

**KESTÄVYYSHARJOITTELUN VAIKUTUS TERVEEN JA DIA-
BEETTISEN SYDÄMEN OIKEAN JA VASEMMAN KAMMION
KALSIUMKANAVIEN MÄÄRIIN – INTERVENTIOTUTKIMUS
ISOLLA MINISIKA-ELÄINMALLILLA**

Katri Heikkilä

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto
Biologian laitos
05.06.2019

Linja: Fysiologia ja genetiikka
Erikoistumisala: Eläinfysiologia

Laajuus: 40 op

Tarkastajat:

1:

2:

Hyväksytty (pvm):

TURUN YLIOPISTO

Biologian laitos

ILuonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

KATRI HEIKKILÄ: Kestävyysharjoittelun vaikutus

terveen ja diabeettisen sydämen oikean ja vasemman kammion kalsiumkanavien määriin

– interventiotutkimus isolla minisika-eläinmallilla

Pro gradu -tutkielma, 47 s., 2 liitettä.

Eläinfysiologia

Kesäkuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Diabetes on aineenvaihduntasairaus, johon liittyy insuliinin tuotanto- ja toimintahäiriötä. Nämä aiheuttavat veren glukoosipitoisuuden nousua, mikä pitkään jatkuessaan johtaa sydänsairauksiin, kuten sepelvaltimotautiin ja sydämen vajaatoimintaan. Liikuntaharjoittelulla on useita positiivisia vaikutuksia sydämen terveyteen ja se parantaa muun muassa sydämen supistumiskykyä. Kalsiumilla on merkittävä rooli sydämen supistumisessa, sillä solunsisäiset kalsiumkonsentraation muutokset johtavat sydämen supistumiseen ja palautumiseen lepovaiheeseen. Tämän tutkielman tarkoituksena oli tutkia, vaikuttaako kestävyysharjoittelu terveeseen ja diabeettiseen sydämen kalsiumkanavien määriin. Tämän selvittämiseksi tutkimuksessa mitattiin isossa koe-eläinmallissa minisikojen sydänten oikean ja vasemman kammion L-tyypin kalsiumkanavien (Cacna1c), ryanodiinireseptorien (RyR2), sarkoplasmisen kalvoston Ca²⁺-ATPaasien (Serca2) ja natrium–kalsium–vaihtajien (NCX) suhteellisia määriä Western blotting –menetelmällä.

Diabeteksen proteiinimääriä vähentävä vaikutus nähtiin oikeassa kammiossa, jossa diabetes laski RyR2-proteiinin määrää, ja tämä ero näkyi erityisesti liikkuneiden eläinten kesken, ja lisäksi diabetes näytti laskevan NCX-proteiinin määrää oikeassa kammiossa. Liikunta näytti yleisesti nostavan Cacna1c-proteiinin määrää vasemman kammion epikardiumissa, mutta liikunnan positiiviset vaikutukset näyttivät olevan paljon suuremmat diabetesta sairastavilla eläimillä kuin terveillä. Yleisesti diabetesta sairastavilla eläimillä oli sydämessä enemmän Cacna1c-proteiinia kuin terveillä. Lisäksi liikunta nosti sydämen Serca2-proteiinin määrää vasemman kammion endokardiumissa sekä terveillä että sairailta eläimillä.

Johtopäätöksenä voidaan sanoa, että diabetes vähensi oikeassa kammiossa RyR2- ja NCX-proteiinien suhteellisia määriä, mikä on voinut aiheuttaa heikompa supistumiskykyä diabeteseläimillä, sillä kalsiumkanavien määrät voivat vaikuttaa sydämen supistumiskykyyn. Liikunnalla oli kuitenkin positiivisia vaikutuksia kalsiumin sisäänvirtaukseen ja poistoon osallistuviin proteiineihin, ja liikunnan positiiviset vaikutukset olivat näkyvissä myös diabetesta sairastavilla eläimillä. Liikunnalla täten saattoi olla sydämen supistumiskykyä parantavia vaikutuksia etenkin diabeteseläimillä.

AVAINSANAT: *diabetes, kestävyysharjoittelu, L-tyypin kalsiumkanava, RyR2, Serca2, NCX*

Sisällys

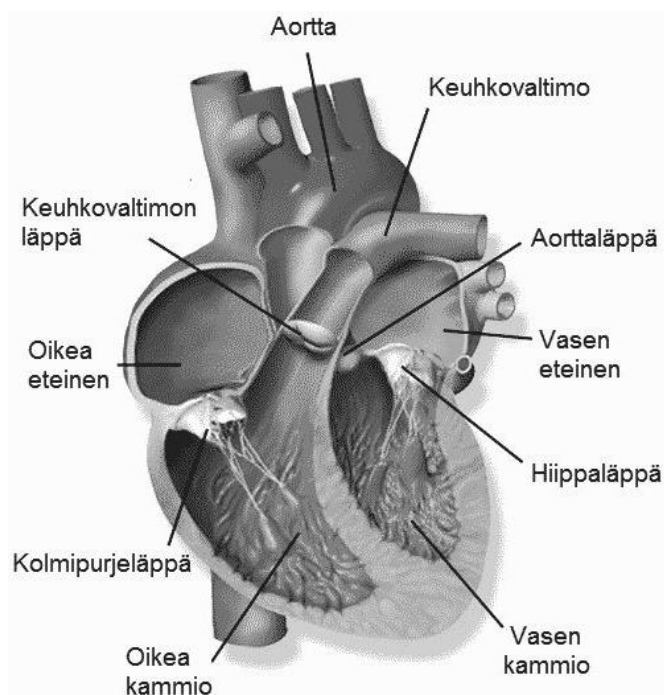
1. Johdanto.....	1
1.1. Sydämen ja sydänlihassolujen rakenne ja toiminta	1
1.2. Ärsytys-supistuskenttä.....	3
1.2.1 L-typin kalsiumkanava (Cacna1c).....	4
1.2.2 Ryanodiinireseptori 2 (RyR2)	6
1.2.3 Sarkoendoplasmisen kalvoston Ca ²⁺ -ATPaasi (Serca2)	7
1.2.4 Natrium—kalsiumvaihtaja (NCX).....	9
1.3. Diabeteksen vaikutus sydämen toimintaan	10
1.4. Liikuntaharjoittelun vaikutus sydämen toimintaan.....	11
1.5. Tutkimuksen tarkoitus	13
2. Aineisto ja menetelmät.....	14
2.1. Koe-eläimet ja ruokavaliot.....	14
2.2. Kuntotesti ja liikuntaharjoittelu	15
2.3. Proteiinimäärien määrittäminen Western blot –menetelmällä	17
2.3.1 Näytteiden valmistelu	17
2.3.2 Kokonaisproteiinikonsentraation määrittäminen BCA-analyysillä.....	18
2.3.3 Western blot.....	18
2.4. Tilastoanalyysit	21
3. Tulokset.....	22
3.1. Ruumiinpainot ja sydämen painot sekä glukoosi-, triglyseridi- ja kolesterolitasot	22
3.2. Cacna1c.....	23
3.3. RyR2.....	24
3.4. Serca2	25
3.5. NCX	26
3.6. Kammioiden väliset erot.....	28
4. Pohdinta	29
4.1. Muutokset Cacna1c-proteiinin määrissä.....	29
4.2. Muutokset RyR2-proteiinin määrissä.....	32
4.3. Muutokset Serca2-proteiinin määrissä	34
4.4. Muutokset NCX-proteiinin määrissä	35
4.5. Erot kammioiden kalsiumkanavien määrissä.....	36
5. Yhteenveto	37
Kiitokset.....	40
Lähteet	41
Liitteet.....	47

1. Johdanto

1.1. Sydämen ja sydänlihassolujen rakenne ja toiminta

Nisäkkään sydän on nelilokeroinen elin, joka muodostuu oikeasta kammiosta ja eteisestä sekä vasemmasta kammiosta ja eteisestä. Sydämen pumppaustoiminta ylläpitää verenkiertoa. Sydämen eri osioiden välillä olevat läpät estävät verta virtaamasta väärään suuntaan (kuva 1). Vähähappinen veri kulkeutuu kehon laskimoita pitkin sydämen oikean eteisen kautta oikeaan kammioon, josta veri pumpataan keuhkoverenkiertoon. Keuhkoissa hiilidioksidia poistuu verestä ja happea siirtyy vereen. Hapekas veri kulkeutuu keuhkolaskimoa pitkin sydämen vasempaan eteiseen ja siitä vasempaan kammioon. Vasen kammiopumppaa veren aorttaan, jota pitkin hapekas veri siirtyy suureen verenkiertoon ja kaikkialle elimistöön. (Hill ym. 2012).

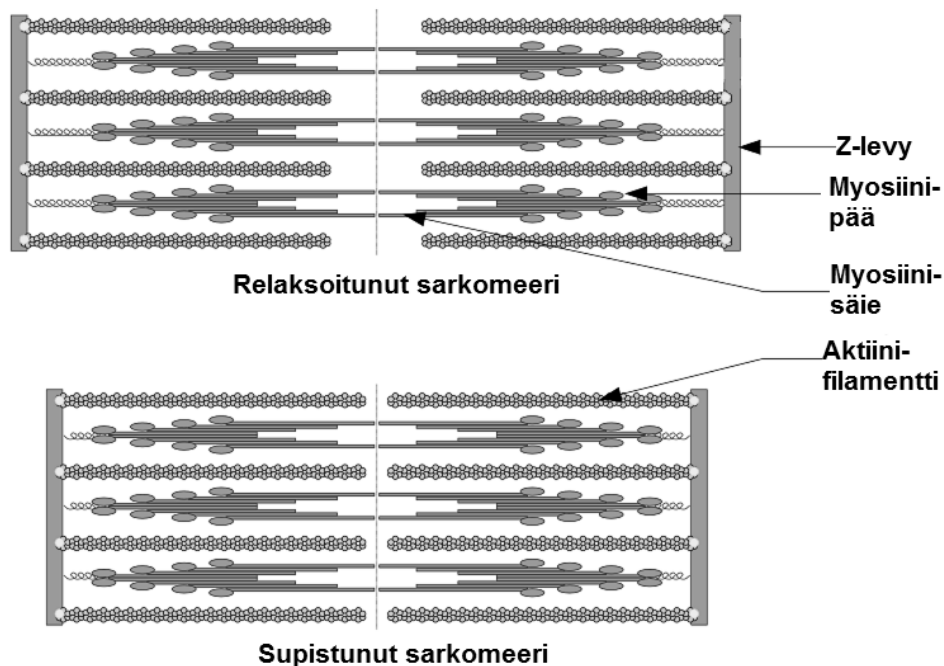
Vasen ja oikea kammiot eroavat toisistaan niin rakenteeltaan kuin kehitykseltäänkin (Poels ym. 2015). Esimerkiksi oikean kammion seinämät ovat ohuempia kuin vasemman kammion seinämät (kuva 1). Oikean kammion ohuempat seinämät eivät supistuessaan tuota yhtä suurta painetta kuin vasemman kammion paksimmat seinämät. Oikean kammion täytyy pumpata veri vain keuhkoverenkiertoon, joten se joutuu työskentelemään pienempää painetta vastaan kuin vasen kammiot, joka pumpaa veren kaikkialle muualle elimistöön. Täten vasemman kammion seinämien on oltava paksimmat suuremman paineen luomiseksi. Kammiot myös kehittyvät eri kantasoluista, mikä osaltaan selittää niiden erilaisen rakenteen ja toiminnan. (Poels ym. 2015).



Kuva 1. Sydämen rakenne. Kuva muokattu otettu ja muokattu nettisivulta Wikijournal of Medicine - Blausen Medical (2014).

Sydänlihas eli myokardium koostuu suurelta osin sydänlihassoluista. Lihaksen keskellä solut sijaitsevat pitkittäin samansuuntaisesti, kun taas reunoilla solut ovat poikittain 90 asteen kulmassa verrattuna keskellä oleviin soluihin (Pappano & Wier 2013). Myokardiumin sisäosan (tässä työssä endokardium tarkoittaa myokardiumin sisäosaa, ei vain sydämen sisäkalvoa) lihassolut lyhenevät supistuessaan enemmän ja supistuminen on nopeampaa kuin myokardiumin ulko-osan solujen (josta käytetään tässä työssä nimeä epikardium) (Kondo ym. 2006; Mou ym. 2009). Lisäksi endokardiumin solunsisäisen kalsiumkonsentraation on havaittu olevan epikardiumia korkeampi (Figueredo ym. 1993). Sydänlihassolut ovat poikkijuovaisia lihassoluja, joissa on runsaasti mitokondrioita tehokkaan soluhengityksen takaamiseksi, mutta vain yksi tuma, toisin kuin luurankolihas-ten poikkijuovaisissa soluissa. Sydänlihassolut ovat haarautuneita ja kiinnittyvät toisiinsa kiinni niiden päissä olevien kytkylevyjen kautta. Kytkylevyt muodostuvat vyö- ja aukkoliitoksista: vyöliitokset sitovat solut mekaanisesti toisiinsa kiinni, ja aukkoliitosten kautta sähköimpulssi pääsee kulkemaan nopeasti solusta toiseen, mikä helpottaa sydänlihassolujen yhtäaikaista supistumista. (Walker & Spinale 1999)

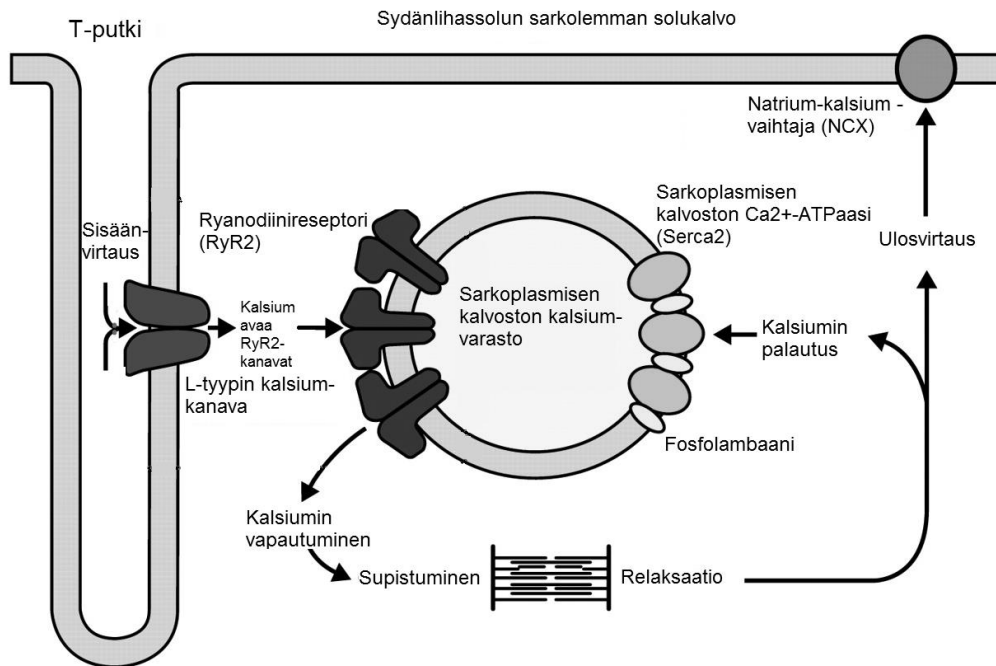
Lihassolut ovat muodostuneet myofibriileistä eli lihassäikeistä. Lihassäikeet ovat puolestaan muodostuneet lomittain asettuneista myosiini- ja aktiinisäikeistä, jotka järjestäytyvät supistumisyksiköiksi, sarkomeereiksi (kuva 2). Sarkomeeriyksikön päitä kutsutaan Z-levyiksi. Sydänlihassolun solukalvosta eli sarkolemmasta lähtee T-putkiksi kutsuttuja rakenteita, jotka työntyvät Z-levyjien kohdalla eli sarkomeeriyksiköiden väleissä lähelle solun sisäistä sarkoplasmista kalvostoa. Aktiinisäikeissä on myosiinin sitoutumiskohtia, joita lepotilassa peittää tropomyosiiniketju ja troponiini-molekyylit, joita on kolmea eri tyyppiä: T, I ja C. Kalsiumionin sitoutuminen troponiini-C:hen saa tropomyosiinin siirtymään pois myosiinin sitoutumiskohtien päältä, jolloin myosiinipää voi sitoutua aktiiniin ja supistuminen voi alkaa. Kalsiumin merkitys sydänlihaksen supistumisessa käydään vielä myöhemmin yksityiskohtaisemmin läpi. Myosiiniin on sitoutuneena adenosiidifosfaatti (ADP) ja inorgaaninen fosfaatti (P_i). Myosiinin sitouduttua aktiiniin inorgaaninen fosfaatti irtoaa myosiinipäästä ja saa aikaan myosiinin konformaation muutoksen. Myosiinipään asennon muuttumisen seurauksena aktiinisäie liikkuu lomittain myosiinin kanssa eli solu supistuu. Samalla ADP irtoaa myosiinipäästä, mikä muuttaa konformaatiota lisää. Myosiinipää pysyy kiinnittyneenä aktiiniin niin kauan, kunnes uusi ATP-molekyylit sitoutuu siihen, mikä saa aikaan myosiinin irtoamisen aktiinista. Tämän jälkeen ATP hydrolysoituu jälleen ADP:ksi ja inorgaaniseksi fosfaatiksi ja myosiinipää palautuu alkuperäiseen konformaatioonsa. Supistuminen loppuu, kun kalsiumionit irtoavat troponiini-C:stä ja kalsiumin solunsisäinen konsentraatio laskee. (Walker & Spinale 1999).



Kuva 2. Sarkomeeriyksikkö muodostuu lomittain asettuneista aktiini- ja myosiinisäikeistä, joiden päissä on Z-levyiksi kutsutut rakenteet. Kuva otettu ja muokattu nettisivustolta WikiJournal of Medicine – Medical Gallery of David Richfield (2014).

1.2. Ärsytys-supistuskytkentä

Kalsiumioneilla on huomattava rooli sydänlihassolun supistumisessa ja solunsisäiset kalsiumkonsentraation muutokset saavat aikaan koko sydämen supistumisen ja palautumisen lepoaiheeseen. Sydämen lepoaiheen eli diastolen aikana kalsiumionien pitoisuus kammioiden lihassolujen sytoplasmassa on matala (~100 nM) verrattuna solun ulkoiseen tilaan (~1-2 mM). Kun solunsisäinen kalsiumkonsentraatio nousee (~1 μM), solu supistuu (Bodi ym. 2005; Carafoli & Krebs 2016). Solujen koordinoitu yhtäaikainen toiminta saa aikaan kammioiden supistumisen eli systolen. Sydänlihassolujen kalsiumkonsentraatioiden muutosten täytyy siis olla tarkasti säädeltyä. Sytoplasmassa kalsiumkonsentraation muutoksiin vaikuttavat sydänlihassolun kalsiumkanavat: T-putkistossa ja solukalvolla sijaitsevat L-tyyppin kalsiumkanavat ja natrium—kalsiumvaihtajat (NCX) sekä sarkoplasmisella kalvostolla sijaitsevat ryanodiinireseptorit (RyR2) ja Ca^{2+} -ATPaasit (Serca2) (kuva 3).



