

**RASVAISEN RUOKAVALION JA KESTÄVYYS-
HARJOITTELUN VAIKUTUKSET ANGIOGENEESIN
SÄÄTELYPROTEIINEIHIN HIIREN
RAAJALIHAKSESSA**

Mira Kaikkonen

Pro Gradu-tutkielma
Liikuntafysiologia
Syksy 2011
Liikuntabiologian laitos
Jyväskylän yliopisto
Ohjaajat: Mika Silvennoinen
ja Heikki Kainulainen

TIIVISTELMÄ

Kaikkonen, Mira 2011. Rasvaisen ruokavalion ja kestävyysharjoittelun vaikutukset angiogeneesin säätelyproteiineihin hiiren raajalihaksessa. Pro Graduatutkielma. Liikuntabiologian laitos, Jyväskylän yliopisto. 65 s.

Verisuonten tehtävänä on toimia hapen kulkureittinä matkalla kudoksiin. Kapillaarit ovat pienimpiä verisuonia ja niissä tapahtuu hapen ja ravinteiden vaihtuminen veren ja kudoksen välillä. Angiogeneesi tarkoittaa olemassa olevan kapillaarisuoniston kasvamista ja haaroittumista. Toimivien suonten kehittyminen on monimutkainen prosessi, joka vaatii tarkasti säädeltyä yhteistoimintaa useiden stimuloivien ja inhiboivien signaalien kesken. Säätelymekanismi on niin monimutkainen, ettei sitä ole onnistuttu jäljittelemään keinoitekoisesti. Liikunta on yksi harvoista mekanismeista, joka aktivoi angiogeneesin säätelytekijät toivotulla tavalla. Myös rasvaisen ruokavalion on havaittu lisäävän raajalihaksen kapillaaritiheyttä.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia 20 viikon mittaisen rasvasyötön sekä siihen yhdistetyn vapaaehtoisen juoksuharjoittelun vaikutusta angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemiseen hiirten raajalihaksissa. Lisäksi tutkittiin, miten rasvainen ruokavalio vaikuttaa maksimaalisen juoksutestin aiheuttamiin akuuttivasteisiin angiogeneesin säätelyproteiinien osalta normaaliin ruokavalioon verrattuna. Pitkäaikaisvaikutuksia tutkittiin neljän ryhmän avulla: kontrolliruoka (4% rasvaa) (n=10), kontrolliruoka+juoksu (n=10), rasvaruoka (60% rasvaa) (n=10) sekä rasvaruoka+juoksu (n=10). Maksimaalisen juoksutestin akuuttivasteita tutkittiin neljän ryhmän (n=7/ryhmä) avulla: välittömästi testin jälkeen lopetetut rasva- ja kontrolliruokaryhmät sekä kuusi (6) tuntia testin jälkeen lopetetut rasva- ja kontrolliruokaryhmät. Hiirten raajalihasnäytteet homogenoitiin ja poolattiin. Angiogeneesin säätelyproteiinien määrä analysoitiin Proteome prolifer array-menetelmällä.

Tutkimusjakson jälkeen inaktiivisessa rasvaryhmässä havaittiin angiogeneesiä inhiboivien proteiinien laskua, mikä on mahdollisesti rasvaruuan kapillaaritiheyttä lisäävä mekanismi. Juoksuryhmissä havaittiin pitkäaikaisvaikutuksena ruokavaliosta riippumatta angiogeneesiä stimuloivien proteiinien määrän lisääntymistä, mikä toiminee kestävyystyypin kuormituksen kapillaaritiheyttä lisäävänä mekanismina. Akuuttivasteena maksimaaliseen kuormitukseen normaaliruokaisten ryhmässä havaittiin sekä stimuloivien että inhiboivien proteiinien laskua, kun taas rasvaryhmässä sekä stimuloivien että inhiboivien säätelyproteiinien määrä kasvoi lähtötilanteeseen verrattuna. Todennäköisesti molemmissa tilanteissa angiogeneesi tehostuu mekanismin ollessa erilainen. Tarkempien signalointireittien arvioiminen on tällä menetelmällä mahdotonta. Käytetyllä menetelmällä saadut mielenkiintoiset tulokset tulee varmistaa western blot-menetelmällä, jotta erojen tilastolliset merkitsevyydet voidaan määrittää ja sulkea pois proteiinien epäspesifin sitoutumisen mahdollisesti aiheuttamat virheet.

Asiasanat: angiogeneesi, rasvainen ruokavalio, säätelyproteiinit, proteomiikka

SISÄLTÖ

TIIVISTELMÄ	2
SANASTO	4
1 JOHDANTO	6
2 VERISUONTEN KASVUMEKANISMEJA	8
2.1 Angiogeneesi	9
2.2 Arteriogeneesi	9
2.3 Vaskulogeneesi.....	10
3 ANGIOGENEESIN SÄÄTELY	11
3.1 Angiogeneesiä säätelevät proteiinit.....	15
3.1.1 VEGF.....	15
3.1.2 Angiopoietiinit.....	16
3.1.3 NOTCH/WNT-signalointi	18
3.1.4 Muut säätelyyn vaikuttavat proteiinit	19
3.2 Häiriöt säätelyssä.....	21
3.3 Terapeuttinen angiogeneesi.....	22
4 KUORMITUKSEN INDUSOIMA ANGIOGENEESI	24
4.1 Hypoksian aiheuttamat vasteet raajalihaksessa.....	25
4.2 PGC-1 α /ERR α /VEGF-signalointireitti	28
5 RUOKAVALION VAIKUTUS KESTÄVYYSHARJOITUSVASTEISIIN JA KAPILLAARITIHEYTEEN	31
5.1 Kestävyysharjoitusvasteet	31
5.2 Ruokavalion vaikutus kestävyysharjoitusvasteisiin	32
5.3 Ruokavalion vaikutus kapillaaritiheyteen	33
6 TUTKIMUSONGELMA JA HYPOTEEESIT	35
7 TUTKIMUSMENETELMÄT	36
7.1 Koe-eläimet	37
7.2 Tutkimusryhmät	37
7.3 Lihasnäytteiden kerääminen.....	38
7.4 Lihasnäytteiden homogenointi ja poolaus.....	39
7.5 Proteomiikkatutkimus	39
7.6 Tulosten analysointi	41

8 TULOKSET	42
8.1 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin	42
8.2 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin	44
8.3 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin	44
8.4 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin	47
9 POHDINTA	49
9.1 Rasvaisen ruokavalion ja kestävyysharjoittelun pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesin säätelyproteiineihin	49
9.2 Rasvaisen ruokavalion vaikutus akuuttiin kuormitusvasteeseen angiogeneesin säätelyproteiinien osalta	52
9.3 Menetelmän hyvät ja huonot puolet	56
10 TÄRKEIMMÄT LÖYDÖKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	57
LÄHTEET	59

SANASTO

ALK-1	= activin receptor-like kinase 1
AMPK	= adenosine monophosphate- activated protein kinase
Ang-1, Ang-2, Ang-4	= angiopoietins
CD34	= solukalvon pintaproteiini, antigeeni
COUP-TFII	= chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2
DLL4	= delta like ligand 4
EGFL7	= epidermal growth factor domain-like 7
ENG	= endoglin
ERR- α	= estrogen-related receptor alpha
FGF1, FGF2=bFGF, FGF9	= fibroblast growth factor
FZD	= frizzled proteins
HIF1 α	= hypoxia-inducible factor 1-alpha
JAGGED1	= solukalvon pintaproteiini, antigeeni
MEF2	= myocyte enhancer factor-2
MMP	= matrix metalloproteinases
MT1-MMP	= membrane type-1 matrix metalloproteinase
NRARP	= NOTCH-regulated ankyrin repeat protein
NRF-1, NRF-2	= nuclear respiratory factors
PAI-1 = Serpin E1	= plasminogen activator inhibitor-1
PDGF-B, PDGF-CC, PDGF-DD	= platelet-derived growth factors
PDGFR- β	= platelet-derived growth factor receptor- β
PGC-1 α	= peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
PIGF	= placental growth factor
SDF-1 α	= stromal cell-derived factor-1 α
tFAM	= mitochondrial transcription factor A
TGFR-1 = ALK-5, TGFR-2	= transforming Growth Factor Receptors
TGF- β	= transforming growth factor beta
Tie-1, Tie-2	= tyrosine-kinase transmembrane receptors
TIMP	= tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
VEGF = VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C	= vascular endothelial growth factors
VEGFR1 = FLT-1, VEGFR2 = FLK-1, VEGFR3	= vascular endothelial growth factor receptors
VE-kadheriini	= vascular endothelial cadherin
WNT	= wingless type proteins

1 JOHDANTO

Angiogeneesi tarkoittaa olemassa olevan kapillaarisuoniston kasvamista ja haaroittumista (Carmeliet 2003). Tärkein angiogeneesiä aiheuttava ärsyke on kudosten hapenpuute eli hypoksia: kun solusta on matkaa lähimpään kapillariin $>100 \mu\text{m}$, tarvitaan uusia haaroja tuomaan happirikasta verta hapen puutteesta kärsiville soluille. (Rissanen & Ylä-Herttuala 2007) Toimivien suonten kehittyminen on monimutkainen prosessi, joka vaatii tarkasti säädeltyä yhteistoimintaa useiden stimuloivien ja inhiboivien signaalien kesken (Carmeliet 2003). Vaikka angiogeneesi on monimutkainen prosessi, sen pääasiallisena säätelijänä toimivat VEGF-perheen proteiinit (Carmeliet & Jain 2011).

Liikunta on yksi tehokkaimmista keinoista välttää ja hoitaa kroonisia elämäntapasairauksia. Lihakset sopeutuvat kestävyystyypiseen harjoitteluun lisäämällä mitokondrioiden biogeneesiä, muokkaamalla lihassolujen rakennetta sekä kasvattamalla uusia verisuonia. Nämä muutokset lihaksen rakenteessa ovat myös monien liikunnan terveyshyötyjen taustalla. (Chinsomboom ym. 2009). Parantunut kestävyysuorituskyky on siis osittain seurausta lisääntyneestä kapillaaritiheydestä, jolloin hapen ja energian kuljetus työskenteleviin lihaksiin tehostuu ja samalla lämmön ja aineenvaihdunnan sivutuotteiden poisto elimistöstä nopeutuu (Andersen & Henriksson 1977).

Tiedetään, ettei yksittäinen angiogeneesin säätelijä kuten VEGF kykene yksinään kasvattamaan täysin toimintakykyisiä verisuonia vaan suuren säätelijöiden joukon on aktivoitettava, jotta angiogeneesi toimisi toivotulla tavalla. Liikunta on yksi harvoista fysiologisista prosesseista, jotka aktivoivat angiogeneesin säätelijöitä toivotulla tavalla. Tästä syystä kuormituksen indusoiman angiogeneesin geenitason säätelyjärjestelmän tutkiminen on suuren mielenkiinnon kohteena. (Chinsomboom ym. 2009). Myös rasvaisen ruokava-

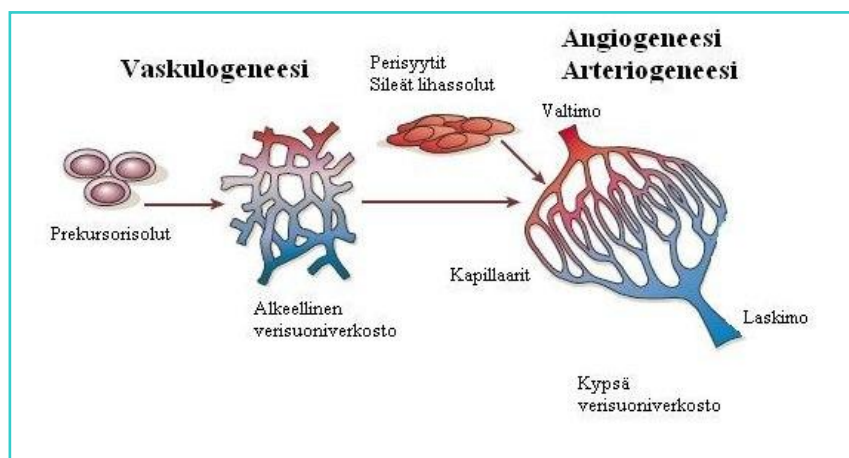
lion on havaittu lisäävän luurankoli hasten kapillaaritiheyttä koe-eläimillä (Silvennoinen ym. 2010).

Kudoksen riittävä kapillaaritiheys on siis kudoksen ravinteiden ja hapensaannin kannalta elintärkeää. Uusien kapillaarien muodostuminen on angiogeneesiä edistävien ja estävien signaalien välisen tasapainon rakentama monimutkainen prosessi, jota ei ole onnistuttu täydellisesti jäljittelemään laboratorioolosuhteissa. Rasvaisen ruokavalion on siis havaittu aikaisemmissa tutkimuksissa lisäävän hiirten raajalihasten kapillaaritiheyttä. Samoin kestävyysharjoittelulla on raajalihasten kapillaaritiheyttä lisäävä vaikutus. Tämän tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, miten angiogeneesiä stimuloivien ja inhiboivien säätelyproteiinien määrät muuttuvat pitkäkestoisen rasvasyötön seurauksena, ja onko rasvasyöttöön yhdistetyllä juoksuharjoittelulla lisävaikutusta angiogeneesin säätelyyn. Toisaalta mielenkiinnon kohteena on se, ovatko maksimaalisen juoksutestin aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemisessä erilaiset riippuen siitä, onko takana 20 viikon jakso rasva- vai kontrolliruualla.

2 VERISUONTEN KASVUMEKANISMEJA

Antiikin ajan kreikkalainen lääkäri Galenos oletti alun perin, ettei veri kierrä elimistössä vaan että tarvittava määrä verta kehitetään aina paikallisesti tarvittaessa. Vasta vuonna 1628 William Harvey havaitsi sydämen pumpaavan veren kaikkialle kehoon valtimoiden kautta ja veren palaavan edelleen sydämeen laskimoita pitkin. Muutamaa vuosikymmentä myöhemmin 1661 Marcello Malpighi tunnisti kapillaarit pienimmiksi verisuoniksi, jotka valtimoiden ja laskimoiden välillä täydentävät verenkierron suljetuksi systeemiksi. Kapillaareissa tapahtuu hapen ja ravinteiden vaihtuminen veren ja kudoksen välillä (Carmeliet 2005.)

Sikiökehityksen aikana verisuonet tuovat kudoksille niiden kasvuun tarvittavan hapen. Ravitsemuksellisen roolinsa lisäksi verisuonet ohjailevat kudosten morfogeneesiä kasvusignaalien avulla. Verisuonet kehittyvät endoteelisistä prekursorisoluista (kts. kuva 1), jotka ovat samaa alkuperää kuin hematopoiettiset kantasolut. Tämä veren ja verisuonten kehityskaaren yhtenevyys säilyy angiogeneesin kannalta tärkeänä koko eliniän. (Carmeliet 2005.) Kapillaarit muodostuvat ainoastaan endoteelisoluista kun taas suurempien suonien ympärillä on myös perisyyttejä ja sileän lihaksen soluja (Carmeliet 2003).



KUVA 1 Uusien verisuonten muodostumismekanismit. Mukailtu Carmeliet 2005.

2.1 Angiogeneesi

Angiogeneesi tarkoittaa olemassa olevan kapillaarisuoniston kasvamista ja haaroittumista. Kasvu tapahtuu erilaistuneiden endoteelisolujen ja perisytytien eli tukisolujen kasvun ja migraation seurauksena. Angiogeneesi on hyvin keskeinen tapahtuma paitsi sikiön kehityksen ja kasvun ohella, myös esimerkiksi haavojen parantumisessa, luutumisessa, naisen lisääntymisfysiologiassa sekä myös erilaisissa patologisissa prosesseissa kuten kasvainten kasvussa ja metastasoinnissa, tulehduksellisessa reumassa ja diabeettisessa retinopatiassa (Carmeliet 2003). Tärkein angiogeneesiä aiheuttava ärsyke on kudosten hapenpuute eli hypoksia: kun solusta on matkaa lähimpään kapillaariin $>100 \mu\text{m}$, tarvitaan uusia haaroja tuomaan happirikasta verta hapen puutteesta kärsiville soluille. (Rissanen & Ylä-Herttuala 2007)

2.2 Arteriogeneesi

Kollateraalivaltimoiden kasvu on tärkeä verisuonten kasvumekanismi sydämen ja alaraajojen laaja-alaisen iskemian lievittämiseksi. Tätä mekanismia kutsutaan arteriogeneesiksi. (Schaper & Scholz 2003). Hypoksia ei ole kollateraalivaltimoiden kasvun suora ärsyke kuten angiogeneesissä, vaan arteriogeneesi perustuu paineeseen reagoivien mekanoreseptoreiden toimintaan. Suuren valtimon ahtautuminen aiheuttaa verenpainegradientin pienten ohittavien valtimoanastomoosien proksimaali- ja distaalipäiden välille, minkä seurauksena mediakerrosta vastaan kohdistuva paine ja endoteelikerrosta vastaan kohdistuva verenvirtauksen kitka kasvaa. Tämä puolestaan johtaa mekanoreseptoreiden välityksellä kasvusignaaleihin. (Rissanen & Ylä-Herttuala 2007). Myös paineen takia ärsyyntyneen endoteelin paikallisella tulehdusreaktiolla on ajateltu olevan tärkeä rooli arteriogeneesissä (Schaper ja Scholz 2003), mutta toisaalta tulehdus saattaa aiheutua myös kollateraalien voimakkaasta kasvusta ollen siten arteriogeneesin seuraus syyn sijaan (Rissanen &

Ylä-Herttuala 2007). Aiemman valtimoahtauman takia muodostuneet kollateraalivaltimot suojaavat kudosta akuutilta iskemialta, mutta niiden verenkielityskyky jää vääjäämättä heikommaksi verrattuna alkuperäiseen valtimoon Poiseuillen lain mukaisesti (Schaper ja Scholz 2003).

