuttui. Proteiinimetaboliaan liittyviä genejä oli tarkastelussa 513, joista ilmeni 206. Ilmeneminen muuttui 117:ssä geenissä. ATP:n tuottoon liittyvien geenien mRNA-molekyyleistä ilmeni 91/123. Ilmeneminen muuttui 77:ssä. Tutkimuksessa oli mukana 569 signaalointiin liittyvää geeniä. Näistä ilmeni 176. Ilmeneminen muuttui 93:ssa. Toiminnalliset pääryhmät jakautuivat alaryhmiin. Alaryhmät ja niiden tulokset näkyvät taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Yhteenvedo sellaisten geenien lukumääristä eri toiminnallisissa ryhmissä, joiden geenien ilmenemisessä havaittiin muutoksia (merkittävä ero ja  $\log_2(\text{näytteiden suhde}) \geq +0,3$  tai  $\leq -0,3$ ) vähintään yhdessä vertailussa (D vs. C, DT vs. C, T vs. C ja DT vs. D).

	Kaikki	Ilmenneet	Muuttuneet
Koko lastu	12488	5531	3044
Energiametabolia	870	412	276
Muut	11618	5119	2768
GLUKOOSIMETABOLIA	89	50	38
Glukoosin kuljetus	14	5	2
Glykolyysi	38	21	19
Pyruvaattidehydrogenaasi	7	4	4
Glukoneogeneesi	10	2	1
Glykogeeni synteesi	11	11	6
Glykogenolyysi	4	3	3
Glukoosimetabolian säätely	5	4	3
LIPIDIMETABOLIA	145	65	44
Lipidien hajotus	70	36	22
Lipidien kuljetus	57	21	14
Beta-oksidaatio	13	10	8
Rasvahappojen synteesi	18	8	8
PROTEIINIMETABOLIA	513	206	117
Proteiinien hajotus	451	188	103
Aminohappojen kuljetus	21	3	2
Aminohappojen hajotus	41	15	12
ATP:N TUOTTO	123	91	77
Sitruunahappokierto	18	15	14
Oksidatiivinen fosforylaatio	93	70	57
Kreatiiniкинаasi	8	4	4
Adenylaattikinaasi	4	2	2
SIGNALOINTI	569	176	93
Insuliinin signaalintireitit	103	47	30
MAPK-signaaliointi	115	58	34
G-proteiinisignaaliointi	357	73	29

#### 8.4.2 Geenien ilmenemismuutosten lukumäärät ja suunnat eri toiminnallisissa ryhmissä

*Kaikki mikrolastun geenit.* Geenien ilmenemismuutosten lukumäärät ja suunnat eri toiminnallisissa ryhmissä näkyvät taulukossa 4. Diabetes lisäsi (D vs. C) useamman geenin ilmenemistä kuin laski, kun tarkasteltiin kaikkia mikrolastun genejä. Nousseiden ja laskeneiden ilmenemisten ero oli suurin ensimmäisessä aikapisteessä. Tässä aikapisteessä diabetes lisäsi 978:n ja laski 487:n geenin ilmenemistä verrattuna kontrolliin. Harjoittelevien diabetesryhmien geenien ilmenemisessä oli vähemmän eroja verrattuna kontrolliin kuin harjoittelemattomilla. Harjoittelu laski diabetesryhmissä useamman geenin ilmenemistä kuin nosti. Harjoittelu aiheutti diabetesryhmissä useampien geenien ilmenemismuutoksia kuin terveillä. Viikon harjoittelu lisäsi terveillä geenien ilmenemistä enemmän kuin laski (256 vs. 105). Kolmen ja viiden viikon harjoittelu laski terveillä useamman geenin ilmenemistä kuin nosti.

*Energiametaboliaan liittyvät geenit.* Diabetes laski kaikissa aikapisteissä useamman energiametabolian geenin ilmenemistä kuin nosti. Harjoitelleilla diabetesryhmillä oli geenien ilmenemisessä vähemmän eroja kontrolliin kuin harjoittelemattomilla. Harjoittelu aiheutti diabetesta sairastaville ryhmille enemmän geenien ilmenemisen muutoksia (DT vs. D) kuin terveille (T vs. C). Harjoittelu nosti diabetesryhmissä geenien ilmenemistä enemmän kuin laski. Ero oli selvin ensimmäisessä aikapisteessä (82 vs. 26). Viikon harjoittelu lisäsi terveillä geenien ilmenemistä enemmän kuin laski (41 vs. 5). Myöhäisemmissä aikapisteissä geenien ilmeneminen oli laskenut useammin kuin noussut. Muutosten määrä oli näissä aikapisteissä vähäisempi kuin ensimmäisessä.

TAULUKKO 4. Eri toiminnallisiin ryhmiin kuuluvien geenien ilmenemisen muutosten lukumäärät ja suunnat eri vertailuissa ja aikapisteissä.

- Muutosten lukumäärä on vähintään 50 % kyseisessä toiminnallisessa ryhmässä ilmenneiden geenien lukumäärästä  
 ■ 1. Muutosten lukumäärä on 5-9 ja lukumäärän suhde ylös- ja alaspäin muuttuneiden summaan samassa käsittelyssä ja aikapisteessä on vähintään 0,8 tai  
 2. Muutosten lukumäärä on vähintään 10 ja lukumäärän suhde ylös- ja alaspäin muuttuneiden summaan samassa käsittelyssä ja aikapisteessä on yli 0,65

Vertailu Aikapiste (vko.)	D vs. C						DT vs. C						T vs. C						DT vs. D						
	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓			
Koko lastu	978	487	739	554	758	653	523	226	481	378	523	594	256	105	66	132	43	127	297	448	127	209	394	577	
Energiametabolia	60	102	44	114	49	101	36	31	28	77	33	85	41	5	4	9	5	10	82	26	18	10	41	31	
Muut	918	385	695	440	709	552	487	195	453	301	490	509	215	100	62	123	38	117	215	422	109	199	353	546	
GLUKOOSIMETABOLIA	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
Glukoosin kuljetus	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Glykolyysi	2	9	1	13	1	9	1	1	0	6	1	5	3	1	0	0	0	1	8	1	1	0	2	1	
Pyruvaattidehydrogenaasi	1	3	1	3	1	2	1	1	0	2	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	
Glukoneogeneesi	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Glykogeensynteesi	4	1	3	1	4	2	2	1	4	1	2	1	1	0	0	0	0	0	1	3	1	0	2	1	
Glykogenolyysi	0	1	0	2	0	3	0	0	0	1	0	2	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	
Glukoosimetabolian säätely	0	1	0	1	0	2	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
LIPIDIMETABOLIA	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
Rasvahappojen synteesi	12	8	13	10	9	15	11	4	8	8	11	11	14	0	1	2	1	1	5	4	1	3	8	4	
Lipidien hajotus	0	5	1	5	1	5	0	3	0	5	1	6	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	1	
Beta-oksidaatio	7	3	5	4	4	8	8	1	4	3	6	3	11	0	1	1	0	0	2	2	1	1	4	1	
Proteiinimetabolia	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
Proteiinien hajotus	38	20	24	22	32	27	20	7	13	15	17	29	6	4	2	4	2	7	12	18	4	6	12	22	
Aminohappojen kuljetus	33	19	21	17	25	23	17	7	9	14	12	25	4	4	2	4	2	7	10	15	4	6	11	21	
Aminohappojen hajotus	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
ATP:N TUOTTO	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
Sitruunahappokierto	2	58	0	61	1	40	0	17	0	42	1	33	13	0	1	1	2	0	51	0	11	0	15	2	
Oksidatiivinen fosforylaatio	1	10	0	12	0	11	0	0	0	5	1	7	4	0	0	1	0	0	11	0	3	0	5	0	
Kreatiiniinaasi	1	43	0	45	1	24	0	16	0	34	0	22	8	0	0	0	0	36	0	6	0	7	2		
Adenylaattikiinaasi	0	4	0	3	0	3	0	0	0	2	0	3	1	0	1	0	2	0	3	0	2	0	3	0	
SIGNALOINTI	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
Insuliinin signalointireitit	0	1	0	1	0	2	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	6	0	2	7
MAPK-signalointi	15	3	8	4	6	11	10	1	8	5	8	7	5	0	3	1	4	1	4	5	2	3	9	4	
G-proteiinisolointi	6	3	7	3	4	7	2	3	5	2	6	3	1	0	0	1	0	1	3	4	1	0	7	4	

*Glukoosimetaboliaan liittyvät geenit.* Diabetes laski kaikissa aikapisteissä useamman glykolyysiin liittyvän geenin ilmenemistä kuin nosti. Harjoitelleissa diabetesryhmissä oli vähemmän glykolyysin geenien ilmenemisen laskuja verrattuna kontrolliin kuin harjoittelemattomilla. Viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmällä kahdeksan geenin ja laski vain yhden geenin ilmenemistä. Terveillä viikon harjoittelu lisäsi vain kolmen glykolyysiin geenin

ilmenemistä ja laski yhden. Diabetes laski yleisesti (vähintään 50 % ilmenneistä geneistä) pyruvaattidehydrogenaasikompleksin geenien ilmenemistä verrattuna kontrolliin. Harjoittelu ei vaikuttanut terveillä ja diabetesta sairastavilla yleisesti pyruvaattidehydrogenaasikompleksin geenien ilmenemiseen. Glykogeenisynteesiin liittyvien geenien ilmeneminen oli diabetesryhmissä (D1, D3 ja D5) useammin noussut kuin laskenut verrattaessa kontrolliryhmiin. Diabetes laski yleisesti glykogenolyysiin liittyvien geenien ilmenemistä kahdessa viimeisessä aikapisteessä. Laskeneiden geenien ilmenemisten määrä oli matalampi harjoitelleissa diabetesryhmissä kuin harjoittelemattomissa ryhmissä. Viikon harjoittelu nosti terveillä ja diabetesta sairastavilla ryhmillä kahden glykogenolyysiin liittyvän geenin ilmenemistä.

*Lipidimetaboliaan liittyvät geenit.* Diabetes lisäsi useamman rasvahapposynteesiin liittyvän geenin ilmenemistä kuin laski. Viikon kestänyt diabetes nosti seitsemän lipidien hajotukseen liittyvän geenin ilmenemistä ja laski kolmen. Viiden viikon diabetesryhmässä nousseita oli neljä ja laskeneita kahdeksan. Ryhmässä DT5 oli vähemmän geenien ilmenemisen laskuja kuin ryhmässä D5 (3 vs. 8), kun ilmenemisiä verrattiin ryhmään C5. Viiden viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmällä neljän ja laski yhden lipidien hajotukseen liittyvän geenin ilmenemistä, kun verrattiin ryhmään D5. Viikon harjoittelu lisäsi terveillä 11:n em. ryhmään kuuluvan geenin ilmenemistä. Pidempien harjoitusjaksojen jälkeen saman laajuista vaikutusta ei enää havaittu. Lipidien kuljetukseen liittyvien geenien ilmeneminen oli diabetesryhmissä useammin noussut kuin laskenut. Nousseiden ja laskeneiden ero oli suurin ryhmissä D1 ja D3. Laskeneiden geenien ilmenemisten lukumäärä oli harjoitelleissa diabetesryhmissä DT1 ja DT3 pienempi kuin vastaavissa harjoittelemattomissa ryhmissä.

*Proteiinimetaboliaan liittyvät geenit.* Harjoittelevilla diabetesryhmillä oli vähemmän muutoksia proteiinien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemisessä kuin harjoittelemattomilla, kun verrattiin kontrolliryhmien geenien ilmenemiseen. Viiden viikon harjoittelu laski diabetesryhmällä proteiinien hajotuksen geenien ilmenemistä enemmän kuin nosti (21 vs. 11), kun verrattiin ryhmään D5. Harjoittelu aiheutti diabetesryhmissä enemmän proteiinien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemismuutoksia kuin terveiden ryhmissä. Aminohappojen kuljetusproteiinien geenien ilmeneminen oli kasvanut (2 geeniä, 67% ilmenneistä) harjoitelleissa ja harjoittelemattomissa diabetesryhmissä verrattuna kontrolliryhmiin.

*ATP:n tuottoon liittyvät geenit.* Diabetes laski kaikissa aikapisteissä sitruunahappokierron, oksidatiivisen fosforylaation, kreatiinikinaasin ja adenylaattikinaasin geenien ilmenemistä.