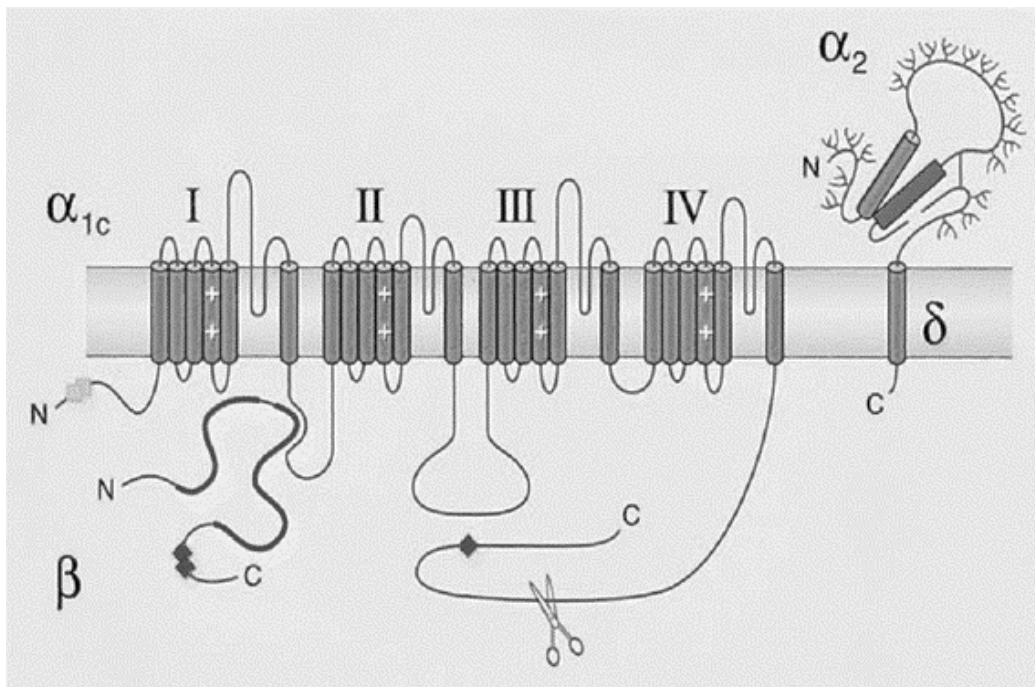
Kuva 3. Sydänlihassolun supistumiseen osallistuvat kalsiumkanavat. Kuva otettu ja muokattu artikkelista Scoote ym. (2003).

Sydämen oikean eteisen seinämässä on sinussolmukkeeksi kutsuttu solukertymä, joka synnyttää aktiopotentiaaleja tasaisin väliajoin autonomisen hermoston säätelyä. Aktiopotentiaalilla saavuttua sydänlihassoluun sen solukalvo depolarisoituu ja depolarisaatioaalto leviää myös T-putkiin. Solukalvon depolarisaatio avaa L-tyypin kalsiumkanavat. Solun ulkopuolinen kalsium kulkeutuu solun sisään kanavan kautta ja nostaa sytoplasmassa kalsiumkonsentraatiota. Koska T-putket työntyvät lähelle sarkoplasmista kalvostoa, L-tyypin kalsiumkanavat ovat fyysisesti lähellä sarkoplasmisella kalvostolla sijaitsevia RyR2-kanavia. Kalsiumkonsentraation nousu sytoplasmassa avaa RyR2-kanavat sarkoplasmisella kalvostossa. L-tyypin kalsiumkanavien ja RyR2-kanavien läheisyyden vuoksi jo vähäisenkin sytoplasmassa kalsiumkonsentraation nousu saa RyR2-kanavat aukeamaan. Sytoplasmassa kalsiumionit sitoutuvat troponiini C:hen, mikä saa aikaan myosiini-aktiini interaktion ja supistumisreaktion. Supistumisen päättyessä Serca2-proteiinit pumppaavat kalsiumioneja takaisin sarkoplasmisella kalvoston sisään tai kalsiumia siirtävät solun ulkopuolelle NCX-proteiinin välityksellä natriumgradienttia apuna käyttäen. Pieni määrä kalsiumia voidaan siirtää myös mitokondrioon. (Eisner ym. 2017).

1.2.1 L-tyypin kalsiumkanava (Cacna1c)

L-tyypin kalsiumkanava on jänniteherkkä kalsiumkanava, joka aukeaa aktiopotentiaalilla aiheuttaman solukalvon jännitteen muutoksen seurauksena ja pysyy pitkään auki. Solukalvon jännitteen muutos saa aikaan L-tyypin kalsiumkanavan konformaation muutok-

sen, jolloin kanava aukeaa ja solun ulkopuolella oleva kalsium pääsee kulkemaan kanavan lävitse solun sisään. L-tyypin kalsiumkanavat sijaitsevat lähinnä T-putkistoissa, jotka työntyvät lähelle sarkoplasmista kalvostoa. Kanavat ovat polypeptidikomplekseja, jotka muodostuvat kolmesta alayksiköistä α_{1c} , $\alpha_2\delta$ ja β . Näistä α_{1c} (Cacna1c) on itse kanavan muodostava transmembraani osa. Se koostuu neljästä homologisesta alueesta, joista jokainen muodostuu kuudesta kalvon läpäisevästä α -heliksistä (kuva 4). Kalvojännitteen muutos positiivisemmaksi saa heliksit muuttamaan konformaatiotaan, jolloin kanava aukeaa. Sen lisäksi, että α_{1c} -alayksikkö muodostaa varsinaisen kalvon läpäisevän kanavan, siinä on myös sitoutumiskohtat kanavaa sääteleville molekyyleille. Kanavan β -alayksikkö sijaitsee sytoplasman puolella, ja $\alpha_2\delta$ -alayksikössä δ on solukalvon läpäisevä osa, joka on sitoutunut solun ulkopuolella olevaan α_2 -osaan disulfididisidoksella. Molemmat alayksiköt ovat tiukasti, mutta eivät kovalenttisesti, sitoutuneena α_{1c} -alayksikköön. Niiden tehtävänä on säädellä α_{1c} -alayksikön biofysikaalisia ominaisuuksia sekä sen kuljettamista ja ankkurointia solukalvolle. (Bodi ym. 2005).



Kuva 4. L-tyypin kalsiumkanavan rakenne (Locatelli ym. 2014).

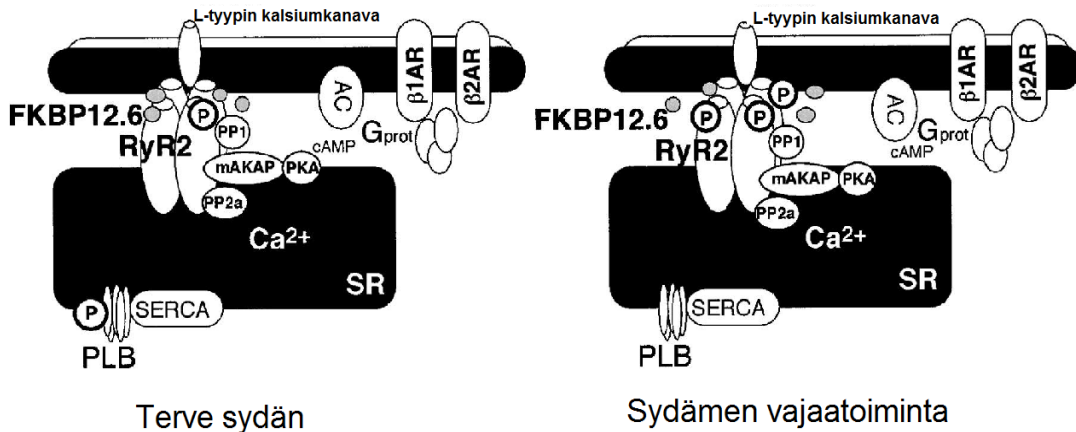
Yksi L-tyypin kalsiumkanavien merkittävistä säätelijöistä on kalsiumriippuvainen kalmoduliini (Bodi ym. 2005). Se osallistuu sekä kanavan inhibitioon että sen aktivaatioon. Kalmoduliini on kalsiumia sitova proteiini, jossa on neljä kalsiumionin sitoutumiskohtaa. Lepotilassa, kun kalsiumia ei ole läsnä, kalmoduliini on sitoutuneena L-tyypin kalsiumkanavan α_{1c} -alayksikön C-terminaaliseen häntään. Kun kanava avautuu, sen läpi kulkevat kalsiumionit sitoutuvat kalmoduliiniin. Ensin kanava pysyy auki, mutta solunsisäisen kalsiumkonsentraation noustessa kanavaan sitoutuneen kalsium-kalmoduliini-kompleksin

konformaatio muuttuu niin, että se muuttaa myös kanavan konformaatiota, jolloin kalsiumia ei enää pääse kanavan läpi (Bodi ym. 2005; Halling ym. 2005). Kalmoduliini voi myös sitoutua Ca^{2+} /kalmoduliini-riippuvaiseen kinaasiin II (CaMKII). Sitoutuminen saa aikaan kinaasin aktivaation. Aktivoitunut kinaasi fosforyloi L-typin kalsiumkanavan, mikä puolestaan edistää kanavan aukeamista (Bodi ym. 2005; Hudmon ym. 2005).

1.2.2 Ryanodiinireseptori 2 (RyR2)

Solun ulkopuolelta tuleva kalsium ei kuitenkaan yksinään riitä saamaan aikaan supistumisreaktiota, vaan lisää kalsiumia vapautetaan sarkoplasmisen kalvoston kalsiumvarastosta ryanodiinireseptorien (RyR2) välityksellä. RyR2 on suuri proteiini, joka sijaitsee sydänlihassolun sarkoplasmisella kalvostolla. Se on ligandiriippuvainen kanava, joka aukeaa kalsiumionien sitoutuessa siihen. L-typin kalsiumkanavien aukeamisen seurauksena kalsiumkonsentraatio nousee sytoplasmassa, mikä laukaisee RyR2-kanavien aukeamisen sarkoplasmisella kalvostolla. Tätä kutsutaan kalsiumin indusoimaksi kalsiumin vapautumiseksi (*engl. calcium-induced calcium release, CICR*). L-typin kalsiumkanavien sijainti lähellä sarkoplasmista kalvostoa olevissa T-putkissa helpottaa solun ulkopuolelta tulevien kalsiumionien sitoutumista RyR2-kanaviin. Lisäksi RyR2-kanavat ovat yleensä pakkautuneet tiheästi vierekkäin tiettyihin kohtiin kalvolla. Kunkin L-typin kalsiumkanavan aukeaminen laukaisee useamman RyR2-kanavan aukeamisen saaden aikaan kalsiumin virtauksen ulos sarkoplasmisesta kalvostosta, mikä puolestaan aktivoi viereisiä RyR2-kanavia vielä lisää. (Lanner ym. 2010).

RyR2 on muodostunut neljästä RyR2-polypeptidistä sekä neljästä niihin sitoutuneesta FKBP12-säätelyproteiinista, jotka stabiloivat proteiinin rakennetta. Kun proteiinikinaasi A (PKA) fosforyloi RyR2-proteiinin, FKBP12-proteiinit irtoavat (kuva 5). Tämä heikentää RyR2-kanavan stabiilisuutta ja lisää kanavan herkkyyttä kalsiumille, ja siten lisää kanavan avautumisherkkyyttä (Marx ym. 2000; Zhao ym. 2017). Aktiivisen PKA:n määrä lisääntyy esimerkiksi sympaattisen hermoston aktivaation seurauksena, sillä sympaattinen hermosto lisää sydämen β -adrenergisten reseptorien aktiivisuutta, ja reseptorien aktiivisuuden seurauksena syklisen AMP:n määrä lisääntyy. Syklinen AMP aktivoi PKA:n sitoutumalla siihen (Wehrens ym. 2003). RyR2:n hyperfosforyloituminen voi johtaa kanavan vuotoon jatkuvan kalsiumherkkyyden takia. Koska sympaattinen hermosto aktivoi RyR2-proteiinia fosforyloivaa PKA:ta, pitkään jatkuva elimistön stressitila voi saada aikaan RyR2-kanavan vuotoa, ja siten heikentää sydämen supistuvuutta (Marx ym. 2000). Lisäksi fosforiryhmiä poistavien PP1- ja PP2a-fosfataasien määrän on havaittu vähenevän sydämen vajaatoiminnan yhteydessä (Marx ym. 2000). Tämä voi myös edesauttaa RyR2-kanavien hyperfosforylaatiota ja kanavan vuotoa.



Kuva 5. RyR2-kanavan vakautta säätelevät proteiinit. Sympaattisen aktivaation seurauksena RyR2-kanavaa fosforyloiva proteiinkinaasi A (PKA) aktivoituu ja kiinnittyy RyR2-kanavaan ankkurointiproteiini mAKAP:n välityksellä. Stabiilivat FKBP12-proteiinit irtoavat fosforyloituneesta RyR2-kanavasta, jolloin kanava muuttuu epävakaammaksi ja aukeaa herkemmin. Fosfaataisit PP1 ja PP2a puolestaan poistavat kanavan fosforylointia ja vakauttavat kanavan toimintaa. Kuva otettu ja muokattu artikkelista Marx ym. (2000). AC = adenylyylisyklaasi, β 1AR ja β 2AR = β 1- ja β 2 -adrenergiset reseptorit, cAMP = syklinen AMP, G prot = heterotrimerinen G proteiini, FKBP12.6 = FK506:a sitova proteiini 12.6, mAKAP = lihaspesifinen A kinaasi ankkurointiproteiini, PLB = fosfolambaani, PP1 = fosfaataasi 1, PP2a = fosfaataasi 2a, Serca = Sarkoplasmisen kalvoston Ca^{2+} -ATPaasi, SR = sarkoplasmisen kalvosto

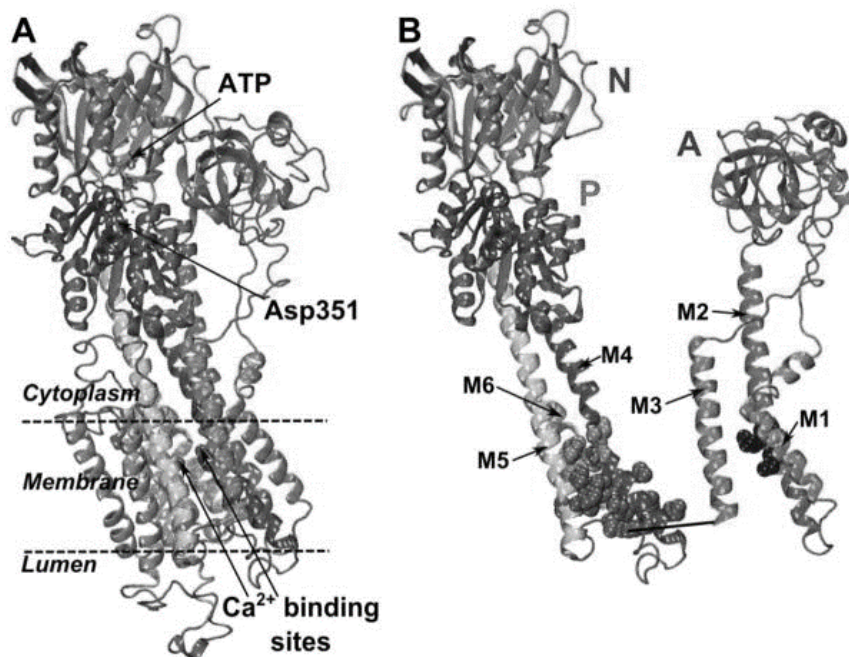
Ca^{2+} /kalmoduliini-riippuvainen proteiinkinaasi II (CaMKII) PKA:n tavoin fosforyloi RyR2-kanavia, muuttaa niiden konformaatiota ja heikentää niiden stabiilisuutta, ja voi siten olla osallisena RyR2-kanavan vuotoon (Uchinoumi ym. 2016). Aktiivisen CaMKII:n on havaittu mm. lisääntyvän diabeteksen yhteydessä (Ai ym. 2005). Myös kalmoduliini yksinään osallistuu RyR2-kanavan säätelyyn. Sen sitoutuminen kanavaan vaikuttaa päinvastoin kuin kanavan fosforylointi: se vähentää kanavan kalsiumherkkyyttä eli se muuttaa kanavan aktivaatiokynnystä niin, että kanavan aktivoituminen vaatii korkeamman kalsiumkonsentraation sytoplasmassa (Balshaw ym. 2001; Yamaguchi ym. 2003).

1.2.3 Sarkoendoplasmisen kalvoston Ca^{2+} -ATPaasi (Serca2)

Supistumisreaktiossa kalsiumionit sitoutuvat troponiini-C:hen, mikä muuttaa troponiini-tropomyosiinikompleksin rakennetta ja laukaisee myosiinin ja aktiinin interaktion, mikä saa aikaan lihaksen supistumisen. Relaksaatiovaiheessa kalsiumionit irtoavat troponiinista, ja kalsiumia poistetaan sytoplasmasta, jotta kalsiumkonsentraatiot palaavat alkuperäiseen tilaan ja supistumisreaktio voi tapahtua uudelleen. Sarkoplasmisen kalvoston Ca^{2+} -ATPaasi (Serca2) käyttää ATP:n hydrolyysistä saatavaa energiaa kalsiumin siirtämiseen takaisin sarkoplasmisen kalvoston lumeniin varastoon (Pereira ym. 2014).

Serca2-proteiini on ATP-riippuvainen kanava, joka on muodostunut yhdestä transmembraanisesta domeenista ja kolmesta sytoplasmisen puoleisesta domeenista: N-, P- ja A-domeenista (kuva 6). N-domeeni sitoo ATP:n, joka hydrolysoituu ja fosforyloi P-alueella olevan asparagiinihappotähteen. Transmembraanisessa osassa on sitoutumiskohdat

kahdelle kalsiumionille. ATP:n hydrolyysi ja sen seurauksena tapahtuva asparagiinihappotähteen fosforylaatio saavat aikaan kanavan konformaation muutoksen. A-domeeni avustaa konformaation muutoksessa. Serca2:n konformaatio vaihtelee E1- ja E2-konformaation välillä. E1-konformaatiossa kalsiumin sitoutumiskohdat ovat sytoplasmaan päin. ATP:n hydrolyysi muuttaa konformaation E2-konformaatioon, jolloin kalsiumin sitoutumiskohdat ovat sarkoplasmisen kalvoston luumenia kohti ja kalsiumionit irtoavat. Tämä jälkeen asparagiinihappotähde defosforyloituu, mikä saa kanavan palaamaan E1-konformaatioon. (Das ym. 2017).



Kuva 6. Serca2-proteiinin rakenne. (Das ym. 2017).

Serca2-proteiinin aktiivisuutta säätelee proteiini nimeltään fosfolambaani. Kun sytoplasmian kalsiumkonsentraatio on matala, fosfolambaani inhiboi Serca2-proteiinin aktiivisuutta vähentämällä kalsiumin affiniteettia siihen. Fosfolambaani on aktiivinen, kun se ei ole fosforyloitu. Sympaattinen hermosto aktivoi β -adrenergisen stimulaation kautta PKA:n. Kun PKA fosforyloi fosfolambaanin, sen aktiivisuus vähenee, jolloin kalsiumin affiniteetti Serca2-proteiiniin lisääntyy ja Serca2:n aktiivisuus lisääntyy. (Frank & Kranias 2000).