2.3 Vaskulogeneesi

Sikiönkehityksen aikaista verisuonten rakentumista mesodermin hemiangioblasteista kutsutaan vaskulogeneesiksi. Vaskulogeneesin aikana kantasolut kerääntyvät primitiiviseen kapillaariverkoston muodostaakseen varsinaisen verisuoniston. Mielenkiintoista on, että jo tässä vaiheessa kapillaarien tyyppi (valtimo/laskimo) on määrätynyt, mikä kertoo siitä että verisuonistoa muodostavien solujen erilaisuus on geneettisesti ohjelmoitua eikä ainoastaan verenpaineen aiheuttamaa. (Carmeliet 2005)

Kantasolujen on ajateltu ottavan osaa vain tässä vaiheessa tapahtuvaan verisuoniston kehitykseen (Rissanen & Ylä-Herttuala 2007). Kantasolututkimuksen kehittymisen myötä on kuitenkin kyetty eristämään myös aikuisen verestä endoteeli- ja kantasolumarkkereita ilmentäviä soluja, jotka in vitro-tutkimuksessa erilaistuiivat endoteelisoluiksi ja joiden havaittiin lisäksi hakeutuvan kasvaviin verisuoniin in vivo (Asahara ym. 1997). Viimeisimmissä aihepiiriin liittyvissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, etteivät nämä kantasoluista erilaistuneet solut merkittävästi liity kasvaviin verisuoniin vaan toimivat lähinnä tukisoluina ja edistävät angiogeneesiä erittämällä parakriinisesti kasvutekijöitä (Rehman ym. 2003, O'Neill ym. 2005). Lisäksi osa aiemmissa tutkimuksissa kantasoluiksi tulkituista soluista on ollut luultavasti varsinaisten kantasolujen sijaan kantasolumarkkereita ilmentäviä monosyyttejä ja muita tulehdussoluja (Rehman ym. 2003).

3 ANGIOGENEESIN SÄÄTELY

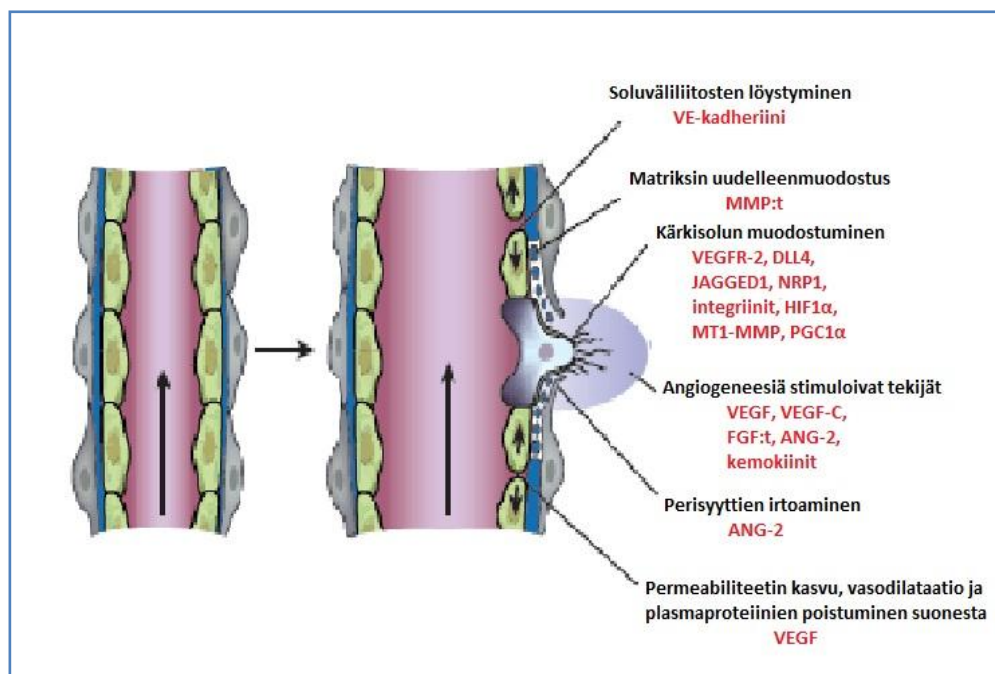
Verisuonten tehtävänä on toimia hapen kulkureittinä matkalla kudoksiin. Verisuonet ovat ratkaisevan tärkeässä roolissa sikiön kasvun kannalta sikiöaikana sekä aikuisiällä vaurioituneen kudoksen korjaamisessa. Häiriöt verisuonten kasvussa johtavatkin usein patogeneisiin tiloihin. (Carmeliet 2005.)

Pitkään ajateltiin, että sikiöllä verisuonet kehittyvät endoteelin kantasoluista kun taas aikuisen yksilön verisuonten kasvu johtuisi ainoastaan erilaistuneiden endoteelisolujen jakautumisesta. Nykyisen näkemyksen mukaan verisuonten uudismuodostumista tapahtuu endoteelin kantasoluista paitsi sikiöllä niin myös aikuisen yksilön iskeemisessä, tulehtuneessa tai pahanlaatuisessa kudoksessa. (Carmeliet 2003.) Endoteelisolut erilaistuvat sikiöllä mesenkymaalaisista angioblasteista (Mikkola & Orkin 2002) ja aikuisella yksilöllä endoteelien kantasoluista, mesoangioblasteista, multipotenteista kantasoluista tai luuytimen side-populaation soluista (Luttun ym. 2002, Reyes ym. 2002). Endoteelien kantasolut voivat edistää verisuonten kasvua paitsi erilaistumalla itse endoteelisoluiksi niin myös vapauttamalla angiogeneettisiä kasvutekijöitä (Rehman ym. 2003).

Geneettiset tutkimukset hiirillä, seeprakaloilla ja nuijapäillä ovat lisänneet tietämystä koskien verisuonten kasvua sääteleviä molekyyli-tason mekanismeja. Tiedetään esimerkiksi että NOTCH-perheen geenit säätelevät valtimoiden kehitystä, kun taas laskimoiden erilaistumisesta vastaavat omat proteiinit reseptoreineen, muun muassa COUP-TFII-perheen proteiinit. VEGF:n tiedetään olevan avainasemassa verisuonten endoteelin muokkauksessa, kun taas kasvutekijä PDGF-BB sekä ang-1 vastaavat verisuonta ympäröivien ja tukevien solujen koordinoinnista. Toimivien suonten kehittyminen on monimutkainen prosessi, joka vaatii tarkasti säädeltyä yhteistoimintaa useiden stimuloivien ja

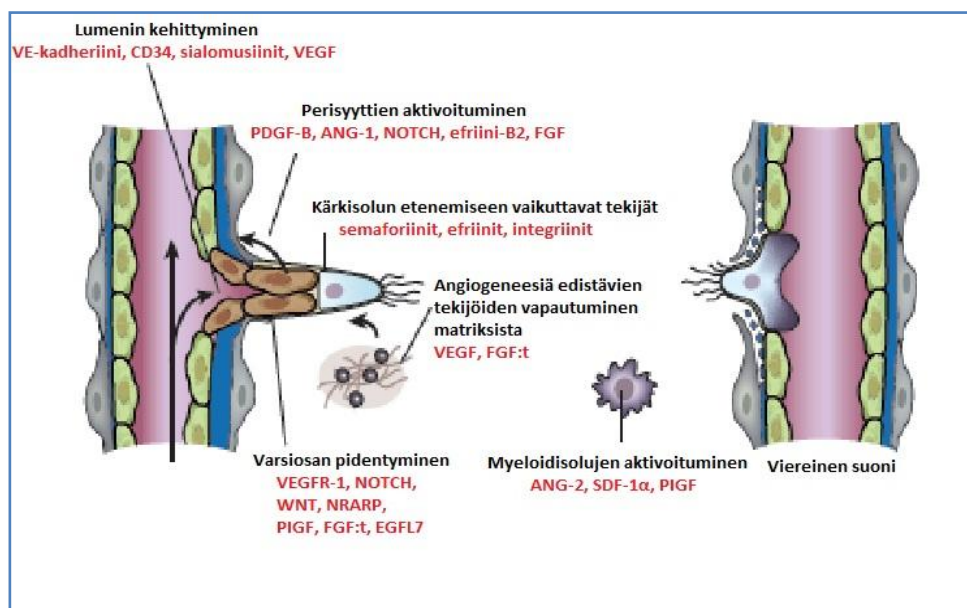
inhiboivien signaalien kesken. Sääteelyyn ottavat osaa aiemmin mainittujen signaalien lisäksi monet integrinit, kemokiinit, liitosmolekyylit, happisensorit, endogeeniset inhibiittorit ja monet muut. (Carmeliet 2003.)

Kuvassa 2 esitetty angiogeneesin käynnistyminen on useiden signaalien ohjaama tapahtuma. Aluksi perisytyt irtautuvat verisuonen seinämästä Ang2:n vaikutuksesta. Tätä seuraa endoteelisolujen vapautuminen tyvikalvosta MMP:ien indusoiman proteolyyttisen hajoamisen seurauksena. VEGF:n vaikutuksesta endoteelisolujen väliset liitokset löystyvät ja läpäisevyys lisääntyy, jolloin plasmaproteiinit siirtyvät solun ulkopuolelle muodostaen väliaikaisen ekstrasellulaarisen matriksin. Integriinien signaloinnin seurauksena endoteelisolut vaeltavat rakentuneen ekstrasellulaarimatriksin pinnalle. Proteaasit vapauttavat ekstrasellulaarimatriksista angiogeenisiä proteiineja kuten VEGF- ja FGF-proteiineja ja muokkaavat siten matriksin verisuonille sopivaksi ympäristöksi. (Carmeliet & Jain 2011.)



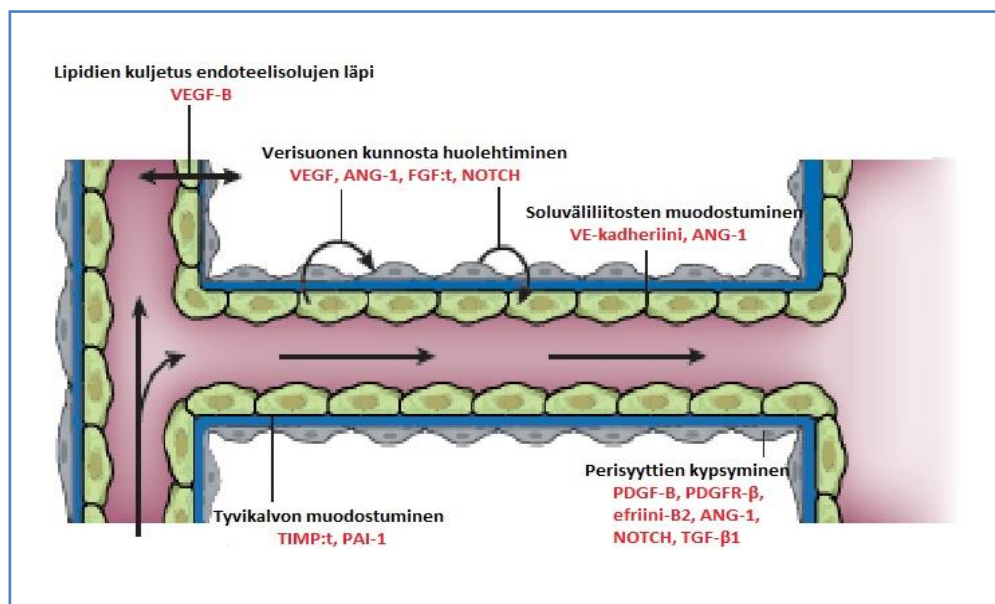
KUVA 2 Angiogeneesin käynnistävät signaalit. Mukailtu Carmeliet & Jain 2011.

Jotta veri virtaisi uudessa suonessa, eikä liikaa endoteelisoluja siirtyisi angiogeneesiä indusoivia signaaleja kohti, on muodostuvan suonon päässä niin sanottu kärkisolä, joka on erikoistunut angiogeneettisten signaalien aistimiseen (kts. kuva 3). Kärkisolussa on muun muassa VEGF reseptoreita, neuropilineja (NRPs) ja NOTCH ligandeja kuten DLL4 ja JAGGED1. Muut solut ottavat sivuroolin ja jakautuvat kasvattaen suonen mittaa ja huolehtien luumenin muodostumisesta. Keskeisiä suonen mitan kasvattamiseen osallistuvia säätelijöitä ovat NOTCH, NRARP (NOTCH-regulated ankyrin repeat protein), WNT:t, PIGF sekä FGF:t. Luumenin muodostumista sääteleviä proteiineja ovat puolestaan muun muassa VE-kadheriini, CD34, sialomuciinit, VEGF ja hedgehog. Kärkisolut reagoivat ympäristön angiogeneettisiin signaaleihin kuten efrineihin sekä semaforiineihin, kun taas muut solut erittävät molekyyliä kuten EGFL7 viestiäkseen naapurisolujen kanssa. (Carmeliet & Jain 2011.)



KUVA 3 Uuden kapillaarin kehittyminen kärkisolun johdolla. Mukailtu Carmeliet & Jain 2011.

Myeloidiset siltasolut yhdistävät uuden suonen olemassa olevaan verisuoniverkostoon ja mahdollistavat siten veren virtaamisen muodostuneen suonen kautta. Jotta uudesta suonestä tulee toimiva, sen täytyy kypsyä ja kehittyä vakaaksi. Kuvassa 4 esitetään uuden kapillaarin kypsymiseen vaikuttavia säätelytekijöitä. Endoteelisolujen peittyminen perisytyteillä ja siten suonen kypsyminen ja vakautuminen tapahtuu muun muassa PDGF-B:n (platelet-derived growth factor B), ANG-1:n, TGF- β :n (transforming growth factor- β), efrini-B2:n ja NOTCH:n säätelämänä. Proteaasi-inhibiittorit kuten TIMP:t (tissue inhibitors of metalloproteinases) sekä PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) aiheuttavat tyvikalvon ja soluväliliitosten muodostumisen, mikä optimoi veren virtaamisen suonessa. Jos perfuusiota ei tapahdu, suonen kehitys taantuu. (Carmeliet & Jain 2011.)



KUVA 4 Uuden kapillaarin kypsymiseen vaikuttavat säätelytekijät. Mukailtu Carmeliet & Jain 2011.

3.1 Angiogeneesiä säätelevät proteiinit

3.1.1 VEGF

Vaikka angiogeneesi on monimutkainen prosessi, sen pääasiallisena säätelijänä toimivat VEGF-perheen proteiinit (Carmeliet & Jain 2011). Yleensä VEGF:sta puhuttaessa tarkoitetaan VEGF-A:ta, joka signaloi angiogeneesiä VEGF reseptori-2:n kautta. VEGFR2 ja kirjallisuudessa esiintyvä FLK1 ovat saman reseptorin kaksi eri nimitystä. (Ferrera 2009, Nagy 2007.) Neuropiliinit NRP1 ja NRP2 ovat VEGF-A:n co-reseptoreita eli ne tehostavat VEGFR2:n toimintaa. Toisaalta NRP1:lla ja NRP2:lla on myös itsenäistä, VEGF:sta riippumatonta signalointia. (Neufeldt & Kessler 2008.) VEGF:n tai VEGFR2:n puute estää verisuonen kehittymisen (Carmeliet 2003). Toinen VEGF-reseptori on VEGFR1 (=FLT-1). Sen rooli on vaikeasti määriteltävä. Yhden teorian mukaan VEGFR1:n liukoinen muoto sitoo ylimääräistä VEGF:ä, jottei sitä sitoudu liikaa VEGFR2:een. Tätä teoriaa puoltaa se, että VEGFR1:n puutteen on havaittu aiheuttavan verisuonten liikakasvua. (Fischer ym. 2008, Schwartz ym. 2010.)

VEGF:n lisääntyminen indusoi DLL4:n erittymisen kärkeisoluista, mikä edelleen aktivoi NOTCH:n varsisoluissa. NOTCH:n aktivoituminen vähentää VEGFR2:n määrää varsisoluissa, jolloin VEGF:n vaikutus suuntautuu pääasiassa kärkeisoluihin. (Phng & Gerhardt 2009.) VEGF:n eri olomuotojen välinen työnjako on hoidettu siten, että liukoinen VEGF indusoi verisuonten kasvua ja ekstrasellulaarimatriksiin sitoutunut muoto puolestaan suonten haaroitumista (Carmeliet & Jain 2011). PIGF on homologinen proteiini VEGF:n kanssa ja siksi sen oletettiin aiemmin osallistuvan myös angiogeneesin säätelyyn. Nykyisin kuitenkin tiedetään että PIGF ei ole tarpeellinen verisuonten

kehittymisen kannalta ja että sillä on merkitystä vain patogeenisissa tiloissa. (Fischer ym. 2008. , Carmeliet ym. 2001.) PIGF:n puutteen on havaittu parantavan muun muassa syöpäpotilaiden vastetta kemoterapiaan (Rolny ym. 2011).

Toinen VEGF:n muoto on VEGF-C. VEGF-C aktivoi kärkisoluja VEGFR2 ja VEGFR3:n kautta. (Tvorogov ym. 2010.) VEGF-C on tärkeä säätelijä embryogeneesin aikana tapahtuvassa verisuonten muodostuksessa, myöhemmin se vastaa pääasiassa uusien lymfasuonten muodostuksesta (Tammela & Alitalo 2010). Kolmas VEGF-perheen jäsen on VEGF-B. VEGF-B:n puute ei tosin heikennä angiogeneesiä eikä myöskään korvaa muiden VEGF-proteiinien puutosta. (Fischer ym. 2008.) VEGF-B indusoi kuitenkin angiogeneesiä tietyissä kudoksissa kuten sydämessä. Lisäksi se edesauttaa muun muassa neuronien selviytymistä. (Fischer ym. 2008, Hagberg ym. 2010.)

3.1.2 Angiopoietiinit

VEGF-perheen geenien lisäksi endoteelisolujen kasvuun on havaittu vaikuttavan useat muutkin molekyylit kuten kasvutekijät, kemokiinit, sytokiinit, lipidivälittäjät, hormonit ja neuropeptidit. Esimerkiksi angiopoietiinit (ang-1 ja ang-2) vaikuttavat useaan ominaisuuteen ja niiden toiminta on kontekstisidonnaista. (Carmeliet 2003.)