Kaikissa harjoitelleissa diabetesryhmissä oli vähemmän sitruunahappokierron ja oksidatiivisen fosforylaation geenien ilmenemisen laskuja kuin harjoittelemattomissa ryhmissä, kun verrattiin kontrolliryhmiin. Kreatiinikinaasin geenien ilmenemisen laskut vähenivät vain niissä ryhmissä, jotka harjoittelivat yhden viikon tai kolme viikkoa. Harjoittelu lisäsi kaikissa diabetesryhmissä sitruunahappokierron, oksidatiivisen fosforylaation ja kreatiinikinaasin geenien ilmenemistä (DT vs. D). Adenylaattikinaasin geenin ilmeneminen oli lisääntynyt vain viikon harjoittelun jälkeen. Harjoittelu vaikutti terveillä vähemmän em. geenien ilmenemiseen kuin diabetesta sairastavilla. Viikon harjoittelu lisäsi terveillä neljän sitruunahappokierron, kahdeksan oksidatiivisen fosforylaation ja yhden kreatiinikinaasin geenin ilmenemistä. Pidempien harjoitusjaksojen jälkeen selviä muutoksia oli tapahtunut vain kreatiinikinaasin geenin ilmenemisessä. Viiden viikon harjoittelu lisäsi kahden kreatiinikinaasin geenin ilmenemistä.

*Signaloinnin geenit.* Diabetes lisäsi viikon ja kolmen viikon aikapisteissä kaikissa tutkituissa signaalointireiteissä geenien ilmenemistä enemmän kuin laski (D vs. C). Insuliinisignaloinnin geenien ilmeneminen oli harjoitelleilla diabetesryhmillä noussut selvästi enemmän kuin laskenut, kun verrattiin kontrolliryhmiin. Signaalointiin liittyvien geenien ilmeneminen oli noussut useammin kuin laskenut, kun verrattiin ryhmän DT5 geenien ilmenemistä ryhmään D5. Harjoittelu lisäsi terveillä kaikissa aikapisteissä useampien MAPK-signaloinnin geenien ilmenemistä kuin laski.

### 8.4.3 Geenikohtaiset ilmenemismuutokset

Taulukoissa 5-9 esitetään geneittäin miten ilmeneminen muuttuu eri käsittelyissä ja aikapisteissä. Geenien ilmenemisen muutokseksi laskettiin näissä taulukoissa kuten kaikissa aikaisemmissakin sellaiset muutokset, joissa muutoksen  $P$ -arvo oli yli 0,9975 tai alle 0,0025 ja  $\log_2(\text{näyte1/näyte2})$  on yli 0,3 tai alle  $-0,3$ . Näytteiden geenien ilmenemisen määrät esitetään taulukoissa suhteessa oman aikapisteen kontrollinäytteeseen. Tilastollisesti merkitsevät muutokset ilmaistaan taulukoissa omilla väreillään seuraavasti:

- Geenin ilmeneminen on suurempi kuin saman aikapisteen ryhmässä C
- Geenin ilmeneminen on pienempi kuin saman aikapisteen ryhmässä C
- Geenin ilmeneminen on muuttunut vertailussa DT vs. D päinvastaiseen suuntaan kuin vertailussa D vs. C (jos voimassa, muiden vertailujen värejä ei näytetä)
- Geenin ilmeneminen on suurempi ryhmässä DT kuin D
- Geenin ilmeneminen on pienempi ryhmässä DT kuin D

Taulukoihin 5-8 on kerätty samanlaisen muutosprofiilin omaavia genejä. Taulukossa 5 ovat ne geenit, joiden ilmenemistä diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä ja harjoittelu laski vähintään yhdessä aikapisteessä. Tällaisia genejä löytyi 23 kappaletta. Taulukossa 6 ovat ne geenit, joiden ilmenemistä diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä eikä harjoittelu laskenut missään aikapisteessä. Tässä taulukossa on viisi geneä. Taulukossa 7 esitetään sellaiset geenit (45 kpl), joiden ilmenemistä diabetes laski kaikissa aikapisteissä ja harjoitus nosti vähintään yhdessä aikapisteessä. Ne geenit, joiden ilmenemistä diabetes laski, eikä harjoittelu nostanut, ovat taulukossa 8. Tällaisia genejä oli tutkituista kuusi. Liitteessä 3 esitetään ne geenit, joiden ilmenemistä terveiden hiirten harjoittelu lisäsi (58 kpl). Harjoittelu laski terveillä hiirillä 22:n geenin ilmenemistä. Kyseisten geenien ilmenemismuutokset esitetään liitteessä 4. Taulukkoon 9 on kerätty sellaisia energiametabolian kannalta tärkeitä genejä, joiden ilmeneminen muuttui diabeteksen vaikutuksesta. Kyseiset geenit eivät näkyneet edellisissä taulukoissa, koska diabetes ei muuttanut näiden geenien ilmenemistä kaikissa aikapisteissä samaan suuntaan.

TAULUKKO 5. Geenit, joiden ilmenemistä diabetes lisäsi (merkittävä ero ja  $\log_2 D/C \geq +0,3$ ) kaikissa aikapisteissä ja harjoittelu laski (merkittävä ero ja  $\log_2 DT/D \leq -0,3$ ) vähintään yhdessä aikapisteessä.

Accession no.	Gene / Protein	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
GLUCOSE METABOLISM										
AW049730	glycogenin 1	2,30	1,41	1,52	1,32	1,52	1,23	1,00	0,93	0,87
AV357306	glycogenin 1	1,63	1,23	1,23	1,23	1,41	1,15	0,93	0,93	0,93
J05277	hexokinase 1	1,41	1,32	1,52	1,00	1,15	1,23	1,00	0,93	0,81
U89924	PTG (Protein targeting to glycogen)	2,83	1,41	1,63	2,14	1,63	2,14	1,07	1,07	1,00
AJ001418	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	1,63	1,52	1,52	1,52	0,93	1,15	1,32	0,38	0,50
LIPID METABOLISM										
U49915	adipocyte complement related protein	2,30	1,87	4,00	3,73	3,25	3,03	1,07	1,32	1,00
D00466	apolipoprotein E	1,41	3,25	1,74	1,32	1,63	2,83	1,41	0,87	0,93
A1837005	carnitine deficiency-associated gene expressed in ventricle 3	1,41	1,32	1,41	1,07	1,15	1,15	1,00	0,87	0,87
A1840013	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase	1,87	1,32	1,32	1,52	1,07	1,32	1,32	1,00	0,87
PROTEIN METABOLISM										
X04673	adipsin	4,60	2,30	8,57	3,73	3,25	6,50	1,63	1,52	2,30
AJ130977	ariadne	1,74	1,41	1,23	1,32	1,15	1,32	1,00	1,00	0,93
X06086	cathepsin L	2,00	3,03	1,41	1,63	1,52	1,74	1,07	0,93	1,07
X64837	ornithine aminotransferase	1,32	1,32	1,41	1,07	1,32	1,52	1,07	0,93	0,93
A1839158	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	1,87	1,41	1,52	1,52	1,32	1,15	1,15	1,07	0,93
A1836676	proteasome (prosome, macropain) 20S subunit, alpha type 7	2,00	1,32	1,41	1,52	1,32	1,23	1,07	1,00	0,87
AW045339	proteasome (prosome, macropain) 20S subunit, beta type 3	1,52	1,41	1,32	1,32	1,32	1,41	1,15	1,15	0,81
AF037206	ring finger protein 13	1,23	1,52	1,52	1,15	1,07	1,32	0,81	0,93	1,07
U13174	solute carrier family 12, member 2	1,52	1,41	1,41	1,41	1,41	1,23	1,00	1,07	0,93
AA795541	solute carrier family 38, member 4	2,00	1,32	1,41	1,52	1,32	1,32	0,93	1,15	1,07
INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALLING PATHWAYS										
M32490	cysteine rich protein 61	1,87	2,46	1,52	1,87	1,52	1,23	1,41	0,93	0,66
U28656	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	5,66	2,83	2,14	3,73	2,46	2,64	1,32	0,81	0,93
D29802	guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1	1,74	1,52	1,74	1,32	1,41	1,32	1,00	1,00	0,93
A1845732	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	2,83	2,00	1,23	2,14	1,74	1,74	1,23	1,00	1,00

TAULUKKO 6. Geenit, joiden ilmenemistä diabetes lisäsi (merkittävä ero ja  $\log_2 D/C \geq +0,3$ ) kaikissa aikapisteissä, eikä harjoittelu laskenut (ei merkittävää eroa ja/tai  $\log_2 DT/D > -0,3$ ) missään aikapisteessä.

Accession no.	Gene / Protein	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
GLUCOSE METABOLISM										
D42083	fructose bisphosphatase 2	1,87	1,63	1,52	1,63	1,41	2,00	1,63	1,32	1,00
LIPID METABOLISM										
AF030343	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	1,41	1,23	1,15	1,32	1,23	1,23	1,32	0,93	0,87
PROTEIN METABOLISM										
U96635	NEDD4	1,63	1,52	1,23	1,41	1,52	1,15	1,32	1,07	1,00
D49686	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	2,00	1,32	1,15	1,74	1,32	1,15	1,23	0,93	1,00
INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALING PATHWAYS										
X57277	RAS-related C3 botulinum substrate 1	1,41	1,23	1,32	1,32	1,32	1,32	1,07	1,15	1,07

TAULUKKO 7. Geenit, joiden ilmenemistä diabetes laskee (merkittävä ero ja  $\log_2 D/C \leq -0,3$ ) kaikissa aikapisteissä ja harjoittelu lisäsi (merkittävä ero ja  $\log_2 DT/D \geq +0,3$ ) vähintään yhdessä aikapisteessä.

Accession no.	Gene / Protein	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
GLUCOSE METABOLISM										
X98848	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 1	0,38	0,62	0,47	0,76	0,66	0,54	1,15	1,15	1,00
AF080469	glucose-6-phosphatase, transport protein 1	0,31	0,35	0,38	0,57	0,62	0,44	0,93	0,87	1,07
AF029843	phosphoglycerate mutase 2	0,38	0,54	0,57	0,76	0,66	0,71	1,15	1,07	1,07
J03293	phosphorylase kinase gamma	0,57	0,57	0,66	0,93	0,62	0,62	1,23	0,71	0,93
AV368209	pyruvate kinase, muscle	0,62	0,62	0,66	0,81	0,71	0,66	0,93	0,93	0,93
M23383	GLUT4	0,50	0,66	0,50	0,87	0,76	0,62	1,07	1,15	1,07
L31777	triosephosphate isomerase	0,66	0,76	0,81	0,93	0,87	0,87	1,15	1,07	1,07
LIPID METABOLISM										
A1849803	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1	0,66	0,66	0,76	0,81	0,76	0,76	1,07	1,07	1,07
AV327760	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	0,38	0,62	0,66	0,62	0,57	0,66	0,87	1,00	1,00
M26270	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	0,35	0,47	0,54	0,62	0,66	0,71	1,00	1,00	1,07
PROTEIN METABOLISM										
X61232	carboxypeptidase E	0,33	0,57	0,57	0,62	0,54	0,54	0,93	0,76	1,00
X61232	carboxypeptidase E	0,35	0,50	0,57	0,54	0,54	0,50	1,00	0,76	1,00
AW060750	glutathione transferase zeta 1 (maleylacetoacetate isomerase)	0,62	0,71	0,76	0,87	0,76	0,76	0,93	1,00	1,00
AW228316	RIKEN cDNA 2310046G15 gene	0,50	0,62	0,62	0,66	0,57	0,57	1,07	0,87	1,07
TRICARBOXYLIC ACID CYCLE, ELECTRON TRANSPORT CHAIN AND ATP SYNTHESIS										
AJ010108	adenylate kinase 1	0,50	0,62	0,76	0,76	0,71	0,76	1,07	1,07	1,07
U59282	ATP synthase E subunit pseudogene	0,62	0,62	0,71	0,87	0,87	0,81	1,23	0,87	1,00
L01062	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1	0,62	0,76	0,81	0,81	0,87	0,87	1,00	1,07	1,07
A1849767	ATP synthase, mitochondrial F1 complex, O subunit	0,66	0,66	0,71	0,93	0,81	0,87	1,23	1,15	1,07
AW125431	citrate synthase	0,71	0,76	0,71	1,00	0,93	0,93	1,32	1,07	1,07
AV250974	creatine kinase, mitochondrial 2	0,31	0,31	0,41	0,87	0,54	0,62	1,23	1,15	1,23
A1181132	creatine kinase, mitochondrial 2	0,41	0,50	0,54	0,87	0,76	0,76	1,15	1,23	1,23
X53157	cytochrome c oxidase, subunit Vb	0,66	0,66	0,66	0,93	0,76	0,81	1,07	1,07	1,07
AF037370	cytochrome c oxidase, subunit VIIa 1	0,35	0,35	0,54	0,71	0,57	0,66	1,07	1,07	1,07
AW121892	cytochrome c-1	0,54	0,71	0,71	0,76	0,76	0,81	1,15	1,07	1,07
A1835446	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	0,54	0,47	0,47	1,00	0,66	0,71	1,32	1,15	1,23
X07295	malate dehydrogenase, mitochondrial	0,62	0,66	0,71	0,81	0,76	0,87	1,07	1,00	1,07
A1844890	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	0,62	0,76	0,54	0,87	0,93	0,81	1,00	1,07	1,07
A1853855	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8	0,71	0,66	0,71	0,93	0,76	0,76	1,15	1,07	1,15
A1845121	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8	0,71	0,71	0,81	0,93	0,76	0,87	1,23	1,00	1,07
A1848871	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	0,62	0,54	0,57	0,93	0,71	0,81	1,23	1,15	1,15
A1851810	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7	0,57	0,62	0,71	0,87	0,66	0,76	0,93	1,00	1,07
A1840263	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1	0,47	0,57	0,76	0,76	0,66	0,76	1,07	1,07	1,00
A1835051	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	0,57	0,62	0,66	0,81	0,76	0,66	1,23	1,07	1,07
AA590675	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4	0,47	0,54	0,71	0,81	0,66	0,87	1,32	1,07	1,15
A1835718	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	0,62	0,71	0,66	0,81	0,87	0,81	1,15	0,87	0,87
AA674669	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	0,66	0,76	0,81	0,87	0,87	0,93	1,15	1,23	1,15
AW121091	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein	0,66	0,62	0,62	0,81	0,76	0,71	1,07	1,00	1,00
AF058955	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	0,57	0,71	0,81	0,76	0,76	0,76	0,93	0,93	0,93
AF058955	succinate-Coenzyme A ligase, ADP-forming, beta subunit	0,50	0,71	0,71	0,71	0,81	0,71	0,93	0,87	0,81
AW125380	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	0,54	0,62	0,66	0,87	0,81	0,81	1,15	1,15	1,07
A1842835	ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2	0,62	0,62	0,71	0,93	0,66	0,76	1,15	1,07	1,07
A1853523	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit	0,66	0,62	0,81	0,87	0,76	0,87	1,23	1,07	1,07
INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALING PATHWAYS										
L12447	insulin-like growth factor binding protein 5	0,25	0,38	0,50	0,47	0,38	0,47	0,87	1,07	1,23
A1595996	myocyte enhancer factor 2C	0,62	0,54	0,38	1,00	0,50	0,47	1,63	1,32	1,52
AJ250489	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	0,35	0,47	0,54	0,54	0,50	0,57	0,81	0,87	1,07