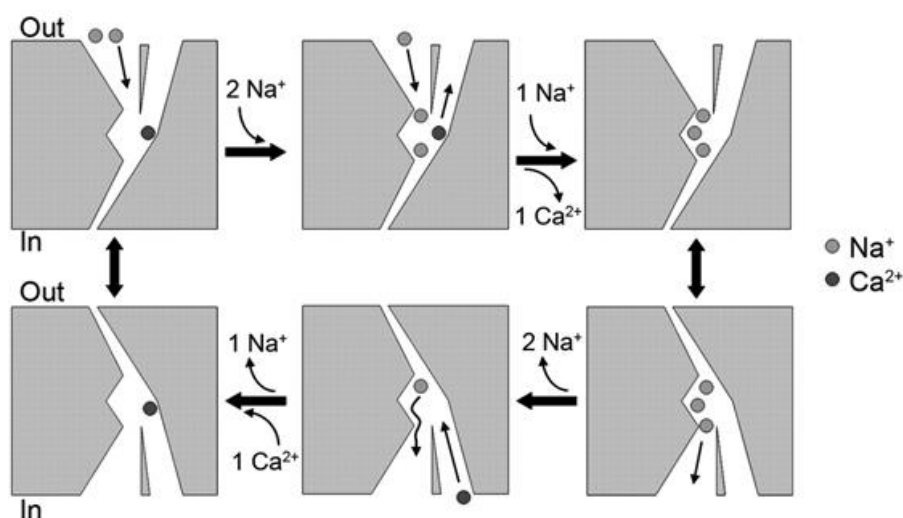
Myös kalsekvesteriini osallistuu välillisesti kalsiumin palauttamiseen sarkoplasmiseen kalvostoon. Kalsium sitoutuu kalsekvestriiniin sarkoplasmisen kalvoston sisällä, mikä vä-

hentää vapaan kalsiumin konsentraatiota sarkoplasmisessa kalvostossa. Täten se helpottaa Serca2:n toimintaa, koska kalsiumin konsentraatiogradientti sytoplasman ja sarkoplasmisen kalvoston välillä ei ole niin suuri (Faggioni & Knollmann 2012).

1.2.4 Natrium—kalsiumvaihtaja (NCX)

Natrium—kalsiumvaihtaja (NCX) osallistuu Serca2:n lisäksi kalsiumin poistamiseen sytoplasmast diastolen aikana. NCX on solukalvolla oleva proteiini, joka on muodostunut yhdeksästä solukalvon läpäisevästä heliksistä. Lisäksi sytoplasman puolella on kalsiumioneja sitova silmukka, joka toimii säätelyalueena. Kalsiumionien sitoutuminen alueeseen aktivoi NCX-kanavan toimintaa. Aktivoitumisen ajatellaan johtuvan kalsiumin sitoutumisen seurauksena tapahtuvasta konformaation muutoksesta, mutta aktivointimekanismia ei tunneta vielä täysin. (Ottolia ym. 2009).

Solukalvon läpäisevissä helikseissä on α -toistojaksoiksi kutsut alueet, joissa on neljä ionien sitoutumiskohtaa; yksi kalsiumionille ja kolme natriumioneille. NCX käyttää solun natriumgradienttia kalsiumin poistamiseen. Se siirtää kolme natriumionia solun sisään niiden elektrokemiallisen gradientin mukaisesti, ja käyttää tästä saatavaa energiaa yhden kalsiumionin siirtämiseen ulos solusta gradienttiaan vastaan (kuva 7). Natriumgradienttia ylläpitää $\text{Na}^+—\text{K}^+$ -ATPaasi, joka vaihtaa kolme natriumionia kahteen kaliumioniin. $\text{Na}^+—\text{K}^+$ -ATPaasi pyrkii palauttamaan ionien konsentraatiot solun lepotasolle, eli se pumppaa natriumia ulos ja kaliumia sisään. NCX:n affiniteetti kalsiumille on matala, mutta sillä on suuri kapasiteetti eli se pystyy poistamaan kalsiumia hyvin nopeasti. Sytoplasman korkea natriumkonsentraatio inaktivoi NCX:n toimintaa. Siten esimerkiksi $\text{Na}^+—\text{K}^+$ -ATPaasin viallinen toiminta vaikuttaa haitallisesti NCX:n aktiivisuuteen ja sitä kautta vähentää sydämen supistuvuutta. (Shattock ym. 2015).



Kuva 7. Natrium-kalsiumvaihtajan toiminta. Kolme natriumionia siirtyy solun sisään niiden elektrokemiallisen gradientin mukaisesti ja yksi kalsiumioni siirtyy ulos solusta (Liao ym. 2012).

1.3. Diabeteksen vaikutus sydämen toimintaan

Diabetes on sairaus, johon liittyy vähentynyt insuliinituotanto haiman Langerhansin saarekkeiden β -soluista, tai insuliinin vaikutuksen heikentyminen kohdekudoksissa. Insuliinia tarvitaan glukoosin kuljettamiseen lihas-, maksa- ja rasvasoluihin; se aktivoi glukosia soluun kuljettavien kuljetusproteiinien translokaatiota solukalvolle (Kharroubi & Darwish 2015). Insuliinin tuotanto- tai toimintahäiriön seurauksena veren glukoosipitoisuus kohoaa. Pitkään jatkuessaan veren korkea glukoosipitoisuus johtaa lopulta sydämen rakenteellisiin ja toiminnallisiin muutoksiin, kuten esimerkiksi proteiinien glykosylaatioon (Lazniewska & Weiss 2017; Wang ym. 2010). Tyypin 1 diabetes johtuu siitä, että autoimmuunisolut tuhoavat suurimman osan haiman β -soluista, jolloin insuliinia ei juuri muodostu. Tyypin 2 diabeteksessa puolestaan kudosten insuliinivaste on heikentynyt. Tällöin haiman Langerhansin saarekkeiden β -solut eivät kykene tuottamaan tarpeeksi insuliinia normaalin verensokerin ylläpitoon (Kharroubi & Darwish 2015).

Diabetes voidaan kokeellisesti aiheuttaa streptotsosiinilla. Se on haiman Langerhansin saarekkeiden β -soluja tuhoava toksiini, jonka seurauksena insuliinituotanto heikkenee ja paastoverensokeri-, triglyseridi- ja kolesterolitasot nousevat (Grüssner ym. 1993; Larsen ym. 2002). Streptotsosiinilla aiheutettu diabetes voi saada aikaan diabetekseen liittyvän sydänlihassairauden. Siinä kroonisesti kohonnut verensokeri aiheuttaa signaalintireittien ja aineenvaihdunnan muutoksia, jotka puolestaan johtavat sydänlihassolujen vaurioihin (Severson 2004).

Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että RyR2- ja Serca2-proteiinien määrä ja mRNA-ekspressio sekä myös Serca2:n aktiivisuus vähenevät diabetesta sairastavien rottien ja hiirien vasemman kammion sydänlihassoluissa (Bai ym. 2012; Choi ym. 2002; Teshima ym. 2000; Wang ym. 2010). Myös aktiivisen fosfolambaaniin eli Serca2-inhibiittorin määrä on usein lisääntynyt diabeteksen yhteydessä (Bai ym. 2012; Choi ym. 2002; Kim ym. 2001). Insuliinihoidon on puolestaan näytetty palauttavan RyR:n ja Serca2:n mRNA-ekspression normaalille tasolle (Le Douairon Lahaye ym. 2012; Teshima ym. 2000). Lisäksi on myös havaittu, että diabeteseläinmalleilla RyR2-kanavat vuotavat ja päästävät kalsiumia ulos sarkoplasmisesta kalvostosta diastolenkin aikana, mikä heikentää supistumiskykyä ja on osallisena muun muassa rytmihäiriöiden syntyyn (Shao ym. 2007; Wehrens ym. 2003).

Diabetekseen liittyvistä L-tyypin kalsiumkanavien toiminnan muutoksista on vaihtelevia tuloksia. Jotkut tutkimukset ovat havainneet L-tyypin kalsiumkanavien määrän vähenevän diabetesta sairastavien hiiren vasemmassa kammiossa (Lu ym. 2007), mutta toisaalta useat tutkimukset eivät ole onnistuneet havaitsemaan muutoksia L-tyypin kalsiumkanavien toiminnassa tai määrässä (Choi ym. 2002; Shao ym. 2007; Teshima ym. 2000). Myös NCX-proteiinin aktiivisuuden ja määrän on osoitettu vähenevän diabeteksen yhteydessä hiirillä ja rotilla (Choi ym. 2002; Hattori ym. 2000; Sheikh ym. 2012), mutta toisaalta osassa tutkimuksista ei ole havaittu NCX:n ekspression muutoksia (Teshima ym. 2000). Kuitenkin kaikki aiempi tutkimus diabeteksen vaikutuksesta sydämen kalsiumkanaviin on tehty jyrsijöillä eikä fysiologisesti ja anatomisesti lähempänä ihmistä olevilla suuremmilla nisäkkäillä, kuten sialla.

Diabetes näyttäisi aiheuttavan siis häiriötä erityisesti sarkoplasmisen kalvoston kyvyssä varastoida sekä vapauttaa kalsiumia. Tämä on sydämen toiminnan kannalta tärkeää, sillä sarkoplasmisen kalvoston kalsium on mahdollisesti supistumisen kannalta merkittävämpää kuin solun ulkopuolelta tuleva kalsium. Vähentynyt RyR2-aktiivisuus vähentää sytoplasman kalsiumkonsentraatiota supistumisen aikana, jolloin kalsiumin sitoutuminen troponiiniin vähenee ja systolevaihe heikkenee. Serca2-aktivaation väheneminen puolestaan hidastaa sytoplasman kalsiumkonsentraation palautumista normaalille tasolle, ja siten estää sydämen relaksaatiota ja uudelleensupistumista. (Belke & Dillmann 2004).

Diabeteksella on havaittu olevan erilaisia vaikutuksia eri sydämen alueilla. Diabetesrottia tutkineet Smail ym. (2016) havaitsivat, että endokardiumissa diastolen kalsiuminkonsentraation puoliintumisaika oli pidempi diabetesrotilla verrattuna kontrollirottiin, mutta epikardiumissa tällaista eroa ei ollut. Tämä saattaa tarkoittaa sitä, että endokardiumissa kalsiumin poisto sytoplastasta on heikentynyt diabeteksen yhteydessä, eli Serca2- ja NCX-proteiinien määrä tai aktiivisuus on vähentynyt.

1.4. Liikuntaharjoittelun vaikutus sydämen toimintaan

Liikunnalla on useita positiivisia vaikutuksia sekä terveen että viallisesti toimivan sydämen toimintaan: korkean intensiteetin aerobisen intervalliharjoittelun on havaittu muun muassa parantavan sydämen vasemman kammion iskutilavuutta ja ejektiofraktiota niin terveillä kuin sydäninfarktin jälkeen tai sepelvaltimotaudin yhteydessä (Kemi & Wisløff 2010). Rotilla sydäninfarktin jälkeinen aerobinen intervalliharjoittelu paransi vasemman kammion sydämen supistuvuutta ja vähensi hypertrofiaa eli sydämen liikakasvua (Wisløff ym. 2002). Lisäksi Serca2- ja NCX-proteiinien määrien on näytetty lisääntyvän liikunnan yhteydessä (Mou ym. 2009; Wisløff ym. 2002). Toisaalta korkean intensiteetin

intervalliharjoittelun on havaittu vähentävän rotilla sekä Serca2:n että aktiivisen fosfolambaaniin määrää vasemmassa kammiossa infarktin jälkeen, siitä huolimatta, että kuitenkin kalsiumin poisto samalla sytoplasmasta tehostuu (Zhang ym. 2000). Tämä viittaa siihen, että kalsiumin poiston parantuminen sydänlihassoluissa ei liity Serca2:n määrän lisääntymiseen, vaan sen inhibiittorin määrän vähenemiseen.

Liikunnan vaikutusta oikeaan kammioon on tutkittu vähemmän. Keuhkovaltimo-ah-
taumaa sairastavilla rotilla liikunnan on näytetty vähentävän useita haitallisia rakenteel-
lisiä ja toiminnallisia muutoksia oikeassa kammiossa. Se esimerkiksi lisäsi Serca2- ja
RyR2-proteiinien määriä, muttei L-typin kalsiumkanavien tai NCX:n määriä de Melo ym.
(2016) tutkimuksessa. Kuitenkin verrattuna terveisiin kontrollieläimiin keuhkovaltimo-ah-
taumaa sairastavilla liikkumattomilla rotilla RyR2- ja Serca2-proteiinin määrät vähenivät,
mutta L-typin kalsiumkanavien ja NCX:n määrät lisääntyivät (de Melo ym. 2016). Tämä
voi viitata siihen, että kun sarkoplasmisen kalvoston kalsiumkanavien toiminta sairauden
seurauksena heikkenee, solukalvon kalsiumkanavien toiminta alkaa kompensoida sar-
koplasmisen kalvoston heikentyntä toimintaa. De Melon ja kumppaneiden tutkimuk-
sessa (2016) ei kuitenkaan tutkittu lainkaan terveitä liikuntaa harrastaneita eläimiä, joten
tutkimus näyttää vain, miten liikunta vaikutti sairaisiin eläimiin.

Rolim ym. (2015) ja Stølen ym. (2009) ovat tutkineet liikunnan vaikutuksia diabetesta
sairastavilla hiirillä. Heidän tulostensa mukaan Serca2-aktiivisuus vähenee tyypin 2 dia-
betesta sairastavien hiirien vasemmassa kammiossa, ja NCX:n aktiivisuus lisääntyy. Li-
säksi he osoittivat, että sarkoplasmisen kalvoston RyR2-kanavien vuoto lisääntyi vasem-
massa kammiossa diabetesta sairastavilla hiirillä. Liikuntaharjoittelu puolestaan lisäsi
Serca2- ja NCX-proteiinien aktiivisuutta diabeteshiirillä (Stølen ym. 2009) ja vähensi
RyR2-kanavien vuotoa ja lisäksi fosfolambaanin eli Serca2-inhibiittorin aktiivisuus väheni
(Rolim ym. 2015). Insuliinihoidon ja aerobisen liikunnan yhteisvaikutuksen tutkimuk-
sessa puolestaan havaittiin, että vaikka molemmat erikseenkin lisäsivät tyypin 1 diabe-
tesrottien NCX-, RyR2- ja Serca2-proteiinien määriä, niiden yhteisvaikutus proteiinien
määriin oli vielä huomattavasti vahvempi (Le Douairon Lahaye ym. 2012).

Muutamit tutkimukset ovat antaneet myös eriäviä tuloksia. Eräs tutkimus havaitsi, että
vaikka diabetes vähensi Serca2-proteiinin määrää ja fosfolambaanin fosforylaatiotasoa
tyypin 1 diabetesta sairastavien rottien vasemmassa kammiossa, korkean intensiteetin
liikuntaharjoittelu ei palauttanut kummankaan määrää normaalille tasolle (Novoa ym.
2017). Lisäksi Shao ym. (2009) havaitsivat, ettei tyypin 1 diabetes vaikuttanut Serca2-
proteiinin määriin rottien vasemmassa kammiossa, ja että liikunta lisäsi proteiinin mää-
rää ainoastaan terveillä kontrolleilla. Samassa tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että

RyR2:n kalsiumherkkyys lisääntyy diabetesta sairastavilla rotilla ja liikunta kumoo tämän vaikutuksen, vaikka RyR2-kokonaismäärissä ei ollut eroja ryhmien välillä. Myös kaikki aiemmat tutkimukset liikunnan vaikutuksesta sydämen kalsiumkanaviin on tehty jyrsijöillä.

Vasemman kammion epikardiumin ja endokardiumin vertailussa Mou ym. (2009) havaitsivat, että sydäninfarkti heikensi rotilla erityisesti endokardiumin supistumisen voimakkuutta ja nopeutta, ja kestävyysharjoittelu palautti supistumiskyvyn normaaliksi. Endokardiumin lihassolujen suurempi supistuvuus saattaa osaksi johtua erilaisesta kalsiumin käsittelystä kammioden eri alueiden välillä, mutta toisaalta Kondo ym. (2006) eivät havainneet eroja hiiren sydämen kalsiumkanavien mRNA-ekspressoissa oikean kammion, vasemman kammion epikardiumin ja vasemman kammion endokardiumin välillä. He kuitenkin havaitsivat, että kalsiumkonsentraatiohuippu oli suurin vasemman kammion endokardiumissa, ja lisäksi kaliumin ulosvirtaus oli hitainta endokardiumissa ja siten myös repolarisaatio hitaampaa kuin muilla alueilla. Aktiopotentiaalin pidempi kesto endokardiumissa voi selittää, miksi kalsiumkonsentraatiohuippu on endokardiumissa suurempi kuin muissa, vaikka kalsiumkanavien määrissä ei ollut eroja.

1.5. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksen oli tutkia liikunnan vaikutuksia sekä terveiden että diabetesta sairastavien minisikojen sydänten oikean ja vasemman kammion kalsiumkanavien määriin. Hypoteesina oli, että diabetes vähentää kalsiumkanavien määriä, ja liikunta kumoo näitä vaikutuksia. Aikaisempi tutkimus liikunnan ja diabeteksen yhteisvaikutuksesta sydämen kalsiumkanaviin on vähäistä, ja lisäksi se on keskittynyt rotan tai hiiren sydämen toimintaan. Sian sydän on fysiologisesti ja anatomisesti lähempänä ihmistä kuin hiiren tai rotan, joten tutkimus sioilla voi antaa lisätietoa siitä, millainen vaikutus liikunnalla voi olla diabetesta sairastavien ihmisten sydämiin (Swindle ym. 2012). Lisäksi tutkimus diabeteksen tai liikunnan vaikutuksesta sydämen toimintaan on keskittynyt sydämen vasempaan kammioon. Oikea ja vasen kammio kuitenkin eroavat toisistaan rakenteeltaan ja toiminnaltaan, joten on mahdollista, että oikean ja vasemman kammion kalsiumkanavien määrät eroavat toisistaan (La Gerche & Claessen 2015; Poels ym. 2015).

2. Aineisto ja menetelmät

Tässä työssä mitattiin Western blot -menetelmällä L-tyypin kalsiumkanavien (*calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C*, CACNA1C), ryanodiinireseptori 2:n (RyR2), sarko-endoplasmakalvoston Ca²⁺-ATPaasi 2:n (Serca2) ja natrium-kalsiumvaihtajan (NCX) suhteellisia määriä Göttingenin minisikojen (*Sus scrofa domestica*) oikeasta ja vasemmasta kammioista. Tarkoituksena oli selvittää, miten diabetes ja liikuntaharjoittelu yhdessä ja erikseen vaikuttavat kalsiumkanavien suhteellisiin määriin.

Näytteet olivat peräisin Rotterdamin Erasmus Medical Centeristä, missä koe-eläintoiimikunnan hyväksymät eläinkokeet minisioilla suoritettiin. Eläinkokeet tehtiin noudattaen ohjeita, jotka perustuvat Yhdysvaltain terveystieteiden oppaaseen *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (8. painos, National Research Council Washington, DC: The National Academies Press, 2011). Jäädetyt oikean ja vasemman kammion sydänlihaskudosnäytteet kuljetettiin Turun Yliopistoon, jossa proteiinimääritykset suoritettiin.

2.1. Koe-eläimet ja ruokavaliot

Tutkimuksessa käytettiin 36:tä aikuista Göttingenin urosminisikaa (Ellegaard, Tanska). Osalle ($n=20$) eläimistä aiheutettiin diabetes injektoimalla streptotsosiinia (Pharmacia and Upjohn, Kalamazoo, Michigan, Yhdysvallat) suonensisäisesti korvakatetrin kautta kolmen päivän ajan (25 mg/kg/päivä, kokonaisannos 75 mg/kg). Tavoitteena oli tuhota 70-80 % insuliinia erittävistä haima β -soluista. Eläinten veren glukoosipitoisuuksia seurattiin päivittäin, ja tarvittaessa niille annettiin insuliinia. Insuliinihoidoista huolimatta kaksi koe-eläintä menehtyi 2-3 viikon kuluessa diabeteksen aiheuttamisesta. Viikko sen jälkeen, kun osalle eläimistä oli aiheutettu diabetes, diabetesta sairastavien eläinten ruokavalio muutettiin vähitellen runsasrasvaiseksi ruokavalioksi diabeettisen vaikutuksen vahvistamiseksi. Runsa-rasvainen ruokavalio sisälsi 25 % tyydyttyneitä rasvoja ja 1 % kolesterolia. Kontrollieläimet jatkoivat tavallisella kasvaville sioille tarkoitetulla ravinnolla (taulukko 1).