Angiopoietiini 1. Ang-1 stimuloi verisuonten kasvua ihossa, iskeemisissä raajoissa, mahahaavoissa ja joissain kasvaimissa (Jain & Munn 2000, Shim ym. 2002) oletettavasti siitä syystä, että ang-1 mobilisoi endoteelin prekursorisoluja sekä hematopoieettisia prekursorisoluja (Hattori ym. 2001). Lisäksi ang-1 vähentää angiogeneesiä sydämessä ja kasvaimissa (Visconti ym. 2002, Ahmad ym. 2001). Ang-1 kiristää verisuonia vaikuttamalla liitosmolekyyleihin (Thurston ym. 2000) ja edistämällä endoteeli- ja tukisolujen yhteistyötä

sekä rekrytoimalla perisytyttejä (Carlson ym. 2001). Ang-1:n angiogeneesiä rajoittava ominaisuus liittyykin todennäköisimmin siihen seikkaan, että verisuonen seinämän täytyy löystyä ennen kuin endoteelisolut pääsevät siirtymään. Toisin sanoen angiogeneesi ei ole mahdollinen, jos verisuonet ovat liian tiukkoja. (Carmeliet 2003.)

Pääasiassa on tutkittu VEGF:n uusien verisuonten kasvua stimuloivaa vaikutusta iskeemisessä kudoksessa (Jain & Munn 2000). Geneettisissä kokeissa on havaittu että VEGF yksin pystyy aloittamaan, mutta ei ohjaamaan loppuun angiogeneesiä (Carmeliet ym. 1999). VEGF:n yksin muodostamat suonet ovat heikkoja ja vuotavia. Kestävämpiä suonia saadaan aikaiseksi VEGF:n ja ang-1:n yhteisvaikutuksesta, mutta muodostuvien suonten läpimitta ei ole yhtenevä. Ei ole varmaa johtaako tämä suonten epänormaali rakenne heikompään verenkiertoon. (Jain & Munn 2000.)

Angiopoietiini 2. Ang-2 puolestaan toimii osittain ang-1:n vastavaikuttajana lisäten angiogeneesiä esim. kasvaimissa, heikentämällä solujen välisiä liitoksia ja hajottamalla ekstrasellulaarista matriksia (Jain & Munn 2000). Myös ang-2:n toiminta on kuitenkin konteksti-sidonnaista. Tiettyjen signaalien vaikutuksesta myös se voi aikaan saada endoteelisolujen kuoleman ja siten verisuonten regression. (Carmeliet 2003.) Ang-2 erittyy kehittyvän suonen kärkisoluista (Saharinen ym. 2008).

Ang/Tie-signalointi. Terveiden suonten täytyy pysyä stabiileina, mutta silti säilyttää kykynsä reagoida angiogeenisiin signaaleihin. Ang/Tie – signalointisysteemi mahdollistaa tämän mekanismin. Ligandeina signaloinnissa toimivat jo edellä mainitut ang-1, ang-2 sekä ang-4, jonka toimintaa ei ole niin paljon tutkittu, mutta jonka uskotaan toimivan ang-1:n tavoin. Reseptoreina puolestaan toimivat Tie-1 ja Tie-2. Ang-1 on Tie-2 agonisti ja ang-2 on ang-1:n kilpaileva antagonisti. Tie-1:n tarkka rooli on epäselvä. Sille ei ole signa-

lointisysteemissä omaa ligandia ja sen uskotaankin toimivan pääasiassa Tie-2:n negatiivisena säätelijänä. (Augustin ym. 2009.)

Kehittyvässä endoteelissa ang-1 lisää Tie-2:n tarttumista endoteelin soluliitoksiin edistäen endoteelin stabiiliutta (Saharinen ym. 2008). Ang-1 stimuloi myös suonen peittymistä mural-soluilla ja tyvikalvon muodostumista, mikä myös lisää suonen lujuutta. Angiogeneenisten signaalien läsnä ollessa kärkisolut erittävät ang-2:ta, mikä toimii ang-1 antagonistina edistäen mural-solujen irtoamista ja lisäten suonen permeabiliteettia. (Augustin ym. 2009.) Hiirillä Tie-2:n puutteen on havaittu aiheuttavan verisuonten heikkoutta ja ihmisillä Tie-2-mutaatiot ovat johtaneet verisuonten epämuodostumiin (De Palma ym. 2005).

3.1.3 NOTCH/WNT-signalointi

Vasteena VEGF:n määrän lisääntymiseen ja edelleen VEGFR-2:n aktivoitumiseen DLL4:n erityis kärkisolusta lisääntyy, mikä vuorostaan aktivoi varren soluissa NOTCH:n eritystä. NOTCH vähentää VEGFR-2:n vaikutusta ja lisää VEGFR-1:n vaikutusta varsisoluissa, näin ollen signalointiketju estää kehittyvän suonen haaroittumisen. (Phng & Gerhardt 2009.) Kärkisolusta erittyvä DLL4 aktivoi myös PDGFR- β :aa mural-soluissa, mikä edistää suonten kypsymistä. Varren solujen erittämä NOTCH-ligandi JAGGED1 toimii puolestaan säätelijänä varren soluista kärkisolun suuntaan. (Benedito ym. 2009.) NOTCH-signalointi säätelee itse itseään negatiivisen palauteketjun kautta NRARP-proteiinin toimiessa negatiivisena säätelijänä (Phng ym. 2009).

Endoteelisolut kilpailevat jatkuvasti kärkisolun asemasta ja valinta tapahtuu NOTCH-signaloinnin avulla säädeltävän VEGFR-1/VEGFR-2 – tasapainon

perusteella. Jos DLL4-signaaliin blokataan, uusia suonia syntyy määrällisesti enemmän, mutta toiminnallisuus on heikkoa eli angiogeneesi on säätelemätöntä. (Thurston ym. 2007.) Hedgehog-perheen molekyylit säätelevät NOTCH-signaaliin ja lisäksi vaikuttavat esimerkiksi uuden suonen putki-muodostukseen (Swift & Weinstein 2009).

NOTCH aktivoi myös WNT-signaaliin. Endoteelisolut muodostavat useita WNT-ligandeja ja -reseptoreja (FZD), jotka puolestaan lisäävät endoteelisolujen proliferaatiota. (Phng ym. 2009). Myös WNT-signaaliinilla on angiogeneesiin säätelyssä tärkeä osuutensa, sillä tutkimuksissa on havaittu, että joidenkin WNT tai FZD-geenien inaktivointi johtaa hiirillä verisuonten epämuodostumiseen (Dejana 2010).

3.1.4 Muut säätelyyn vaikuttavat proteiinit

PGC-1 α . Uusien toimivien ja kestävien verisuonten rakentaminen vaatii useiden molekyylisignaaliinireittien yhteistoimintaa (Carmeliet 2003). PGC-1 α säätelee voimakkaasti kudosten oksidatiivista metaboliaa (Chinsomboon ym. 2009). PGC-1 α onkin yksi tunnetuimmista angiogeneesiin säätelyyn liittyvistä proteiineista. Angiogeneesiin lisäksi PGC-1 α säätelee voimakkaasti muun muassa oksidatiivista fosforylaatiota, mitokondrioiden biogeneesiä sekä hengitystä. PGC-1 α on verisuonituksen säätelyn osalta nimenomaan angiogeneesiin liittyvä säätelytekijä, sillä PGC-1 α knockout - hiiret ovat elinkelpoisia ja toimintakykyisiä, mikä kertoo siitä, ettei PGC-1 α ole välttämätöntä sikiöaikaiselle vaskularisaatiolle. Arany ym. (2008) havaitsivat, että PGC-1 α :n lisäyksen seurauksena kapillaarien määrä nousi pinta-alaa kohti tarkasteltuna sadasta kolmeensataan ja vastaavasti säiettä kohti tarkasteltuna viidestä kymmeneen. Täten voidaan todeta, että PGC-1 α indusoi angiogeneesiä voimakkaasti in vivo. (Arany ym. 2008.)

PDGF-perhe. Verisuonten tulee toimiakseen kypsyä ja peittyä mural-soluilla. Tätä tapahtumaa indusoivat monet kasvutekijät kuten edellä mainitut angiopoietiinit, sekä PDGF:t ja TGF- β :t. (Jain 2003.) Stabiloituakseen angiogeeniset endoteelisolut vapauttavat PDGF-B:ta, joka houkuttelee paikalle PDGF receptor- β (PDGFR- β)-proteiineja sekä perisyyttejä (Hellberg ym. 2010). PDGF-B:n puutteen on tutkimuksissa havaittu johtavan suonten vuotamiseen, muodottomuuteen ja mikroaneurysmien muodostumiseen (Quaegerbeur ym. 2010). PDGFR:n blokkaminen puolestaan johtaa perisyyttien tarttumisen estymiseen ja siten epäkypsien suonten muodostumiseen (Bergers ym. 2003). Hiirillä on havaittu PDGF-B:n liiallisen ilmenemisen paradoksinen vaikutus, kun perisyyttejä aktivoidaan niin paljon että endoteelien kasvaminen estyy ja verisuonten kasvu pysähtyy (McCarty ym. 2007). PDGF-perheen muiden proteiinien PDGF-CC:n ja PDGF-DD:n on havaittu liittyvän pääasiassa syöpäkasvainten verisuonituksen säätelyyn (Carmeliet & Jain 2011).

TGF- β -signalointi. Verisuonten kypsymisen säätelyyn osallistuu myös TGF- β -signalointireitti (Jain 2003). Hiiritutkimuksissa on havaittu että TGF- β reseptorien ALK-1:n, TGFR-1 eli ALK-5:n, TGFR-2:n tai ENG:n puute johtaa verisuonten epämuodostumiin. Sama on havaittu ihmisillä tutkittaessa perinnöllistä hemorragista teleangiektasiaa sairastavien henkilöiden genomia. Signalointireitin selvittäminen ei ole johtanut yksiselitteisiin tuloksiin, sillä TGF- β -perheen jäsenillä on kontekstista riippuvia angiogeneesiä indusoivia tai estäviä vaikutuksia. (Pardali ym. 2010.)

FGF-perhe. bFGF oli ensimmäisiä löydettyjä angiogeenin säätelijöitä. bFGF ja FGF toimivat säätelijöinä niin angiogeenisissä kuin arteriogeneesissä. FGF9 stimuloi angiogeneesiä luun paranemisprosessin yhteydessä. FGF-perheen proteiinit indusoivat angiogeneesiä joko aktivoimalla suoraan endoteelisoluissa olevia FGF-reseptoreita tai epäsuorasti lisäämällä muiden an-

giogeneesin säätelijöiden eritystä. (Beenken & Mohammadi 2009.) Esimerkiksi sydämessä FGF lisää hedgehog:n, ang-2:n ja VEGF-B:n eritystä (Murakami ym. 2008). FGF:n merkitys angiogeneesin säätelyssä on kuitenkin ilmeisesti kompensatorinen, sillä hiirellä FGF1:n ja FGF2:n blokkaminen ei estänyt verisuonten muodostumista (Beenken & Mohammadi 2009).

Neuronien erittämät signaalimolekyylit. Mielenkiintoinen yhteys on löydetty myös verisuonten ja perifeeristen hermojen välillä. Aksonien erittämien signaalimolekyylien kuten efrinien, semaforiinien ja netriinien on havaittu liittyvän verisuonten rakenteen kehittymiseen sekä ohjaavan verisuonet oikeaan kohteeseensa. (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005.) Perifeeriset hermot erittävät myös VEGF:ää, joka vaikuttaa verisuonten erilaistumiseen ja angiogeneesin säätelyyn. Tämä antaa molekylaarisen perustelun sille, miksi perifeeriset hermot ja verisuonet kulkevat usein yhdessä. (Mukouyama ym. 2002.)

3.2 Häiriöt säätelyssä

Verisuonten kasvun säätelyn häiriöillä on suuri vaikutus terveyteen. Esimerkiksi syöpä, psoriasis, niveltulehdus, sokeus, lihavuus, astma, ateroskleroosi sekä monet infektiosairaudet ovat yhteydessä häiriöihin verisuonten kasvun säätelyssä. Myös useat kognitiiviset ja perinnölliset sairaudet on yhdistetty häiriintyneeseen verisuonten kasvuun. Riittämätön verisuonten kasvu rajoittaa hapen ja ravinnon pääsyä kudoksiin ja on siten ymmärrettävästi hengenvaarallista. Esimerkiksi sydämen ja aivojen iskemia sekä neurodegeneraatio aiheutuvat riittämättömän verisuonten kasvun seurauksena. Lisäksi muita patologisia tiloja kuten korkea verenpaine, raskausmyrkytys, hengitysvaikeusoireyhtymä (RDS-tauti), osteoporoosi jne. on yhdistetty riittämättömään verisuonten kasvuun. (Carmeliet 2003)

3.3 Terapeuttinen angiogeneesi

VEGF:n terapeuttista vaikutusta esimerkiksi kroonisessa raajaiskemiassa ihmisillä tutkineet kliiniset kokeet ovat johtaneet huonoihin tuloksiin. (Jain 2003, Carmeliet 2000, Henry ym. 2003). On havaittu, että VEGF:n yksin muodostamat suonet ovat heikkoja ja vuotavia. Kestävämpiä suonia saadaan aikaiseksi VEGF:n ja ang-1:n yhteisvaikutuksesta, mutta muodostuvien suonien läpimitta ei ole yhtenevä. Ei ole varmaa johtaako tämä suonien epänormaali rakenne heikompaan verenkiertoon. (Jain & Munn 2000.) VEGF:n tiedetään olevan avainasemassa verisuonten endoteelin muokkauksessa, kun taas kasvutekijä PDGF-BB ja ang-1 vastaavat verisuonta ympäröivien ja tukevien solujen koordinoinnista (Carmeliet 2003).

VEGF:n hallitsevan roolin vuoksi sen inhibointia on pidetty keinona rajoittaa angiogeneesiä esimerkiksi kasvaimissa (Carmeliet 2005). Anti-VEGF-hoitojen on havaittu syöpäpotilaille parantavan vastetta kemokiinihoitoihin, sillä se normalisoi kasvainsolukon epänormaalia rakennetta, lisää suonien läpäisevyyttä, vähentää kasvaimen sisäistä painetta ja siten lisää kasvainkudoksen sensitiivisyyttä sytotoksisille lääkeaineille (Jain ym. 2006). VEGF-inhibiittorit myös vähentävät endoteelin kantasolujen mobilisointia luuytimestä (Jain ym. 2006). Lisäksi VEGF-inhibiittorit vähentävät jo olemassa olevaa verisuonitusta edistämällä endoteelisolujen kuolemaa (Carmeliet 2005).

Myös rasvakudoksessa tapahtuu paljon angiogeneesiä. Angiogeneettinen kudokse houkuttelee paikalle rasvakudoksen kantasoluja ja siten angiogeneesi voi edelleen edistää rasvan kertymistä elimistöön ylipainoisilla yksilöillä. (Silverman ym. 1988.) VEGF, insuliinin indusoima bFGF sekä keskeinen lihavuuden säätelijä leptiini toimivat pääsääntöisinä angiogeneesin säätelijöinä rasvakudoksessa (Sierra-Honigmann ym. 1998). Angiogeneesiä rajoittavien

menetelmien käyttö lihavuuden hoitomuotona on tärkeä tulevaisuuden tutkimuskohde (Carmeliet & Jain 2000).

VEGF:n inhibointi vaikuttaakin olevan välttämätöntä, muttei kuitenkaan yksin riittävää angiogeneesin estämisen kannalta. Itse asiassa vaikuttaa siltä, että yhden signaalin inhiboiminen voi vahvistaa vaihtoehtoisia angiogeneesiä stimuloivia tekijöitä. Esimerkiksi PlGF:n ilmeneminen lisääntyy anti-VEGF-hoidon vaikutuksesta. Vastaavalla tavalla reagoivat myös muut angiogeneesin säätelijät: HIF-1 α :n inhibointi lisää interleukiini 8:n ilmenemistä. Osa anti-VEGF-terapian käänteisistä vaikutuksista voivat olla selitettävissä sillä, että terveiden suonten ylläpito ja selviäminen vaativat elimistöön tietyn määrän VEGF:a.(Carmeliet 2005.)

Terapeuttinen angiogeneesi lisää angiogeneettisten sytokiinien määrää elimistössä, mikä mobilisoi liitosmolekyylejä verenkiertoon ja voi mahdollisesti kiihdyttää ateroskleroosia (Carmeliet & Jain 2000). Angiogeneesin säätelytekijöiden keinotekoisessa stimuloinnissa ja inhiboinnissa tulee olla hyvin varovainen, sillä monet näistä tekijöistä säätelevät myös solukuolemaa (Fidler & Ellis 2000).

4 KUORMITUKSEN INDUSOIMA ANGIOGENEESI

Lisääntyvä fyysinen inaktiivisuus on yksi suurimmista kansanterveydellisistä huolenaiheista länsimaissa. Fyysinen inaktiivisuus lisää tunnetusti monien kroonisten sairauksien kuten lihavuuden, diabeteksen, ateroskleroosin ja neurodegeneratiivisten sairauksien esiintyvyyttä ja vakavuutta. Liikunta on yksi tehokkaimmista keinoista välttää ja hoitaa näitä sairauksia. Lihakset sopeutuvat kestävyystyypin harjoitteluun lisäämällä mitokondrioiden biogeneesiä, muokkaamalla lihassolujen rakennetta sekä kasvattamalla uusia verisuonia. Nämä muutokset lihaksen rakenteessa ovat myös monien liikunnan terveyshyötyjen taustalla. (Chinsomboon ym. 2009.) Parantunut kestävyysuotituskyky on siis osittain seurausta lisääntyneestä kapillaaritiheydestä, jolloin hapen- ja energiankuljetus työskenteleviin lihaksiin tehostuu ja samalla lämmön ja aineenvaihdunnan sivutuotteiden poisto elimistöstä nopeutuu (Andersen & Henriksson 1977). Tutkimuksissa on havaittu urheilijoiden kapillaaritiheyden lihassolua kohden olevan huomattavasti suurempi kuin inaktiivisilla henkilöillä (Zolanz ym. 2005). Kestävyysharjoittelun aiheuttamaa kapillaaritiheyden lisääntymistä on tutkittu myös hiirillä. Kahden viikon vapaaehtoisin, keskimäärin 8km/vrk juoksuharjoittelun jälkeen juosseiden hiirien etureiden kapillaaritiheys oli kaksinkertainen inaktiiviseen verrokkiryhmään verrattuna. Kestävyysharjoittelu on siis vahvasti angiogeneesiä lisäävä stimulus myös koe-eläimillä. (Prior ym. 2004, Waters ym. 2004.)