TAULUKKO 8. Geenit, joiden ilmenemistä diabetes laski (merkittävä ero ja  $\log_2 D/C \leq -0,3$ ) kaikissa aikapisteissä, eikä harjoittelu lisännyt(ei merkittävä eroa ja/tai  $\log_2 DT/D < +0,3$ ) missään aikapisteessä.

Accession no.	Gene / Protein	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
GLUCOSE METABOLISM										
AW124813	dihydroliipoamide S-acetyltransferase (E2 component of PDH complex)	0,47	0,62	0,62	0,66	0,71	0,62	0,93	1,07	1,00
AW125336	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	0,66	0,71	0,81	0,87	0,81	0,76	1,15	1,00	1,00
LIPID METABOLISM										
M21285	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0,35	0,62	0,62	0,44	0,54	0,76	1,15	0,87	1,52
M21285	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0,41	0,50	0,50	0,57	0,44	0,54	1,15	0,93	1,15
PROTEIN METABOLISM										
AB024427	ring finger protein 11	0,62	0,66	0,81	0,66	0,76	0,66	0,76	0,87	0,93
INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALLING PATHWAYS										
Z50013	C-H-Ras.	0,57	0,66	0,76	0,81	0,71	0,76	0,87	0,93	0,81

TAULUKKO 9. Tuloksia täydentävät geenit, joiden ilmenemistä diabetes ei muuttanut kaikissa aikapisteissä samaan suuntaan.

Accession no.	Gene / Protein	D1	D3	D5	DT1	DT3	DT5	T1	T3	T5
GLUCOSE METABOLISM										
Y11666	hexokinase 2	0,81	0,57	0,62	0,93	0,76	0,71	1,23	1,15	1,07
A1852672	phosphofruktokinase, muscle	0,76	0,81	0,71	0,93	0,87	0,81	1,15	1,07	1,07
M17516	lactate dehydrogenase 1, A chain	0,66	0,76	0,93	0,81	0,76	0,87	1,00	1,15	1,07
X51905	lactate dehydrogenase 2, B chain	0,76	0,76	0,76	0,93	0,87	0,87	1,32	0,93	1,15
LIPID METABOLISM										
M63335	lipoprotein lipase	1,00	0,87	0,66	1,32	0,87	0,87	1,52	1,23	1,52
X14961	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	1,41	1,15	1,41	1,15	1,00	1,52	1,63	0,93	1,00
U01170	carnitine palmitoyltransferase 2	0,81	0,76	0,76	1,00	0,87	0,71	1,15	1,07	0,93
U96116	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type II	1,07	1,07	1,23	1,15	1,00	1,32	1,32	1,07	1,00
D29639	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0,76	0,76	0,71	0,81	0,87	0,81	1,15	0,93	1,07
PROTEIN METABOLISM										
L47335	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha	0,87	0,76	0,66	1,00	0,87	0,76	1,32	0,93	1,07
AF043070	branched chain ketoacid dehydrogenase kinase	0,81	0,76	0,62	1,00	0,87	0,76	1,15	1,07	1,07

## 9 POHDINTA

Kaikkien diabetesta sairastavien hiirten seerumin glukoosipitoisuus oli vähintään nelinkertainen verrattuna terveisiin. Tämän lisäksi diabetesryhmiin kuuluvien hiirten paino putosi kokeen aikana keskimäärin 21 prosenttia. Seerumin korkea glukoosipitoisuus ja hiirten suuri painonmenetykset olivat selviä merkkejä siitä, että streptozotosiini oli tuhonnut hiirten haiman  $\beta$ -solut ja aiheuttanut näin tyypin 1 diabeteksen kaltaisen tilan. Sitraattisyntaasin aktiivisuus oli sekä terveillä että sairailta harjoitelleilla hiirillä korkeampi kuin vastaavilla harjoittelemattomilla hiirillä, kun kaikkien eri aikapisteiden hiiriä käsiteltiin yhtenä ryhmänä. Yksittäisissä aikapisteissä erot olivat saman suuntaisia, mutta eivät tilastollisesti merkitseviä. Harjoitteluohjelma oli siis ollut riittävä aiheuttamaan adaptaatiovaikutuksia, mutta entsyymiaktiivisuuksien hajonta oli yksittäisissä aikapisteissä liian suuri suhteessa vasteesseen ja hiirten määrään.

### 9.1 Glukoosimetabolia

Diabetes heikensi hiirten glukoositasapainoa eikä harjoittelulla ollut parantavaa vaikutusta. Saman ovat todenneet rotilla esim. Goodyear ym. (1988), Kainulainen ym. (1994a) ja Noble & Ianuzzo (1985). Diabetes laski GLUT4-glukoosinkuljetusproteiinin geenin ilmene- mistä (taulukko 7). Saman havaitsivat omassa tutkimuksessaan Yechoor ym. (2002). Vii- kon harjoittelu lisäsi diabetesryhmässä GLUT4:n geenin ilmenemistä. Diabeteksen ja har- joittelun aiheuttamat ilmenemismuutokset saattoivat vaikuttaa lihaksissa myös GLUT4- proteiinin määrään, sillä GLUT4:n määrää säädellään transkription säätelyn kautta (Neufer ym. 1993). Diabeteksen onkin havaittu vähentävän (Kainulainen ym. 1994 b, Nakai ym. 2002) ja harjoittelun lisäävän rottien raajalihasten GLUT4-pitoisuutta (Nakai ym. 2002). GLUT4 on lihassolujen tärkein glukoosinkuljetusproteiini, minkä takia proteiinilla on suuri vaikutus solujen glukoosinottoon. Lihassolukalvojen GLUT4-konsentraatio ei ole kuiten- kaan ainut glukoosinoton määrään vaikuttava tekijä, sillä lihassolukoostumuksella on myös merkittävä vaikutus. Kainulaisen ym. (1994b) tutkimuksessa diabetes laski kaikkien poh- jekompleksin osien GLUT4-konsentraatiota. Glukoosinotto muuttui kuitenkin vain soleuk- sessa ja gastrocnemiuksen valkoisessa osassa. Soleuksen glukoosinotto laski ja gastrocne- miuksen valkoisen osan nousi. Soleus koostuu pääasiassa hitaista oksidatiivisista lihasso-

luista (I) ja gastrocnemiuksen valkoinen osa nopeista glykolyyttisistä soluista (IIb). Glukoosinotto laskee siis sellaisissa lihaksissa, joissa ATP:a tuotetaan pääasiassa aerobisesti, ja lisääntyy sellaisissa lihaksissa, joissa suurin osa ATP:sta tuotetaan anaerobisesti. (Kainulainen ym. 1994b.) Raajalihakset adaptoituvat hoitamattomaan diabetekseen siten, että ne alkavat käyttää ATP:n tuottoon enemmän rasvahappoja. Rasvahappojen käyttöä lisäävät etenkin sellaiset lihakset ja lihasten osat, joiden lihassoluista suurin osa on tyyppiä I ja IIa. Rasvahappojen lisääntynyt käyttö johtuu todennäköisesti heikentyneestä glukoosinkäyttökyvystä sekä lisääntyneestä veren triglyseridipitoisuudesta. Kun hoitamaton diabetes jatkuu pitkään, lihasten on havaittu siirtyvän takaisin glukoosin käyttöön. Tämän ajatellaan johtuvan rasvavarastojen loppumisesta ja veren triglyseridipitoisuuden laskusta. Rasvavarastojen loppumisen jälkeen ATP:a tuotettiin pääasiassa tyyppiin IIb soluissa anaerobisen glykolyysin avulla. (Lawrence ym. 1986.) Kainulaisen ym. (1994b) havaitsemat diabeteksen aiheuttamat erisuuntaiset glukoosinoton muutokset eri lihassolukoostumuksen omaavissa lihaksissa tukevat Lawrence'n ym. (1986) havaintoja. Siirtyminen rasvahappojen käytöstä takaisin glukoosin käyttöön havaittiin Lawrence'n ym. (1986) tutkimuksessa, kun diabetes oli kestänyt 14 päivää. Tässä tutkimuksessa diabeteksen kesto oli yhdestä viikosta viiteen viikkoon eli on hyvin todennäköistä, että myös tämän tutkimuksen hiirten raajalihaksissa tapahtui edellä mainittuja ravintoaineiden käytön muutoksia.

Diabetes laskee kaikissa aikapisteissä useiden glykolyysin entsyymien geenien ilmenemistä, mikä voi olla yksi syy diabeteksessä havaittuun glukoosin käytön heikkenemiseen. Harjoitelleissa diabetesryhmissä oli pienempi lukumäärä glykolyysin geenien ilmenemisen laskuja verrattuna kontrolliin kuin harjoittelemattomilla. Viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmällä kahdeksan geenin ja laskee vain yhden geenin ilmenemistä. Harjoittelu näyttää siis normalisoivan diabeteksen aiheuttamia muutoksia. Tällä voi olla positiivinen vaikutus lihasten glukoosinkäyttökykyyn. Diabetes laskee heksokinaasi-2:n (HK-2) ja nosti heksokinaasi-1:n (HK-1) ilmenemistä. HK-2:n geenien ilmenemismuutokset näkyvät taulukossa 9 ja HK-1:n taulukossa 5. Diabetes laskee HK-2:n ilmenemistä myös Yechoor:in ym. (2002) tutkimuksessa. Harjoittelu ei vaikuttanut diabetesta sairastavilla HK-2:n ilmenemiseen, mutta laskee HK-1:n ilmenemistä aikapisteessä yksi viikko (DT1 vs. D1). Heksokinaasit katalysoivat glykolyysin ensimmäistä reaktiota, jossa glukoosi muutetaan glukoosi-6-fosfaatiksi. Reaktio liittyy glukoosin glykolyysiin ja estää sen poistumisen solusta. Heksokinaasi voi näin vaikuttaa solujen glukoosinoton määrään. HK-2 on herkkä hormonien säätelylle. Insuliini on yksi HK-2:een vaikuttavista hormoneista. Se aiheuttaa HK-2:n siirtymisen solukalvolle GLUT4:n läheisyyteen. Hormonien ei ole havaittu vaikuttavan HK-



Diabetes lisäsi hiirten raajalihaksessa fruktoosibisfosfaataasi-2:n (FBPaasi-2) mRNA:n määrää (taulukko 6). Saman havaitsivat omassa tutkimuksessaan Yeator ym. (2002). Harjoittelu ei vaikuttanut diabetesta sairastavilla geenin ilmenemiseen. FBPaasi-2 laskee fruktoosi-2,6-bisfosfaatin määrää (katso kuvio 10). Fruktoosi-2,6-bisfosfaatti lisää normaalisti fosforuktokinaasi-1:n (PFK-1) aktiivisuutta ja laskee fruktoosi-1,6-bisfosfaatin (FBPaasi-1) aktiivisuutta. Diabetes laskee kahdessa viimeisessä aikapisteessä PFK-1:n geenin ilmenemistä, mikä voi yhdessä lisääntyneen FBPaasi-2:n ilmenemisen kanssa laskea PFK-1:n aktiivisuutta. Diabetes voi näin vähentää glykolyysiä ja lisätä glukoneogeneesiä. Harjoittelu ei vaikuttanut FBPaasi-2:n eikä PFK-1:n ilmenemiseen. Diabetes laskee laktaattidehydrogenaasi-1:n (LDH-1) ja laktaattidehydrogenaasi-2:n (LDH-2) geenien ilmenemistä. Diabetes saattaa näin heikentää anaerobisen glykolyysin kapasiteettia.