Taulukko 1. Kontrollisikojen ruokavalio ja diabeetikosikojen runsasrasvainen ruokavalio (g/kg).

Raaka-aine	Kontrolliruokavalio	Diabetesruokavalio
<i>Soijapavut, jauheena</i>	-	164,5
<i>Perunaproteiini</i>	50,0	50,0
<i>Eläinrasva</i>	-	250,0
<i>Ohra</i>	396,2	-
<i>Vehnä</i>	500,0	-
<i>Vehnägluteeniateria</i>	8,7	106,0
<i>Sukroosi</i>	-	200,0
<i>Fruktoosi</i>	-	200,0
<i>Soijaöljy</i>	17,3	-
<i>Kalkkikivi</i>	13,0	9,6
<i>Monokalsiumfosfaatti</i>	6,9	10,8
<i>Natriumkloridi</i>	4,0	4,7
<i>Mineraali/vitamiinisekoitus</i>	2,0	2,0
<i>L-lysiinivetykloridi</i>	1,9	2,4
<i>Kolesteroli (lisä)</i>	-	10,0
<i>Kokonaismäärä, g/kg</i>	1000,0	1010,0
<i>Bruttoenergia, MJ/kg</i>	17,3	23,5

Minisiat elivät Rotterdamin Erasmus Medical Centerissä koe-eläinkeskuksessa 9 sian ryhmissä. Ruokaa oli tarjolla *ad libitum* kahdesti päivässä, tunnin kerrallaan koko viisi kuukautta kestävä tutkimusjakson ajan. Laskimoverinäytteet otettiin paastonneilta eläimiltä kolmena eri ajankohtana: lähtötilanteessa sekä 3 kuukautta ja 5 kuukautta diabeteksen aiheuttamisen jälkeen. Verinäytteistä analysoitiin plasman glukoosi-, triglyseridi- ja kokonaiskolesteroliarvot standardoidulla protokollalla Erasmus Medical Centerin kliinisessä kemian laboratoriossa.

2.2. Kuntotesti ja liikuntaharjoittelu

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää, miten liikuntaharjoittelu vaikuttaa terveiden ja diabetesta sairastavien eläinten kalsiumkanavamääriin. Ennen liikuntaharjoitteluohjelman alkua eläimille tehtiin asteittain kiihtyvä kestävyyskuntotesti juoksumatolla. Testi alkoi juoksunopeudella 1,5 km/h, ja viiden minuutin välein nopeutta lisättiin 0,5 km/h uupumukseen asti. Juoksuaika kuvasti eläimen maksimaalista aerobista kestävyyskapasi-

teettii ja sitä käytettiin harjoitteluohjelman intensiteettien määrittämiseen (jokaisella eläimellä oli yksilöllinen harjoitusohjelma). Liikuntaharjoitteluohjelma aloitettiin puolelle runsasrasvaista ravintoa syöneistä ja puolelle normaalia ravintoa syöneistä eläimistä kolme kuukautta ruokavalion aloittamisen jälkeen. Eläimet valittiin satunnaisesti juoksumatolla tehtävään liikuntaharjoitteluohjelmaan.

Minisiat jaettiin tutkimuksessa neljään ryhmään:

- 1) ei diabetesta, ei liikuntaharjoittelua ($n=8$).
- 2) ei diabetesta, liikuntaharjoittelu ($n=8$).
- 3) diabetes, ei liikuntaharjoittelua ($n=9$).
- 4) diabetes, liikuntaharjoittelu ($n=9$).

Liikuntaharjoitteluohjelman jokainen harjoituskerta aloitettiin helpolla tasolla, ja harjoituksen intensiteettiä kasvatettiin asteittain kunkin eläimen kehityksen ja kapasiteetin mukaan.

Liikuntaharjoittelu koostui kahdeksan viikon jaksosta. Joka viikko eläimillä oli kolme eri harjoituskertaa:

1. Pitkäkestoinen (90 minuuttia) matalan intensiteetin (55-65 % maksimaalisesta nopeudesta) harjoitus,
2. keskipitkä (60 minuuttia) harjoitus, jossa nopeus vaihteli kohtalaisesta suureen (65-85%),
3. ja intervalliharjoitus, joka koostui viidestä 5 minuutin suuren nopeuden juoksupätkästä (85%-100%), joiden välissä oli 3 minuutin palautusjaksot.

Vuorokausi viimeisen harjoituskerran jälkeen eläimille tehtiin rintakehän avausleikkaus (*thoracotomy*). Eläinten rauhoitukseen ja tutkimiseen käytetyt aineet olivat Zoletil (tiletamiini ja tsolatsepaami, 5 mg/kg), Rompun (ksylatsiini, 2,25 mg/kg) ja atropiini (2 ml, lihaksen sisäinen). Eläimet nukutettiin pentobarbitaalinaatriumilla (20 mg/kg/h, suonensisäisesti), ja hengitystä ylläpidettiin keinoitekoisesti 6-9 tunnin ajan, minkä aikana tehtiin mittauksia ja kerättiin näytteet toiminnallisia mittauksia varten. Tämän jälkeen eläimet lopetettiin, ja niiden sydämet pysäytettiin ja operoitiin irti välittömästi. Sydämet pestiin suolaliuoksessa ylimääräisen veren poistamiseksi ja preparoitiin paloiksi: vasemman kammion myokardium jaettiin keskeltä kahtia endo- ja epikardiumiksi, kun taas oikean kammion myokardiumia ei jaettu, vaan pala myokardiumista jäädytettiin kokonaisuena. Osa paloista jäädytettiin nopeasti nestetyypeen ja varastoitettiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen myöhempiä analyyseja varten.

2.3. Proteiinimäärien määrittäminen Western blot –menetelmällä

Tässä tutkimuksessa määritettiin Cacna1c-, RyR2-, Serca2- ja NCX-proteiinien määrät koe-eläinten sydämen oikeassa kammiossa ja vasemman kammion endo- ja epikardiumissa. Kuten sanottu, tutkimuksen tarkoituksena oli vertailla proteiinimääriä terveiden ja diabetesta sairastavien minisikojen välillä sekä liikuntaa harrastaneiden minisikojen ja kontrollisikojen välillä. Proteiinimäärien mittaamiseen käytettiin Western blot -menetelmää, jolla voidaan tunnistaa tutkittava proteiini spesifisellä vasta-aineella. Tässä menetelmässä proteiinit erotellaan ensin niiden molekyylipainon mukaan geielektroforeesilla, jonka jälkeen ne siirretään nitroselluloosamembraanille.

Jotta vasta-aine ei sitoutuisi epäspesifisesti membraaniin, membraani blokataan yleensä rasvattomalla maitojauheella tai naudan seerumin albumiinilla (*bovine serum albumin*, BSA), jotka on liuotettu Tris-puskuriin (*tris buffered saline*, TBS). Tämän jälkeen membraania inkuboidaan primaarisella vasta-aineella, joka on tutkittavalle proteiinille spesifinen. Sekundaarinen vasta-aine on leimattu esimerkiksi entsyymillä, fluoroforilla tai biotiinilla. Sitoutuessaan primaariseen vasta-aineeseen sekundaarinen vasta-aine saa aikaan reaktion, joka tuottaa havaittavan lopputuotteen, yleensä valoa. Valon intensiteetti kertoo antigenein eli proteiinin määrästä membraanilla. Tässä tutkimuksessa ennen varsinaisia Western blot -analyyskejä näytteet valmistettiin ja optimoitiin määrittämällä sydännäytteiden kokonaisproteiinimäärät *bicinchoninic acid* (BCA) -analyysillä.

2.3.1 Näytteiden valmistelu

Pakkasessa olleista sydännäytteistä otettiin palaset nestetyössä. Palaset punnittiin ja homogenisoitiin kylmässä 62.5 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA) homogenisointiliuoksessa, jonka pH oli 6.8. Homogenisointiliuos sisälsi proteiini-inhibiittoreina leupeptiiniä (1 ug/ml), pepstatiinia (1 ug/ml) ja fenyylimetaanisulfonyylifluoridia (PMFS, 1 mM) (Sigma-Aldrich). Homogenisaatio suoritettiin TissueLyser -laitteella (Qiagen, Hilden, Germany) kahdesta kolmeen kertaan, minuutti kerrallaan ja frekvenssillä 30 ravistusta/s. Homogenisoimatta jääneen kudoksen poistamiseksi näytteet sentrifugoitiin Eppendorf Centrifuge-laitteella (5417R, Mississauga, Ontario, Canada) +4 °C asteessa 5 minuutin ajan nopeudella 5100 g. Supernatanttia ja Laemmli-liuosta (liite 2) lisättiin samansuuruiset määrät Eppendorf-putkiin, jonka jälkeen putkia lämmitettiin +70 °C asteisessa lämpöblokkissa 7 minuuttia. Osa supernatantista otettiin talteen eri Eppendorf-putkiin kokonaisproteiinikonsentraation mittausta varten.

2.3.2 Kokonaisproteiinikonsentraation määrittäminen BCA-analyysillä

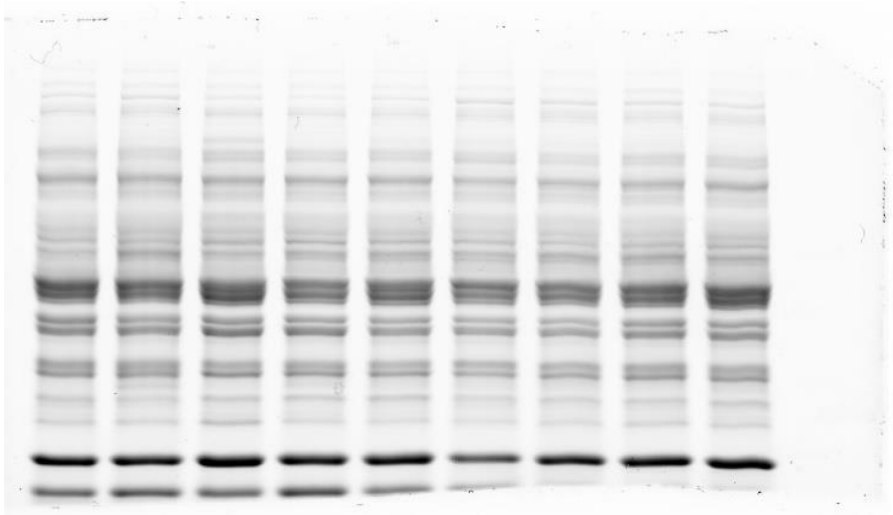
Optimaalisen proteiinikonsentraation määrittäminen tehtiin ennen Western blot -ajoja. Näytteiden kokonaisproteiinikonsentraation määrittäminen tehtiin *BCA protein assay* -kitillä (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti (liite 1). BCA-proteiinimääritys perustuu siihen, että emäksisessä ympäristössä kupari-ionit ensin sitoutuvat näytteen proteiineihin, ja tämän jälkeen bikinkoniinihappo reagoi näiden pelkistyneiden kupari-ionien kanssa. Reaktiotuotteessa on violetti väri ja sen absorbanssi voidaan mitata ja siten määrittää näytteen proteiinimäärä standardisuoraa käyttäen.

Näytteiden kokonaisproteiinikonsentraation määrittämisen jälkeen näytteet laimennettiin Laemmli-liuokseen niin, että Serca2-, Cacna1c- sekä NCX -vasta-aineita varten proteiinikonsentraatio oli 20 µg/15 µl ja RyR2-vasta-ainetta varten 30 µg/15 µl. Näytteitä säilytettiin -80 °C asteessa Western blot -analyysien suorittamiseen asti.

2.3.3 Western blot

Western blot -analyysi tehtiin yhdelle proteiinille yhdestä sydämen osasta kerrallaan. Koepäivinä näytteet sulatettiin jäällä ja pipetoitiin (15 µl) satunnaisessa järjestyksessä SDS-PAGE geeleille, jotka tehtiin valmistajan ohjeen mukaisesti (TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%; BioRad, Hercules, California, USA) (liite 2). Lisäksi jokaiselle geelille pipetoitiin All Blue 10-250 kDa-molekyyli-markkeri (BioRad) sekä kontrollinäyte, joka valmistettiin sekoittamalla keskenään satunnaisia vasemman kammion epikardium- ja endokardiumnäytteitä. Serca2-, NCX ja Cacna1c-näytteitä varten proteiineja ajettiin elektroforeesilla 35 minuuttia 200 V:n jännitteellä ja RyR2-näytteitä varten 90 minuuttia 200 V:n jännitteellä. Elektroforeesissa proteiinit eroteltiin niiden koon mukaan niin, että pienemmät proteiinit kulkivat positiivista napaa kohti nopeammin kuin suuremmat.

Ajon jälkeen geelit kuvattiin ChemiDoc™ MP Imaging System -laitteella (BioRad) kunkin näytteen kokonaisproteiinimäärän määrittämistä varten (kuva 8).



Kuva 8. Stainfree-kuva vasemman kammion endokardiumista otetuista näytteistä geelillä ajon jälkeen.

Kuvaamisen jälkeen jatkokäsittelyihin leikattiin osa geelistä, jossa tutkittava proteiini sijaitti. Proteiinit siirrettiin Whatman Protran Nitrocellulose –membraanille, jonka huokoskoko oli 0,45 µm (PerkinElmer, Boston, Massachusetts, USA). Siirtoajo kesti 60 minuuttia, ja siinä käytettiin 100 V:n jännitettä. Tämän jälkeen membraanit pestiin Tris-puskuriliuoksessa (*tris buffered saline*, TBS) 15 minuutin ajan ja inkuboitiin epäspesifisten paikkojen blokkauksiliuoksessa (TBS + 5% maitojauhe, Sigma-Aldrich) sekoittajassa tunnin ajan. Blokkauksen jälkeen TBS-liuos poistettiin huolellisesti ja membraania inkuboitiin yön yli +4 °C asteessa TBS + 0,1 % Tween-20 (TBST) + 5% maitojauhe -liuoksessa, johon oli sekoitettu primaarista vasta-ainetta kullekin proteiinille aikaisemmin optimaaliseksi havaittu määrä (taulukko 2).

Taulukko 2. Primaariset vasta-aineet.

Primaarinen vasta-aine	Laimennossuhde	Tuote	Valmistaja	Valmistuskaupunki- ja maa
Anti-SERCA2 ATPase	1:2000	ab91032	Abcam	Cambridge, England
Anti-CACNA1C	1:1000	ab58552	Abcam	Cambridge, England
Anti-NCX1	1:1000	ab2869	Abcam	Cambridge, England
Monoclonal Anti-Ryanodine Receptor	1:1000	R128	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Seuraavana päivänä vasta-aineliuos poistettiin ja membraanit pestiin TBST-liuoksella viisi kertaa 5 minuutin ajan. Pesuliuos poistettiin huolellisesti ennen sekundaarisen vasta-aineen lisäämistä laimenemisen estämiseksi. Membraaneja inkuboitiin valolta

suojattuna tunnin ajan TBST + 5 % maitojauhe -liuoksessa, johon oli lisätty kullekin proteiineille optimaalinen määrä sopivaa sekundaarista vasta-ainetta (taulukko 3).

Taulukko 3. Sekundaariset vasta-aineet.

Proteiinit	Sekundaarinen vasta-aine	Laimennossuhde	Valmistaja	Valmistuskaupunki- ja maa
Serca2 ja Cacna1c	StarBright™ Blue 700 Goat Anti-Rabbit IgG	1:5000	BioRad	Hercules, California, USA
NCX ja RyR2	IRDye® 800CW anti-mouse IgG (H + L), 0.1 mg	1:5000	Li-cor	Bad Homburg, Germany

IRDye® 800CW -vasta-aineen optimaalinen laimennossuhde olisi ollut 1:10000, mutta oikean kammion NCX-proteiinianalyysissä sekundaarista vasta-ainetta laimennettaessa TBST-liuokseen lisättiin vahingossa vanhempaa, huonosti toimivaa vasta-ainetta, minkä takia liuokseen lisättiin vielä vastaava määrä uudempaa sekundaarista vasta-ainetta. Tämän vuoksi myös muihin analyyseihin, jossa käytettiin IRDye® 800CW -vasta-ainetta, laitettiin kaksinkertainen määrä vasta-ainetta, eli vasta-aineliuoksen todellinen laimennossuhde oli 1:5000.

Sekundaarisen vasta-aineen inkubaation jälkeen membraanit pestiin jälleen TBST:llä viisi kertaa 5 minuutin ajan ja kuvattiin Bio Radin ChemiDoc™ MP Imaging System -laitteella. Kunkin proteiinin kuvaamiseen käytetyt valotusajat ovat esitettynä taulukossa 4. Kuvista analysointiin kunkin näytteen kokonaisproteiinimäärät ja proteiinispesifiset määrät ImageLab 6.0 ohjelmalla (Bio-Rad). Stainfree-kuvista määritettiin kaikkien bandien intensiteettiarvot, jotka ilmaisivat näytteen kokonaisproteiinimäärää. Mahdollisista geelien ja ajojen välisistä eroista aiheutuneet erot proteiinitasoissa poistettiin kertomalla kunkin näytteen antama intensiteettiarvo korjauskertoimella. Korjauskerroin saatiin jakamalla kunkin näytteen intensiteettiarvo membraanin kontrollin antaman intensiteetin arvolla. Korjaus tehtiin sekä kokonaisproteiiniarvoille että tutkittavien proteiinien antamille arvoille. Lopuksi tutkittavien proteiinien intensiteettiarvot jaettiin vastaavilla Stainfree-kuvista analysoiduilla näytteen kokonaisproteiinimäärää ilmaisevalla arvoilla.

$$x = \frac{\text{Tutkittavan näytteen proteiinin int. / kontrollin int.}}{\text{näytteen kokonaisproteiinimäärän int. / kokonaisproteiinimäärän int.}}$$

Taulukko 4. Membraanien kuvaamisessa käytetyt valotusajat sekunteina.

Proteiini	Valotusaika (s)	Poikkeukset
Serca2	2,1	
NCX	45	30 (vasemman kammion endokardiumissa, uusi erä vasta-ainetta)
Cacna1c	20	60 (vasemman kammion endokardiumissa, uusi erä vasta-ainetta)
RyR2	30	

2.4. Tilastanalyysit

Aineistossa tulokset ovat esitetty keskiarvoina (\pm SEM). Liikuntaharjoittelun ja diabeteksen vaikutuksia kalsiumkanavien suhteellisiin määriin analysoitiin kaksisuuntaisella ANOVA –testillä jokaisesta kammiotyypistä erikseen. Kammiot päätettiin tutkia kaksisuuntaisella ANOVA-testillä sen takia erikseen, koska kolmesuuntaisessa ANOVA-testissä (jossa liikunnan ja diabeteksen lisäksi myös kammio olisi ollut yhtenä muuttujana) post-hoc testillä ei voi testata liikunnan ja diabeteksen yhteisvaikutuksia, mikä oli tämän tutkimuksen tarkoitus. Kammioiden välisissä vertailuissa käytettiin yksisuuntaista ANOVA -testiä. Ennen ANOVA -testiä ryhmien homogeenisuus ja normaalijakautuneisuus testattiin Brown-Forsythe- ja Shapiro-Wilk -testeillä. Aineistot, jotka eivät olleet normaalisti jakautuneet tai joiden varianssissa oli liikaa vaihtelua, muunnettiin logaritmiseksi asteikoksi analyysia varten.