Harjoittelun angiogeenin käynnistävää mekanismia ei vielä täysin tunneta. Tiedetään, ettei yksittäinen angiogeenin säätelijä kuten VEGF kykene yksinään kasvattamaan täysin toimintakykyisiä verisuonia vaan suuren säätelijöiden joukon on aktivoitettava, jotta angiogeneesi toimii toivotulla tavalla. Liikunta on yksi harvoista fysiologisista prosesseista, jotka aktivoivat angiogeenin säätelijät toivotulla tavalla. Tästä syystä kuormituksen in-

dusoiman angiogeneesin geenitason säätelyjärjestelmän tutkiminen on suuren mielenkiinnon kohteena. (Chinsomboom ym. 2009.)

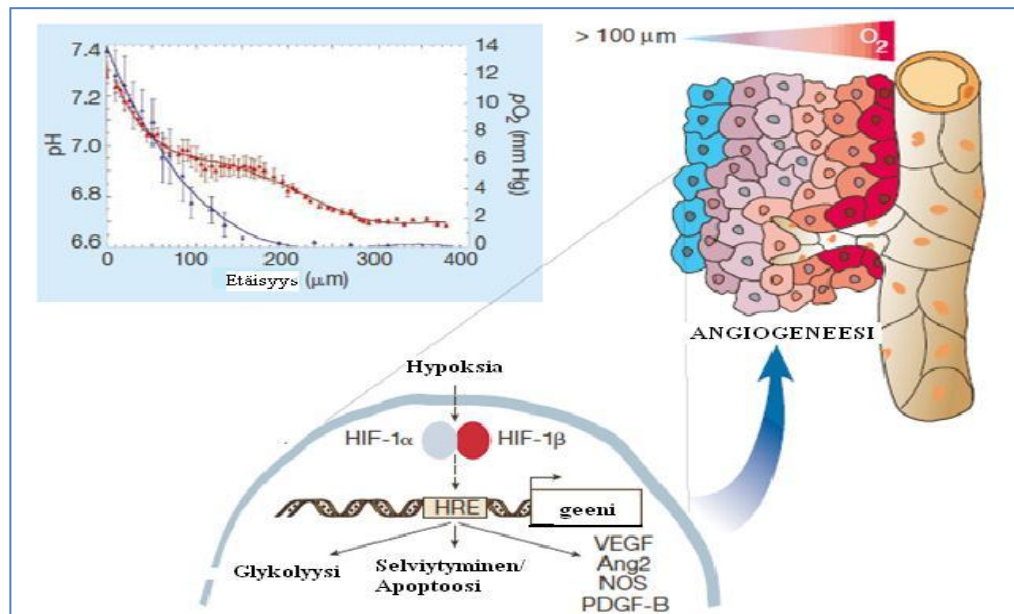
Vallitsevan käsityksen mukaan kuormituksen indusoima angiogeneesi aiheutuu aktiivisen lihaksen kasvaneista metabolisista tarpeista. Kestävyyssuorituksen aiheuttama paikallinen hypoksia aiheuttaa HIF-1 α :n (hypoxia-inducible transcription factor) määrän lisääntymisen, mikä indusoi VEGF:n erityksen ja edelleen angiogeneesin käynnistymisen. (Chinsomboom ym. 2009.) Tämän teorian heikkoutena on se, että hypoksiaa on vaikea määrittää lihaksesta kestävyysuorituksen aikana (Hudlicka ym. 1992) ja toisaalta se, että tutkimuksissa on havaittu HIF-1 α :n blokkaamisen ennemminkin lisäävän kuin vähentävän lihaksen kapillaaritiheyttä (Mason ym. 2007). Toisena mahdollisena metabolian muutoksia lihaksessa aistivana ja sitä kautta harjoittelun indusoimaa angiogeneesiä säätelevänä sensorina on pidetty AMP kinaasia (AMPK). Tässäkin tapauksessa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu AMPK:n blokkaamisen jälkeen normaalia kapillaaritiheyden kasvua harjoittelun yhteydessä. Lisätutkimusta tarvitaan siitä, millä mekanismeilla harjoittelu indusoi VEGF:a ja edelleen angiogeneesiä. (Zwetsloot ym. 2008.)

4.1 Hypoksian aiheuttamat vasteet raajalihaksessa

Syntymän jälkeen angiogeneesiä tapahtuu pääasiassa kudosten kasvun ja uusiutumisen yhteydessä kuten munasarjoissa kuukautiskierron mukaan sekä kohdussa raskauden aikana. Pääasiassa verisuonten rakenne pysyy suhteellisen stabiilina aikuisuudessa. Verisuonten endoteelisolut säilyttävät kuitenkin kykynsä nopeaan jakautumiseen vasteena fysiologisiin ärsykkeisiin kuten hypoksiaan. Samoin endoteelisolut aktivoituvat esimerkiksi haavan paranemisen yhteydessä. (Carmeliet 2005.) Angiogeneesin lisäksi hypoksia voi aiheuttaa

olemassa olevan verisuoniverkoston uudelleen järjestäytymistä (Carmeliet & Jain 2000).

Hypoksia on siis tärkeä kapillarisaatiota lisäävä tekijä. Solut saavat hapen yksinkertaisen diffuusion avulla, mutta kudoksen ja samalla välimatkojen kasvaessa happea ei enää siirry kudokseen tarpeeksi ja aiheutuu hypoksia (kts. kuva 5). Tämä käynnistää HIF-signaalintireitin käynnistymisen. HIF:n määrän lisääntyminen vaikuttaa monien angiogeneettisten geenien ilmenemiseen, joista tärkeimpänä VEGF:n määrän jopa 30-kertaistuminen minuutissa. VEGF:n määrä on suoraan verrannollinen angiogeneesin lisääntymiseen. (Carmeliet 2003.) Tutkimuksissa onkin havaittu alemmassa hapen osapaineessa harjoittelamisen lisäävän angiogeneesiä normoksiassa harjoitteluun verrattuna (Hepple 2000). Fyysinen kuormitus indusoi voimakkaasti myös PGC-1 α :n ilmenemistä ja johtaa tunnettujen harjoitusvasteiden kuten solutyypimuutosten ja mitokondriaalisen biogeneesin syntyyn. (Arany ym. 2008)



KUVA 5 Kapillaarin etäisyyden vaikutus kudoksen hapensaantiin. Mukailtu Carmeliet & Jain 2000.

Löytyy myös ristiriitaisia tutkimustuloksia, joiden mukaan hypoksiolla ei ole vaikutusta VEGF:n tuottoon. Prior ym. (2004) havaitsivat, että VEGF:n tuotto jopa vähentyi pitkäaikaisen hypoksian seurauksena vaikuttamatta kuitenkaan angiogeneesiin. Tästä voidaan päätellä, ettei VEGF ole ainoa angiogeneesiä hypoksiassa lisäävä säätelytekijä. Esimerkiksi veren virtauksen lisääntymisen ja lihassupistuksen aiheuttama mekaaninen venytyskuormitus kapillaarien seiniin lisää angiogeneesiä. Myös soluvälitilan homeostaasin muuttuminen aktivoi useita angiogeneesiä sääteleviä tekijöitä. (Prior ym. 2004).

Hypoksian indusoima angiogeneesi on monimutkainen järjestelmä, joka vaatii useiden signaalien yhteistoimintaa. VEGF vastaa pääasiassa endoteelisolujen toiminnan säätelystä, kun taas verihiutaleista peräisin oleva kasvutekijä PDGF-BB huolehtii endoteelia tukevien ja suojaavien seinämäsolujen toiminnasta. Angiopoietiini 2, VEGF:n läsnä ollessa, helpottaa uusien suonten kehittymistä olemassa olevista suonista. PGC-1 α indusoi kaikkien kolmen näitä proteiineja koodaavien geenien toimintaa. (Arany ym. 2008.) PGC-1 α on transkriptionaalinen koaktivaattori eli se tarttuu transkriptiofaktoreihin muuttaen niiden kromatiinin sekä transkriptiokoneiston rakennetta, mikä aktivoi geeniekspressiota (Chinsomboon ym. 2009). Yhteenvetona voidaan todeta, että hapen ja ravinnon puute indusoi PGC-1 α :n erityistä, joka puolestaan säätelee laajalti neovaskularisaatioon liittyvien geenien toimintaa. (Arany ym. 2008.)

PGC-1 α :n merkitystä harjoittelun aiheuttamassa angiogeneesissä on tutkittu PGC-1 α MKO-hiirillä, transgeenisella hiirikannalla, jolta PGC-1 α -geeni on poistettu. Lähtötilanteessa PGC-1 α MKO-hiirten ja kontrolliryhmän välillä ei ollut eroa kapillaaritiheydessä, mikä viittaa siihen, ettei PGC-1 α säätele angiogeneesiä normaalitilassa. Harjoittelun jälkeen verrokkiryhmällä havaittiin kapillaaritiheyden kaksinkertaistuminen kun taas PGC-1 α MKO-hiirillä kapillaaritiheys ei muuttunut lähtötilanteesta. Tämä viittaa vahvasti siihen, että

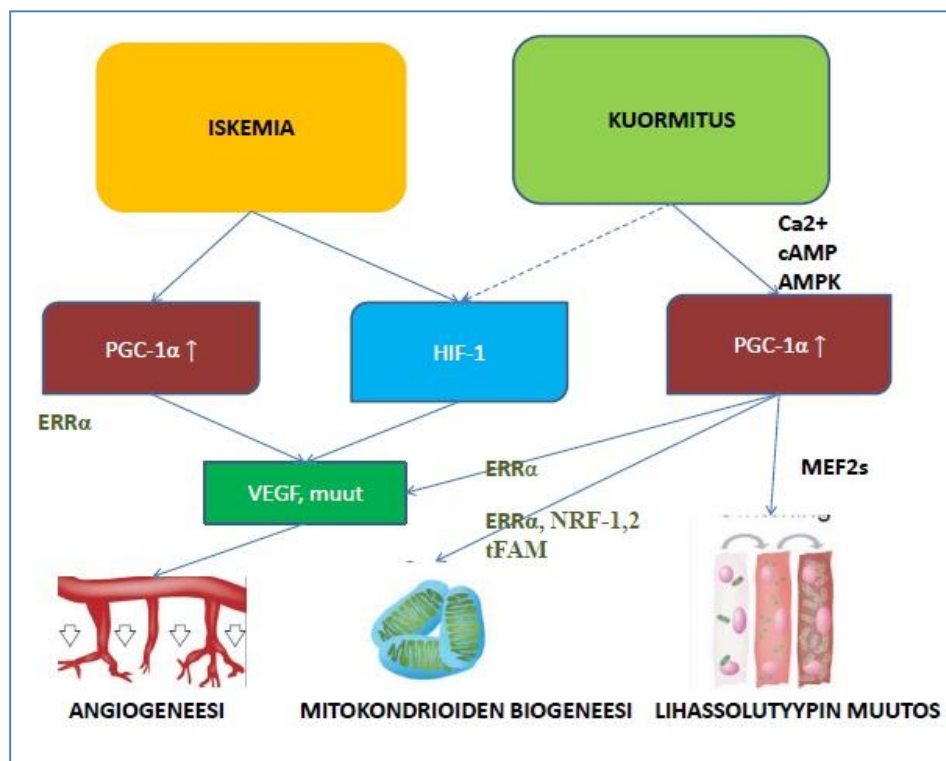
PGC-1 α on keskeisessä roolissa harjoittelun aiheuttaman angiogeneesin säätelystä. (Prior ym. 2004.) Useissa tutkimuksissa on havaittu PGC-1 α :n lisääntyminen kuormituksen yhteydessä niin ihmisellä kuin koe-eläimillä. Tarkka mekanismi, jolla kuormitus indusoi PGC-1 α :a, on edelleen epäselvä. (Baar ym. 2002, Koves ym. 2005, Norrbom ym. 2004.) Kuormitus aktivoi β -adrenergisia reseptoreja laaja-alaisesti. β -adrenergisen signaloinnin merkitystä angiogeneesissä ei ole kuitenkaan tutkittu intensiivisesti. Iccarino ym. (2005) osoittivat tutkimuksessaan β -adrenergisten reseptorien aktivoinnin lisäävän angiogeneesiä luurankolihasessa (Iaccarino ym. 2005). Miura ym. (2007) puolestaan osoittivat, että β -adrenergisten reseptorien stimulointi luurankolihasessa johtaa selkeään PGC-1 α :n ilmenemisen lisääntymiseen. Niinpä voidaan päätellä, että PGC-1 α :n lisääntyminen kuormituksen seurauksena on ainakin osittain β -adrenergisen signaloinnin aiheuttamaa. (Miura ym. 2007.)

4.2 PGC-1 α /ERR α /VEGF-signalointireitti

Hypoksian aiheuttaman VEGF:n säätelyn on ajateltu olevan pääasiassa hyvin tunnettujen HIF-tekijöiden aiheuttamaa. (Ferrara ym. 2003). PGC-1 α :lla on merkittävä rooli niin sanotussa HIF:sta riippumattomassa angiogeneesireitissä, sillä PGC-1 α :n siirto soluun virusvektorin avulla ei aiheuta muutosta HIF-1 α :n tuotantoon tai stabiliteettiin, mutta indusoi VEGF:n tuotantoa voimakkaasti. Näin ollen voidaan todeta, että PGC-1 α :n VEGF:a indusoiva signalointireitti ei kulje HIF:n kautta. Samalla tavoin hapen ja ravinnon puutteen indusoima PGC-1 α :n erityis on nähtävästi HIF:sta riippumatonta. HIF-1 α :n aktiivisen muodon lisääminen ei vaikuta PGC-1 α :n promoottorialueeseen kun taas VEGF:n promoottorialue aktivoituu voimakkaasti lisäyksen seurauksena. (Arany ym. 2008.)

Lisäksi tutkimuksissa on havaittu, että PGC-1 α :n lisäys yksittäiseen ERR- α tumareseptoriin johtaa VEGF:n ilmenemistä indusoivan luciferaasi-

aktiivisuuden kahdeksankertaistumiseen. Kuvassa 6 on kuvattu PGC-1 α /ERR α /VEGF-signaalintireitti kuormituksen yhteydessä. ERR- α :n ja PGC-1 α :n tiedetään vaikuttavan toisiinsa fysikaalisesti ja toiminnallisesti. ERR- α vaikuttaa myös rasvahappojen hapetuksen ja oksidatiivisen fosforylaation säätelyyn. PGC-1 α :n VEGF:n ilmenemistä stimuloiva vaikutus välittyykin ainakin osittain ERR- α :n aktivoitumisen kautta. (Arany ym. 2008.)



KUVA 6 PGC-1 α /ERR α /VEGF-signaalintireitti kuormituksen yhteydessä. Mukailtu Arany ym. 2008.

Tutkimusten perusteella voidaan olettaa, että PGC-1 α /ERR- α – reitin kautta tapahtuu kuormituksen aiheuttamaa neovaskularisaatiota. Kaikkiaan PGC-1 α säätelee laajasti raajalihasten genetiikkaa. Sen säätelemänä toimivat angiogeneesin lisäksi muun muassa rasvahappojen hapetus, oksidatiivinen fosforylaatio sekä lihassolutyypin muutos oksidatiiviseen kapillaaritiheydeltään suurempaan suuntaan. (Arany 2008, Handschin & Spiegelman 2006.) Tämä teoria yhdistää mitokondrioiden säätelemän hapenkulutuksen sekä ve-

risuoniston kautta tapahtuvan hapen ja ravintoaineiden jakelun ja kuljetuksen. (Arany ym. 2008.)

Chinsomboom ym. (2009) havaitsivat voimakkaan angiogeneesi-vasteen hiirten raajalihaksissa vapaaehtoisen harjoittelun seurauksena. PGC-1 α – knockout hiirten raajalihaksissa ei puolestaan havaittu kapillaaritiheyden lisääntymistä lainkaan vasteena harjoittelulle. Kuormituksen indusoima PGC-1 α :n lisääntyminen on riippuvainen β -adrenergisesta signaloinnista. PGC-1 α :n läsnä ollessa β -adrenerginen signalointi lisää myös muiden angiogeneesin säätelytekijöiden kuten VEGF:n määrää lihaksessa. PGC-1 α :n ja VEGF:n välillä tässä signalointireitissä toimii välittäjäaineena tumareseptori ERR α . ERR α :n puuttuminen estää kapillaaritiheyden lisääntymisen kuormituksen jälkeen. β -adrenergisen signaloinnin käynnistämä PGC-1 α /ERR α /VEGF-signalointireitti on hyvin todennäköinen kuormituksen indusoiman angiogeneesin säätelijä. (Chinsomboom ym. 2009.)

5 RUOKAVALION VAIKUTUS KESTÄVYYSHARJOITUSVASTEISIIN JA KAPILLAARITIHEYTEEN

5.1 Kestävyysharjoitusvasteet

Pitkäaikaisen kestävyysharjoittelun vaikutusta on tutkittu paljon ja harjoittelun aiheuttamat anatomiset ja fysiologiset muutokset ovat yleisesti tunnettuja. Säännöllinen kestävyysharjoittelu aiheuttaa muutoksia luurankolihas- toimintaan ja rakenteeseen. Lihassolujen oksidatiivinen kapasiteetti ja mitokondrioiden koko sekä määrä kasvavat, minkä seurauksena lihas pystyy tuottamaan tehokkaammin energiaa aerobisesti ja siten vastustamaan harjoituksen aiheuttamaa homeostaasin muutosta tehokkaammin kuin harjoittelematon lihas. (McArdle ym. 2001, 477-479.)

Plasman ja koko verimäärän on havaittu lisääntyvän kestävyysharjoittelun vaikutuksesta (Convertino 1991). Suurin kestävyysharjoittelun aiheuttama muutos tapahtuu kuitenkin sydämen vasemmassa kammiossa. Kammio joutuu rasituksen aikana pumppaamaan suuria verimääriä, jolloin se adaptoituu tilanteeseen lisäämällä kammion tilavuutta. Kammion tilavuuden kasvun lisäksi myös sen seinämän lihaskerros paksuntuu ja kammion massa lisääntyy. Lisääntyneen massan vuoksi sydän pystyy supistumaan ja siten pumppaamaan verta elimistön käyttöön tehokkaammin. Käytännössä suuremman verimäärän ja sydämen kasvaneen pumppaustehon vaikutuksesta sydämen iskutilavuus eli sydämen kerralla systeemiverenkiertoon pumppaama verimäärä kasvaa. Vasemman kammion massan on havaittu myös korreloivan vahvasti maksimaalisen hapenottokyvyn ($VO_2\max$) kanssa, jota pidetään tärkeimpänä kestävyysuorituskykyä kuvaavana muuttujana. (Brandao ym. 1993.)