Diabetes laskee pyruvaattidehydrogenaasikompleksin (PDH) geenien ilmenemistä. Saman ovat havainneet Yeator ym. (2002). Harjoittelu ei vaikuttanut geenien ilmenemiseen. Diabetes lisäsi pyruvaattidehydrogenaasikinaasin (PDK) ilmenemistä. Kolmen ja viiden viikon harjoittelu laskee geenin ilmenemistä. PDH:n geenien ilmenemismuutokset näkyvät taulukossa 8 ja PDK:n taulukossa 5. Diabeteksen on havaittu laskevan rottien gastrocneumiuksessa PDH:n kokonaismäärää sekä aktiivisen muodon määrää. Kestävyysharjoittelu lisäsi diabeetikoilla sekä entsyymien kokonaismäärää että aktiivisen muodon määrää. (Nakai ym. 2002.) PDH katalysoi reaktiota, jossa pyruvaatti muutetaan asetyylikoentsyymi-A:ksi ennen sitruunahappokiertoa siirtymistä. Entsyymikompleksi toimii tällä tavalla pyruvaatin hapetuksen nopeutta rajoittavana tekijänä. PDK inhiboi fosforyloimalla pyruvaattidehydrogenaasikompleksin (Sugden ym. 2003). Diabetes näyttää laskevan PDH:n aktiivisuutta laskemalla sen mRNA:n määrää sekä lisäämällä PDK:n mRNA:n ja mahdollisesti itse entsyymien määrää. Diabetes laskee rotilla raajalihaksen pyruvaatin hapetuskykyä (Ianuzzo ym 1974). Tämä johtuu mahdollisesti diabeteksen aiheuttamasta PDH-aktiivisuuden laskusta. Jos PDK:n aktiivisuus laskee harjoittelun seurauksena kuten sen mRNA:n määrä, harjoittelu lisää PDH:n aktiivisuutta. Kestävyysharjoittelu voi näin parantaa raajalihasten pyruvaatinhapetuskykyä.

Glukoosi-6-fosfaati-kuljetusproteiini-1:n (G6PT1) mRNA:n määrä oli diabetesta sairastavissa ryhmissä noin kolme kertaa pienempi kuin kontrolliryhmissä (taulukko 7). Harjoittelu lisäsi geenin ilmenemistä diabetesyhmissä DT1 ja DT3, kun verrattiin vastaavien aikapisteiden harjoittelemattomiin ryhmiin. G6PT1:stä tarvitaan glykokeenin synteesiin. Virhe kyseisen proteiinin geenissä aiheuttaa tyypin Ib glykokeenin varastoisairauden (Hiraiwa ym. 1999). Diabetes saattaa laskea G6PT1:n määrää hiirten raajalihaksissa, koska proteiinin mRNA:n määrä laskee selvästi (62-69 %). Jos näin on, raajalihasten glykokeeni-



synteesi heikkenee merkittävästi. Synteesin heikkenemistä tukee se, että diabetesta sairastavien rottien raajalihaksissa on havaittu olevan erittäin vähän glykogeenia. (Lawrence ym. 1986.) Harjoittelu saattaa lievittää glykogeenisynteesin häiriötä, koska harjoittelu lisäsi diabeetikoilla G6PT1:n mRNA:n määrää. Diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä glykogeniinin sekä PTG:n (protein targeting to glycogen) ilmenemistä sekä laski fosforylaasikinaasi-gamman ilmenemistä. Viikon harjoittelu aiheutti em. geenien ilmenemisessä vastakkaisen muutoksen kuin diabetes. Glykogeniini on glykogeenin synteesiin osallistuva tärkeä proteiini. PTG on proteiini joka liittyy glykogeenin synteesiin ja hajotukseen osallistuvat entsyymit glykogeeniin. PTG:n puute heikentää glykogeenisynteesiä. (Crosson ym. 2003.) Fosforylaasikinaasi-gamma on entsyymi, joka aktivoi glykogeenia hajottavan glykogeenifosforylaasin (s.14, kuvio 2). Diabeteksen aiheuttamat glykogeniinin ja PTG:n geenien ilmenemismuutokset parantaisivat proteiinitasolla glykogeenin synteesiä. Fosforylaasikinaasi-gamman aktiivisuuden lasku vähentäisi glykogeenin hajotusta. Glykogeniinin, PTG:n ja fosforylaasikinaasi-gamman geenien ilmenemismuutokset saattavat olla kompensatioreaktioita heikentyneelle glykogeenisynteesille, joka on aiheutunut G6PT1:n puutoksesta.

## 9.2 Lipidimetabolia

Viikon kestänyt diabetes lisäsi seitsemän lipidien hajotukseen liittyvän geenin ilmenemistä ja laski kolmen, kun verrattiin kontrolliryhmään. Viiden viikon diabetesryhmässä nousseita oli neljä ja laskeneita kahdeksan. Diabeteksen aiheuttamat muutokset viittaavat siihen, että raajalihakset pyrkivät ensimmäisessä aikapisteessä lisäämään lipidien hajotukseen liittyvien proteiinien määrää ja näin myös lipidien hajotuskykyä. Viimeisen aikapisteen lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemisen lasku heikensi todennäköisesti raajalihasten lipidienhajotuskykyä. Geenien ilmenemisen muutokset viittaavat siihen, että lihaksissa on tapahtunut ensimmäisen ja viimeisen aikapisteen välillä Lawrence:n ym. (1986) kuvaama siirtyminen rasvojen käytöstä glukoosin käyttöön. Harjoitelleessa viiden viikon diabetesryhmässä kuuden lipidien hajotukseen liittyvän geenin ilmeneminen nousi ja kolmen laski, kun verrattiin kontrolliin. Viiden viikon harjoittelu oli lisännyt diabetesryhmässä neljän geenin ilmenemistä ja laskenut yhden, kun verrattiin harjoittelemattomiin diabetesryhmiin. Näiden tulosten perusteella näyttää siltä, että harjoittelu esti harjoittelemattomassa ryhmässä havaitun lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemisen laskun ja näin ehkä myös siirtymisen rasvojen käytöstä glukoosin käyttöön.

Lipoproteiinilipaasi on kudosten hiussuonissa oleva entsyymi, joka katalysoi reaktiota, jossa rasvahapot vapautetaan triglyserideistä (Nelson & Cox 2000, 601). Viisi viikkoa kestänyt diabetes laski lipoproteiinilipaasin geenin ilmenemistä. FATBP3 (fatty acid binding protein 3) kuljettaa rasvahappoja solukalvon läpi soluun (Bonen ym. 2003). Diabetes lisäsi ensimmäisessä ja viimeisessä aikapisteessä FATBP3:n geenin ilmenemistä. Diabetes saattaa viimeisessä aikapisteessä heikentää rasvahappojen ottoa lihassoluihin laskemalla lipoproteiinilipaasin geenin ilmenemistä. FATBP3:n ilmenemisen kasvu saattaa parantaa solujen rasvahappojenottokykyä, mutta tämä ei kuitenkaan riitä lisäämään rasvahappojen ottoa, jos vapaita rasvahappoja ei ole riittävästi tarjolla. Yhden ja viiden viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmässä lipoproteiinilipaasin geenin ilmenemistä. Harjoittelu saattoi näin lisätä lihassolujen rasvahappojen saantia. Karnitiinipalmityylitransferaasi-2 (CPT2) on proteiini, joka osallistuu rasvahappojen siirtämiseen sytosolista mitokondrioon. Se vapauttaa mitokondrion sisälle kuljetetun asyylikoentsyymi-A:n karnitiinista (Zammit 1999). CPT2 on tätä kautta yksi rasvahappojen hapetuksen nopeutta rajoittavista tekijöistä (Nelson & Cox 2000, 603). Pitkäkestoinen diabetes (3 ja 5 viikkoa) laski CPT2:n ilmenemistä, mikä voi heikentää rasvahappojen hapetusta. Kestävyysharjoittelu ei vaikuttanut CPT2:n geenin ilmenemiseen.

Diabetes laski stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi-1:n ja -2:n geenien ilmenemistä keskimäärin noin 50 % (taulukot 7 ja 8). Viikon harjoittelu lisäsi diabetesta sairastavilla stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi-2:n ilmenemistä, mutta ei vaikuttanut stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi-1:n ilmenemiseen. Tulosten luotettavuutta lisää se, että molempien entsyymimuotojen muutokset havaittiin kahdella eri koetinsarjalla. Yeacoor ym. (2002) tutkimuksessa diabetes laski hiirten raajalihaksissa stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi-2:n ilmenemistä. Stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi-1:n muutosta tutkijat eivät olleet havainneet. Stearyylikoentsyymi-A-desaturaasi on entsyymi, joka osallistuu tyydyttämättömien rasvahappojen synteesiin. Stearyylikoentsyymi-A-desaturaasin geenin puutos lisää lipidien hapetukseen liittyvien geenien ilmenemistä ja laskee lipidien synteesiin osallistuvien geenien ilmenemistä. Geenin puutos vähentää tätä kautta lipidien synteesiä ja varastointia sekä lisää lipidien hapetusta. (Ntambi ym. 2002.) Diabetes saattaa aiheuttaa vastaavat muutokset raajalihaksen lipidimetaboliaan vähentämällä stearyylikoentsyymi-A-desaturaasin geenin ilmenemistä. Kestävyysharjoittelulla voi olla muutoksia vastustava vaikutus.

Diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä adiponektiinin geenin ilmenemistä. Adiponektiini on rasvasolujen erittämä proteiini, joka vaikuttaa verenkierron kautta muihin kudoksiin. Adiponektiinin geenin lisääntynyt ilmeneminen voi johtua vähentyneestä rasvavarastojen määrästä, sillä veren adiponektiinipitoisuus on käänteisesti verrannollinen elimistön rasvavarastojen määrään. Adiponektiinin on havaittu aikaisemmin ilmenevän vain rasvasoluissa. (Diez & Iglesias 2003.) Adiponektiinin geeni ilmeni kaikkien ryhmien hiirten raajalihaksissa, mikä on yllättävää, sillä lihasten pinnalta poistettiin rasvakertymät preparoinnin yhteydessä. Adiponektiinigeenin on täytynyt ilmetä joko lihasnäytteiden pinnalle tai sisälle jääneissä rasvasoluissa tai sitten itse lihassoluissa. Veren mukana kiertävä Adiponektiini lisää lihaksissa rasvahappojen hapetusta, glukoosin ottoa sekä laktaatin tuottoa. Adiponektiini lisää myös asetyylikoentsyymi-A-karboksyylaasin fosforylointia, mikä saattaa vähentää rasvahappojen synteesiä. (Diez & Iglesias 2003.)

### 9.3 Proteiinien hajotus

Hoitamaton diabetes johtaa nopeasti lihasatrofiaan, koska proteiinien hajotus on selvästi nopeampaa kuin proteiinien synteesi. Lihasproteiinien hajotuksessa vapautuvia aminohappoja voidaan käyttää lihaksen energiantuottoon tai niistä voidaan valmistaa maksassa glukoosia. Lihasproteiinit hajotetaan pääasiassa ubikitini-proteosomi-järjestelmän avulla. Proteiineja hajotetaan kuitenkin myös lysosomeissa, joiden osuus hajotuksesta on 10-20%. Proteosomit (26S) hajottavat spesifisti sellaiset proteiinit, joihin on liitetty merkiksi ubikitiniketjut. Diabetesta sairastavien rottien lihaksissa on havaittu olevan noin 40-50 prosenttia enemmän ubikitinoituja proteiineja kuin terveiden rottien lihaksissa. Proteiinien lisääntynyt ubikitinointi johtuu mahdollisesti ubikitini-proteosomi-järjestelmän entsyymien E2<sub>14k</sub> ja E3 $\alpha$  lisääntyneestä aktiivisuudesta. (Lecker ym. 1999.) Diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä seuraavien proteiinien hajotukseen liittyvän geenien ilmenemistä: proteosomi-20S ( $\alpha$ 7 ja  $\beta$ 3), proteosomi-26S (8 ja 3), ariadne, katepsiini L ja NEDD4. Viikon harjoittelu laski diabetesta sairastavilla kaikkien muiden em. geenien ilmenemistä paitsi proteosomi-26S:n (3) ja NEDD4:n. Proteosomeihin 20S ja 26S kuuluvien geenien ilmenemisen kasvu saattaa lisätä proteiinien hajotuskapasiteettiä. Ariadne lisää ihmisillä proteiinien ubikitinointia aktivoimalla E2-entsyymiä (Tan ym. 2003). Ariadnen geenin ilmenemisen kasvu saattaa siis olla osasy diabeteksessa havaittuun lisääntyneeseen proteiinien hajotukseen. Katepsiini L on lysosomaalinen proteaasi, joka osallistuu polypeptidien hajotukseen (Yasothornsrikul ym. 2003). Diabetes voi lisätä lysosomaalista proteiinienhajotusta lisää-

mällä katepsiini L:n geenin ilmenemistä. Kestävyys harjoittelu saattaa vähentää proteiinien hajotusta vähentämällä ariadnen, proteosomien 26S (8) ja 20S ( $\alpha 7$  ja  $\beta 3$ ) sekä katepsiini L:n geenien ilmenemistä.