Tilastanalyysi tehtiin SigmaPlot-ohjelmalla (versio 13.0, Systat Software, San Jose, California, USA). Tilastolliset erot olivat merkittäviä, kun $p \leq 0,05$ ja kun $p \leq 0,1$, kyseessä oli tilastollinen trendi. Vasemman kammion endokardiumin Cacna1c-, vasemman kammion epikardiumin Serca2- ja oikean kammion RyR2-aineistot eivät läpäisseet Shapiro-Wilk-normaaliustestiä, eivätkä siten olleet normaalisti jakautuneita. Vasemman kammion endokardiumin NCX-aineisto puolestaan ei läpäissyt Brown-Forsythen –varianssitestiä. Kammioiden välisien erojen aineiston testauksessa ainoastaan NCX-aineisto läpäisi Shapiro-Wilk-testin, muille suoritettiin Kruskal-Wallis H-testi. Kaikille aineistoille, jossa oli merkitseviä eroja, tehtiin post-hoc testi. Tämä kertoo, minkä ryhmien välillä merkitsevä ero on. Kammioiden välisessä vertailussa tehtiin Dunnin post-hoc testi ja proteiinikohtaisissa analyyseissä Holm-Sidak-testi.

3. Tulokset

3.1. Ruumiinpainot ja sydämen painot sekä glukoosi-, triglyseridi- ja kolesterolitasot

Runsasarasvainen ravinto aiheutti merkitseviä eroja glukoosi-, triglyseridi- ja kolesterolitasoissa kontrolli- ja diabeteseläinten välillä (triglyseridi $F=8,2$, $p=0,007$; glukoosi $F=21,8$, $p<0,001$; kolesteroli $F=107,3$, $p<0,001$) (taulukko 5). Arvot olivat huomattavasti korkeampia diabeteseläimillä kuin kontrollieläimillä. Liikunta ei aiheuttanut eroja glukoosi-, triglyseridi- ja kolesterolitasoissa ryhmien välillä (taulukko 5). Eläinten painoissa eikä niiden sydänten tai kammioiden painoissa ollut merkitseviä eroja ryhmien välillä (taulukko 6).

Taulukko 5. Plasman triglyseridi-, kolesteroli- ja glukoosiarvot loppumittauksessa viimeisen liikuntasuorituksen jälkeen. Merkitsevät tulokset ($p\leq 0,05$) lihavoituna. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM.

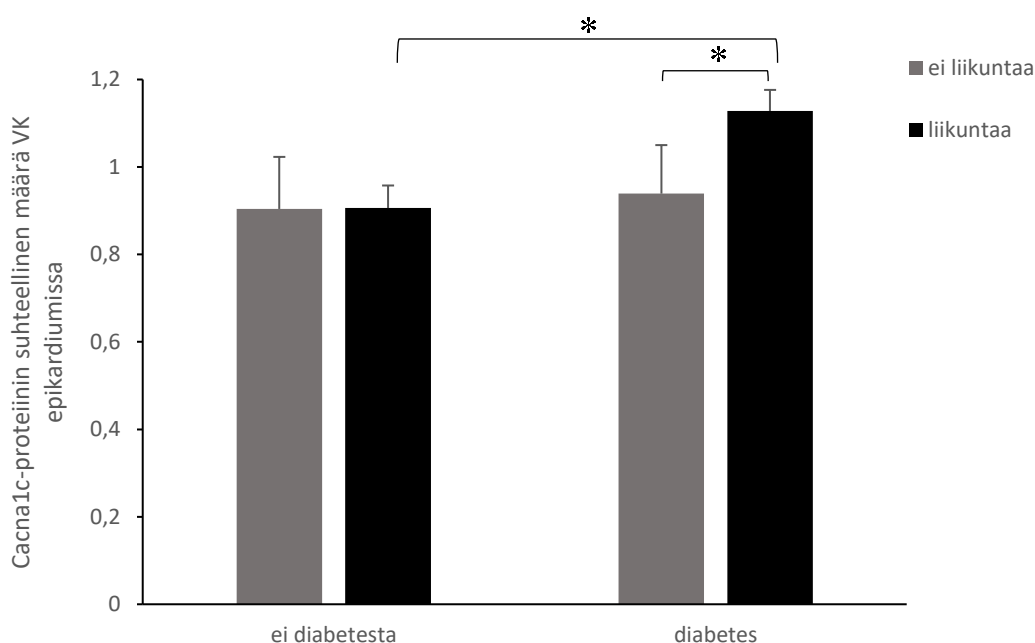
	Ei diabetesta		Diabetes		p-arvo		
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Liikunta	Diabetes	Yhteisvaikutus
Triglyseridi (mmol/l)	0,27 $\pm 0,02$	0,25 $\pm 0,01$	0,67 $\pm 0,19$	0,87 $\pm 0,28$	0,610	0,0070	0,522
Kolesteroli (mmol/l)	1,10 $\pm 0,04$	1,20 $\pm 0,08$	5,89 $\pm 1,03$	4,74 $\pm 0,71$	0,715	0,0001	0,373
Glukoosi (mmol/l)	6,85 $\pm 0,74$	6,31 $\pm 1,1$	13,89 $\pm 2,0$	14,07 $\pm 2,0$	0,739	0,0001	0,599

Taulukko 6. Eläinten painot tutkimuksen alussa ja lopussa (kg) sekä sydänten ja kammioiden painot (g) ja kammioiden painon osuus koko sydämen painosta (%) eri tutkimusryhmissä. Sydänten ja kammioiden painot ovat tutkimusjakson lopussa mitattuja painoja. Arvot ovat keskiarvoina \pm SEM.

	Ei diabetesta		Diabetes	
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa
Eläimen paino lopussa (kg)	36,8 \pm 1,1	35,1 \pm 1,6	38,7 \pm 3,0	34,7 \pm 2,4
Eläimen paino lopussa (kg)	37,1 \pm 1,3	35,2 \pm 1,7	39,8 \pm 3,1	34,2 \pm 2,4
Sydämen paino (g)	167,3 \pm 4,8	158,9 \pm 8,5	165,8 \pm 5,5	160,5 \pm 8,1
Oikean kammio (g)	35,5 \pm 1,2	31,1 \pm 2,4	35,9 \pm 1,8	35,4 \pm 3,5
Oikean kammio (%)	21,2 \pm 0,4	19,5 \pm 0,8	21,6 \pm 0,7	21,7 \pm 1,1
Vasen kammio (g)	115,2 \pm 2,4	108,4 \pm 7,3	114,8 \pm 4,5	110,4 \pm 4,9
Vasen kammio (%)	68,9 \pm 0,7	67,9 \pm 1,3	69,2 \pm 1,0	68,9 \pm 0,7

3.2. Cacna1c

Diabeteksella oli huomattava vaikutus Cacna1c-proteiinimääriin. Vasemman kammion epikardiumissa Cacna1c-proteiinin määrä oli merkitsevästi suurempi diabetesta sairastavilla eläimillä kuin terveillä eläimillä ($F=6,8$, $p=0,014$) (kuva 9). Tämä ero näkyi liikuntaa harrastaneilla eläimillä, joista diabetesta sairastavilla eläimillä oli 20 % enemmän Cacna1-proteiinia kuin terveillä liikuntaa harrastavilla eläimillä ($t=3,1$, $p=0,004$). Liikunnalla ja diabeteksella näytti siis olevan yhteisvaikutus tuloksiin, tosin tämä oli tilastollisesti ainoastaan vahva trendi ($F=3,6$, $p=0,069$) (kuva 9). Lisäksi liikunnalla näytti olevan lisäävä vaikutus Cacna1c-proteiinimääriin, tosin tämäkään tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä, vaan ainoastaan vahva trendi ($F=3,8$, $p=0,062$). Etenkin liikuntaa harrastaneilla diabeteseläimillä Cacna1c-proteiinin määrä oli 17 % suurempi kuin niillä diabeteseläimillä, jotka eivät olleet harrastaneet liikuntaa ($t=2,8$, $p=0,01$).



Kuva 9. Cacna1c-proteiinin suhteellinen määrä vasemman kammion (VK) epikardiumissa terveillä ja diabetesta sairastavilla eläimillä sekä liikuntaa harrastaneilla ja harrastamattomilla eläimillä. Proteiinimäärä on ilmoitettu tutkittavan proteiinin määränä (intensiteetti) suhteessa näytteen kokonaisproteiinimäärään (intensiteetti), ja mahdollisista systemaattisista virheistä aiheutuneet erot on poistettu jakamalla luvut membraanikontrollin arvoilla. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM (ei diabetesta, ei liikuntaa, $n=8$; ei diabetesta, liikuntaa, $n=8$; diabetes, ei liikuntaa, $n=9$; diabetes, liikuntaa, $n=9$). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää tulosta ryhmien välillä.

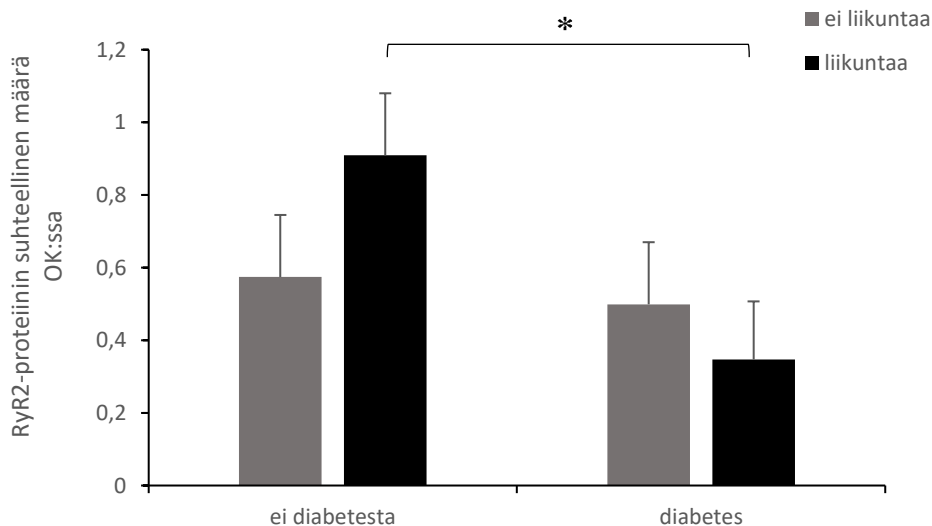
Diabeteksella ja liikunnalla ei ollut vaikutusta Cacna1c-proteiinin määriin oikeassa kammiossa eikä vasemman kammion endokardiumissa (taulukko 7).

Taulukko 7. Liikuntaharjoittelun ja diabeteksen vaikutus sekä niiden yhteisvaikutus Cacna1c-, proteiinien suhteellisiin määriin kammioiden eri osissa. RV = oikea kammio, EPI = vasemman kammion epikardium, ENDO = vasemman kammion endokardium. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM. Merkitsevät tulokset ($p \leq 0,05$) **lihavoituna** ja trendit *kursivoituna* ($P \leq 0,1$)

	Ei diabetesta		Diabetes		Liikunta		Diabetes		Yhteisvaikutus	
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa	P	F	P	F	P	F
RV	0,843 \pm 0,0761	0,896 \pm 0,0761	0,857 \pm 0,0712	0,982 \pm 0,0712	0,239	1,452	0,502	0,463	0,632	0,463
EPI	0,904 \pm 0,0482	0,906 \pm 0,0516	0,939 \pm 0,0482	1,128 \pm 0,0482	0,062	3,781	0,014	6,828	0,069	3,599
ENDO	1,026 \pm 0,119	1,19 \pm 0,119	1,153 \pm 0,111	1,021 \pm 0,111	0,891	0,019	0,858	0,0328	0,209	1,662

3.3. RyR2

Diabeteksella oli merkitsevä vaikutus RyR2-proteiinin määriin sydämen oikeassa kammiossa. Oikeassa kammiossa RyR2-proteiinin määrä oli pienempi diabetesta sairastavilla eläimillä kuin terveillä eläimillä ($F=4,3$, $p=0,05$) (kuva 10). Tämä näkyi erityisesti liikuntaa harrastaneiden eläinten välillä: sairailta eläimillä oli 62 % vähemmän RyR2-proteiinia kuin terveillä eläimillä ($t=2,2$, $p=0,037$). Diabeteksen ja liikunnan yhteisvaikutus oli heikko trendi ($F=2,0$, $p=0,161$). Liikuntaa harrastamattomien eläinten kesken merkitsevää eroa ei ollut sairaiden ja terveiden eläinten RyR2-proteiinimäärissä ($t=0,7$, $p=0,469$).



Kuva 10. RyR2-proteiinin suhteellinen määrä oikeassa kammiossa terveillä ja diabetesta sairastavilla eläimillä sekä liikuntaa harrastaneilla ja harrastamattomilla eläimillä. Proteiinimäärä on ilmoitettu tutkittavan proteiinin määränä (intensiteetti) suhteessa näytteen kokonaisproteiinimäärään (intensiteetti), ja mahdollisista systemaattisista virheistä aiheutuneet erot on poistettu jakamalla luvut membraanikontrollin arvoilla. Merkitsevä ero terveiden ja diabetesta sairastavien eläinten välillä. Liikuntaa harrastaneilla diabeteseläimillä oli vähemmän RyR2-proteiinia oikeassa kammiossa kuin liikuntaa harrastaneilla terveillä eläimillä. Diabeteksen ja liikunnan yhteisvaikutus oli heikko tilastollinen trendi. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM (ei diabetesta, ei liikuntaa, $n=8$; ei diabetesta, liikuntaa, $n=8$; diabetes, ei liikuntaa, $n=9$; diabetes, liikuntaa, $n=9$). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää tulosta ryhmien välillä.

Liikunnalla näytti olevan vaikutusta vasemman kammion epikardiumin proteiinimääriin. Tämä tulos ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä tulos, vaan trendi ($F=3,1$, $p=0,091$) (taulukko 8). Lisäksi liikunnalla ja diabeteksella oli yhteisvaikutus tuloksiin, joka tosin myöskin oli vain tilastollinen trendi ($F=3,5$, $p=0,072$). Liikuntaa harrastavilla terveillä eläimillä näytti olevan 49 % vähemmän RyR2-proteiinia kuin niillä terveillä, jotka eivät harrastaneet liikuntaa. Liikuntaa harrastaneiden eläinten kesken taas diabeteseläimillä RyR2-proteiinin määrä näytti olevan 47 % suurempi kuin terveillä eläimillä.

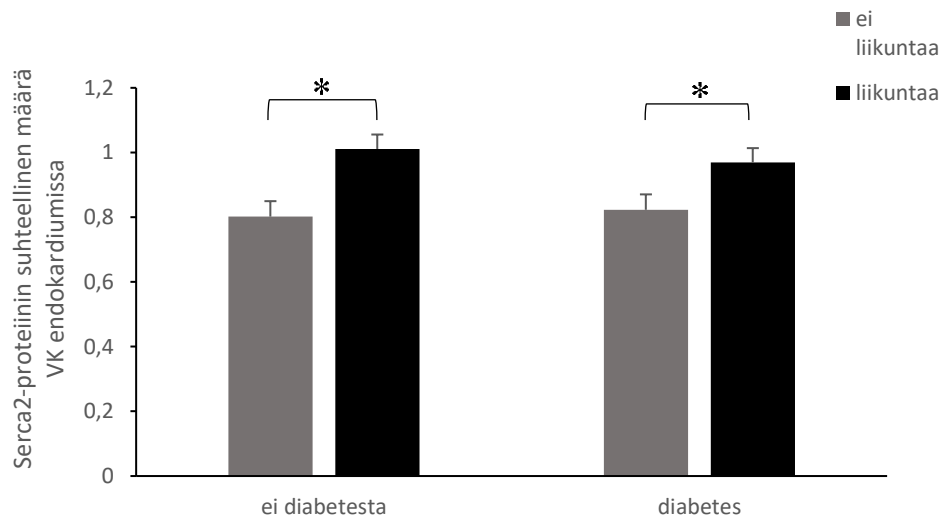
Liikunnalla näytti olevan vaikutus myös vasemman kammion endokardiumin RyR2-proteiinin määriin. Tämäkin oli kuitenkin vain heikko tilastollinen trendi ($F=2,8$, $p=0,108$) (taulukko 8). Diabetesta sairastavilla liikuntaa harrastaneilla eläimillä näytti olevan 34 % enemmän proteiinia kuin niillä diabetesta sairastavilla eläimillä, jotka eivät harrastaneet liikuntaa.

Taulukko 8. Liikuntaharjoittelun ja diabeteksen vaikutus sekä niiden yhteisvaikutus RyR2-, proteiinien suhteellisiin määriin kammioiden eri osissa. RV = oikea kammio, EPI = vasemman kammion epikardium, ENDO = vasemman kammion endokardium. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM. Merkitsevät tulokset ($p \leq 0,05$) **lihavoituna** ja trendit *kursivoituna* ($P \leq 0,1$)

	Ei diabetesta		Diabetes		Liikunta		Diabetes		Yhteisvaikutus	
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa	P	F	P	F	P	F
RV	0,574 $\pm 0,171$	0,896 $\pm 0,171$	0,499 $\pm 0,171$	0,347 $\pm 0,160$	0,594	0,292	<i>0,07</i>	3,757	0,161	2,092
EPI	0,755 $\pm 0,106$	0,384 $\pm 0,106$	0,706 $\pm 0,098$	0,719 $\pm 0,0987$	<i>0,091</i>	3,081	0,174	1,95	<i>0,072</i>	3,512
ENDO	0,623 $\pm 0,111$	0,696 $\pm 0,103$	0,516 $\pm 0,103$	0,782 $\pm 0,0907$	0,108	2,774	0,917	0,0111	0,354	0,89

3.4. Serca2

Liikunta vaikutti Serca2-proteiinimääriin. Vasemman kammion endokardiumin Serca2-proteiinimäärissä oli merkitsevä ero ($F=14,7$, $p<0,001$), jonka mukaan liikuntaa harrastaneilla eläimillä Serca2-proteiinin määrä oli keskimäärin 18 % suurempi kuin niillä eläimillä, jotka eivät harrastaneet liikuntaa ($t=3,8$, $p<0,001$) (kuva 11). Terveiden eläinten kesken liikunnalla oli suurempi vaikutus ($t=3,2$, $p=0,004$) kuin sairaiden eläinten kesken ($t=2,2$, $p=0,035$)



Kuva 11. Serca2-proteiinin suhteellinen määrä vasemman kammion endokardiumissa terveillä ja diabetesta sairastavilla eläimillä sekä liikuntaa harrastaneilla ja harrastamattomilla eläimillä. Proteiinimäärä on ilmoitettu tutkittavan proteiinin määränä (intensiteetti) suhteessa näytteen kokonaisproteiinimäärään (intensiteetti), ja mahdollisista systemaattisista virheistä aiheutuneet erot on poistettu jakamalla luvut membraanikontrollin arvoilla. Merkitsevä ero liikuntaa harrastaneiden ja ei liikkuneiden eläinten välillä. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM (ei diabetesta, ei liikuntaa, $n=8$; ei diabetesta, liikuntaa, $n=8$; diabetes, ei liikuntaa, $n=9$; diabetes, liikuntaa, $n=9$). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää tulosta ryhmien välillä

Diabeteksella ja liikunnalla ei ollut vaikutusta Serca2-proteiinin määriin oikeassa kammiossa eikä vasemman kammion epikardiumissa (taulukko 9).