Aktiivisesti kestävyysurheilua harrastavilla on alhaisempi leposyke sekä suurempi sydämen iskutilavuus ja minuuttitilavuus harjoittelemattomiin yksilöi-

hin verrattuna. Varsinkin maksimaalisessa rasituksessa minuuttitilavuus on kestävyysharjoittelun ansiosta huomattavasti suurempi, johtuen lähinnä iskutilavuuden paranemisesta, sillä maksimisykkeeseen kestävyysharjoittelulla ei ole havaittu olevan juurikaan vaikutusta. Maksimisyke voi jopa hieman laskea lisääntyneen parasympaattisen aktiivisuuden seurauksesta. (McArdle ym. 2001, 479-486.)

5.2 Ruokavalion vaikutus kestävyysharjoitusvasteisiin

Rasvalla on tärkeä rooli kalvojen rakennusaineena ja energianlähteenä suorituksen aikana. Tutkimukset ovat osoittaneet, että vähärasvainen ruokavalio heikentää kestävyyssuoritusta. Kestävyysharjoittelun seurauksena mitokondriot, oksidatiiviset entsyymit ja rasva-aineenvaihdunta lisääntyvät, eli vapaiden rasvahappojen käyttö ja rasvahappojen vapauttaminen rasvakudoksesta paranevat. Kestävyysharjoittelu myös kasvattaa lihaksen sisäisiä rasva- ja glykogeenivarastoja. (Venkatraman & Pendergast, 2002.)

Laajan kaksivuotisen seurantatutkimuksen mukaan matalahiilihydraattinen ja rasvapitoinen ruokavalio on parempi vaihtoehto veren kolesteroliarvojen optimoimiseksi ja insuliinisensitiivisyyden lisäämiseksi kuin vähärasvainen ruokavalio. Kaiken kaikkiaan vähärasvaista ruokavaliota, jossa hiilihydraatit on karsittu minimiin, voidaan pitää terveyden kannalta vähintäänkin yhtä turvallisenä kuin perinteisten ravintosuositusten mukaista ruokavaliota. (Shai ym. 2008.)

Helge toteaa laajassa rasvasyötön vaikutuksia ihmisten kestävyysuorituskykyyn käsittelevässä review-artikkelissaan, että alle viikon kestävillä rasvasyöttöjaksoilla on muutamissa tutkimuksissa havaittu positiivinen vaikutus kestävyysuorituskykyyn, kun taas yli viikon kestävillä rasvasyöttöjaksoilla ei vastaavaa vaikutusta keskiraskaalla tai raskaalla teholla toteutettuihin kestä-

vyysuorituksiin ole havaittu. Yli viikon kestäneitä tutkimusjaksoja on ihmisillä kuitenkin toteutettu vain muutamia ja koska eläinkokeissa on saatu ristiriitaisia tuloksia, ei rasvasyötön hyötyjä tai haittoja kestävyysuorituskykyyn ihmisillä voida kiistatta osoittaa ilman jatkotutkimuksia. (Helge 2000.)

Lee ym. (2001) puolestaan havaitsivat rottien rasvasyötön, kestävyysuorittelun ja suorituskyvyn välisiä suhteita koskevassa tutkimuksessaan, että harjoittelemattomilla rotilla rasvasyöttö lisäsi rottien suorituskykyä hiilihydraattipitoista ruokaa syöneisiin rottiin verrattuna. Eniten suorituskykyään paransivat rotat, joilla rasvaiseen ruokavalioon oli yhdistetty kovaintensiteettinen (>75% VO₂max) harjoittelu. Kevyen harjoittelun ja rasvaisen ruokavalion yhdistelmällä ei puolestaan ollut vaikutusta suorituskykyyn verrattuna kevyen harjoittelun ja hiilihydraattipitoisen ruokavalion yhdistelmään. (Lee ym. 2001.)

Kestävyysuorituskyvyn kannalta paras mahdollinen ruokavalion avulla saatava hyöty näyttäisi olevan mahdollista saavuttaa jaksottelemalla korkearasvaista ja korkeahiilihydraattista ruokavaliota. Näin saadaan rasvaisen ruokavalion rasva-aineenvaihduntaa tehostava ja glykogeenivarastoja säästävä hyöty ja lisäksi voidaan suurentaa lihasten glykogeenivarastoja, jolloin glykogeenin varhainen loppuminen ei muodostu rajoittavaksi tekijäksi. Kiistaton hyöty rasvaisen ruokavalion vaikutuksesta kestävyysuorituskykyyn on kuitenkin todistamatta. (Burke & Hawley 2002.)

5.3 Ruokavalion vaikutus kapillaaritiheyteen

Rasvainen ruokavalio aiheuttaa elimistölle stressin joka kuormittaa aineenvaihduntaa ja aiheuttaa kroonisen tulehduksen aineenvaihduntaan osallistuvissa kudoksissa. Tämä johtaa elimistön homeostaasin häiriintymiseen. Elimistö reagoi homeostaasin häiriintymiseen säätelemällä geenien ilmenemistä sopeutuakseen muuttuneeseen tilanteeseen. (Spriggs ym. 2010.)

Pitkäkestoisen rasvaruokinnan on havaittu lisäävän etureiden kapillaaritiheyttä merkittävästi hiirillä. Mekanismi kapillaaritiheyden lisääntymiseen rasvaruokinnan vaikutuksesta on epäselvä, mutta sekä tutkimusten mukaan PGC-1 α - että HIF1 α -riippuvaiset signalointireitit aktivoituvat. (Silvennoinen ym. 2010.) Rasvainen ruokavalio lisää hiirillä rasvakudoksen määrää ja siten myös leptiini-hormonin tuottoa. Leptiini on angiogeneesiä stimuloiva hormoni ja sen on havaittu lisäävän uusien kapillaarien muodostumista tehostamalla MMP-proteiinien tuotantoa sekä lisäämällä VEGFR1-reseptorien aktiivisuutta. (Park ym. 2001.)

Balwierz ym. (2009) tutkivat seitsemän viikkoa kestäneen rasvaruokinnan vaikutuksia hiirillä. Kapillaaritiheyden havaittiin kasvaneen, mutta säätelyproteiinien lähempi tarkastelu osoitti, että vain angiogeneesin käynnistävien proteiinien aktivaatio oli lisääntynyt kun taas useiden angiogeneesiä säätelevien proteiinien reseptorien määrä sekä endoteelisolujen muuntumisesta ja kapillaarien kypsymisestä vastaavien säätelyproteiinien ilmeneminen oli jopa vähentynyt tavalliseen ruokavalioon verrattuna. Tutkimuksessa käytettiin kapillaarien määrän tutkimiseen niin sanottua matrixi-implanttia, joka ei vastaa oikeaa kudosta. Epäkypsille kapillaareille tyypillistä geeniekspressiota havaittiin myös normaalilla ruokavaliolla eläneessä kontrolliryhmässä, mistä voidaan päätellä, ettei kyseisellä menetelmällä saaduista tuloksista voi vetää kovin luotettavia johtopäätöksiä oikean lihaskudoksen suhteen. (Balwierz ym. 2009.)

6 TUTKIMUSONGELMA JA HYPOTEESIT

Rasvasyöttö lisäsi aiemman tutkimuksen mukaan kapillaaritiheyttä (Silvennoinen ym. 2010). Edelleen on epäselvää millä mekanismeilla rasvasyöttö lisää kapillaaritiheyttä.

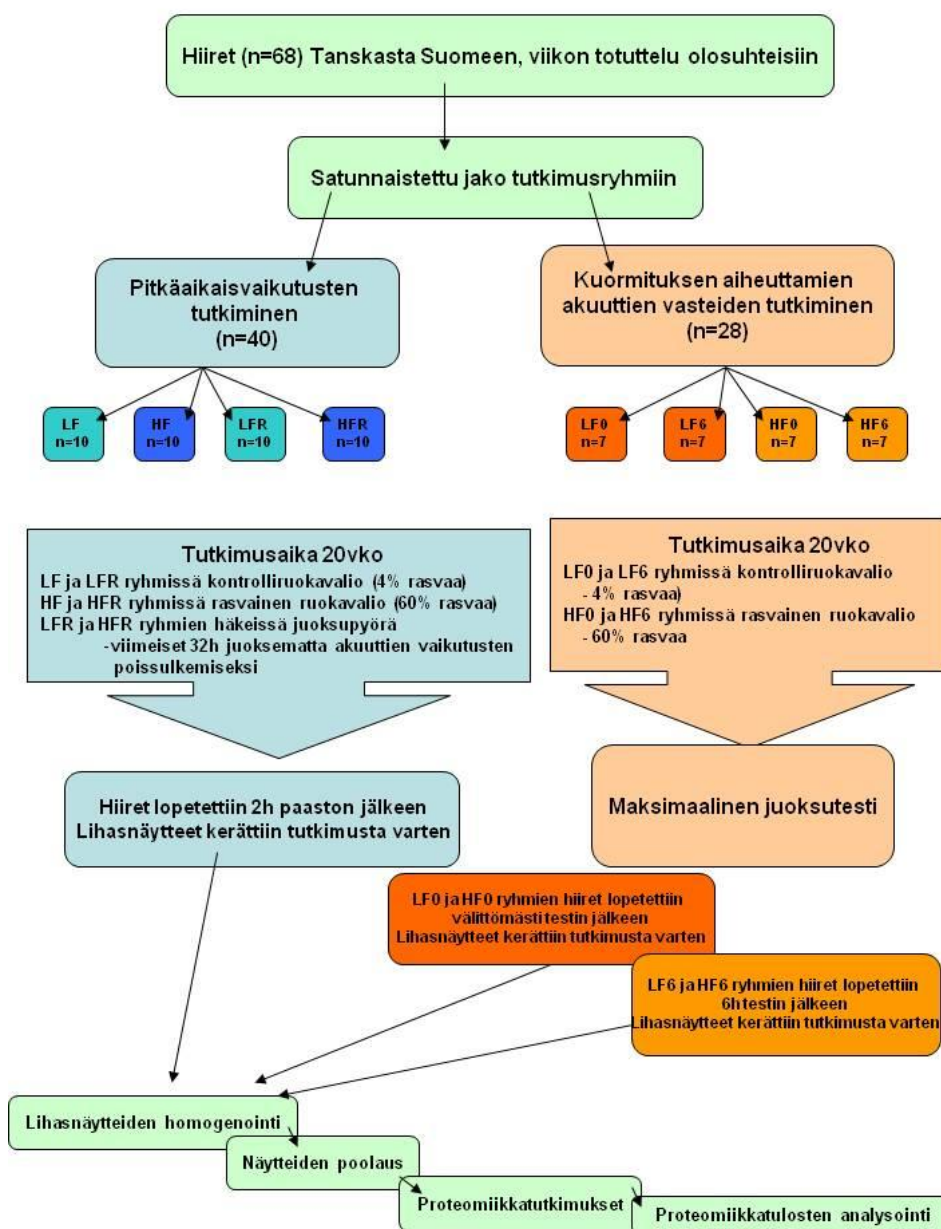
Tässä tutkimuksessa tarkoituksena on selvittää:

1. 20 viikon mittaisen rasvasyötön vaikutusta angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemiseen hiiren raajalihaksissa inaktiivisilla sekä kestävyysharjoitelleilla koe-eläimillä
2. Millaisen vasteen maksimaalinen kestävyysharjoitus aiheuttaa angiogeneesin säätelytekijöissä 20 viikon rasvasyötön jälkeen verrattuna normaaliruokavalioon

Hypoteesina on, että rasvainen ruokavalio lisää angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä ja vähentää angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmenemistä normaaliin ruokavalioon verrattuna ja että ilmiö on vielä voimakkaampi rasvaisen ruokavalion ja kestävyysharjoittelun yhteisvaikutuksesta. Toisena hypoteesina on, että maksimaalinen kestävyysharjoitus rasvaisen ruokavalion yhteydessä aiheuttaa suuremman nousun angiogeneesiä indusoivien proteiinien määrässä kuin normaalin ruokavalion yhteydessä.

7 TUTKIMUSMENETELMÄT

Kaaviossa 1 kuvataan tutkimuksen kulku kokonaisuudessaan. Tulevissa kappaleissa käydään läpi koe-eläimiin, tutkimusryhmiin sekä näytteiden keräämiseen ja käsittelyyn liittyvät asiat.



KAAVIO 1 Tutkimuksen kulku

7.1 Koe-eläimet

Tutkimus on Etelä-Suomen lääninhallituksen eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen hyväksymä. Koe-eläiminä käytettiin C57BL/6J- kannan uroshiiriä (n=68), jotka Taconic (Ejby, Tanska) toimitti Suomeen kuuden viikon ikäisinä. Hiiret elivät tutkimuksen ajan kukin omassa kosteuden ja lämpötilan suhteen kontrolloiduissa häkissään valo-pimeä-rytmillä 12:12 (08.00 – 20.00). Hiiret saivat viikon aikaa sopeutua uuteen elinympäristöönsä ennen tutkimusryhmiin jakoa (kts. kaavio 1).

7.2 Tutkimusryhmät

Hiiret jaettiin kaavion 1 mukaisesti kaikkiaan kahdeksaan tutkimusryhmään. Neljän ryhmän osalta tutkittiin 20 viikkoa kestävästä rasvasyötön sekä rasvasyöttöön yhdistetyn kestävyystyypin harjoittelun pitkäaikaisvaikutuksia angiogeenin säätelyproteiinien ilmenemiseen hiirten raajalihaksissa. Normaali ruokainen kontrolliryhmä LF (n=10) söi tutkimusjakson ajan normaalia teollisesti koe-eläimille valmistettua ruokaa (R36: 4 % rasvaa, 55.7 % hiilihydraattia, 18.5 % proteiinia, 3 kcal/g; Labfor, Tukholma, Ruotsi). Rasvaruokainen kontrolliryhmä HF (n=10) puolestaan söi tutkimusjakson ajan teollista laardipohjaista korkearasvaista ruokaa (D12492: 60 % rasvaa, 20 % hiilihydraattia, 20 % proteiinia, 5.24 kcal/g; Research Diets, New Brunswick, USA). Hiiret saivat rajoittamattomasti ruokaa ja vettä. Kontrollijuoksijoiden ryhmä LFR (n=10) sekä rasvajuoksijoiden ryhmä HFR (n=10) söivät ryhmän mukaan kontrolli- tai rasvaruokaa ja lisäksi ryhmien hiirillä oli häkeissään juoksupyörät, joissa ne saivat vapaaehtoisesti harjoitella. Tutkimuksessa käytetyn juoksupyörän halkaisija on 12 cm ja leveys 8 cm. Juoksuryhmien hiirten juoksumäärä rekisteröitiin pyörään liitettyllä magneettisella kierroslaskijalla.

Neljä muun tutkimusryhmän kohdalla haluttiin tutkia 20 viikkoa kestäneen rasvasyötön jälkeen tehdyn maksimaalisen juokсутestin akuuttia vaikutusta angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemiseen hiirten raajalihaksissa verrattuna kontrolliruokavaliolla eläneiden hiirten kuormitusvasteisiin. Ryhmät LF0 (n=7) sekä LF6 (n=7) söivät tutkimusjakson ajan edellä kuvatuslaista normaalia koe-eläinruokaa kun taas ryhmien HF0 (n=7) sekä HF6 (n=7) hiiret elivät tutkimusjakson ajan korkearasvaisella ruokavaliolla. Kaikille näille ryhmille suoritettiin maksimaalinen juokсутesti tutkimusjakson lopuksi. Hiiret paastosivat tunnin ennen testin aloittamista. Testi toteutettiin moottoroidulla juoksumatolla siten että testin alussa oli 5 min lämmittelyaika nopeudella 8 tai 10 m/min, jonka jälkeen juoksumaton nopeus nostettiin hiljalleen seuraavan 5 min aikana varsinaiseen aloitusnopeuteen. Aloitusnopeus määritettiin jokaiselle hiirelle yksilöllisesti kuukautta aiemmin tehdyn maksimaalisen testin perusteella siten, että testin kesto olisi kaikilla hiirillä suurin piirtein sama. Taulukossa 1 esitetään maksimaalisen juokсутestin kesto ryhmien keskiarvoina.

TAULUKKO 1 Ryhmien keskimääräiset juoksuajat maksimaalisessa juokсутestissä

	LF0	LF6	HF0	HF6
Keskiarvo (h:min)	1:18	1:20	1:04	1:07
SD	0:13	0:19	0:10	0:05

7.3 Lihasnäytteiden kerääminen

20 viikon tutkimusjakson päätteeksi koe-eläimet lopetettiin lihasnäytteiden keräämiseksi. Pitkäaikaisvaikutusryhmien (LF, HF, LFR sekä HFR) hiiret lopetettiin kahden tunnin paaston jälkeen. Juoksuryhmiltä LFR ja HFR oli lisäksi estetty juoksuharjoittelu viimeisen 32 tunnin ajan akuuttien harjoitusvaikutusten poissulkemiseksi. Ryhmissä LF0 ja HF0 hiiret paastosivat tunnin ajan ennen noin tunnin kestänyttä juokсутestiä, minkä jälkeen ryhmien hiiret

lopetettiin välittömästi. LF6- ja HF6-ryhmillä oli myös tunnin paasto ennen juokсутestiä, minkä jälkeen ne saivat vielä syödä ryhmänsä mukaista ruokaa. Neljä tuntia testin jälkeen ne eivät enää saaneet ruokaa ja kahden tunnin paaston jälkeen eli kuusi tuntia maksimaalisen juokсутestin loppumisen jälkeen ryhmien LF6 ja HF6 hiiret lopetettiin. Tällä pyrittiin siihen, että nähtäisiin muutokset niin välittömästi kuormituksen jälkeen, kuin hieman hitaamminkin ilmenevien proteiinien ilmenemisessä. Kaikissa kahdeksassa ryhmässä hiiret siis paastosivat kaksi tuntia ennen lopettamista. Kaikilta hiiriltä kerättiin lihasnäytteet myöhempää tutkimista ja analysointia varten.