BCKD (branched chain ketoacid dehydrogenase) on entsyymi, joka osallistuu reaktioihin, joissa haaraketjuisista aminohapoista tuotetaan hapettamalla energiaa. BCKD muuttaa haaraketjuisista aminohapoista syntyneet ketohapot asyylikoentsyymi-A-johdannaisiksi. (Nelson & Cox 2000, 651.) Diabetes laski kahdessa viimeisessä aikapisteessä BCKD-E1 $\alpha$ :n ilmenemistä. Diabetes laski geenin ilmenemistä myös Yechoor:in ym. (2002) tutkimuksessa. BCKDK:n (branched chain ketoacid dehydrogenase kinase) geenin ilmeneminen oli vähäisempää kolme ja viisi viikkoa sairastaneilla hiirillä kuin terveillä hiirillä. BCKDK on BCKD:n aktiivisuuden tärkein säätelijä. Se lisää fosforyloimalla BCKD:n aktiivisuutta. (Nellis 2002.) BCKD-E1 $\alpha$ :n ja BCKDK:n geenin ilmenemisen väheneminen heikentää todennäköisesti BCKD:n aktiivisuutta ja näin myös lihassolujen kykyä hapettaa haaraketjuisia aminohappoja. Harjoittelu saattaa estää BCKD:n aktiivisuuden laskua, sillä BCKD-E1 $\alpha$ :n ja BCKDK:n geenien ilmeneminen ei laskenut kolme viikkoa harjoitelleilla diabeteshiirillä. Harjoittelun positiivista vaikutusta tukee myös se, että viiden viikon harjoittelu lisäsi diabeteshiirillä BCKDK:n ilmenemistä.

NEDD4:n on havaittu ubikitinoivan GRB10-adapteriproteiinin avustuksella IGF-1R:n (insulin like growth factor I receptor). IGF-1R on reseptori joka välittää soluun IGF-1:n signaalin. IGF-1:n on havaittu vaikuttavan esim. verisuonten endoteelin sileiden lihassyiden kasvuun. (Dahlfors & Arnqvist 2003.) IGF-1R:n ubikitinointi lyhentää kyseisen proteiinin puoliintumisaikaa sekä nopeuttaa sen siirtymistä solukalvolta sytosoliin (Vecchione ym. 2003). Diabetes ryhmissä havaittu NEDD4-geenin ilmenemisen lasku saattaa tätä kautta heikentää lihaskudoksen solujen vastetta IGF-1:lle.

Karboksipeptidaasi E (CPE) on entsyymi, joka osallistuu peptidien (aminohappoketju) synteesiin. Se poistaa peptidin C-terminaalista päästä ylimääräiset emäksiset aminohapot. Jos entsyymiä ei ole, syntetisoitava peptidi jää yleensä toimintakyvyttömäksi. CPE:n mutaation on havaittu aiheuttavan esimerkiksi neuroendokriinisten peptidihormonien sekä insuliinin toimintakyvyttömyyttä. (Fricker & Leiter 1999.) Diabetes laski tässä tutkimuksessa CPE:n geenin ilmenemistä (keskimäärin 52 %), mikä voi häiritä raajalihaksissa bioaktiivisten peptidien synteesiä. Viikon harjoittelu lisäsi diabetesta sairastavilla CPE:n il-

menemistä. Tämä saattaa vähentää diabeteksen mahdollisesti aiheuttamaa peptidien toimintakyvyttömyyttä.

#### 9.4 ATP:n tuotto

Diabetes laski sitruunahappokierron, elektroninsiirtoketjun, kreatiinikinaasin ja adenylaattikinaasin geenien ilmenemistä (taulukko 4). Diabetes laski kaikissa aikapisteissä seuraavien sitruunahappokierron entsyymien geenien ilmenemistä: sitraattisyntaasi, isositraattidehydrogenaasi, malaattidehydrogenaasi, sukkiinaattikoentsyymi-A-ligaasi ja sukkiinaattidehydrogenaasi. Diabetesta sairastavien hiirten raajalihasten sitraattisyntaasiaktiivisuus oli matalampi kuin kontrollihiirillä. Tämä oli mahdollisesti seurausta laskeneesta mRNA:n määrästä. Viikon harjoittelu lisäsi diabeteshiirten raajalihaksissa sitraattisyntaasin mRNA:n määrän lisäksi myös sitraattisyntaasin aktiivisuutta. Harjoittelu lisäsi diabetesryhmissä sitraattisyntaasin lisäksi myös muiden em. sitruunahappokierron entsyymien ilmenemistä. Harjoitus oli vaikuttanut kyseisten geenien ilmenemiseen ainakin aikapisteessä yksi viikko. Diabeteksen aiheuttama sitruunahappokierron entsyymien geenien ilmenemisen lasku voi heikentää lihassolujen aerobista energiantuottokykyä. Koska harjoittelu lisäsi sitruunahappokierron entsyymien geenien ilmenemistä, se saattaa näin vähentää myös diabeteksen aiheuttamaa aerobisen energiantuottokyvyn laskua.

Elektroninsiirtoketju sijaitsee mitokondrioiden sisemmällä kalvolla ja koostuu viidestä entsyymikompleksista (I-V) (Nelson & Cox 2000, 666-667). Diabetes laski yleisesti elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Saman ovat havainneet Yechoor ym. (2002). Diabetes laski kaikissa aikapisteissä seuraavien entsyymien geenien ilmenemistä: NADH-dehydrogenaasi (I), ubikinoli-sytokromi-c-reduktaasi [core protein 1 ja 2] (III), ubikinoli-sytokromi-c-reduktaasi [subunit] (IV), sytokromi-c-oksidaasi [Vb, VIIa1, C-1] (IV), ATP-syntaasi [ $\alpha$ , 1, O, E] (V). Viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmissä kaikkien edellä mainittujen geenien ilmenemistä. Diabeteksen aiheuttama elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemisen lasku heikentää todennäköisesti mitokondrioiden kykyä tuottaa ATP:a. Harjoittelu saattaa estää ATP:n tuottokyvyn laskua lisäämällä elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Heikentynyt elektroninsiirtoketjun toiminta voi lisätä happiradikaalien syntyä ja tätä kautta erilaisten komplikaatioiden riskiä. Raskaan liikunnan on havaittu lisäävän diabetesta sairastavien raajalihasten ennestään nousutta radikaalien tuotantoa. Liikunta voi näin lisätä komplikaatioiden riskiä. (Davison ym. 2002; Laaksonen ym. 1996.)

Diabetes laski kaikissa aikapisteissä mitokondriaalisen kreatiinikinaasin geenin ilmenemistä (keskimäärin 59%, taulukko 7). Harjoittelu lisäsi geenin ilmenemistä sekä terveillä että diabetesta sairastavilla hiirillä. Kreatiinikinaasi on entsyymi, joka katalysoi ADP:n muuttamista ATP:ksi kreatiinifosfaatin sisältämän energian avulla. Reaktio voi edetä myös päinvastaiseen suuntaan, jos ATP:a on paljon ja ADP:a vähän. (Nelson & Cox 2000, 510.) Mitokondriaalista kreatiinikinaasia on pääasiassa mitokondrion ulomman ja sisemmän kalvon välisessä tilassa. Mitokondriaalisen kreatiinikinaasin toiminta mahdollistaa sen, että välitilan ATP/ADP-suhde pysyy jatkuvasti samana kuin sytosolissa. Sytosolin energiatilanne pääsee näin vaikuttamaan oksidatiivisen fosforylaation toimintaan. Sytosolin huono energiatilanne (paljon ADP:a) aktivoi oksidatiivisen fosforylaation toimintaa. (Lipskaya 2001.) Diabetes saattaa häiritä energian kulutuksen ja tuoton välistä tasapainoa laskemalla mitokondriaalisen kreatiinikinaasin ilmenemistä.

Diabetes laski kaikissa aikapisteissä adenylaattikinaasi-1:n ilmenemistä. Viikon harjoittelu lisäsi geenin ilmenemistä diabetesta sairastavilla hiirillä. Adenylaattikinaasi on entsyymi, joka katalysoi reaktiota:  $ATP + AMP \leftrightarrow 2ADP$ . Reaktio on hyvin tärkeä solujen korkeenergisten yhdisteiden muodostaman systeemin toiminnalle. Adenylaattikinaasi-1:n puutoksen on havaittu vaikuttavan lihasten käyttämiin energiantuottoreitteihin. Adenylaattikinaasi-1:n puutos lisää hiirten gastrocnemiuksessa glykolyysireitin käyttöä. Koska adenylaattikinaasin mRNA:n määrän on havaittu korreloivan hyvin entsyymin aktiivisuuden kanssa, on hyvin mahdollista, että diabetes laski hiirten raajalihasadenylaattikinaasi-1:n aktiivisuutta. (Janssen ym. 2003.) Jos aktiivisuuden lasku on ollut riittävän suuri, AMP:n määrä voi jäädä liian pieneksi suhteessa energiatilanteeseen. Tällöin myös AMPK:n aktiivisuus on liian matala suhteessa energiatilanteeseen. Alhainen AMPK-aktiivisuus voi laskea GLUT4:n, heksokinaasin, sitruunahappokierron sekä elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä, koska aktiivisen AMPK:n on havaittu lisäävän näiden geenien ilmenemistä. Kyseiset ilmenemismuutokset havaittiin diabetesryhmissä. Voi olla siis mahdollista, että diabetes on aiheuttanut em. geenien ilmenemisen laskun laskemalla adenylaattikinaasi-1:n geenin ilmenemistä. Aktiivinen AMPK lisää akuutisti rasvahappojen hapetusta ja GLUT4:n siirtymistä solukalvolle. AMPK:n normaalia vähäisempi aktivoituminen voi näin vähentää akuutisti lihasten glukoosinottoa ja rasvahappojen hapetusta. (Hardie & Hawley 2001.)

## 9.5 Signalointi

Diabetes oli lisännyt insuliini-, MAPK- ja G-proteiinisignaloinnin geenien ilmenemistä kahdessa ensimmäisessä aikapisteessä selvästi enemmän kuin laskenut. Lihassolut pyrkivät ilmeisesti näin adaptoitumaan diabeteksen aiheuttamiin metabolian muutoksiin. Diabetes laski viimeisessä aikapisteessä useamman signalointiin liittyvän geenin ilmenemistä kuin nosti. Geenien ilmenemismuutosten suunta oli siis päinvastainen kuin kahdessa ensimmäisessä aikapisteessä. Metaboliassa oli ilmeisesti tapahtunut uusi muutos, johon signaalireitien oli jälleen adaptoituttava. Harjoitteleissa diabetesryhmissä tätä jälkimmäistä adaptoitumista ei näkynyt, sillä viimeisessä aikapisteessä oli enemmän geenien ilmenemisen nousuja kuin laskuja, kuten kahdessa ensimmäisessäkin aikapisteessä. Edellä mainitut geenien ilmenemismuutokset noudattavat samaa kaavaa kuin lipidien hajotukseen liittyvät geenit. Harjoittelu saattoi edistää rasvahappojen käyttöä ja estää näin pitkäkestoisen diabeteksen aiheuttamaa siirtymistä rasvahappojen käytöstä glukoosin käyttöön.

Diabetes lisäsi kaikissa aikapisteissä seuraavien signaalireitteihin (MAPK, G-prot. ja insuliini) kuuluvien geenien ilmenemistä: cystein rich protein 61 (CYR61), eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (PHAS-1), guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence (rack1), MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2 (MNK2), RAS-related C3 botulinum substrate 1 (Rac1). Harjoittelu laski diabetesryhmissä kaikkien muiden geenien ilmenemistä vähintään yhdessä aikapisteessä paitsi Rac1:n. Diabetes laski kaikissa aikapisteissä seuraavien geenien ilmenemistä: C-H-Ras, insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP-5), myocyte enhancer factor 2C (Mef2c), receptor (calsitonin) activity modifying protein 1 (Ramp1). Harjoittelu lisäsi diabetesryhmissä kaikkien muiden geenien ilmenemistä vähintään yhdessä aikapisteessä paitsi C-H-Ras:in.