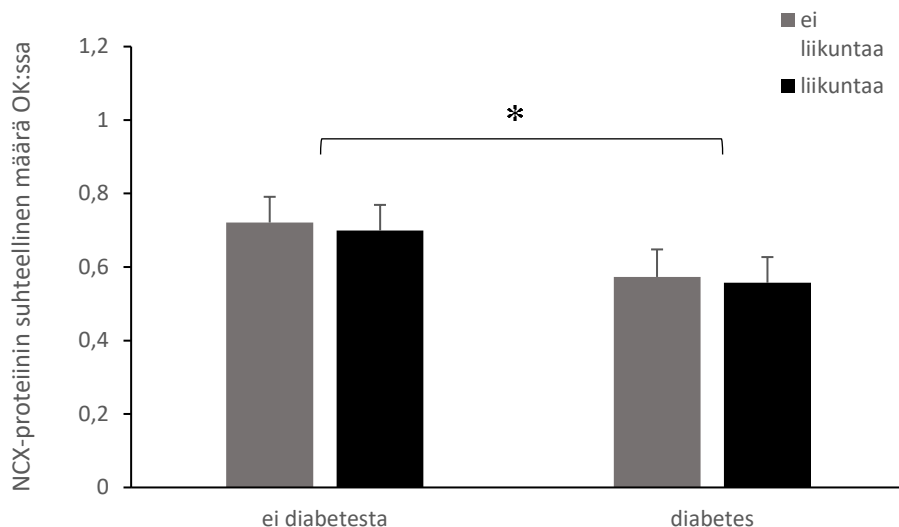
Taulukko 9. Liikuntaharjoittelun ja diabeteksen vaikutus sekä niiden yhteisvaikutus Serca2-, proteiinien suhteellisiin määriin kammioiden eri osissa. RV = oikea kammio, EPI = vasemman kammion epikardium, ENDO = vasemman kammion endokardium. Arvot ovat keskiarvoja \pm SEM. Merkitsevät tulokset ($p \leq 0,05$) **lihavoituna** ja trendit *kursivoituna* ($P \leq 0,1$)

	Ei diabetesta		Diabetes		Liikunta		Diabetes		Yhteisvaikutus	
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa	P	F	P	F	P	F
RV	0,931 $\pm 0,0554$	0,946 $\pm 0,0592$	0,929 $\pm 0,0554$	0,913 $\pm 0,0522$	0,992	0,0001	0,76	0,0951	0,78	0,0796
EPI	0,906 $\pm 0,0813$	1,061 $\pm 0,076$	0,999 $\pm 0,0813$	1,019 $\pm 0,076$	0,277	1,234	0,746	0,107	0,399	0,734
ENDO	0,802 $\pm 0,0477$	1,011 $\pm 0,0477$	0,823 $\pm 0,0477$	0,969 $\pm 0,0477$	<0,001	14,694	0,823	0,0511	0,5	0,468

3.5. NCX

Diabetes vaikutti oikean kammion NCX-proteiinin määriin. Diabetesta sairastavien ja terveiden eläinten NCX-proteiinin määrässä oli lähes merkitsevä ero ($F=4,1$, $p=0,051$). Sairailla eläimillä oli keskimäärin 20 % vähemmän NCX-proteiinia kuin terveillä eläimillä (kuva 12). Sekä liikunnalla ($F=2,5$, $p=0,125$) että diabeteksella ($F=2,3$, $p=0,144$) oli mahdollisesti alkavaa vaikutusta vasemman kammion epikardiumin NCX-proteiinin määriin,

mutta nämä olivat vain heikkoja tilastollisia trendejä (taulukko 10). Diabetesta sairastavilla eläimillä proteiinin määrä näytti olevan keskimäärin 16 % vähäisempi kuin terveillä eläimillä ja liikuntaa harrastavilla puolestaan keskimäärin 17 % vähäisempi kuin liikuntaa harrastamattomilla eläimillä.



Kuva 12. NCX-proteiinin suhteellinen määrä oikeassa kammiossa terveillä ja diabetesta sairastavilla eläimillä sekä liikuntaa harrastaneilla ja harrastamattomilla eläimillä. Proteiinin määrä on ilmoitettu tutkittavan proteiinin määränä (intensiteetti) suhteessa näytteen kokonaisproteiinimäärään (intensiteetti) sekä membraanin kontrollinäytteeseen, ja mahdollisista systemaattisista virheistä aiheutuneet erot on poistettu jakamalla luvut membraanikontrollin arvoilla. Lähes merkitsevä ero diabetesta sairastavien ja terveiden eläinten välillä. Arvot ovat keskiarvoja ± SEM (ei diabetesta, ei liikuntaa, $n=8$; ei diabetesta, liikuntaa, $n=8$; diabetes, ei liikuntaa, $n=9$; diabetes, liikuntaa, $n=9$). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää tulosta ryhmien välillä.

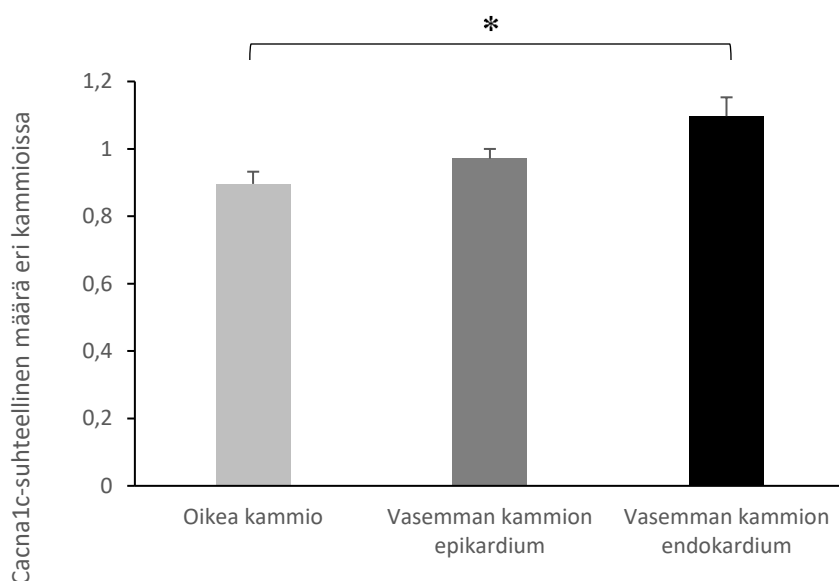
Diabeteksen ja liikunnalla ei ollut vaikutusta NCX-proteiinin määrään vasemman kammion endokardiumissa. Yleisesti ottaen diabetesta sairastavilla eläimillä NCX-proteiinin määrät olivat vähäisempiä kuin terveillä, mutta kaikki erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (taulukko 10).

Taulukko 10. Liikuntaharjoittelun ja diabeteksen vaikutus sekä niiden yhteisvaikutus Serca2-, proteiinien suhteellisiin määriin kammioden eri osissa. RV = oikea kammi, EPI = vasemman kammion epikardium, ENDO = vasemman kammion endokardium. Arvot ovat keskiarvoja ± SEM. Merkitsevät tulokset ($p \leq 0,05$) **lihavoituna** ja trendit *kursivoituna* ($P \leq 0,1$)

	Ei diabetesta		Diabetes		Liikunta		Diabetes		Yhteisvaikutus	
	Ei liikuntaa	Liikuntaa	Ei liikuntaa	Liikuntaa	P	F	P	F	P	F
RV	0,721 ± 0,0701	0,699 ± 0,0749	0,573 ± 0,0701	0,557 ± 0,0701	0,797	0,0673	0,051	4,152	0,965	0,00192
EPI	0,642 ± 0,0651	0,541 ± 0,0651	0,545 ± 0,0609	0,447 ± 0,0609	0,125	2,506	0,144	2,272	0,981	0,000562
ENDO	0,653 ± 0,0924	0,612 ± 0,0924	0,612 ± 0,0865	0,575 ± 0,0865	0,662	0,196	0,667	0,19	0,985	0,00036

3.6. Kammioiden väliset erot

Kammioiden välillä havaittiin merkitseviä eroja Cacna1c-proteiinin määrässä (H=9,9, p=0,005). Lähemmässä tarkastelussa Dunnin post-hoc testin mukaan vasemman kammion endokardiumissa oli 18 % enemmän proteiinia kuin oikeassa kammiossa (Q=3,1, p=0,005) (kuva 13). Lisäksi kammioiden välillä oli ero RyR2-proteiinin määrässä, mutta tämä oli vain heikko tilastollinen trendi (H=4,496, p=0,106). Vaikutti siltä, että oikeassa kammiossa oli 47 % vähemmän RyR2-proteiinia kuin vasemman kammion epikardiumissa, ja 50 % vähemmän kuin vasemman kammion endokardiumissa.



Kuva 13. Cacna1c-proteiinin suhteellinen määrä kamnioissa. Proteiininmäärä on ilmoitettu tutkitavan proteiinin määränä (intensiteetti) suhteessa näytteen kokonaisproteiinimäärään (intensiteetti) sekä membraanin kontrollinäytteeseen, ja mahdollisista systemaattisista virheistä aiheutuneet erot on poistettu jakamalla luvut membraanikontrollin arvoilla. Merkitsevä ero oikean kammion ja vasemman kammion endokardiumin välillä. Arvot ovat keskiarvoja ± SEM (n=36). * merkitsee tilastollisesti merkitsevää tulosta ryhmien välillä.

Muiden proteiinien määrässä ei ollut merkitseviä eroja oikean kammion, vasemman kammion epikardiumin ja vasemman kammion endokardiumin välillä (taulukko 11).

Taulukko 11. Cacna1c-, RyR2-, Serca2- ja NCX-proteiinien määrät eri oikeassa kammiossa (RV), vasemman kammion epikardiumissa (EPI) ja vasemman kammion endokardiumissa (ENDO). Ainoastaan NCX-proteiinin aineisto oli normaalisti jakautunut ja siten testattu One Way Anova -testillä. Muiden proteiinien kohdalla on käytetty ei-parametrinen Kruskal-Wallis testiä. Arvot ovat keskiarvoja ± SEM, jotka on saatu One Way Anova -testistä. Merkitsevät tulokset (p < 0,05) **lihavoituna** ja trendit *kursivoituna* (P < 0,1).

	RV	EPI	ENDO	P	F / H
Cacna1c	0,896 ± 0,0363	0,971 ± 0,0288	1,097 ± 0,056	0,005	3,138
RyR2	0,574 ± 0,0885	0,646 ± 0,0553	0,664 ± 0,0514	0,106	4,496
Serca2	0,929 ± 0,0264	0,997 ± 0,0385	0,907 ± 0,0275	0,433	1,673
NCX	0,636 ± 0,0363	0,541 ± 0,0324	0,612 ± 0,0426	0,180	1,751

4. Pohdinta

Tässä työssä tutkittiin kestävyysharjoittelun vaikutusta terveiden ja diabetesta sairastavien minisikojen sydämen vasemman ja oikean kammion kalsiumkanavien suhteellisiin määriin. Hypoteesina oli, että diabetes vähentäisi kalsiumkanavien määriä ja siten saattaisi heikentää sydämen supistumiskykyä, ja että liikunta lisäisi kalsiumkanavien määriä ja siten mahdollisesti parantaisi supistumiskykyä. Tutkittavien ryhmien välillä havaittiin useita eroja. Lisäksi vasteet diabetekseen, liikuntaan ja niiden yhteisvaikutuksiin vaihtelivat kammioden ja niiden osien välillä. Osa tuloksista oli hypoteesien mukaisia, esimerkiksi diabetes näytti vähentävän RyR2:n ja NCX:n määriä oikeassa kammiossa. Vasemman kammion kalsiumkanavien määriin diabeteksella ei kuitenkaan ollut merkittäviä negatiivisia vaikutuksia, ja yllättävästi Cacna1c:n määrä oli itse asiassa korkeampi diabetesta sairastavien vasemman kammion epikardiumissa kuin terveillä etenkin harjoittelun jälkeen. Liikunnalla oli myös osaksi hypoteesin mukaisia vaikutuksia. Liikunta nosti Serca2-määrää vasemman kammion endokardiumissa ja Cacna1c-proteiinin määrää vasemmassa epikardiumissa diabetesta sairastavilla eläimillä. Lisäksi liikunta näytti nostavan RyR2-proteiinin määrää vasemman kammion endokardiumissa, ja vasemmassa epikardiumissa liikunta näytti yllättävästi laskevan RyR2-proteiinin määrää terveillä eläimillä. Diabeteksella ja liikuntaharjoittelulla oli myös yllättäviä yhteisvaikutuksia, ja niitä sekä diabeteksen ja liikunnan erillisiä vaikutuksia käsitellään tarkemmin kanavakohtaisesti seuraavissa kappaleissa.

4.1. Muutokset Cacna1c-proteiinin määrissä

Sydämen systole- eli supistumisvaiheeseen osallistuvat L-tyyppin kalsiumkanavat (Cacna1c) ja RyR2-kanavat. Tutkimukseni päätulokset Cacna1c proteiinin suhteen olivat, että liikunta yleisesti näytti hypoteesin mukaisesti nostavan Cacna1c-proteiinin määrää vasemmassa epikardiumissa, mutta liikunnan positiiviset vaikutukset näyttivät olevan paljon suuremmat diabetesta sairastavilla eläimillä kuin terveillä. Yleisesti diabetesta sairastavilla eläimillä oli enemmän Cacna1c-proteiinia kuin terveillä. Moni aiempi tutkimus, joka on keskittynyt tutkimaan joko diabeteksen (Choi ym. 2002; Shao ym. 2007; Teshima ym. 2000) tai liikunnan (de Melo ym. 2016; Mokolke ym. 1997) vaikutusta rottien sydämen kalsiumkanaviin, ei ole havainnut muutoksia L-tyyppin kalsiumkanavien määrissä tai aktiivisuudessa.

Tässä tutkimuksessa liikunnalla havaittiin olevan L-tyyppin kalsiumkanavien määrää nostava vaikutus vasemman kammion epikardiumissa. Tämä voi tarkoittaa sitä, että kalsiumin sisäänvirtaus supistumisreaktiossa lisääntyy, ja tämä saattaa vaikuttaa positiivi-

sesti sydämen supistumiskapasitettiin. Se, miksi aiemmissa tutkimuksissa ei havaittu liikunnan vaikuttavan L-tyyppin kalsiumkanavien määrään tai aktiivisuuteen, on epäselvää. On mahdollista, että niissä RyR2-proteiinin määrä tai aktiivisuus onkin lisääntynyt, ja siten liikunnalla on voinut olla mahdollisia positiivisia vaikutuksia supistuvuuteen RyR2-kanavien määrään tai aktiivisuuden lisääntymisen kautta, vaikka L-tyyppin kanavien määrässä tai aktiivisuudessa ei ollutkaan muutoksia. RyR2-proteiinin määrän havaittiinkin lisääntyvän sairailta rotilla de Melon ja kumppaneiden (2016) tutkimuksessa, jossa tutkittiin keuhkovaltimoahtaumaa sairastavien rottien oikeaa kammiota. Mokolke ym. (1997) tutkivat vain L-tyyppin kalsiumkanavien aktiivisuuksia terveiden rottien sydämissä eivätkä havainneet niissä muutoksia, mutta on mahdollista, että myös heidän tutkimukseensa RyR2-kanavan aktiivisuus on lisääntynyt. Se, miksi tässä tutkimuksessa liikunnalla kuitenkin oli L-tyyppin kalsiumkanavien määrää lisäävä vaikutus, voi johtua siitä, että aiemmat tutkimukset on tehty jyrsijöillä. Laboratoriohiiret ja rotat ovat todennäköisesti keskenään geneettisesti samankaltaisempia kuin minisiat, minkä vuoksi sioilla yksilölliset erot voivat vaikuttaa tuloksiin.

Tutkimuksessani diabetes yksinään testattuna näytti nostavan L-tyyppin kalsiumkanavien määrää, mutta tämä johtui siitä, että proteiinin määrä nousi diabeteseläimillä liikunnan seurauksena. Tosin myös sydämen oikeaa kammiota tutkinut De Melo (2016) havaitsi, että L-tyyppin kalsiumkanavien määrä oli suurempi keuhkovaltimoahtaumaa sairastavilla rotilla kuin terveillä kontrollirovilla, mutta liikunnalla ei ollut vaikutusta kanavien määriin. Aiemmissä tutkimuksissa diabeteksen ei kuitenkaan ole havaittu vaikuttavan L-tyyppin kalsiumkanavien määriin, vaikka tosin kaikissa diabetes kuitenkin vähensi RyR2-proteiinin määrää (Choi ym. 2002; Shao ym. 2007; Teshima ym. 2000). Tämä tarkoittaa sitä, että vaikkei aiemmissä tutkimuksissa L-tyyppin kalsiumkanavan määrässä ollutkaan muutoksia, diabetes saattoi vaikuttaa heikentävästi sydämen supistumisvoimaan vähentämällä RyR2-kanavien kautta vapautuvan kalsiumin määrää. Lisäksi jotkut tutkimukset ovat kuitenkin havainneet L-typinkalsium kanavien määrän tai kalsiumvirran vähenevän diabeteksen yhteydessä (Chattou ym. 1999; Lu ym. 2007; Pereira ym. 2006). Myös diabeteksen yhteydessä kaikki aiempi tutkimus on tehty rotilla tai hiirillä. Koska sioilla on todennäköisesti keskenään enemmän geneettistä vaihtelua kuin jyrsijöillä, sioilla yksilölliset erot voivat vaikuttaa tuloksiin. Vaikka diabetes näytti nostaneen eläimillä mm. veren sokeripitoisuuksia merkitsevästi, niin yksi selittävä tekijä sille, miksi diabeteksella ei ollut merkitsevää vähentävää vaikutusta voi olla se, ettei sairaus ollut edennyt tarpeeksi vakavaksi.

Liikunnan ja diabeteksen yhteisvaikutuksena nähtiin, että vasemman kammion epikardiumissa liikunta lisäsi Cacna1c-proteiinin eli L-tyyppin kalsiumkanavien määrää merkittävästi diabetesta sairastavilla eläimillä, mutta ei terveillä eläimillä. Tämä viittaisi siihen, että liikunta voi mahdollisesti parantaa vasemman kammion epikardiumin supistumisvoimaa diabetesta sairastavilla eläimillä, sillä L-tyyppin kalsiumkanavien määrien lisääntyessä solun sisään tulevan kalsiumin määrä lisääntyy, ja tämä puolestaan tehostaa RyR2-kanavien avautumista ja kalsiumin vapautumista sarkoplasmisesta kalvostosta. Koska lihaksen supistumisvoima riippuu siitä, kuinka paljon myosiini- ja aktiinisäikeet liikkuvat lomittain, ja koska kalsiumin sitoutuminen troponiini-tropomyosiinikompleksiin saa aikaan myosiiniin ja aktiinin interaktion, kalsiumionien määrä sytoplasmassa vaikuttaa siten supistumisvoimakkuuteen. Tämän vuoksi myös L-tyyppin kalsiumkanavien (ja RyR2-kanavien) lisääntynyt määrä vaikuttaa positiivisesti supistumisvoimakkuuteen (Anttila 2009). Aiempaa tutkimusta diabeteksen ja liikunnan yhteisvaikutuksesta L-tyyppin kalsiumkanaviin ei juuri ole, mutta liikunnan on vastaavasti havaittu lisäävän L-tyyppin kalsiumkanavien määrää vasemmassa kammiossa hiirillä sydäninfarktin jälkeen (Guizoni ym. 2016). Se, miksi tässä tutkimuksessa liikunta nosti vain diabeteseläinten L-tyyppin kalsiumkanavien määrä, on epäselvää. On mahdollista, että rasituksen intensiteetti oli suurempaa sairailta eläimillä kuin terveillä eläimillä. Kuten jo mainittiin, lisääntynyt L-tyyppin kalsiumkanavien määrä saattaa parantaa sydämen supistumiskapasiteettia lisäämällä sisään tulevan kalsiumin määrää, ja siten lisäämällä sarkoplasmisesta kalvostosta vapautuvan kalsiumin määrää. Lisääntyneen kalsiumkonsentraation seurauksena useampi kalsiumioni voi sitoutua troponiini-tropomyosiinikompleksiin, jolloin myosiini ja aktiini pystyvät liikkumaan enemmän lomittain. Liikunta voi siis mahdollisesti parantaa diabetesta sairastavien eläinten sydänten supistumiskapasiteettia. On mahdollista, että koska diabeteksen yhteydessä sydämen toiminta on jäykistynyt (Falcão-Pires ym. 2011; Røe ym. 2017), sydän joutuu tekemään enemmän työtä ja sympaattisen hermoston, joka saa aikaan sinussolmukkeesta lähtevät aktiopotentiaalit, on toimittava tehokkaammin, mikä on johtanut L-tyyppin kalsiumkanavien määrän lisääntymiseen. Se, miksi eroja L-tyyppin kalsiumkanavien määrässä nähtiin vain vasemman kammion epikardiumissa, voi johtua siitä, että vasen kammio tuottaa supistuksessa suurimman voiman, joten siihen kohdistuu myös enemmän rasitusta. Tällöin L-tyyppin kalsiumkanavien lisääntyvät paremman supistuskapasiteetin ylläpitämiseksi.