7.4 Lihasnäytteiden homogenointi ja poolaus

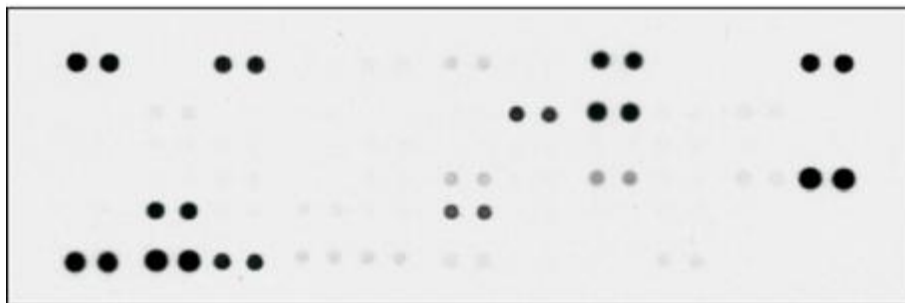
Hirten oikean takajalan gastrocnemius-lihaksen distaalinen osa homogenoitiin käsin proteaasi- ja fosfataasi-inhibiittoreita sisältävässä puskuriliuoksessa (Hepes pH7.4 20 mM, EDTA 1mM, EGTA 5mM, Sodium deoxy cholate 0,2%, MgCl₂ 10mM, DDT 2mM, NP-40 1%, Proteaasi fosfataasi INH. 3%, Na₃VO₄ 1mM, Beta-glycerophosphate 100 mM, H₂O). Näytteen ja puskurin suhde oli 7 %. Homogenoituja näytteitä pyöritettiin 30 minuuttia 4°C lämpötilassa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin nopeudella 10 000g 10 minuutin ajan samassa lämpötilassa solujätteiden poistamiseksi. Näytteitä säilytettiin -80°C lämpötilassa. Kokonaisproteiinin määritykset tehtiin käyttäen bicinchoninic acid protein assay-menetelmää (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Näytteet poolattiin ryhmittäin siten, että yhden ryhmän kaikista näytteistä otettiin sama kokonaisproteiinimäärä muodostamaan yksi yhteinen koko ryhmää kuvaava näyte. Näin saatiin kahdeksan näytettä, joista kukin edusti omaa tutkimusryhmäänsä.

7.5 Proteomiikkatutkimus

Angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemisen tutkimiseen käytettiin R&D Systems:n Proteome Profiler™ Array - Mouse Angiogenesis Array Kit – me-

netelmää. Valmistajan mukaan kyseessä on nopea ja sensitiivinen menetelmä näytteiden välisten erojen havaitsemiseen. Menetelmällä on mahdollista havaita 53 angiogeneesiin säätelyyn liittyvän proteiinin suhteelliset ilmenemistason ilman lukuisia vasta-aine- ja Western blot- määrittäyksiä. Menetelmän vasta-aineet on valittu käyttäen sekä luonnollisia että rekombinoituja proteiineja.

Nitroselluloosakalvolle on kiinnitetty kahtena vierekkäisenä parina proteiini-kohtaisia vasta-aineita sekä kontrollivasta-aineita. Tutkittava poolattu näyte sekoitettiin vasta-ainecocktailin kanssa, jonka jälkeen seos kaadettiin kalvolle ja inkuboitiin +4 asteessa yön yli. Inkubaation jälkeen seuraavana aamuna kalvo pestiin huolellisesti sitoutumattoman materiaalin poistamiseksi. Kalvolle lisättiin Streptavidin-HRP- sekä chemiluminescent-reagensseja (SuperSignal West femto maximum sensitivity substrate, Pierce Biotechnology), jotka aiheuttavat kuvatussa havaittavan signaalin voimakkuuden sen mukaan, kuinka paljon proteiinia kalvon vasta-aineisiin on sitoutunut. Tuotteen mukaan tulevan oppaan mukaan pystyttiin määrittämään, mitä proteiinia mikäkin pistepari kalvolla kuvaa.



KUVA 7 Esimerkki käsitellystä ja kuvatusta nitrosellulaarimembraanista

7.6 Tulosten analysointi

Kalvot kuvattiin ja analysoitiin käyttäen ChemiDoc XRS laitetta ja Quantity One -ohjelmaa (version 4.6.3. Bio-Rad Laboratories). Kuvankäsittelyohjelmalla määritettiin jokaisen pisteen pikselitiheys. Suuri pikselitiheys kuvaa proteiinin suurta määrää näytteessä. Jokaisen proteiinin kohdalta määritettiin pikselitiheys vierekkäisten pisteiden pikselitiheyden keskiarvon perusteella. Kalvon negatiivista kontrollipistettä käytettiin taustan pikselitiheyden määrittämiseen ja se vähennettiin jokaisesta proteiinin määrää kuvaavasta pikselitiheydestä.

Proteiinimääritykset toteutettiin kolmella eri tutkimuskerralla, jotka keskinäisen vertailun mahdollistamiseksi normalisoitiin analyysivaiheessa toistensa suhteen. Ensimmäisellä kerralla tutkittiin kolmea ryhmää, jotka olivat HF, HFR sekä LFR. Toisessa määrityksessä olivat mukana ryhmät HF0, LF0, HF6 sekä LF6. Viimeisessä määrityksessä tutkittiin ryhmiä LF, HF, LF6 sekä HF6. Ensimmäinen ja kolmas tutkimuskerta normalisoitiin toistensa suhteen HF-ryhmän tulosten perusteella muodostetun normalisointikertoimen mukaan. Toinen ja kolmas tutkimuskerta normalisoitiin puolestaan keskenään HF6-ryhmän tulosten perusteella muodostetun normalisointikertoimen mukaan. Näin eri tutkimuskerroilla saadut tulokset saatiin vertailukelpoisiksi keskenään. Tämänkaltaisen tulosten analysointi ei voi hyödyntää tilastanalyysia.

8 TULOKSET

8.1 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin

Taulukossa 2 eri ryhmien proteiinimäärää kuvaavat pikselitiheydet on normalisoitu kontrolliryhmän LF suhteen siten, että taulukon lukuarvot >1 kuvaavat kyseisen proteiinin suurempaa määrää näytteessä kontrolliryhmään nähden kun taas lukuarvot <1 kuvaavat näytteessä olleen vähemmän kyseistä proteiinia kuin kontrolliryhmän näytteessä.

Suurin osa angiogeneesiä stimuloivien proteiinien lisääntymisestä nähdään juoksuryhmissä. Rasvakontrolliryhmässä angiogeneesiä stimuloivien proteiinien määrä on pääasiassa kontrolliryhmää vähäisempää.

TAULUKKO 2 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin LF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	HF	LFR	HFR
Amphiregulin	0,52	1,36	1,40
Angiogenin	0,75	0,92	0,92
Angiopoietin-1	0,59	1,45	1,38
Angiopoietin-3	0,63	1,01	0,81
Coagulation Factor III	0,93	1,26	1,07
CXCL16	0,77	1,05	0,92
Cyr61	0,80	1,00	1,09
DLL4	0,82	1,10	0,97
DPPIV	1,20	1,13	0,79
EGF	0,90	2,92	2,53
Endoglin	1,03	1,02	0,84
Endothelin-1	0,89	0,58	0,39
FGF acidic	1,15	0,85	0,91
FGF basic	0,80	0,73	0,48
FGF-7	0,61	0,80	0,71
Fractalkine	0,79	0,93	0,76
HB-EGF	1,09	1,09	0,93
HGF	0,82	1,19	0,72
IL-1α	0,71	0,91	0,60
IL-1β	0,78	5,23	4,06
KC	0,64	2,97	2,85
Leptin	1,35	1,54	1,38
MCP-1	0,91	1,60	0,93
MIP-1α	1,05	1,70	0,84
MMP-3 (pro and mature form)	0,75	2,54	1,50
MMP-8 (pro form)	0,75	0,90	0,74
MMP-9 (pro and active form)	0,58	1,05	0,77
NOV	0,52	1,04	0,95
PD-ECGF	0,46	0,99	0,85
PDGF-AA	1,05	1,10	0,83
PDGF-AB/PDGF-BB	1,16	1,28	1,01
PIGF-2	0,85	0,96	0,80
Proliferin	0,62	0,83	0,77
SDF-1	0,68	1,07	0,81
Serpin E1	0,57	1,48	1,48
VEGF	0,77	1,02	0,84
VEGF-B	0,64	0,86	0,78

8.2 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin

Myös taulukossa 3 muiden ryhmien tuloksia verrataan LF-ryhmän tuloksiin, kuten edellä kuvattiin. HF-ryhmässä angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmeneminen on ollut yleisesti vähäisempää kontrolliruokavalioryhmään verrattuna.

TAULUKKO 3 Rasvaruokinnan pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin LF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	HF	LFR	HFR
ADAMTS1	0,73	1,37	1,48
Endostatin/Collagen XVIII	1,09	0,93	0,81
IGFBP-1	0,86	1,24	0,66
IGFBP-2	0,89	1,15	0,77
IGFBP-3	0,84	1,07	0,87
IL-10	0,65	0,97	0,83
IP-10	0,74	0,88	0,77
Osteopontin	1,28	0,65	0,65
Pentraxin-3	0,87	1,62	1,16
Platelet Factor 4	1,15	1,75	1,60
Prolactin	0,59	1,16	0,78
Serpin F1	0,80	1,14	1,05
Thrombospondin-2	0,59	0,90	1,01
TIMP-1	0,88	0,41	0,29
TIMP-4	0,74	1,35	1,09

8.3 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin

Taulukossa 4 verrataan maksimaaliseen juoksutestiin osallistuneiden ryhmien tuloksia ryhmän LF tuloksiin. Kuormitus on aiheuttanut normaalilla ruokavaliolla tutkimusjakson ajan eläneillä hiirillä angiogeneesiä stimuloivien proteiinien akuutin vähenemisen, kun taas rasvaruokaa syöneillä hiirillä osa angiogeneettisistä proteiineista on heti kuormituksen jälkeen koholla. Kuusi tuntia kuormituksen jälkeen LF6 ryhmän tilanne vastaa LF-ryhmän tilannetta,

kun taas HF6-ryhmän näytteessä angiogeneesiä stimuloivia proteiineja esiintyy vähemmän.

TAULUKKO 4 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin LF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	LF0	LF6	HF0	HF6
Amphiregulin	0,85	0,80	0,68	0,59
Angiogenin	0,89	0,77	1,20	0,84
Angiopoietin-1	0,42	0,79	0,71	0,63
Angiopoietin-3	0,41	0,95	0,76	0,70
Coagulation Factor III	0,68	0,86	0,96	0,85
CXCL16	0,48	0,94	0,76	0,91
Cyr61	0,64	0,80	1,39	0,76
DLL4	0,64	0,95	0,94	0,87
DPPIV	0,99	0,96	1,30	1,06
EGF	0,40	0,72	0,71	0,64
Endoglin	0,74	1,05	2,20	0,80
Endothelin-1	0,88	0,99	1,13	0,92
FGF acidic	0,67	0,81	1,34	0,90
FGF basic	0,76	1,17	1,14	0,84
FGF-7	0,40	0,92	0,68	0,63
Fractalkine	0,48	0,82	0,83	0,63
HB-EGF	0,56	1,08	0,84	0,91
HGF	0,37	1,16	0,89	0,88
IL-1 α	0,52	1,17	1,08	0,66
IL-1 β	0,84	1,68	2,66	0,90
KC	0,31	1,16	1,33	0,74
Leptin	0,45	1,10	0,96	1,20
MCP-1	0,42	1,46	1,03	0,99
MIP-1 α	0,36	1,20	0,97	0,67
MMP-3 (pro and mature form)	0,13	0,87	0,65	0,44
MMP-8 (pro form)	0,31	0,99	0,67	0,61
MMP-9 (pro and active form)	0,33	1,10	0,80	0,52
NOV	0,34	0,83	0,75	0,39
PD-ECGF	0,29	0,98	0,89	0,67
PDGF-AA	0,55	1,11	0,99	1,07
PDGF-AB/PDGF-BB	0,64	1,04	1,29	0,98
PIGF-2	0,32	1,20	0,71	0,79
Proliferin	0,28	1,02	0,77	0,54
SDF-1	0,49	1,20	1,07	0,85
Serpin E1	0,38	1,25	1,28	0,90
VEGF	0,45	0,98	0,79	0,52
VEGF-B	0,69	0,88	0,78	0,49

Taulukossa 5 puolestaan verrataan kuormituksen aiheuttamia vasteita rasvaruokaa syöneeseen kontrolliryhmään HF. Nähdään, että rasvaryhmissä suurin osa angiogeneesiä stimuloivista proteiineista on koholla välittömästi kuormituksen jälkeen HF- kontrolliin verrattuna. Kuuden tunnin kuluttua kuormituksesta tilanne on palautunut lähes kaikkien proteiinien osalta samalle tasolle kuin ennen kuormitusta.

TAULUKKO 5 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä stimuloiviin proteiineihin rasvaruokaryhmissä HF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	HF0	HF6
Amphiregulin	1,31	1,14
Angiogenin	1,60	1,12
Angiopoietin-1	1,20	1,07
Angiopoietin-3	1,21	1,11
Coagulation Factor III	1,03	0,91
CXCL16	0,99	1,19
Cyr61	1,74	0,94
DLL4	1,15	1,07
DPPIV	1,08	0,88
EGF	0,79	0,71
Endoglin	2,15	0,78
Endothelin-1	1,26	1,03
FGF acidic	1,16	0,78
FGF basic	1,42	1,04
FGF-7	1,11	1,04
Fractalkine	1,05	0,79
HB-EGF	0,77	0,84
HGF	1,08	1,07
IL-1 α	1,52	0,92
IL-1 β	3,41	1,16
KC	2,06	1,15
Leptin	0,71	0,89
MCP-1	1,12	1,08
MIP-1 α	0,92	0,63
MMP-3 (pro and mature form)	0,87	0,58
MMP-8 (pro form)	0,90	0,81
MMP-9 (pro and active form)	1,39	0,90
NOV	1,43	0,75
PD-ECGF	1,95	1,46
PDGF-AA	0,94	1,02
PDGF-AB/PDGF-BB	1,11	0,85
PIGF-2	0,84	0,93
Proliferin	1,24	0,87
SDF-1	1,58	1,25
Serpin E1	2,24	1,58
VEGF	1,03	0,67
VEGF-B	1,22	0,77

8.4 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin

Taulukossa 6 on listattu kuormituksen aiheuttamia vasteita angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin LF-ryhmään verrattuna. Normaaliruokavaliolla eläneissä ryhmissä angiogeneesin inhibiittoreiden määrä on alentunut välittömästi kuormituksen jälkeen ja tilanne on palannut kuormitusta edeltäneelle tasolle kuusi tuntia kuormituksen jälkeen. Rasvaruokaryhmissä angiogeneesiä inhiboivien proteiinien määrä on alentunut etenkin kuusi tuntia kuormituksen jälkeen LF-ryhmään verrattuna.

TAULUKKO 6 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin LF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	LF0	LF6	HF0	HF6
ADAMTS1	0,89	0,69	0,85	0,70
Endostatin/Collagen XVIII	1,20	1,02	1,64	1,00
IGFBP-1	0,75	0,95	0,91	0,76
IGFBP-2	0,31	0,91	0,58	0,57
IGFBP-3	0,51	0,91	1,03	0,64
IL-10	0,31	0,94	0,84	0,59
IP-10	0,30	0,90	0,85	0,65
Osteopontin	0,34	0,83	0,90	1,95
Pentraxin-3	0,38	1,22	0,96	0,81
Platelet Factor 4	0,95	1,04	1,90	0,87
Prolactin	0,23	0,84	0,68	0,50
Serpin F1	0,41	1,01	0,88	0,81
Thrombospondin-2	0,41	0,98	0,79	0,53
TIMP-1	0,51	1,04	1,03	0,83
TIMP-4	0,40	0,87	0,68	0,50

Kun taas verrataan rasvaruulla eläneiden ryhmien kuormitusvasteita rasvaruulla eläneeseen kontrolliryhmään (taulukko 7), havaitaan että osa angiogeneesiä inhiboivista proteiineista lisääntyy välittömästi kuormituksen jälkeen. Kuusi tuntia kuormituksen jälkeen tilanne on muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta palautunut vastaavaan tilanteeseen kuin ennen kuormitusta.

TAULUKKO 7 Kuormituksen aiheuttamat akuutit vasteet angiogeneesiä inhiboiviin proteiineihin rasvaryhmissä HF-ryhmän tuloksiin verrattuna

	HF0	HF6
ADAMTS1	1,17	0,97
Endostatin/Collagen XVIII	1,50	0,92
IGFBP-1	1,06	0,88
IGFBP-2	0,66	0,65
IGFBP-3	1,23	0,76
IL-10	1,28	0,91
IP-10	1,15	0,89
Osteopontin	0,70	1,52
Pentraxin-3	1,10	0,94
Platelet Factor 4	1,65	0,76
Prolactin	1,14	0,84
Serpin F1	1,10	1,01
Thrombospondin-2	1,35	0,90
TIMP-1	1,17	0,94
TIMP-4	0,92	0,68

9 POHDINTA

9.1 Rasvaisen ruokavalion ja kestävyysharjoittelun pitkäaikaisvaikutukset angiogeneesin säätelyproteiineihin

Angiogeneesiä stimuloivat proteiinit. Rasvainen ruokavalio yhdistettynä vapaaehtoiseen juoksuharjoitteluun lisäsi useiden angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä inaktiiviseen kontrolliruokavalioryhmään verrattuna. Kuitenkin on huomattava, että vastaava nousu havaitaan myös kontrolliruokaa syöneellä niin sanotulla juoksukontrolliryhmällä, mistä voidaan päätellä muutosten olevan pääasiassa juoksuharjoittelun aiheuttamaa. Esimerkiksi molemmissa juoksuryhmissä koholla oleva interleukiini-1 β (IL-1 β) kuuluu angiogeneesiä stimuloivien multipotenttien sytokiinien ryhmään, mutta sillä on myös tärkeä rooli akuutissa tulehdusreaktiossa, jota esimerkiksi harjoittelu lihaksistossa aiheuttaa (Nakao ym. 2011). Koska IL-1 β :n on noussut reilusti molemmissa ryhmissä, voidaan olettaa että ilmenemisen lisääntyminen on pääasiassa juoksuharjoittelun aiheuttamaa. Tätä päätelmää vahvistaa myös se havainto, ettei IL-1 β :n määrässä nähdä eroa rasvaista ruokaa syöneen kontrolliryhmän ja normaaliruokaisen kontrolliryhmän välillä.