Diabetes aiheuttaa verisuonten endoteelissa toiminnanhäiriöitä. Säännöllinen kestävyysharjoittelu parantaa diabeetikoilla endoteelin toiminnanhäiriöitä. (Fuchsjäger-Mayrl ym.2002; Rigla ym. 2001.) IGFBP-5 lisää IGF:1:n vaikutusta endoteelin sileiden lihassyiden kehittymiseen (Duan & Clemmons 1998). Diabetes laski IGFBP-5:n ilmenemistä (50-75 %) , mikä voi näin osaltaan selittää diabeteksen aiheuttamia endoteelitoiminnan häiriöitä. Kestävyysharjoittelu lisäsi ensimmäisessä aikapisteessä geenin ilmenemistä, mikä voi selittää muissa tutkimuksissa havaittua endoteelitoiminnan paranemista. CYR61 säätelee angiogeneesiä (verisuonien uudismuodostus) ja endoteelisolujen toimintaa. Se edistää endoteelisolujen kasvua, liikettä, kiinnittymistä ja elinkykyä (Brigstock 2002). Diabetes lisäsi

CYR61:n ilmenemistä, mikä voisi olla kompensatioreaktio diabeteksen aiheuttamille endoteelisolujen toiminnan häiriöille.

PHAS-1 inhiboi proteiinisynteesiä sitoutumalla eif-4E:hen (eukaryotic initiation factor 4E), joka on translaation aloitusta säätelevä proteiini. Diabetesta sairastavien rottien lihaksissa on havaittu olevan kolme kertaa enemmän PHAS-1:n ja eif-4E:n komplekseja kuin terveiden rottien lihaksissa. (Kinball ym. 1996.) Insuliini fosforyloi normaalisti PHAS-1:stä, mikä estää kompleksin muodostumista (Azpiazu ym. 1996). Diabetes nosti tässä tutkimuksessa PHAS-1-geenin ilmenemisen vähintään kaksinkertaiseksi (yhden viikon kohdalla yli viisinkertaiseksi, taulukko 5) verrattuna kontrolliin. Diabeteksen aiheuttama PHAS-1:n lisääntynyt ilmeneminen ja normaalia alhaisempi fosforyloituminen voivat yhdessä selittää PHAS-1-eif-4E-kompleksien määrän kasvun ja näin myös heikentyneen proteiinisynteesin. Diabetes lisäsi selvästi MNK2:n geenin ilmenemistä (taulukko 5). Tämä voi myös omalta osaltaan heikentää proteiinisynteesiä, sillä aktiivinen MNK2 inhiboi fosforyloimalla eif-4E:tä (Knauf ym. 2001). Harjoittelu laski diabetesryhmissä sekä PHAS-1:n että MNK2:n geenin ilmenemistä, mikä voi vaikuttaa positiivisesti lihassolujen proteiinisynteesiin.

Mef2-transkriptiotekijät lisäävät ja ylläpitävät lihassolujen erilaistumista säätelemällä lihassolujen geenien ilmenemistä (Ornatsky 1997). Mef2-transkriptiotekijöihin kuuluva Mef2c lisää GLUT4:n geenin ilmenemistä yhdessä PGC-1:n kanssa. (Michael ym. 2001.) PGC-1 (peroxisome proliferator activated receptor, gamma, coactivator 1) on proteiini, joka säätelee transkriptiotekijöiden välityksellä useita energiametaboliaan liittyviä genejä. PGC-1-geenin ilmeneminen lisääntyy lihassoluissa kestävyysharjoittelun vaikutuksesta, minkä ajatellaan aiheuttavan suuren osan lihassolujen adaptaatiomuutoksista. (Pilegaard ym. 2003.) Diabetes laski Mef2c:n geenin ilmenemistä, mikä voi olla ainakin osasy diabeteksen aiheuttamaan GLUT4-geenin ilmenemisen laskuun. Viikon harjoittelu lisäsi diabetesryhmässä selvästi mef2c:n geenin ilmenemistä. Harjoittelu saattaa tätä kautta lisätä GLUT4:n ilmenemistä.



## 10 YHTEENVETO

Diabetes laski hypoteesin mukaisesti GLUT4:n, glykolyysin, PDH:n, sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Hypoteesin mukaan diabeteksen piti lisätä LDH:n geenien ilmenemistä. Näin ei kuitenkaan käynyt, sillä diabetes laski LDH:n geenien ilmenemistä. Beta-oksidaation geenien ilmenemisessä ei havaittu yleisesti muutoksia, kuten hypoteesissa oletettiin.

Kestävyysharjoittelu lisäsi diabetesta sairastavilla hiirillä hypoteesin mukaisesti glykolyysin, GLUT4:n, sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Hypoteesin mukaan kestävyysharjoittelun piti lisätä LDH:n geenien ilmenemistä tai sen ei pitänyt vaikuttaa LDH:n geenien ilmenemiseen. Tulokset olivat hypoteesin mukaiset, sillä LDH-1a:n ilmeneminen nousi, ja LDH-2b:n ilmeneminen ei muuttunut. Kestävyysharjoittelu ei lisännyt diabetesta sairastavilla hiirillä hypoteesin mukaisesti beta-oksidaatioon liittyvien geenien ilmenemistä. Kestävyysharjoittelun odotettiin lisäävän PDH:n geenien ilmenemistä, mutta näin ei tapahtunut. Kestävyysharjoittelu vähensi kuitenkin PDK:n geenin ilmenemistä, mikä saattoi lisätä PDH:n aktiivisuutta.

Diabeteksen aiheuttamat geenien ilmenemismuutokset heikentävät sekä lihassolujen glukosinottokykyä että glykolyysiä. Kestävyysharjoittelu voi vähentää glukosinoton heikkenemistä lisäämällä GLUT4:n ilmenemistä. Harjoittelu ei ilmeisesti lisää glykolyysiä, mutta se saattaa lisätä aerobisen glykolyysin osuutta suhteessa anaerobiseen glykolyysiin. Aerobisen glykolyysin osuus voi kasvaa, koska harjoittelun havaittiin vähentävän PDK:n geenin ilmenemistä ja lisäävän sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä. Diabetes heikentää hiirten raajalihasten glykogeenisynteesiä laskemalla G6PT1:n ilmenemistä. Kestävyysharjoittelu vähensi G6PT1:n geenin ilmenemisen laskua, mikä voi parantaa lihassolujen glykogeenisynteesiä.

Lyhytkestoinen diabetes pyrkii parantamaan lipidienhajotuskykyä lisäämällä lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemistä. Pitkäkestoinen diabetes heikentää lipidienhajotuskykyä laskemalla lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemistä (esim. lipoproteiinilipaasi ja CPT2). Kestävyysharjoittelu voi estää pitkäkestoisen diabeteksen aiheuttaman lipidienhajotuskyvyn laskun lisäämällä lipidien hajotukseen liittyvien geenien ilmenemistä.

Diabetes lisää raajalihasten proteiinien hajotusta lisäämällä ariadnen, proteosomi-26S:n, proteosomi-20S:n ja katepsiini L:n geenin ilmenemistä. Kestävyysharjoittelu voi vähentää proteiinien hajotusta vähentämällä geenien ilmenemisen nousua. Diabetes heikentää lihas-solujen kykyä hapettaa haaraketjuisia aminohappoja laskemalla BCKD:n ja BCKDK:n geenien ilmenemistä. Kestävyysharjoittelu voi estää hapetuskyvyn vähenemistä, sillä harjoitelleilla diabeteshiirillä BCKD:n ja BCKDK:n geenien ilmeneminen laski vähemmän kuin harjoittelemattomilla. Diabetes lisäsi MNK2:n ja PHAS-1:n geenien ilmenemistä, mikä selittää diabeteksessä yleisesti havaittua proteiinisynteesin heikkenemistä. Harjoittelu vähensi MNK2:n ja PHAS-1:n geenien ilmenemistä, mikä voi vähentää proteiinisynteesin laskua.

Diabetes laskee raajalihaksissa sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä, mikä johtaa todennäköisesti aerobisen energiantuottokyvyn laskuun. Aerobisen energiantuottokyvyn lasku heikentää kaikkien eri ravintoaineiden hapetusta ja vähentää niistä saatavaa ATP:n määrää. Kestävyysharjoittelu lisää sitruunahappokierron ja elektroninsiirtoketjun geenien ilmenemistä, mikä parantaa aerobista energiantuottokykyä.

Pilegaard ym. (2002) ovat havainneet harjoittelun aiheuttavan suurempia transkription muutoksia, kun lihaksen glykogeenipitoisuus on pieni. Diabeteksen aiheuttama lihasten glykogeenipitoisuuden lasku voisi siis selittää sen, että kestävyysharjoittelu muutti diabetesta sairastavilla hiirillä useampien geenien ilmenemistä kuin terveillä. Tässä tutkimuksessa havaitut geenien ilmenemismuutokset selittävät monia metabolian ilmiöitä, joita diabeteksen on aikaisemmin havaittu aiheuttavan. Kestävyysharjoittelu lievitti yleensä ainakin ensimmäisessä aikapisteessä diabeteksen aiheuttamia geenien ilmenemismuutoksia. Kestävyysharjoittelu voi näin vähentää diabeteksen vaikutuksia raajalihasten energiametaboliaan.

Tässä tutkimuksessa selvitettiin geenien ilmenemistä vain mRNA-tasolla. Tämän takia jatkotutkimuksissa tulee selvittää, aiheuttavatko havaitut mRNA:n määrän muutokset myös proteiinimäärien ja entsyymiaktiivisuuksien muutoksia. Jatkotutkimuksissa kannattaa myös tutkia, aiheuttavatko diabetes ja kestävyysharjoittelu samat muutokset, kun diabetesta hoidetaan insuliinilla. Tässä tutkimuksessa selvitettiin raajalihaksen geenien ilmenemismuutoksia. Koska diabeteksen ja kestävyysharjoittelun tiedetään vaikuttavan myös sydänlihakseen, tutkimusryhmämme aikoo tulevaisuudessa selvittää jo olemassa olevien tulosten pe-

rusteella, miten diabetes ja kestävyysharjoittelu vaikuttavat sydänlihaksen geenien ilmenemiseen.

## 11 KIITOKSET

Tutkimuksen päärahoittajana toimi opetusministeriö. Tutkimusta tukivat myös LIKES-tutkimuskeskus, Tampereen lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT) sekä Jyväskylän yliopiston liikuntabiologian laitos.

Tutkimuksen suunnittelussa olivat mukana Heikki Kainulainen (IMT), Veikko Vihko (LIKES) sekä Jyrki Komulainen (LIKES). Laboratoriotyöskentelyssä auttoivat Heidi Päivärinne (IMT), Riikka Kivelä (LIKES), Maarit Lehti (LIKES), Anna-Maria Touvra sekä biokemian laboratorion väki (Liikunta- ja terveystieteiden tiedekunta).

Erityiskiitokset haluan osoittaa Heikki Kainulaiselle aktiivisesta työn ohjauksesta.

## LÄHTEET

- Affymetrix 2003a. Genechip expression analysis: data analysis fundamentals.  
www.affymetrix.com
- Affymetrix 2003b. Genechip expression analysis: technical manual. www.affymetrix.com
- Azpiazu, I., Saltiel, A.R., De Paoli-Roach, A.A. & Lawrence, J.C.jr. 1996. Regulation of both glycogen synthase and PHAS-1 by insulin in rat skeletal muscle involves mitogen-activated protein kinase -independent and rapamycin -sensitive pathways. *The journal of biological chemistry* 271, 5033-5039.
- Bakay, M., Chen, Y.W., Borup, R., Zhao, P., Nagaraju, K. & Hoffman, E.P. 2002. Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics* 3, 4.
- Beck-Nielsen, H. & Hother-Nielsen, O. 2000. Obesity in type 2 diabetes mellitus. Teoksessa: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 567-575.
- Beebe, C. 2000. Diet therapy in type 1 diabetes mellitus. Teoksessa: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 471-481.
- Bell, G.I. & Polonsky, K.S. 2001. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414, 788-791.
- Bennet, P.H. 2000. Epidemiology of type 2 diabetes mellitus. Teoksessa: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 544-548.
- Bonen, A., Benton, C.R., Campbell, S.E., Chabowski, A., Clarke, D.C., Han, X.-X., Glatz, J.F.C. & Luiken, J.J.F.P. 2003. Plasmalemmal fatty acid transport is regulated in heart and skeletal muscle by contraction, insulin and leptin, and in obesity and diabetes. *Acta Physiologica Scandinavica* 178, 347-356.
- Brigstock, D.R. 2002. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis* 5, 153-165.
- Brink, S.J. 2000. Insulin therapy and home monitoring for type 1 diabetes mellitus. Teoksessa: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 488-500.

- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.
- Challis, R.A.J., Vranic, M. & Radda, G.K. 1989. Bioenergetic changes during contraction and recovery in diabetic rat skeletal muscle. *American journal of physiology* 256, E129-E137.
- Costill, D.L., Cleary, P., Fink, W.J., Foster, C., Ivy, J.L. & Witzmann, F. 1976. Training adaptations in skeletal muscle of juvenile diabetics. *Diabetes* 28, 818-822.
- Crosson, S.M., Khan, A., Printen, J., Pessin, J.E. & Saltiel, A.R. 2003. PTG gene deletion causes impaired glycogen synthesis and developmental insulin resistance. *The journal of clinical investigation* 111, 1423-1432.
- Crowther, G.J., Milstein, J.M., Jubrias, S.A., Kushmerick, M., Gronka, R.K. & Conley, K.E. 2003. Altered energetic properties in skeletal muscle of men with well-controlled insulin -dependent (type 1) diabetes. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 284, E655-E662.
- Dahlfors, G. & Arnqvist, H.J. 2000. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 regulate the expression of insulin like growth factor-binding protein-3, -4, and -5 in large vessel endothelial cells. *Endocrinology* 141, 2062-2067.
- Dall'Aglio, E., Chang, F., Chang, H., Wright, D. & Reaven, G.M. 1983. Effects of exercise training and sucrose feeding on insulin-stimulated glucose uptake in rats with step-tozotocin-induced insulin-deficient diabetes. *Diabetes* 32, 165-168.
- Davison, G.W., George, L., Jackson, S.K., Young, I.S., Davies, B., Bailey, D.M., Peters, J.R. & Ashton, T. 2002. Exercise, free radicals, and lipid peroxidation in type 1 diabetes mellitus. *Free radical biology & medicine* 33, 1543-1551.
- Díez, J.J. & Iglesias, P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *European journal of endocrinology* 148, 293-300.
- Duan, C. & Clemmons, D.R. 1998. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 in vascular smooth muscle cells. *Journal of biological chemistry* 273, 16836-16842.
- Ebeling, P., Tuominen, J.A., Bourey, R., Koranyi, L. & Koivisto, V.A. 1995. Athletes with IDDM exhibit impaired metabolic control and increased lipid utilization with no increase in insulin sensitivity. *Diabetes* 44, 471-477.
- Flakoll, P.J., Carlson, M.G. & Cherrington, A.D. 2000. Physiologic action of insulin. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 148-161.

- Fricker, L.D. & Leiter, E.H. 1999. Peptides, enzymes and obesity: new insights from a 'dead' enzyme. *Trends in biochemical sciences* 24, 390-393.
- Fuchsjäger-Mayrl, G., Pleiner, J., Wiesinger, G.F., Sieder, A.E., Quittan, M., Nuhr, M.J., Francesconi, C., Seit, H., Francesconi, M., Schmetterer, L. & Wolzt, M. 2002. Exercise training improves vascular endothelial function in patients with type I diabetes. *Diabetes care* 25, 1795-1801.
- Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., Knutson, S.M., Horton, E.D. & Horton, E.S. 1988. Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats. *Journal of applied physiology* 65, 844-851.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. 2001. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders company
- Hardie, D.G. & Hawley, S.A. 2001. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays* 23, 1112-1119.
- Harris, M.I. 2000. Definition and classification of diabetes mellitus and the new criteria for diagnosis. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 326-333.
- Hiraiwa, H., Pan, C.-J., Lin, B., Moses, S.W. & Chou, J.Y. 1999. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *The journal of biological chemistry* 274, 5532-5536.
- Horton, E.S. 2000. Exercise for the patient with type 1 diabetes mellitus. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 148-161.
- Howard, B.V. & Magee, M.F. 2000. Macrovascular complications of diabetes mellitus. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 957-970.
- Ianuzzo, C.D., Lesser, M. & Battista, F. 1974. Metabolic adaptations in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats following exercise training. *Biochemical and biophysical research communications* 58, 107-111.
- Janssen, E., Groof, A.D., Wijers, M., Fransen, J., Dzeja, P.P., Terzic, A. & Wieringa, B. 2003. Adenylate kinase 1 deficiency induces molecular and structural adaptations to support muscle energy metabolism. *The journal of biological chemistry* 278, 12937-12945.
- Jiang, G. & Zhang, B.B. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American journal of physiology, endocrinology and metabolism* 284, E671-E678.

- Kainulainen, H., Komulainen, J., Joost, H.G. & Vihko, V. 1994a. Dissociation of the effects of training on oxidative metabolism, glucose utilisation and GLUT4 levels in skeletal muscle of streptozotocin-diabetic rats. *Pflügers Arch* 427, 444-449.
- Kainulainen, H., Breiner, M., Schürmann, A., Marttinen, A., Virjo, A. & Joost, H.G. 1994b. In vivo glucose uptake and glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT4 in heart and various types of skeletal muscle from streptozotocin-diabetic rats. *Biochimica et biophysica acta* 1225, 275-282.
- Keen, H.L., Ryan, M.J., Beyer, A., Mathur, S., Scheetz, T.E., Gackle, B.D., Faraci, F.M., Casavant, T.L. & Sigmund, C.D. 2004. *Physiological Genomics*. Käsikirjoitus 15054141.
- Khayat, Z.A., Patel, N. & Klip, A. 2002. Exercise- and insulin-stimulated muscle glucose transport: distinct mechanisms of regulation. *Canadian journal of applied physiology* 27, 129-151.
- Kinball, S.R., Jefferson, L.S., Fadden, P., Haystead, T.A. & Lawrence, J.C.j. 1996. Insulin and diabetes cause reciprocal changes in the association of eif-4E and PHAS-1 in rat skeletal muscle. *American journal of physiology* 270, C705-C709.
- Knauf, U., Tschopp, C. & Gram, H. 2001. Negative regulation of protein translation by mitogen activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Molecular and cellular biology* 21, 5500-5511.
- Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hänninen, O. & Sen, C.K. 1996. Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes care* 19, 569-574.
- Laporte, R.E., Cruickshanks, K.J., Cavender, D.E. & Drash, A.L. 1986. Pittsburgh insulin-dependent diabetes mellitus morbidity and mortality study: physical activity and diabetic complications. *Pediatrics* 78, 1027-1033.
- Larsson, Y., Persson, B., Sterky, G. & Thorin, C. 1964. Functional adaptation to rigorous training and exercise in diabetic and non-diabetic adolescents. *Journal of applied physiology* 19, 629-635.
- Lawrence, G.M., Walker, D.G. & Trayer, I.P. 1986. Histochemical evidence of changes in fuel metabolism induced in red, white and intermediate muscle fibres of streptozotocin-treated rats. *Histochemical journal* 18, 203-212.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Price, S.R., Kwon, Y.T., Mitch, W.E. & Goldberg, A.L. 1999. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetics rats. *The journal of clinical investigation* 104, 1411-1420.



- LeRoith, D., Taylor, S.I. & Olefsky, J.M. 2000. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Lewin, B. 2000. Genes VII. New York: Oxford University Press Inc.
- Lipskaya, T.Y. 2001. Mitochondrial creatine kinase: properties and function. *Biochemistry (Moscow)* 66, 1098-1111.
- Mandroukas, K., Krotkiewski, M., Holm, G., Stömlad, G., Grimby, G., Lithell, H., Wroblewski, Z. & Björntrop, P. 1984. Muscle adaptations and glucose control after physical training in insulin -dependent diabetes mellitus. *Clinical physiology* 6, 39-52.
- Marrero, D.G., Fremion, A.S. & Golden, M.P. 1988. Improving compliance with exercise in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: results of a self-motivated home exercise program. *Pediatrics* 81, 519-525.
- Michael, L.F., Wu, Z., Cheatham, R.B., Puigserver, P., Adelmant, G., Lehman, J.J., Kelly, D.P. & Spiegelman, B.M. 2001. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 98, 3820-3825.
- Midaoui, A., Tancredi, G. & Nadeau, A. 1996. Effect of physical training on mitochondrial function in skeletal muscle of normal and diabetic rats. *Metabolism* 45, 810-816.
- Nakai, N., Miyazaki, Y., Sato, Y., Oshida, Y., Nagasaki, M., Tanaka, M., Nakashima, K. & Shimomura, Y. 2002. Exercise training increases the activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle of diabetic rats. *Endocrine journal* 49, 547-554.
- Nathan, D.M. 2000. The treatment of diabetes mellitus to prevent and delay long-term complications. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 456-462.
- Nellis, M.M., Doering, C.B., Kasinski, A. & Danner, D.J. 2002. Insulin increases branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase kinase expression in clone 9 rat cells. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 283, E853-E860.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. 2000. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers

- Neufer, P.D., Carey, J.O. & Dohm, G.L. 1993. Transcriptional regulation of the gene for glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle: effects of diabetes and fasting. *The journal of biological chemistry* 268, 13824-13829.
- Noble, E.G. & Ianuzzo, D. 1985. Influence of training on skeletal muscle enzymatic adaptations in normal and diabetic rats. *American journal of physiology* 249, E360-E365.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., Stoehr, J.P., Lan, H., Kendziorski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M. & Attie, A.D. 2002. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 99, 11482-11486.
- Ornatsky, O.I., Andreucci, J.J. & McDermott, J.C. 1997. A dominant-negative form of transcription factor MEF2 inhibits myogenesis. *The journal of biological chemistry* 272, 33271-33278.
- Park, Y. & Eisenbarth, G.S. 2000. The natural history of autoimmunity in type 1a diabetes mellitus. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 347-363.
- Paulson, D.J., Kopp, S.J., Peace, D.G. & Tow, J.P. 1987. Myocardial adaptation to endurance exercise training in diabetics rats. *American journal of physiology* 252, R1073-R1081.
- Pilegaard, H., Ordway, G.A., Saltin, B. & Neufer, P.D. 2000. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 279, E806-E814.
- Pilegaard, H., Keller, C., Steensberg, A., Helge, J.W., Pedersen, B.K., Saltin, B. & Neufer, P.D. 2002. Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes. *Journal of physiology* 541, 261-271.
- Pilegaard, H., Saltin, B. & Neufer, P.D. 2003. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *Journal of physiology* 546, 851-858.
- Rigla, M., Sánchez-Quesada, J.L., Ordóñez-Llanos, J., Prat, T., Caixàs, A., Jorba, O., Serra, J.R., de Leiva, A. & Pérez, A. 2000. Effect of physical exercise on lipoprotein(a) and low-density lipoprotein modifications in type 1 and type 2 diabetic patients. *Metabolism* 49, 640-647.

- Rigla, M., Fontcuberta, J., Mateo, J., Caixàs, A., Pou, J.M., de Leiva, A. & Pérez, A. 2001. Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia* 44, 693-699.
- Ritov, V.B. & Kelley, D.E. 2001. Hexokinase isozyme distribution in human skeletal muscle. *Diabetes* 50, 1253-1262.
- Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Silver, K.D. & Shuldiner, A.R. 2000. Candidate genes for type 2 diabetes mellitus. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 705-718.
- Skyler, J.S. 2000. Immune intervention. *Teoksessa: Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. D. LeRoith, S. I. Taylor and J. M. Olefsky. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 500-505.
- Spriet, L.L. & Watt, M.J. 2003. Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. *Acta Physiol Scand* 178, 443-452.
- Stratton, R., Wilson, D.P., Endres, R.K. & Goldstein, D.E. 1987. Improved glycemic control after supervised 8-wk exercise program in insulin-dependent diabetic adolescents. *Diabetes care* 10, 589-593.
- Sugden, M.C. & Holness, M.J. 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American journal of physiology: endocrinology and metabolism* 284, E855-E862.
- Tahiliani, A.G. & McNeill, J.H. 1986. Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. *Life sciences* 38, 959-974.
- Tan, N.G.S., Ardley, H.C., Scott, G.B., Rose, S.A., Markham, A.F. & Robinson, B.A. 2003. Human homologue of ariadne promotes the ubiquitylation of translation initiation factor 4E homologous protein, 4EHP. *FEBS Letters* 554, 501-504.
- Tancredi, G., Rousseau-Migneron, S. & Nadeau, A. 1982. Beneficial effects of physical training in rats with a mild streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes* 31, 406-409.
- Tuomilehto, J., Karvonen, M., Pitkäniemi, J., Virtala, E., Kohtamäki, K., Toivanen, L. & Tuomilehto-Wolf, E. 2000. Record-high incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Finnish children. *Diabetologia* 42, 655-660.
- Wallberg-Henriksson, H., Gunnarsson, R., Henriksson, J., Ostman, J. & Wahren, J. 1984. Influence of physical training on formation of muscle capillaries in type I diabetes. *Diabetes* 33, 851-857.