4.2. Muutokset RyR2-proteiinin määrissä

Diabetes näytti hypoteesin mukaisesti vähentävän RyR2-proteiinia sydämen oikeassa kammiossa, ja tämä ero näkyi varsinkin liikuntaa harrastaneiden eläinten välillä. Vasemman kammion RyR2-proteiinimääriin diabeteksella ei tässä tutkimuksessa ollut vaikutusta, vaikka aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet RyR2-proteiinin määrän vähenevän diabeteksen yhteydessä vasemmassa kammiossa (Bai ym. 2012; Choi ym. 2002; Teshima ym. 2000; Wang ym. 2010). Diabeteksen on myös aiemmin osoitettu vähentävän oikean kammion supistuvuutta (Gorter ym. 2018; Widya ym. 2013). RyR2-kanavien määrän vähentymisellä saattaa olla kammion supistumiskykyä heikentävä vaikutus, sillä kun kalsiumia vapautuu vähemmän sytoplasmaan, troponiini-tropomyosiinikompleksiin sitoutuvan kalsiumin määrä vähenee. Tämä puolestaan vähentää myosiiniaktiiniyhteyksien määrää, jolloin supistumisvoima heikkenee eli diabetes voi heikentää oikean kammion supistumisvoimaa. Se, miksi diabeteksen vaikutukset näkyivät tässä tutkimuksessa ainoastaan oikeassa kammiossa, jää tässä kohtaa epäselväksi.

Diabeteksella ja liikunnalla oli myös mielenkiintoisia yhteisvaikutuksia RyR2-proteiinin määrään. Terveillä eläimillä liikunta näytti hypoteesin mukaisesti nostavan RyR2:n määrää oikeassa kammiossa, kun taas diabetesta sairastavilla liikkuvien ja lepäävien eläinten välillä ei ollut huomattavia eroja. Vasemman kammion epikardiumin osalta tulokset olivat kuitenkin erilaiset, sillä diabeteksella ei näyttänyt olevan vaikutusta RYR2:n määrään, ja liikunta itse asiassa näytti hypoteesin vastaisesti vähentävän RyR2:n määrää terveillä eläimillä. Liikuntaa harrastaneiden kesken diabeteseläimillä RyR2-proteiinin määrä oli huomattavasti suurempi kuin terveiden. Vasemman kammion endokardiumissa liikunta puolestaan näytti hypoteesin mukaisesti lisäävän RyR2-proteiinin määrää varsinkin diabetesta sairastavilla eläimillä. RyR2:n osalta nämä kaikki tulokset olivat kuitenkin vain suuntaa-antavia trendejä.

De Melo ym. (2016), jotka tutkivat keuhkovaltimoahtauksen ja liikunnan vaikutusta rottien sydämen oikeaan kammioon, havaitsivat RyR2-kanavien määrän vähenevän sairauden yhteydessä ja liikunnan lisäävän niiden määrää. Myös vasemmassa kammiossa liikunnan on osoitettu lisäävän RyR2-proteiinin määrää diabetesta sairastavilla rotilla (Le Douairon Lahaye ym. 2012). Tässä tutkimuksessa liikunta kokonaisuutena nosti, tosin vain trendinä, terveillä eläimillä RyR2-määräiä oikeassa kammiossa ja vasemman kammion endokardiumissa. Se, miksi vasemman kammion epikardiumissa liikunta näytti puolestaan yllättävästi laskevan terveillä eläimillä RyR2-proteiinin määrää, on epäselvää. Voi olla, että oikean kammion ja vasemman kammion endokardiumin osuus sydämen toi-

minnassa korostuu liikunnan yhteydessä ja vasemman kammion epikardiumin puolestaan vähenee. Tosin L-tyypin kalsiumkanavan tulokset olivat päinvastaiset, sillä liikunnan positiivisia muutoksia havaittiin etenkin epikardiumissa diabeteseläimillä. On mahdollista, että liikunta ja diabetes voivat vaikuttaa siihen, miten kalsiumvirrat soluissa supistuksessa jakaantuvat, ja L-tyypin ja RyR:n suhteelliset merkitykset supistukselle muuttuvat. Liikunnan proteiinimääriä vähentävä vaikutus voi myös mahdollisesti selittyä sillä, että liikunta on ollut liian kuormittavaa eläimille. Pitkällä aikavälillä raskas kestävyysharjoittelu voi olla haitallista sydämen toiminnalle, sillä sen on todettu aiheuttavan esimerkiksi kammiovärinää (O'Keefe ym. 2012). Tiedetyt mutaatiot RyR2-kanavissa aiheuttavat RyR2-kanavien vuotoa heikentämällä niitä stabiloivien proteiinien sitoutumista. Tällaisten mutaatioiden on havaittu kestävyysliikunnan yhteydessä altistavan rytmihäiriöille tai aiheuttavan jopa sydämenpysähdyksen (Lehnart ym. 2008; Wehrens ym. 2003). Tämä huomioon ottaen olisi mahdollista, että liian raskas kestävyysharjoittelu voisi myös vähentää RyR2-proteiinin määriä, kuten tässä tutkimuksessa havaittiin terveiden eläinten vasemman kammion epikardiumissa. Tämän tutkimuksen eläimet harrastivat liikuntaa kahdeksan viikon ajan kolme kertaa viikossa, joista yksi kerta oli korkean intensiteetin intervalliharjoitus. Tämä on kohtuullinen määrä eikä todennäköisesti vaikuta haitallisesti etenkin terveiden eläinten sydänten toimintaan. Lisäksi liikunta nosti Cacna1c-proteiinin määrää epikardiumissa, mikä myös antaa viitettä siitä, ettei liikunta ollut liian kuormittavaa eläimille. Tässä kohtaa jää siis epäselväksi, miksi liikunnan negatiivisia vaikutuksia havaittiin vain terveillä eläimillä eikä diabeteseläimillä. Toisaalta on mahdollista, että vaikka sairailta eläimillä liikunta ei vaikuttanut RyR2-proteiinimääriin vasemman kammion epikardiumissa, niiden stabiliteetti on voinut heikentyä tai aktiivisuus vähentyä. Liikunnalla kuitenkin vaikutti olevan RyR2-proteiinin määriä lisäävä vaikutus oikeassa kammiossa ja vasemman kammion endokardiumissa. On mahdollista, että liikunnan rasitukset jakaantuvat eri tavalla kammioden osien kesken. Jotta liikunnan rasittavuus saataisiin selville, jatkotutkimuksissa voitaisiin mitata veren kortisoliarvoja.

Jatkotutkimuksissa olisi myös hyvä mitata RYR2-kanavia stabiloivia säätelyproteiineja, sillä aiemmissa tutkimuksissa on mm. havaittu RyR2-kanaviin sitoutuneiden FKBP12-säätelyproteiinien määrien muuttuvan sydämen vajaatoiminnan yhteydessä, vaikka RyR2-proteiinin määrä ei muutu (Marx ym. 2000). Sympaattisen hermoston aktivaation seurauksena RYR2-proteiinit fosforyloituvat, jolloin FKBP12-proteiinit irtoavat RyR2-proteiineista ja proteiini muuttuu epävakammaksi. Jatkuvan sympaattisen aktivaation seurauksena RyR2-kanava voi alkaa vuotaa (Grimm ym. 2015), eli päästää kalsiumia ulos sarkoplasmisesta kalvostosta myös diastolen aikana. Tämä voi heikentää supistumisvoimaa, koska sytoplasman kalsiumkonsentraation tulisi palautua alkuperäiselle tasolle en-

nen uuden supistumisen alkua. Diabeteksen onkin havaittu lisäävän RyR2-vuotoa ja liikuntaharjoittelun puolestaan vähentävän sitä (Rolim ym. 2015; Stolen ym. 2009). Myös CaM-proteiinikinaasi (CaMKII) fosforyloi RyR2-kanavia ja vähentää niiden stabiilisuutta. Aktiivisen CaMKII:n on havaittu lisääntyvän diabeteksen yhteydessä (Ai ym. 2005). On mahdollista, että vaikka liikuntaa harrastamattomilla kontrollieläimillä diabetes ei vaikuttanut RyR2-proteiinimääriin, niiden säätelyproteiinien määrät olivat voineet muuttua ja stabiiliteetti vähentyä.

L-tyypin kalsiumkanavien ja RyR2-proteiinien määrien muutoksia on järkevää tarkastella myös yhdessä, sillä kanavat toimivat läheisessä vuorovaikutuksessa keskenään. Sydämen sarkoplasmisen kalvoston kalsiumin uskotaan olevan supistumiseen kannalta tärkeämpää kuin solun ulkopuolinen kalsium (Belke & Dillmann 2004), ja siten sekä RyR2- että Serca2-kanavien määrien tai toiminnan muutokset ovat mahdollisesti oleellisempia sydämen supistumisen kannalta kuin L-tyypin kalsiumkanavan. Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan diabetes eikä liikunta juuri vaikuttanut merkittävästi RyR2-kanavien määriin, mutta L-tyypin kalsiumkanavien määrissä oli merkitseviä muutoksia. Onkin mahdollista, että liikunta tai diabetes muuttaa kanavien merkityssuhteita niin, että L-tyypin kalsiumkanavan merkitys supistumisessa lisääntyy, sillä vasemman kammion epikardiumissa liikunta nosti L-tyypin kalsiumkanavien määrää diabeteseläimillä, mutta RyR2-kanavien määrä puolestaan näytti laskevan ainakin terveillä eläimillä.

4.3. Muutokset Serca2-proteiinin määrissä

Diastolevaiheessa eli sydämen relaksaatiovaiheessa troponiini C:stä irronnut kalsium poistuu sytoplasmasta joko siirtymällä takaisin sarkoplasmisen kalvoston sisälle Serca2-proteiinin avulla tai kokonaan ulos solusta NCX-proteiinin välityksellä. Kalsiumkonsentraation on palattava takaisin alkuperäiselle tasolle, jotta supistuminen voi tapahtua tehokkaasti uudelleen. Tässä tutkimuksessa liikunta hypoteesin mukaisesti lisäsi Serca2-proteiinin määrää vasemman kammion endokardiumissa sekä terveillä että diabetesta sairastavilla eläimillä, mutta diabeteksella ei ollut negatiivisia vaikutuksia Serca2-proteiinin suhteellisiin määriin. Aiemmissä tutkimuksissa kestävyysliikunnan on havaittu lisäävän Serca2-proteiinin määrää vasemmassa kammiossa (Le Douairon Lahaye ym. 2012; Wisløff ym. 2002). Serca2-proteiinin lisääntynyt määrä viittaa siihen, että liikunta on tehostanut kalsiumin palauttamista sarkoplasmisen kalvoston varastoon, jolloin sydämen relaksaatiovaihe voi tapahtua nopeammin (Lehnart ym. 1998). Liikunnalla ei kuitenkaan ollut vaikutusta vasemman kammion epikardiumin tai oikean kammion Serca2-proteiinin määriin. Aiempi tutkimus on osoittanut, että endokardiumin lihassolut lyhenevät supistuessa enemmän, ja että endokardiumin supistuminen on nopeampaa ja suurempaa kuin epikardiumin (Kondo ym. 2006; Mou ym. 2009). On mahdollista, että koska endokardium

supistuu nopeammin kuin epikardium, ja sen siis täytyy pumpata kalsiumia nopeasti ulos solusta seuraavaa supistusta varten, liikunta vaikutti vasemman kammion endokardiumin Serca2-määriin, muttei vaikuttanut epikardiumin Serca2-määriin.

Diabetes ei vaikuttanut Serca2-määriin. Aiemmissä tutkimuksissa Serca2-proteiinin määrä tai aktiivisuus on vähentynyt diabeteksen yhteydessä (Bai ym. 2012; Choi ym. 2002; Teshima ym. 2000; Wang ym. 2010). Lisäksi esimerkiksi sydäninfarktin jälkeisen sydämen vajaatoiminnan yhteydessä on havaittu, että kammion seinämän lisääntynyt mekaaninen stressi liittyy suoraan Serca2-proteiinin määrän vähenemiseen ja relaksaatiovaiheen hidastumiseen (Røe ym. 2019). Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan tutkittu Serca2-proteiinin aktiivisuutta. On mahdollista, että vaikka proteiinin määrissä ei havaittu muutoksia diabeteksen yhteydessä, niiden aktiivisuus on voinut vähentyä. Yksi Serca2-proteiinin aktiivisuutta säätelevä proteiini on fosfolambaani, joka inhiboi Serca2-proteiinin toimintaa vähentämällä Serca2-proteiinien affiniteettia kalsiumiin sytoplasman kalsiumkonsentraation ollessa matala (Frank & Kranias 2000). Sympaattinen hermosto stimuloi β -adrenergisia reseptoreja, joiden aktivaatio puolestaan inhiboi fosfolambaanin toimintaa, ja siten lisää Serca2-proteiinin aktiivisuutta (Frank & Kranias 2000). Aktiivisen fosfolambaanin on havaittu lisääntyvän diabeteksen yhteydessä (Bai ym. 2012; Choi ym. 2002; Kim ym. 2001), joten on mahdollista, että vaikka tässä tutkimuksessa diabeteksen ei havaittu vaikuttavan Serca2-määriin, sen inhibiittorin määrä on voinut lisääntyä. Lisäksi on mahdollista, että sikojen diabetes ei ollut edennyt tarpeeksi pitkälle, jotta sen vaikutukset näkyisivät Serca2-kanavien määrissä. Streptotsosiini-injektion saaneiden eläinten kohonneet glukoosi-, triglyseridi- ja kolesteroliarvot kuitenkin osoittavat, että sioille kehittyi diabetekselle ominaisia aineenvaihdunnanmuutoksia, ja lisäksi kaksi eläintä menehtyi pian streptotsosiini-injektoiden jälkeen insuliinihoidosta huolimatta. Toisaalta kuten jo aiemmin mainittiin, sikojen yksilölliset erot ovat huomattavia ja se voi selittää, miksi tilastollisesti merkitseviä eroja ei havaittu.

4.4. Muutokset NCX-proteiinin määrissä

Tässä tutkimuksessa diabetes näytti hypoteesin mukaisesti vähentävän NCX:n määrää liikuntaa harrastaneilla eläimillä ja kontrollieläimillä oikeassa kammiossa. Tämä tulos oli tilastollinen trendi, joskin hyvin vahva sellainen ($p=0,051$). Myös aiempien tutkimusten mukaan NCX-proteiinin aktiivisuus ja määrä vähenee diabeteksen yhteydessä rotilla (Choi ym. 2002; Hattori ym. 2000; Sheikh ym. 2012). NCX-määrän vähentyminen diabeteksen yhteydessä voi merkitä sitä, että kalsiumin poisto sytoplasmasta hidastuu, jolloin myös kalsiumkonsentraation palautuminen alkuperäiselle tasolle hidastuu. Liikunnalla ei ollut huomattavia vaikutuksia NCX-proteiinin määrään ja ainoastaan pieni laskeva trendi oli havaittavissa vasemmassa epikardiumissa. Osa aiemmasta tutkimuksesta on kuitenkin

havainnut liikunnan lisäävän NCX-proteiinin määrää rotilla (Mou ym. 2009; Wisløff ym. 2002). NCX-määrän lisääntyminen liikunnan seurauksena voi tarkoittaa siitä, että kalsiumin poistuminen sytoplasmasta nopeutuu ja kalsiumkonsentraatio palaa nopeammin ennen supistumista vallitsevalle tasolle. Vaikka tässä tutkimuksessa liikunta ei vaikuttanut positiivisesti NCX-proteiinin määriin, niiden aktiivisuus on kuitenkin voinut muuttua.

NCX-proteiinin määrän ja toiminnan muutoksia on myös hyvä tarkastella yhdessä Serca2-proteiinin määrän ja toiminnan kanssa, sillä ne molemmat poistavat kalsiumia sytoplasmasta relaksaatiovaiheessa. Kuten aiemmin mainittiin, sarkoplasmisen kalvoston kalsiumin uskotaan olevan merkityksellisempää supistumisreaktiossa kuin solun ulkopuolelta tuleva kalsium (Belke & Dillmann 2004), ja siksi Serca2-proteiinien toiminta supistumisen relaksaatiovaiheessa voi olla tärkeämpää kuin NCX-proteiinin. Aiemmissa hiirillä tehdyillä liikunnan ja diabeteksen yhteisvaikutuksen tutkimuksissa on havaittu, että diabeteksen yhteydessä Serca2-proteiinin aktiivisuus vähenee, mutta NCX-proteiinin aktiivisuus lisääntyy vasemmassa kammiossa, ja liikuntaharjoittelu palauttaa aktiivisuustasot terveiden eläinten tasolle (Rolim ym. 2015; Stolen ym. 2009). Nämä aktiivisuuden muutokset voivat olla osoitus siitä, että Serca2-proteiinin toiminnan heikentyessä diabeteksen yhteydessä NCX-proteiini alkaa kompensoida Serca2:n toimintaa, ja sen oma aktiivisuus lisääntyy. Liikunta puolestaan palauttaa Serca2-proteiinin toiminnan ennalleen, jolloin NCX-proteiinin ei mahdollisesti tarvitse enää toimia yhtä aktiivisesti (Rolim ym. 2015; Stolen ym. 2009). Tässä tutkimuksessa havaittiin, että liikunta lisäsi vasemman kammion endokardiumissa Serca2-proteiinin määrä, mutta ei juurikaan vaikuttanut NCX-proteiinin määriin. Tämä tulos on osaksi yhteneväinen aiemman havainnon kanssa siitä, että Serca2-proteiinin toiminta on tärkeämpää kuin NCX-proteiinin. On mahdollista, että kun Serca2-proteiinin määrä lisääntyy, kalsiumia pumpataan niin tehokkaasti sarkoplasmiseen kalvostoon, ettei sitä enää riitä yhtä paljon pumpattavaksi ulos solusta, ja NCX-proteiinia tarvitaan vähemmän. Vaikka vasemman kammion endokardiumin NCX-määrissä ei ollut muutoksia, niin kuten aiemmin mainittiin, proteiinien tai niiden säätelyproteiinien aktiivisuus on voinut kuitenkin muuttua.