Vastaavan kaltainen, molemmissa juoksuryhmissä havaittava nousu on epidermaalisen kasvutekijän (EGF) kohdalla. Myös tällä proteiinilla on useita solun kasvun säätelyyn liittyviä tehtäviä (Bianco ym. 2007), ja voidaan olettaa, että tässäkin tapauksessa ilmenemisen lisääntyminen on pääasiassa juoksuharjoittelun aiheuttamaa, sillä kontrolliryhmissä eri ruokavalioiden välillä ei eroa havaita. Juoksuryhmien näytteissä on kontrolliryhmiin verrattuna enemmän myös KC-proteiinia, joka on CXC-ryhmään kuuluva angiogeneettinen kemokiini. Kyseisen ryhmän proteiinien on havaittu säätelevän erityisesti iskemian indusoimaa angiogeneesiä. (Moldobaeva ym. 2010.) Molemmissa juoksuryhmissä koholla on myös angiopoietiini-1, jolla tiedetään ole-

van tärkeä rooli uusien kapillaarien kypsymisessä toimiviksi verisuoniksi (Carmeliet & Jain 2011).

Pelkkä rasvainen ruokavalio ilman juoksuharjoittelua vaikuttaa puolestaan vähentävän angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä. Tämä ei ole hypoteesin mukaista, sillä rasvaisen ruokavalion odotettiin lisäävän angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä normaaliin ruokavalioon verrattuna. Rasvainen ruokavalio ei siis tämän tutkimuksen mukaan lisää angiogeneesiä ainakaan angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemisen lisäämisen kautta. Tuloksia tarkasteltaessa tulee kuitenkin huomioida, että tässä tutkimuksessa havaittu proteiinien ilmeneminen kuvaa tilannetta 20 viikkoa kestäneen rasvaiseen ruokaan adaptoitumisen jälkeen, joten tämän hetken muutokset eivät välttämättä kuvaa kapillaariteheyden kasvamisen alkumekanismia parhaalla mahdollisella tavalla. Angiogeneesiä stimuloivista proteiineista ainoastaan rasvakudoksen tuottamaa leptiiniä on enemmän rasvaruokaisten ryhmässä, mikä on luonnollista, sillä HF-ryhmän hiirten rasvakudoksen määrä tutkimusjakson lopussa oli huomattavasti suurempi LF-ryhmän hiiriin verrattuna.

Angiogeneesin tärkeimmässä säätelyproteiinissa VEGF:ssa ei havaita merkitseviä eroja ryhmien välillä. Rasvaryhmissä VEGF:n määrä on jopa hieman vähäisempi kuin kontrolliruokavalioryhmissä. On epätodennäköistä, että rasvasyötön angiogeneesiä stimuloiva vaikutus välittyisi VEGF:sta riippumattomaa reittiä pitkin, sillä VEGF-nousua ei havaittu myöskään juoksuryhmissä. Kuormituksen aiheuttama angiogeneesin lisääntyminen on tutkimusten mukaan aina VEGF-välitteistä, tapahtui se sitten HIF1 α - tai PGC-1 α /ERR- α –reitit kautta (Arany ym. 2008). Todennäköistä on se, että VEGF-muutosten puuttuminen johtuu käytetyn menetelmän heikkouksista, sillä aiemmissa vastaavissa tutkimuksissa sekä rasvaisen ruokavalion että kestävyystyyppisen kuormituksen on havaittu lisäävät VEGF:n määrää raajalihaksissa (Stenroth 2011).

Angiogeneesiä inhiboivat proteiinit. Rasvaisen ruokavalion aiheuttamia pitkäaikaisvasteita tarkasteltaessa mielenkiintoista on se, että rasvainen ruokavalio on aiheuttanut inaktiivisessa rasvaruokaryhmässä angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmenemisen laskua normaaliruokaiseen kontrolliryhmään verrattuna. Vaikuttaakin siltä, että aiemmissa tutkimuksissa (Silvennoinen ym. 2010) havaittu rasvaisen ruokavalion kapillaaritiheyttä lisäävä vaikutus välittyy mahdollisesti angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmenemisen estämisen kautta.

Rasvaisen ruokavalion vaikutuksesta useiden tärkeiden angiogeneesin inhibiittoreiden ilmenemistasot ovat laskeneet kontrolliruokavalioon verrattuna. Esimerkiksi endoteelisolujen proliferaatiota ja ekstrasellulaarimatriksin muodostusta säätelevän thrombospondin-2:n (Kradly ym. 2008) sekä suoraan endoteelisoluja säätelevän ja epäsuorasti angiogeneesiä VEGF:n eritystä vähentämällä inhiboivan prolaktiinin (Clapp ym. 2009) määrät ovat HF-ryhmässä alhaisemmat kuin LF-ryhmässä. Juoksuryhmissä osa inhiboivista proteiineista on lisääntynyt, kun taas osa on laskenut verrattuna kontrolliryhmään. Merkittäviä systemaattisia muutoksia suuntaan tai toiseen ei juoksuryhmissä ole tapahtunut.

Rasvaisen ruokavalion ja kestävyysharjoittelun pitkäaikaisvaikutuksista angiogeneesin säätelyproteiineihin voidaan yhteenvetona todeta, että juoksuharjoittelu vaikuttaa tämän tutkimuksen tulosten perusteella lisäävän angiogeneesiä lisäämällä angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä. Myös rasvainen ruokavalio lisää mahdollisesti angiogeneesiä, mutta eri mekanismin avulla kuin juoksuharjoittelu. Rasvaisen ruokavalion seurauksena angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmeneminen vähenee, mikä mahdollistaa uusien kapillaarien kehittymisen. Toisaalta rasvainen ruokavalio vähentää angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistä verrattuna kontrolliruokavalioon. Siten onkin vaikea arvioida, onko inhibitoristen signaalien pienellä määrällä suurempi angiogeneesiä lisäävä vaikutus vai angiogeneettisten sig-

naalien vähyydellä suurempi angiogeneesiä vähentävä vaikutus. Hypoteesin mukaista rasvaisen ruokavalion ja juoksuharjoittelun aiheuttamaa kompensatorista angiogeneesiä lisäävää yhteisvaikutusta ei tässä tutkimuksessa havaittu.

9.2 Rasvaisen ruokavalion vaikutus akuuttiin kuormitusvasteeseen angiogeneesin säätelyproteiinien osalta

Angiogeneesiä stimuloivat proteiinit. Maksimaalinen juoksutesti aiheutti erilaiset vasteet angiogeneesin säätelyproteiineissa sen mukaan, olivatko ryhmän hiiret syöneen 20 viikon tutkimusjakson ajan rasvaista vai normaalia ruokaa. Normaalia ruokaa syöneillä hiirillä käytännössä kaikkien tutkittujen angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistaso oli välittömästi maksimaalisen kuormituksen jälkeen selvästi matalampi kuin LF-ryhmällä, mikä vastaa tilannetta ennen kuormitusta. Esimerkiksi tärkeä angiogeneesiä stimuloiva angiopoietin-1, sekä hiirille lajispesifinen angiopoietiinin muoto angiopoietin-3 (Lee ym. 2004) ovat kontrolliruokavalioryhmällä selvästi lähtötilannetta alemmalla tasolla välittömästi kuormituksen jälkeen. Kuuden tunnin kuluttua angiopoietiinien määrä oli jo palautunut lähes lähtötasolle.

Tuloksista voidaan havaita, että myös angiogeneesiä laaja-alaisesti säätelevä (Bianco ym. 2007) epidermaalinen kasvutekijä (EGF) on kontrolliruokavalioryhmissä selvästi alemmalla tasolla välittömästi maksimaalisen kuormituksen jälkeen eikä EGF-ekspressio ole palautunut lähtötasolle vielä kuusi tuntia kuormituksen jälkeenkään. Erittäin matalalla tasolla heti kuormituksen jälkeen ovat myös kaikki tutkitut matrix metalloproteinase (MMP) –muodot. MMP:t säätelevät ekstrasellulaarimatriksin muodostumista ja mahdollistavat endoteelisolujen migraation (Nedeau ym. 2011). MMP:t ovat palautuneet kuuden tunnin kuluttua kuormituksesta jo lähtötasolle. Muutamien proteiinien määrä oli kuusi tuntia kuormituksen jälkeen sen sijaan lisääntynyt lähtötilan-

teeseen nähden. Muun muassa IL-1 β :n määrä oli lisääntynyt, mikä voi johtua maksimaalisen kuormituksen aiheuttamasta lihasvauriosta (Nakao ym. 2011).

Rasvaryhmässä välittömästi maksimaalisen kuormituksen jälkeen monien angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemistaso oli koholla kuormitusta edeltävään tilanteeseen verrattuna. Kuormituksen aiheuttamat vasteet näkyvät selvimmin kun verrataan HF0-ryhmän tuloksia HF-ryhmän tuloksiin. Rasvaryhmän vasteita LF-ryhmän tuloksiin verratessa tulee huomioida se, että suuri osa angiogeneesiä stimuloivista proteiineista laski tutkimusjakson aikana rasvaruuan vaikutuksesta. Tästä syystä nähdään suurempi muutos verrattaessa rasvaryhmässä tapahtuneita maksimaalisen kuormituksen aiheuttamia akuutivasteita HF-ryhmään, kuin verrattaessa LF-ryhmään.

Maksimaalisen kuormituksen seurauksena reilu nousu havaittiin erityisesti IL-1 β -proteiinissa. Myös iskemian indusoiman angiogeenin säätelijän KC-kemokiinin (Moldobaeva ym. 2010) tasot olivat reilusti koholla välittömästi maksimaalisen kuormituksen jälkeen rasvaryhmän kuormitusta edeltävään tilanteeseen verrattuna. Nämä erot olivat niin suuria, että ne olivat nähtävissä myös LF-ryhmään verrattuna. Sekä IL-1 β :n että KC:n ilmeneminen olivat palautuneet kuusi tuntia kuormituksen jälkeen kuormitusta edeltävälle tasolle. Serpin E1-proteiini eli PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) oli selvästi koholla heti kuormituksen jälkeen ja yhä kuusi tuntia kuormituksen jälkeenkin. Tämän angiogeneesiä stimuloivan proteiinin on tutkimuksissa havaittu olevan yhteydessä veren korkeisiin kolesteroli- ja triglyseridiarvoihin (Lira ym. 2010). Tutkimuksissa jo 8 viikon rasvasyötöllä on havaittu olevan kolesteroli- ja triglyseridiarvoja nostava vaikutus (Ren ym. 2011), joten varmasti myös tämän tutkimuksen 20 viikon rasvasyöttöjakson jälkeen rasvaryhmän hiirillä nämä arvot olivat koholla. Myös monet muut angiogeneesiä lisäävät proteiinit kuten endoglin, CYR61 sekä IL-1 α olivat välittömästi maksimaalisen kuormituksen jälkeen kuormitusta edeltäneeseen tilanteeseen nähden koholla.

Myöskään akuuttivasteiden kohdalla ei tässä tutkimuksessa nähty muutosta angiogeneesin tärkeimmän säätelijän VEGF:n ilmenemisessä. Kirjallisuuden perusteella VEGF:ssa pitäisi näkyä selvä nousu maksimaalisen kuormituksen vaikutuksesta, joten saatu tulos ei ole odotetun kaltainen. Tässäkin tapauksessa se, ettei muutosta havaittu johtunee käytetyn tutkimusmenetelmän teknisiin heikkouksiin liittyvistä tekijöistä.

Angiogeneesiä inhiboivat proteiinit. Välittömästi kuormituksen jälkeen käytännössä kaikki tutkitut angiogeneesiä inhiboivat proteiinit olivat normaaliruokaisten ryhmässä laskeneet kuormitusta edeltäneeseen tilanteeseen verrattuna. Kuormituksen vaikutuksesta esimerkiksi endoteelisoluja ja VEGF:n eritystä säätelevän prolaktiinin (Clapp ym. 2009) määrä oli merkittävästi laskenut. CXC-perheen kemokiinilla IP-10:lla (interferon gamma inducible protein 10) on perheen muista kemokiineista poiketen angiogeneesiä inhiboiva vaikutus poikkeavan molekyyliarakenteensa vuoksi (Strieter ym. 1995). Myös IP-10:n määrä oli laskenut huomattavasti maksimikuormituksen vaikutuksesta normaaliruokaisten ryhmässä. Sekä näiden että kaikkien muidenkin välittömästi kuormituksen jälkeen alhaalla olleiden proteiinien ilmenemistasot olivat palanneet lähtötasolle kuusi tuntia kuormituksen jälkeen. Voimakkaalla lukuisten angiogeneesi-inhibiittoreiden samanaikaisella pitoisuuden laskulla voi olla merkittävä angiogeneesiä lisäävä vaikutus normaaliruokaisten ryhmässä.

Rasvaruokaisten ryhmässä puolestaan muutamat angiogeneesiä inhiboivat proteiinit olivat koholla välittömästi kuormituksen jälkeen HF-ryhmään verrattuna. Esimerkiksi toinen CXC-perheen rakenteeltaan poikkeavista ja siten antiangiogeenisistä kemokiineista eli Platelet Factor 4 (Strieter ym. 1995) oli koholla välittömästi kuormituksen jälkeen. Myös tärkeä angiogeneesin inhibiittori thrombospondin-2 sekä erityisesti iskemian aiheuttamaa angiogenee-

siä inhiboiva IL-10 (interleukiini-10) (Silvestre ym. 2000) olivat koholla välittömästi kuormituksen jälkeen. Myös erityisesti endoteelisolujen proliferaatiota estävä endostatiini (O'Reilly ym. 1997) oli koholla rasvaruokaryhmässä välittömästi kuormituksen jälkeen. Huomioitavaa on, etteivät nousut rasvaruokaryhmän inhibitoristen proteiinien määrissä ole yhtä suurta luokkaa kuin angiogeneesiä stimuloivien proteiinien kohdalla.

Yhteenvedona maksimaalisen juokсутestin aikaansaamista vasteista angiogeenin säätelyproteiineihin voidaan todeta, että maksimaalinen juokсутesti todennäköisesti lisää angiogeneesiä sekä normaalilla ruokavaliolla tutkimusjakson ajan eläneiden hiirten että rasvaruokaa syöneiden hiirten ryhmässä. Mekanismi angiogeenin lisääntymiseen vaikuttaa kuitenkin olevan erilainen ryhmien välillä. Kontrolliryhmässä sekä angiogeneesiä stimuloivien, että angiogeneesiä inhiboivien proteiinien määrä oli välittömästi kuormituksen jälkeen matala kuormitusta edeltävään tilanteeseen verrattuna. Rasvaryhmässä puolestaan sekä stimuloivat että inhiboivat proteiinit olivat lähtötilanteeseen verrattuna lisääntyneet maksimaalisen juokсутestin vaikutuksesta. Kuusi tuntia kuormituksen jälkeen kaikkien proteiinien tasot molemmissa ryhmissä olivat pääsääntöisesti palanneet kuormitusta edeltävälle tasolle. Kuten todettua, angiogeneesi on monimutkaisesti säädelty fysiologinen tapahtuma, ja säätely tapahtuu angiogeneesiä stimuloivien ja inhiboivien signaalien tasapainon mukaan. On mahdotonta sanoa proteiinitasoja mittaamalla, kuinka suuri on minkäkin angiogeneesiä säätelevän signaalin voimakkuus elävässä kudoksessa. Tutkimustuloksen perusteella voidaan kuitenkin olettaa, että sekä rasva- että kontrolliruokaisten ryhmissä tapahtuu kapillaaritiheyden kasvua säätelyn tapahtuessa kuitenkin eri signalointireittejä pitkin.

9.3 Menetelmän hyvät ja huonot puolet

Tässä tutkimuksessa käytetty proteomiikkamenetelmä on erittäin nopea menetelmä proteiinimäärien tutkimiseen. Yhdellä analyysikerralla voi tutkia neljää tai jopa useampaa ryhmää kerralla ja yhden ryhmän näytteistä voi kerralla määrittää yli 50 proteiinia. Kyseinen menetelmä soveltuu kuitenkin vain suurien muutosten karkeaan selvittämiseen, minkä jälkeen kiinnostavat proteiinit, joissa muutoksia havaittiin, tulisi tutkia tarkemmin proteiinitutkimuksissa golden standard-asetmassa olevalla Western Blot-menetelmällä. Oleellinen ero näissä menetelmissä on se, että proteomiikkamembraaniin sitoutuu myös epäspesifisesti proteiineja ja nämä epäspesifisesti sitoutuneet proteiinit vaikuttavat tulokseen, kun taas Western Blot-menetelmässä väärän kokoiset proteiinit voidaan poissulkea analyysistä. Proteomiikkamenetelmä on myös kallis, minkä takia tässä tutkimuksessa analysoitiin poolattuja näytteitä. Tästä syystä ei voida sulkea pois sitä mahdollisuutta, että yksittäiset näytteiden poikkeavuudet ovat voineet merkittävästi vaikuttaa saatuun keskiarvotulokseen, jolloin tuloksena saatu keskiarvo ei kuvaakaan hyvin koko ryhmää.

10 TÄRKEIMMÄT LÖYDÖKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Lihaksen hapentarpeen kasvaessa syystä tai toisesta tarvitaan uusia kapillaarisuonia toimittamaan happea ja ravintoaineita kudokselle. Tätä uusien kapillaarisuonten muodostumista kutsutaan angiogeneesiksi, joka on stimuloivien ja inhiboivien signaalien avulla hyvin tarkasti säädelty fysiologinen toiminto. Tutkimusten perusteella lihasten kestävyystyyppinen kuormittaminen käynnistää raajalihaksissa angiogeneesiä lisäävän signalointireitin ja samoin tapahtuu pitkäkestoisen rasvasyötön yhteydessä. Angiogeneesin säätelymekanismi näissä tilanteissa on vielä tuntematon. Tässä tutkimuksessa tarkoituksena oli tutustua näihin mekanismeihin ja selvitettiin miten rasvasyöttö sekä kestävyystyyppinen liikunta vaikuttavat angiogeneesin säätelyproteiinien ilmenemiseen hiiren raajalihaksessa pitkäkestoisesti ja akuutin kuormituksen yhteydessä.