- Vecchione, A., Marchese, A., Henry, P., Rotin, D. & Morrione, A. 2003. The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Molecular and cellular biology* 23, 3363-3372.
- Veves, A., Saouaf, R., Donaghue, V.M., Mullooly, C., Kistler, J.A., Giurini, J.M., Horton, E.S. & Fielding, R.A. 1997. Aerobic exercise capacity remains normal despite impaired endothelial function in the micro- and macrocirculation of physically active IDDM patients. *Diabetes* 46, 1846-1852.
- Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradzky, K.F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., Logvinova, A., Goldsmith, P., Neveu, J.M., Lane, W.S., Gibson, B., Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M. & Hook, V. 2003. Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 100, 9590-9595.
- Yechoor, V.K., Patti, M.-E., Saccone, R. & Kahn, C.R. 2002. Coordinated patterns of gene expression for substrate and energy metabolism in skeletal muscle of diabetic mice. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 99, 10587-10592.
- Zammit, V.A. 1999. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in Lipid Research* 38, 199-224.
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M. & Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

## LIITE 1. Sitraattisyntaasiaktiivisuustittauksen protokolla

Homogenointipuskuri:

NaCl		5,85 g	
Triton X-100	0,5 ml		Kokonaistilavuudeksi säädetään 500 ml ja
Tris-HCl		1,27 g	ja pH:ksi 7,5 (+4°C)
Tris-base		0,236 g	

Reagenssit:

DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitro-benzoic acid))

3,9 mg / 10 ml 1M Tris-HCl-puskurissa pH 8,1

Asetyylikoentsyymi-A (Li-suola)

3,0 mg / ml tislattua vettä

OAA (Oxaloacetic acid)

1.32 mg / ml 0,1 M Tris-HCl-puskurissa pH 8,1

1. Lihasnäyte homogenoidaan teflonsauvalla sellaiseen tilavuuteen homogenointipuskuria, että lihashomogenaatin pitoisuudeksi tulee 3%.
2. Homogenaattia sentrifugoidaan 20 min. nopeudella 13000 RPM
3. Supernatantti talteen
4. Supernatanttia laimennetaan mittausta varten puskurilla 1:20
5. 96-kuoppalevyyn pipetoidaan järjestyksessä:

DTNB	29 µl	
Aset.-KoA	8,7 µl	
H <sub>2</sub> O	230 µl	OAA pipetoidaan juuri ennen mittausta
Näyte	14,6 µl	
<u>OAA</u>	<u>14,6 µl</u>	
V <sub>kok</sub>	296,9 µl	

6. Kuoppalevy ravistajan kautta spektrofotometriin (Labsystems iEMS reader MF)
7. Mitataan absorbanssia aallonpituudella 412 nm 3 minuuttia
8. Lasketaan absorbanssin muutos minuuttia kohti (dA/min) lineaariselta ajanjaksolta ja sijoitetaan kaavaan:

$$\text{Sitsy.akt. (nmol/(min*mg))} = \text{dA/min} * V_{\text{kok}} * 10^{-3} (\text{l/ml}) * 10^9 (\text{nmol/mol}) * \text{LK} / (\text{AK} * \text{VP} * V_{\text{näyte}} * \text{Prot.pit.})$$

V<sub>kok</sub> = reaktion kokonaistilavuus (0,296 ml)

LK = laimennuskertoimen (20)

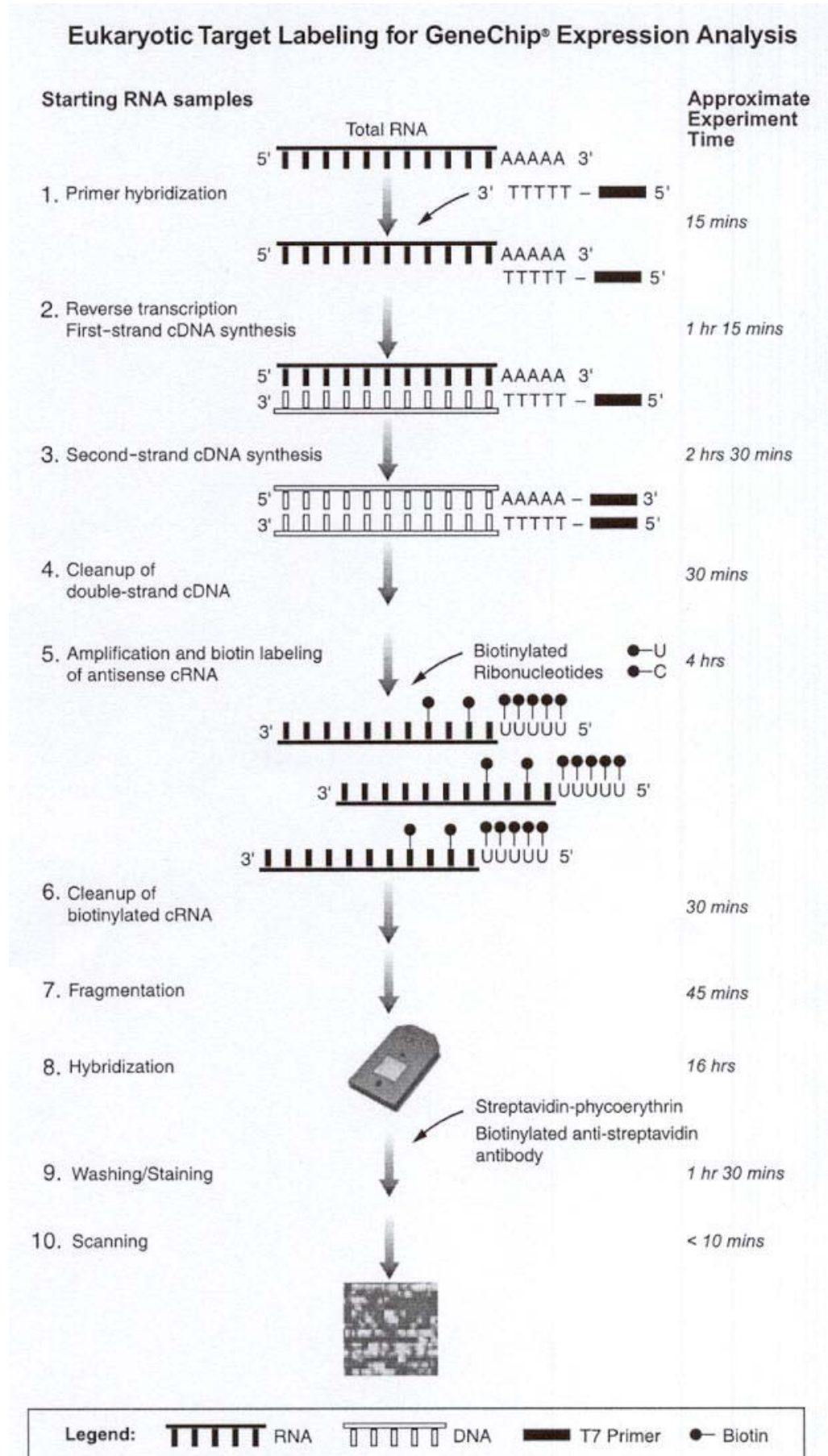
AK = absorptiokerroin (13600 l/(mol\*cm))

VP = valotien pituus (0,86 cm)

V<sub>näyte</sub> = näytteen tilavuus (0,0146 ml)

Prot.pit. = näytteen proteiinipitoisuus (mg/ml)

## LIITE 2. Affymetrix:in microarray-protokolla



**LIITE 3.** Geenit, joiden ilmenemistä harjoittelu lisäsi (merkitsevä ero ja  $\log_2 T/C \geq +0,3$ ) terveillä vähintään yhdessä aikapisteissä.

Accession no.	Gene / Protein	T1	T3	T5
<b>GLUCOSE METABOLISM</b>				
X13586	2,3-bisphosphoglycerate mutase	1,23	0,93	0,87
D42083	fructose bisphosphatase 2	1,63	1,32	1,00
M14220	glucose phosphate isomerase 1	1,52	0,93	1,07
U53218	glycogen synthase 3, brain	1,23	1,00	1,15
X51905	lactate dehydrogenase 2, B chain	1,32	0,93	1,15
X74616	phosphorylase kinase alpha 1	1,32	1,00	0,93
J03293	phosphorylase kinase gamma	1,23	0,71	0,93
AJ001418	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	1,32	0,38	0,50
<b>LIPID METABOLISM</b>				
AI841705	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	1,23	1,00	1,00
AI849271	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	1,23	1,00	1,07
U21489	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	1,87	0,87	1,00
AV354445	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	1,07	1,32	1,23
D00466	apolipoprotein E	1,41	0,87	0,93
AV238359	carnitine acetyltransferase	1,23	1,00	1,07
X85983	carnitine acetyltransferase	1,52	1,07	1,07
AF030343	enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	1,32	0,93	0,87
U96116	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase type II	1,32	1,07	1,00
M63335	lipoprotein lipase	1,52	1,23	1,52
AF093857	peroxiredoxin 6	1,41	1,00	1,07
AF093853	peroxiredoxin 6	1,32	1,15	1,15
AI845798	phospholipase A2, group XII	1,23	1,00	0,93
AI845798	phospholipase A2, group XII	1,23	1,00	1,00
AW122615	RIKEN cDNA 4930479F15 gene	1,41	0,93	0,93
M21285	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	1,15	0,87	1,52
<b>PROTEIN METABOLISM</b>				
X04673	adipsin	1,63	1,52	2,30
L47335	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	1,32	0,93	1,07
L16992	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide	1,32	1,15	1,07
AJ242663	cathepsin Z	1,23	1,07	1,07
AI574278	insulin degrading enzyme	1,63	1,15	1,52
AI839371	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 2	1,32	0,93	1,07
D49686	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	1,32	1,00	1,00
X57349	transferrin receptor	0,71	1,41	1,07
X57349	transferrin receptor	0,87	1,63	1,23
AF079565	ubiquitin specific protease 2	1,15	1,41	1,32
<b>TRICARBOXYLIC ACID CYCLE, ELECTRON TRANSPORT CHAIN AND ATP SYNTHESIS</b>				
AW125431	citrate synthase	1,32	1,07	1,07
AV250974	creatine kinase, mitochondrial 2	1,23	1,15	1,23
AI181132	creatine kinase, mitochondrial 2	1,15	1,23	1,23
U51167	isocitrate dehydrogenase 2 (NAD <sup>+</sup> ), mitochondrial	1,23	0,81	1,07
AI835446	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD <sup>+</sup> ) alpha	1,32	1,15	1,23
U68564	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD <sup>+</sup> ), gamma	1,32	1,15	1,07
AI846396	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9	1,23	1,15	1,07
AI845121	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8	1,23	1,00	1,07
AI848871	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	1,23	1,15	1,15
AI835051	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1	1,23	1,07	1,07
AI837493	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	1,41	1,07	1,15
AW123802	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3	1,32	1,07	1,07
AI844043	RIKEN cDNA 0610010I20 gene	1,32	1,00	0,87
AI853523	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit	1,23	1,07	1,07
<b>INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALLING PATHWAYS</b>				
U51866	casein kinase II, alpha 1 related sequence 4	1,07	1,32	1,52
U28656	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	1,32	0,81	0,93
U57524	I kappa B alpha gene, exons 2-6, partial cds.	1,41	1,07	1,07
X76850	MAP kinase-activated protein kinase 2	1,52	1,32	1,52
AI595996	myocyte enhancer factor 2C	1,63	1,32	1,52
L13171	myocyte enhancer factor 2C	1,32	1,32	1,41
L13171	myocyte enhancer factor 2C	1,74	1,52	1,52
AI849126	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 7	1,41	1,23	1,23
J05479	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	1,32	0,87	1,07
X65687	thymoma viral proto-oncogene 1	1,23	1,15	1,07

**LIITE 4.** Geenit, joiden ilmenemistä harjoittelu laski (merkittävä ero ja  $\log_2 T/C \leq -0,3$ ) terveillä vähintään yhdessä aikapisteissä.

Accession no.	Gene / Protein	T1	T3	T5
<b>GLUCOSE METABOLISM</b>				
AV295044	glucose phosphate isomerase 1	0,71	1,32	0,87
J05277	hexokinase 1	1,00	0,93	0,81
J03293	phosphorylase kinase gamma	1,23	0,71	0,93
AJ001418	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	1,32	0,38	0,50
<b>LIPID METABOLISM</b>				
AA726364	lipoprotein lipase	0,81	0,81	1,00
AA408956	very low density lipoprotein receptor	0,87	0,76	0,62
<b>PROTEIN METABOLISM</b>				
AV367224	bleomycin hydrolase	0,35	0,87	1,52
AJ012475	calpain 7	0,81	0,81	0,76
X61232	carboxypeptidase E	1,00	0,76	1,00
Y10007	fibroblast activation protein	0,57	1,07	1,32
U51014	peptidase 4	0,76	0,71	0,93
AI836804	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	0,93	0,87	0,81
AW045339	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3	1,15	1,15	0,81
AI836623	RIKEN cDNA 1100001F19 gene	0,81	0,81	0,81
AI847826	RIKEN cDNA 1100001F19 gene	0,76	0,76	0,81
AB024427	ring finger protein 11	0,76	0,87	0,93
U62483	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	0,87	0,81	0,81
X92665	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 1, UBC4/5 homolog (yeast)	0,93	0,71	0,71
<b>TRICARBOXYLIC ACID CYCLE, ELECTRON TRANSPORT CHAIN AND ATP SYNTHESIS</b>				
U51167	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	1,23	0,81	1,07
<b>INSULIN-, G-PROTEIN AND MAPK-SIGNALLING PATHWAYS</b>				
X15643	adrenergic receptor, beta 2	0,71	0,71	0,62
M70642	connective tissue growth factor	0,93	0,66	0,87
V00727	FBJ osteosarcoma oncogene	1,07	0,50	0,38