Pitkäaikaisvaikutuksena havaittiin, että 20 viikon rasvasyöttöjakso vähensi rasvaryhmässä angiogeneesiä inhiboivien proteiinien ilmenemistä kontrolliryhmään verrattuna. Samoin suuri osa angiogeneesiä stimuloivista proteiineista on hyvin matalalla tasolla kontrolliryhmään verrattuna. Aikaisempien tutkimusten perusteella rasvaryhmässä kapillaaritiheyden pitäisi olla kontrolliryhmää suurempi, eli tässä tapauksessa angiogeneesin inhibition esto olisi niin tehokas, että uusia kapillaareja muodostuisi enemmän angiogeneesiä edistävien signaalien vähäisestä määrästä huolimatta. On kuitenkin mahdollista sanoa, miten signaalien väliset voimasuhteet vaikuttavat elävässä kudoksessa. Lisäksi on muistettava, että tulokset kuvaavat tilannetta 20 viikon adaptoitumisen jälkeen, eivätkä tästä syystä välttämättä kuvaa hyvin kapillaaritiheyden kasvun alkumekanismeja. Juoksuryhmissä tulokset olivat samantyyppiset ruokavaliosta riippumatta. Näissä ryhmissä angiogeneesiä stimuloivien proteiinien määrä oli nousut, mikä viittaa kapillaaritiheyden lisääntymiseen

kestävyysharjoittelun vaikutuksesta. Hypoteesin mukaista rasvasyötön ja kestävyysharjoittelun suurempaa yhteisvaikutusta ei havaittu.

Tutkimusjakson lopussa tehdyn maksimaalisen juoksutestin aiheuttamat akuutit vasteet ovat mielenkiintoisia, sillä tulokset ovat systemaattisesti vastakkaiset ryhmien välillä. Kontrolliruokavaliolla tutkimusjakson ajan eläneiden ryhmässä sekä angiogeneesiä stimuloivien että inhiboivien proteiinien määrät olivat laskeneet välittömästi kuormituksen jälkeen. Rasvaruokaryhmässä kuormitus aiheutti puolestaan akuutin nousun erityisesti angiogeneesiä stimuloivien, mutta myös angiogeneesiä inhiboivien proteiinien määrään. Aiempien tutkimusten perusteella oletusarvona on se, että angiogeneesi on lisääntynyt molemmissa ryhmissä. Näiden tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että säätelymekanismi ryhmien välillä on erilainen: rasvaruoka lisää angiogeneesiä stimuloivien proteiinien ilmenemisen tehostamisen kautta, kun taas normaaliruudalla eläneillä angiogeneesi lisääntyy inhiboivien signaalien estämisen kautta.

Tutkimuksen heikkoutena on käytetty menetelmä, joka mahdollistaa vain ryhmien välisten suurten muutosten tarkastelun. Myös epäspesifisten proteiinien sitoutuminen, jota ei tällä menetelmällä voi estää, vaikuttaa tuloksiin. Tutkimuksessa käytettiin poolattuja näytteitä, jolloin yksittäiset poikkeavat näytteet ovat voineet vaikuttaa suuresti analysoituihin keskiarvotuloksiin. Menetelmän heikkouksista johtuen tarvitaan lisätutkimusta, jotta rasvasyötön ja kestävyystyyppisen liikunnan angiogeneesiä lisäävä mekanismi saataisiin selvitettyä. Yksittäisten proteiinien määrässä tapahtuvien muutosten tarkastelu ei myöskään anna vastauksia siihen, millaiset kapillaaritiheyden lisääntymiseen johtavat signaalintireitit rasvaisen ruuan ja kestävyystyyppisen kuormituksen vaikutuksesta aktivoituvat ja miten eri säätelyproteiinit vaikuttavat toisiinsa.

LÄHTEET

- Ahmad, S.A., Liu, W., Jung, Y.D., Fan, F., Wilson, M., Reinmuth, N., Shaheen, R.M., Bucana, C.D. & Ellis, L.M. 2001. The Effects of Angiopoietin-1 and -2 on Tumor Growth and Angiogenesis in Human Colon Cancer. *Cancer Res.* 61:1255–1259.
- Andersen, P. & Henriksson, J. 1977. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *J Physiol.* Sep;270(3):677–690.
- Arany, Z., Foo, S-Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., Baek, K. H., Rosenzweig, A. & Spiegelman, B. M. 2008. HIF independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature.* 451: 1008-1013.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schattman, G. & Isner, J.M. 1997. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science.* 275, 964.
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. & Alitalo, K. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 165–177.
- Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P. & Holloszy, J.O. 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 16: 1879-1886.
- Balwierz, A., Polus, A., Razny, U., Wator, L., Dyduch, G., Tomaszewska, R., Scherneck, S., Joost, H. & Dembinska-Kiec, A. 2009. Angiogenesis in the New Zealand obese mouse model fed with high fat diet. *Lipids Health Dis.* 8:13.
- Beenken, A. & Mohammadi, M. 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 235–253.
- Benedito, R. ym. 2009. The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell.* 137, 1124–1135.
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest.* 111, 1287–1295.
- Bianco, R., Gelardi, T., Damiano, V., Ciardiello, F. & Tortora, G. 2007. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1416-31.
- Brandao, M., Wajngarten, M., Rondon, E., Giorgi, M., Hironaka, F. & Negrão, C. 1993. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. *J Appl Physiol.* 75 : 1989 –1995.

- Burke, L.M. & Hawley, J.A. 2002. Effects of short-term fat adaptation on metabolism and performance of prolonged exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, 34(9):1492–1498.
- Carlson, T.R., Feng, Y., Maisonpierre, P.C., Mrksich, M. & Morla, A.O. 2001. Direct Cell Adhesion to the Angiopoietins Mediated by Integrins. *J Biol Chem.* 276(28):26516–26525.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 473, 298–307.
- Carmeliet, P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 438: 932-936.
- Carmeliet, P. & Tessier-Lavigne, M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature.* 436, 193-200.
- Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9(6): 653-660.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A. ym. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med.* 7: 575–583.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6(4):389-95.
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407: 249-257.
- Carmeliet, P., Ng, Y-S., Nuyens, D. ym. 1999. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF₁₆₄ and VEGF₁₈₈. *Nat Med.* 5: 495– 502.
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S. & Arany, Z. 2009. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *PNAS.* 106(50): 21401–21406.
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., Martínez D. & La Escalera, G. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.* 89(4):1177-215.
- Convertino, V.A. 1991. Blood volume: its adaptation to endurance training. *Med Sci Sports Exerc.*, 23(12):1338-1348.
- Dejana, E. 2010. The role of Wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res.* 107:943–952.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi, L.S., Politi, L.S., Sampaolesi, M. & Naldini, L. 2005. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell.* 8: 211–226.
- Ferrara, N. 2009. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 20:158–163.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. & LeCouter, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9(6):669-76.

- Fidler, I.J. & Ellis, L.M. 2000. Chemotherapeutic drugs—more really is not better. *Nat Med.* 6: 500 – 502.
- Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B. & Carmeliet, P. 2008. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer.* 8: 942–956.
- Hagberg, C. E., Falkevall, A., Wang, X. ym. 2010. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature.* 464: 917–921.
- Handschin, C. & Spiegelman, B.M. 2006. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 Coactivators, Energy Homeostasis, and Metabolism. *Endocr Rev.* 27(7):728–735.
- Hattori, K., Dias, S., Heissig, B. ym. 2001. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1 Stimulate Postnatal Hematopoiesis by Recruitment of Vasculogenic and Hematopoietic Stem Cells. *J Exp Med.* 193(9): 1005–1014.
- Helge, J.W. 2000. Adaptation to a Fat-Rich Diet Effects on Endurance Performance in Humans. *Sports Med.* 30 (5): 347-357.
- Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R. ym. 2003. The VIVA Trial: Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation.* 107:1359-1365.
- Hepple, R.T. 2000. Skeletal muscle: microcirculatory adaptation to metabolic demand. *Med Sci Sports Exerc.* 32(1):117-23.
- Hudlicka, O., Brown, M. & Egginton, S. 1992. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 72: 369-417.
- Iaccarino, G., Ciccarelli, M., Sorriento, D. ym. 2005. Ischemic Neovascularization Enhanced by β 2-Adrenergic Receptor Overexpression: A Novel Role for the Endothelial Adrenergic System. *Circ Res.* 97:1182-1189.
- Jain, R.K., Ruda, D.G., Clark, J.W. & Loeffler, J.S. 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 3(1): 24-40.
- Jain, R.K. 2003. Molecular Regulation of Vessel Maturation. *Nat Med.* 9: 685-693.
- Jain, R.K. & Munn, L.L. 2000. Leaky vessels? Call Ang1!. *Nat Med.* 6(2):131-2.
- Koves, T.R., Li, P., An, J., Akimoto, T., Slentz, D., Ilkayeva, O., Dohm, G.L., Yan, Z., Newgard, C.B. & Muoio, D.M. 2005. Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Co-activator 1 α -mediated Metabolic Remodeling of Skeletal Myocytes Mimics Exercise Training and Reverses Lipid-induced Mitochondrial Inefficiency. *J Biol Chem.* 280(39): 33588–33598.
- Krady, M.M., Zeng, J., Yu, J., MacLauchlan, S., Skokos, E.A., Tian, W., Bornstein, P., Sessa, W.C. & Kyriakides, T.R. 2008. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis. *Am J Pathol.* 173(3):879-91.

- Lee, H.J., Cho, C.H., Hwang, S.J., Choi, H.H., Kim, K.T., Ahn, S.Y., Kim, J.H., Oh, J.L., Lee, G.M. & Koh, G.Y. 2004. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J.* 18(11):1200-8.
- Lee, J.S., Bruce, C.R., Spriet, L.L. & Hawley, J.L. 2001. Interaction of diet and training on endurance performance in rats. *Exp Physiol.* 86(4): 499–508.
- Lira, F.S., Rosa, J.C., Lima-Silva, A.E., Souza, H.A., Caperuto, E.C., Seelaender, M.C., Damaso, A.R., Oyama, L.M. & Santos, R.V. 2010. Sedentary subjects have higher PAI-1 and lipoproteins levels than highly trained athletes. *Diabetol Metab Syndr.* 22(2):7.
- Luttun, A., Carmeliet, G. & Carmeliet, P. 2002. Vascular Progenitors: From Biology to Treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 12:88–96.
- Mason, S.D., Rundqvist, H., Papandreou, I., Duh, R., McNulty, W.J., Howlett, R.A., Olfert, I.M., Sundberg, C.J., Denko, N.C., Poellinger, L. & Johnson, R.S. 2007. HIF-1 α in endurance training: suppression of oxidative metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293: 2059–2069.
- McArdle, W.D., Katch, F.I. & Katch, W.L. 2001. *Exercise Physiology: Energy, Nutrition, and Human Performance.* 5th edition.
- McCarty, M. F. ym. 2007. Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *J Clin Invest.* 117: 2114–2122.
- Mikkola, H.K. & Orkin, S.H. 2002. The search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 11(1), 9-17.
- Miura, S., Kawanaka, K., Kai, Y., Tamura, M., Goto, M., Shiuchi, T., Mino koshi, Y. & Ezaki, O. 2007. An Increase in Murine Skeletal Muscle Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in Response to Exercise Is Mediated by β -Adrenergic Receptor Activation. *Endocrinology.* 148(7):3441–3448.
- Moldobaeva, A., Baek, A., Eldridge, L., Wagner, E.M. 2010. Differential activity of pro-angiogenic CXC chemokines. *Microvasc Res.* 80(1):18-22.
- Mukoyama, Y., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M. & Anderson, D.J. 2002. Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin. *Cell,* 109(6): 693-705.
- Murakami, M. ym.2008. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 118: 3355–3366.
- Nagy, J. A., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. 2007. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2:251–275.
- Nakao, S., Noda, K., Zandi, S., Sun, D., Taher, M., Schering, A., Xie, F., Mashima, Y. & Hafezi-Moghadam, A. 2011. VAP-1-mediated M2 macrophage infiltration underlies IL-1 β - but not VEGF-A-induced lymph- and angiogenesis. *Am J Pathol.* 178(4):1913-21.

- Nedeau, A.E., Gallagher, K.A., Liu, Z.J. & Velazquez, O.C. 2011. Elevation of hemopexin-like fragment of matrix metalloproteinase-2 tissue levels inhibits ischemic wound healing and angiogenesis. *J Vasc Surg.* 54(5):1430-8.
- Neufeld, G. & Kessler, O. 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 8:632–645.
- Norrbom, J., Sundberg, C.J., Ameln, H., Kraus, W.E., Jansson, E. & Gustafsson, T. 2004. PGC-1 α mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 96: 189–194.
- O'Neill, T.J., Wamhoff, B.R., Owens, G.K. & Skalak, T.C. 2005. Mobilization of Bone Marrow-Derived Cells Enhances the Angiogenic Response to Hypoxia Without Transdifferentiation Into Endothelial Cells. *Circ Res.* 97:1027-1035.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. & Folkman, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 88(2):277-85.
- Pardali, E., Goumans, M. J. & ten Dijke, P. 2010. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 20: 556–567.
- Park, H.Y., Kwon, H.M., Lim, H.J., Hong, B.K., Lee, J.Y., Park, B.E., Jang, Y., Cho, S.Y. & Kim, H.S. 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med.* 33(2):95-102.
- Phng, L. K. & Gerhardt, H. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by Notch. *Dev Cell.* 16: 196–208.
- Phng, L. K. ym. 2009. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell.* 16: 70–82.
- Prior, B.M., Yang, H.T. & Terjung, R.L. 2004. What makes vessels grow with exercisetraing? *J Appl Physiol.* 97: 1119–1128.
- Quaeghebeur, A., Segura, I. & Carmeliet, P. 2010. Pericytes: blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration? *Neuron.* 68: 321–323.
- Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M. & March, K.L. 2003. Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation.* 107:1164-1169.
- Ren, Y., Li, Y., Zhao, Y., Yu, F., Zhan, Z., Yuan, Y., & Yang, J. 2011. Effects of resveratrol on lipid metabolism in C57BL/6J mice. *Wei Sheng Yan Jiu.* 40(4):495-7.

- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H., & Verfaillie, C.M. 2002. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 109:337–346.
- Rissanen, T.T. & Ylä-Herttuala, S. 2007. Uudisverisuonten kasvattaminen – kohti iskeemisten kudosten parempaa verenkiertoa. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim.* 123(3):306-16.
- Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S. ym.. 2011. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell.* 19: 31–44.
- Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J. ym. 2008. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell–cell and cell–matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 10: 527–537.
- Schaper, W. & Scholz, D. 2003. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler ThrombVasc Biol.* 23:1143–51.
- Schwartz, J. D., Rowinsky, E. K., Youssoufian, H., Pytowski, B. & Wu, Y. 2010. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer. *Cancer.* 116: 1027–1032.
- Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y. ym. 2008. Weight Loss with a Low-Carbohydrate, Mediterranean or Low-Fat Diet. *N Engl J Med.* 359:229-41.
- Shim, W.S.N., Teh, M., Bapna, A., Kim, I., Koh, G-Y., Mack, P.O.P. & Ge. R. 2002. Angiopoietin 1 Promotes Tumor Angiogenesis and Tumor Vessel Plasticity of Human Cervical Cancer in Mice. *Exp Cell Res.* 279: 299–309.
- Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcõ-Carden, G., Papatropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. & Flores-Riveros, J.R. 1998. Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science.* 281:1683 – 1686.
- Silvennoinen, M., Rinnankoski-Tuikka, R., Vuento, M., Kivelä, R., Lehti, M. & Kainulainen, H. 2010. High Fat Feeding Increases The Capillary Density In The Skeletal Muscle Of Mice. *Med Sci Sports Exerc.* 42(10): 67.
- Silverman, K.J., Lund, D.P., Zetter, B.R., Lainey, L.L., Shahood, J.A., Freeman, D.G., Folkman J. & Barger, A.C. 1988. Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 153(1): 347-352.
- Silvestre, J.S., Mallat, Z., Duriez, M., Tamarat, R., Bureau, M.F., Scherman, D., Duverger, N., Branellec, D., Tedgui, A. & Levy, B.I. 2000. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res.* 87(6):448-52.
- Spriggs, K.A., Bushell, M. & Willis, A. E. 2010. Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Mol Cell.* 40(2):228-37.

- Stenroth, L. 2011. Rasvaisen ruokavalion ja liikunnan vaikutukset hiusveisuonten kasvutekijöihin hiirten raajalihaksissa. Kandidaatin tutkielma. Jyväskylän yliopisto.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D. & Polverini, P.J. 1995. Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 210(1):51-7.
- Swift, M. R. & Weinstein, B. M. 2009. Arterial–venous specification during development. *Circ Res.* 104: 576–588.
- Tammela, T. & Alitalo, K. 2010. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell.* 140: 460–476.
- Thurston, G., Noguera-Troise, I. & Yancopoulos, G. D. 2007. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 7: 327–331.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald D.M. & Yancopoulos, G.D. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 6: 460 – 463.
- Tvorogov, D. ym. 2010. Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell.* 18: 630–640.
- Venkatraman, J.T. & Pendergast, D.R. 2002. Effect of Dietary Intake on Immune Function in Athletes. *Sports Med.* 32(5): 323-337.
- Visconti, R.P., Richardson, C.D. & Sato, T.N. 2002. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *PNAS.* 99(12): 8219–8224.
- Waters, R.E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B.H. & Yan, Z. 2004. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287: C1342–C1348.
- Zoladz, J.A., Semik, D., Zawadowska, B., Majerczak, J., Karasinski, J., Kolodziejcki, L., Duda, K. & Kilarski, W.M. 2005. Capillary density and capillary-to-fibre ratio in vastus lateralis muscle of untrained and trained men. *Folia Histochem Cytobiol.* 43(1):11-7.
- Zwetsloot, K.A., Westerkamp, L.M., Holmes, B.F. & Gavin, T.P. 2008. AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. *J Physiol.* 586(24):6021–6035.