4.5. Erot kammioden kalsiumkanavien määrissä

Yleisesti myös kammiot erosivat toisistaan kalsiumkanavien suhteellisissa määrissä. Oikeassa kammiossa oli esimerkiksi merkittävästi vähemmän Cacna1c-proteiinia kuin vasemman kammion endokardiumissa. Oikeassa kammiossa vaikutti olevan myös vähemmän RyR2-proteiinia, kuin vasemman kammion epi- tai endokardiumissa. Oikean kammion seinämät ovat ohuempia ja sen supistumisvoima on heikompi (Poels ym. 2015). On johdonmukaista, että myös supistumiseen osallistuvia kanavia tarvitaan tällöin vähemmän.

Alueellisia eroja tarkastellessa vasemman kammion endokardiumissa nähtiin merkitsevä muutos Serca2-proteiini määrissä, sillä liikunta lisäsi Serca2-proteiinin määrää sekä terveillä että sairailta. Vasemman kammion endokardiumin lihassolujen supistumisen onkin havaittu olevan nopeampaa ja suurempaa kuin epikardiumin (Kondo ym. 2006; Mou ym. 2009), joten on mahdollista, että liikunnan yhteydessä endokardium tekee enemmän työtä, ja Serca2-proteiinin määrä siinä lisääntyy, jotta kammion relaksaatiovaihe voi tapahtua nopeammin. Toisaalta vaikka on havaittu, että koirilla levossa vasemman kammion endokardiumin verenvirtaus diastolen aikana on suurempaa kuin vasemman kammion epikardiumin tai oikean kammion, on liikunnan osoitettu vähentävän näitä eroja verenvirtauksessa eri osien välillä (Ball ym. 1975). Tämä taas voi viitata siihen, että liikunta tehostaa erityisesti vasemman kammion epikardiumin ja oikean kammion toimintaa. Tässäkin tutkimuksessa liikunnan nähtiin lisäävän L-tyypin kalsiumkanavien määrää vasemman kammion epikardiumissa erityisesti sairailta eläimillä, ja oikeassa kammiossa liikunta näytti lisäävän terveillä eläimillä RyR2-proteiinin määrää, vaikka tosin sairaiden eläinten kesken tätä muutosta ei ollut. On kuitenkin mahdollista, että levossa vasemman kammion endokardiumin merkitys sydämen supistumisessa on suurin, ja liikunta tasaa näitä eroja eli muiden osien merkitys lisääntyy.

Aiemmin on havaittu, että vasemman kammion endokardiumissa diastolen kalsiumkonsentraation puoliintumisaika on pidempi diabetesrotilla verrattuna kontrolloituihin, mutta epikardiumissa tätä muutosta ei havaittu (Smail ym. 2016). Tämä voi viitata siihen, että diabetes heikentää endokardiumissa kalsiumin poistoa sytoplasmasta diastolen aikana, mikä taas voi johtua Serca2- tai NCX-proteiinin määrän tai aktiivisuuden väheneemisestä. Tässä tutkimuksessa diabetes ei vaikuttanut juurikaan NCX- tai Serca2-proteiinien määriin endokardiumissa eikä epikardiumissa, mutta kuten jo aiemmin mainittiin, niiden aktiivisuuksissa on voinut tapahtua muutoksia. On mahdollista, että diabeteksen yhteydessä erot kammioiden merkityksessä tasoittuvat, eli vasemman kammion endokardiumin merkitys supistumisessa vähenee, jolloin muiden osien merkitys lisääntyy.

5. Yhteenveto

Tutkimukseni päätulokset olivat, että liikunta yleisesti näytti nostavan Cacna1c-proteiinin eli L-tyypin kalsiumkanavien määrää vasemmassa epikardiumissa, mutta liikunnan positiiviset vaikutukset näyttivät olevan paljon suuremmat diabetesta sairastavilla eläimillä kuin terveillä. Yleisesti diabetesta sairastavilla eläimillä oli enemmän Cacna1c-proteiinia kuin terveillä. Lisäksi liikunta nosti Serca2-proteiinin määrää vasemman kammion endokardiumissa sekä terveillä että sairailta eläimillä. Diabeteksen proteiiniääriä vähentävä

vaikutus nähtiin oikeassa kammiossa, jossa diabetes laski RyR2-proteiinin määrää, ja tämä ero näkyi erityisesti liikkuneiden eläinten kesken, ja lisäksi diabetes näytti laskevan NCX-proteiinin määrää oikeassa kammiossa.

Diabeteksen vaikutukset olivat kokonaisuudessaan vähäisiä: diabetes vähensi merkittävästi ainoastaan RyR2-proteiinin määrää oikeassa kammiossa liikuntaa harrastaneiden eläinten kesken. Lisäksi NCX-määrän väheneminen oikeassa kammiossa diabeteksen yhteydessä oli melkein merkitsevä tulos. On mahdollista, ettei diabetes ollut kehittynyt eläimillä tarpeeksi pitkälle erojen havaitsemiseksi, vaikka toisaalta sikojen veriarvot osoittavat diabetekselle ominaisia muutoksia. Aiemmat tutkimukset aiheesta on kuitenkin tehty hiirillä ja rotilla. On mahdollista, että tutkimusjakso oli minisioille liian lyhyt, ja että pidemmällä tutkimusjaksolla voitaisiin nähdä diabeteksen proteiinimääriä vähentävä vaikutus paremmin. Vähentynyt NCX-proteiinin määrä viittaa siihen, että kalsiumin ulosvirtaus sydänlihassoluista on kuitenkin heikentynyt, mikä voi johtaa sydämen supistumisvoiman heikkenemiseen. On toisaalta mahdollista, että vähentynyttä NCX-proteiinin määrää kompensoi Serca2-proteiinin aktiivisuuden lisääntyminen, jolloin kalsiumin palautus takaisin sarkoplasmiseen kalvostoon tehostuu ja supistumisvoima säilyy ennallaan. Tulevissa tutkimuksissa olisikin hyvä mitata proteiinimäärien lisäksi myös kanavien aktiivisuuksia.

Terveillä eläimillä liikunta näytti lisäävän RyR2-proteiinin määrää oikeassa kammiossa ja hieman vasemman kammion endokardiumissa, mutta vaikutti vähentävän sen määrää vasemmassa epikardiumissa. RyR2-proteiinin suhteen tulokset olivat suuntaa antavia trendejä. Lisäksi liikunta lisäsi merkittävästi Serca2-proteiinin määrää. Liikunnan RyR2-proteiinia vähentävälle vaikutukselle ei tässä kohtaa löytynyt selitystä. Voi olla, että vasemman kammion epikardiumin osuus sydämen toiminnassa vähenee liikunnan yhteydessä. Liikunta näyttää lisäävän RyR2- ja Serca2-proteiinien, eli sarkoplasmisen kalvoston kalsiumkanavien, määriä varsinkin vasemmassa endokardiumissa. Tämä tarkoittaa sitä, että kalsiumionien siirtyminen sarkoplasmisen kalvoston varaston ja sytoplasman välillä supistumisreaktiossa on tehostunut. Tämä voi parantaa sydämen supistumisvoimaa, sillä sytoplasman kalsiumkonsentraatio on yksi merkittävimmistä sydänlihassolujen supistuskapasiteettiin vaikuttavista tekijöistä. Liikunta kuitenkin näytti vähentävän NCX-proteiinin määrää oikeassa kammiossa. On mahdollista, että Serca2-proteiinien aktiivisuus on lisääntynyt, minkä vuoksi NCX-proteiinien määrä on vähentynyt, kun kalsiumia ei tällöin riitä yhtä paljon siirrettäväksi ulos solusta. Seuraavissa tutkimuksissa olisikin mielenkiintoista mitata myös kalsiumkanavien aktiivisuutta sekä säätelyproteiinien, kuten fosfolambaanin tai FKBP12-proteiinien, määrää, sillä monissa aiemmissä tutkimuksissa

sydämen kalsiumkanavien aktiivisuuksien on osoitettu muuttuvan diabeteksen tai liikunnan yhteydessä. Sikojen sydänten kalsiumkanavien aktiivisuuden tutkiminen olisi erityisen mielenkiintoista siksi, että aiempi vähäinen tutkimus diabeteksen ja liikunnan yhteisvaikutuksesta sydämen kalsiumkanaviin on keskittynyt vain hiiriin tai rottiin. Sikojen sydämet ovat rakenteellisesti ja fysiologisesti lähempänä ihmistä, minkä vuoksi sioilla saatuja tuloksia voidaan paremmin soveltaa ihmisen tutkimukseen.

Diabeteksen ja liikunnan yhteisvaikutuksena nähtiin, että liikunta lisäsi L-tyyppin kalsiumkanavien määrää diabetesta sairastavilla eläimillä. Lisääntynyt L-tyyppin kalsiumkanavien määrä vasemman kammion epikardiumissa viittaa tehostuneeseen kalsiumin sisäänvirtaukseen, mikä puolestaan voi tehostaa RyR2-proteiinien avautumista ja kalsiumin vapautumista sarkoplasmisen kalvoston kalsiumvarastosta. Vaikka epikardiumissa ei havaittu RyR2-kanavien määrän lisääntymistä sairailta, niiden aktiivisuus on voinut parantua. Vasemmassa endokardiumissa liikunta lisäsi Serca2-proteiinin määrää, ja näytti myös hieman lisäävän RyR2-proteiinin määrää. Serca2-proteiinin määrän lisääntyminen merkitsee kalsiumin poiston tehostumista sytoplasmasta supistumisreaktion päättyessä. Liikunnalla vaikuttaisi täten olevan kalsiumkanavien määriä lisääviä vaikutuksia diabetesta sairastavien minisikojen sydämissä ja siten mahdollisesti voi vaikuttaa positiivisesti myös diabetessydämen supistumiskykyyn.

Lopuksi kammioiden välinen vertailu osoitti oikeassa kammiossa olevan vähemmän L-tyyppin kalsiumkanavia ja RyR2-proteiinia kuin vasemmassa kammiossa. Koska oikean kammion seinämät ovat ohuempia, ja sen supistusvoima on vähäisempi, on luonnollista, että supistumiseen osallistuvia kalsiumkanavia on vähemmän oikeassa kammiossa.

Kiitokset

Haluan kiittää ohjaajiani Katja Anttilaa Turun yliopiston biologian laitokselta sekä Ilkka Heinosta Turun PET-keskuksesta. Katja on ollut korvaamaton apu ja tuki prosessin jokaisessa vaiheessa, ja on ollut aina valmis auttamaan ja antamaan ohjeita minkä tahansa pulman edessä. Ilkka on antanut tärkeitä kommentteja ja vinkkejä tutkielman kirjoittamiseen ja sen sisältöön liittyen, sekä tarjonnut aiheeseen liittyviä taustatietoja. Lisäksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni henkisestä tuesta, ja erityisesti halua kiittää ystävääni ja opiskelijakollegaani Laura Lintukorpea, joka on ollut vertaistukena ja keskusteluapuna prosessin aikana.

Lähteet

- Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, and Pogwizd SM. 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ. Res.* 97, 1314-1322.
- Anttila K. 2009. Swimming muscles of wild, trained and reared fish: aspects of contraction machinery and energy metabolism. Oulun Yliopisto.
- Bai S, Sun J, Wu H, Zhang N, Li H, Li G, Li H, He W, Zhang W, Zhao Y, *et al.* 2012. Decrease in calcium-sensing receptor in the progress of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 95, 378-385.
- Ball RM, Bache RJ, Cobb FR, and Greenfield J, J C. 1975. Regional myocardial blood flow during graded treadmill exercise in the dog. *The Journal of Clinical Investigation* 55, 43-49.
- Balshaw DM, Xu L, Yamaguchi N, Pasek DA, and Meissner G. 2001. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 276, 20144-20153.
- Belke D & Dillmann W. 2004. Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Current Science Inc* 6, 424-429.
- Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2): 10. doi:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436. <https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_2014> Aineisto haettu 3.6.2019.
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, and Schwartz A. 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 3306-3317.
- Carafoli E & Krebs J. 2016. Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *The Journal of Biological Chemistry* 291, 20849-20857.
- Chattou S, Diacono J, and Feuvray D. 1999. Decrease in sodium-calcium exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiol. Scand.* 166, 137-144.
- Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, and Matlib MA. 2002. Defective intracellular Ca²⁺ signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, 1398.
- Das A, Rui H, Nakamoto R, and Roux B. 2017. Conformational transitions and alternating-access mechanism in the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *Journal of Molecular Biology* 429, 647-666.
- de Melo BL, Vieira SS, Antônio EL, Dos Santos, Luís F N, Portes LA, Feliciano RS, de Oliveira HA, Silva J, José A, de Carvalho, Paulo de Tarso C, Tucci PJF, and Serra AJ. 2016. Exercise training attenuates right ventricular remodeling in rats with pulmonary arterial stenosis. *Frontiers in Physiology* 7, 541.

- Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, and Trafford AW. 2017. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ. Res.* 121, 181-195.
- Faggioni M & Knollmann BC. 2012. Calsequestrin 2 and arrhythmias. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302, 1250.
- Falcão-Pires I, Hamdani N, Borbély A, Gavina C, Schalkwijk CG, van der Velden J, van Heerebeek L, Stienen GJM, Niessen HWM, Leite-Moreira AF, and Paulus WJ. 2011. Diabetes mellitus worsens diastolic left ventricular dysfunction in aortic stenosis through altered myocardial structure and cardiomyocyte stiffness. *Circulation* 124, 1151-1159.
- Figueredo VM, Brandes R, Weiner MW, Massie BM, and Camacho SA. 1993. Endocardial versus epicardial differences of intracellular free calcium under normal and ischemic conditions in perfused rat hearts. *Circ. Res.* 72, 1082-1090.
- Frank K & Kranias EG. 2000. Phospholamban and cardiac contractility. *Ann. Med.* 32, 572-578.
- Gorter TM, Streng KW, van Melle JP, Rienstra M, Dickinson MG, Lam CSP, Hummel YM, Voors AA, Hoendermis ES, and van Veldhuisen DJ. 2018. Diabetes mellitus and right ventricular dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* 121, 621-627.
- Grimm M, Ling H, Willeford A, Pereira L, Gray CBB, Erickson JR, Sarma S, Respress JL, Wehrens XHT, Bers DM, and Brown JH. 2015. CaMKII δ mediates β -adrenergic effects on RyR2 phosphorylation and SR Ca²⁺ leak and the pathophysiological response to chronic β -adrenergic stimulation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 85, 282-291.
- Grüssner R, Nakhleh R, Grüssner A, Tomadze G, Diem P, and Sutherland D. 1993. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs. *Horm. Metab. Res.* 25, 199-203.
- Guizoni DM, Oliveira-Junior SA, Noor SLR, Pagan LU, Martinez PF, Lima ARR, Gomes MJ, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, *et al.* 2016. Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 221, 406-412.
- Halling DB, Aracena-Parks P, and Hamilton SL. 2005. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci. STKE* 2005, re15.
- Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, and Kanno M. 2000. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol* 527, 85-94.
- Hill RW, Wyse GA, and Anderson M. 2012. *Animal Physiology*. Sinauer Associates Inc. US.
- Hudmon A, Schulman H, Kim J, Maltez JM, Tsien RW, and Pitt GS. 2005. CaMKII tethers to L-type Ca²⁺ channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca²⁺ signals for facilitation. *J. Cell Biol.* 171, 537-547.
- Kemi OJ & Wisloff U. 2010. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 30, 2-11.

- Kharroubi AT & Darwish HM. 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes* 6, 850-867.
- Kim HW, Ch YS, Lee HR, Park SY, and Kim YH. 2001. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci* 70, 367-379.
- Kondo RP, Dederko DA, Teutsch C, Chrast J, Catalucci D, Chien KR, and Giles WR. 2006. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *The Journal of Physiology* 571, 131-146.
- La Gerche A & Claessen G. 2015. Is exercise good for the right ventricle? Concepts for health and disease. *Can J Cardiol* 31, 502-508.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, and Hamilton SL. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a003996.
- Larsen MO, Wilken M, Gotfredsen CF, Carr RD, Svendsen O, and Rolin B. 2002. Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, 1342.
- Lazniewska J & Weiss N. 2017. Glycosylation of voltage-gated calcium channels in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 662-668.
- Le Douairon Lahaye S, Gratas-Delamarche A, Malardé L, Zguira S, Vincent S, Lemoine Morel S, Carré F, and Rannou Bekono F. 2012. Combined insulin treatment and intense exercise training improved basal cardiac function and Ca²⁺-cycling proteins expression in type 1 diabetic rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 37, 53-62.
- Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, and Hasenfuss G. 1998. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 853, 220-230.
- Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, Lindegger N, Chen B, Hsueh W, Reiken S, Wronska A, Drew LJ, Ward CW, *et al.* 2008. Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 2230-2245.
- Liao J, Li H, Zeng W, Sauer DB, Belmares R, and Jiang Y. 2012. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* 335, 686-690.
- Locatelli J, De Assis LV, and Isoldi MC. 2014. Calcium handling proteins: structure, function, and modulation by exercise. *Heart Fail Rev* 19, 207-225.
- Lu Z, Jiang Y, Xu X, Ballou LM, Cohen IS, and Lin RZ. 2007. Decreased L-type Ca²⁺ current in cardiac myocytes of type 1 diabetic Akita mice due to reduced phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Diabetes* 56, 2780-2789.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, and Marks AR. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376.
- Mokelke EA, Palmer BM, Cheung JY, and Moore RL. 1997. Endurance training does not affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. *Am. J. Physiol.* 273, 1193.

Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, and Cazorla O. 2009. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovascular Research* 81, 555-564.

Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, Valdes C, Villaseñor J, Zambrano CG, and Gonzalez DR. 2017. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017,

O'Keefe JH, Patil HR, Lavie CJ, Magalski A, Vogel RA, and McCullough PA. 2012. Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. *Mayo Clinic Proceedings* 87, 587-595.

Ottolia M, Nicoll DA, and Philipson KD. 2009. Roles of Two Ca²⁺-binding Domains in Regulation of the Cardiac Na⁺-Ca²⁺ Exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 284, 32735-32741.

Pappano AJ and Wier WG. 2013. *Cardiovascular Physiology*. Elsevier/Mosby. Philadelphia, PA.

Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, and Gómez AM. 2006. Mechanisms of [Ca²⁺]_i transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes* 55, 608-615.

Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Rueda A, Mercadier J, Benitah J, and Gómez AM. 2014. Calcium signaling in diabetic cardiomyocytes. *Cell Calcium* 56, 372-380.

Poels EM, da Costa Martins PA., and van Empel V PM. 2015. Adaptive capacity of the right ventricle: why does it fail? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, 803.

Richfield, David (2014). "Medical gallery of David Richfield". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.009. ISSN 2002-4436. <https://en.wikiversity.org/wiki/WikiJournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_David_Richfield_2014> Aineisto haettu 7.4.2019.

Røe ÅT, Ruud M, Espe EK, Manfra O, Longobardi S, Aronsen JM, Nordén ES, Husebye T, Kolstad TRS, Cataliotti A, *et al.* 2019. Regional diastolic dysfunction in post-infarction heart failure: role of local mechanical load and SERCA expression. *Cardiovasc. Res.* 115, 752-764.

Røe ÅT, Aronsen JM, Skårdal K, Hamdani N, Linke WA, Danielsen HE, Sejersted OM, Sjaastad I, and Louch WE. 2017. Increased passive stiffness promotes diastolic dysfunction despite improved Ca²⁺ handling during left ventricular concentric hypertrophy. *Cardiovascular Research* 113, 1161-1172.

Rolim N, Skårdal K, Høydal M, Sousa MML, Malmo V, Kaurstad G, Ingul CB, Hansen HEM, Alves MN, Thuen M, *et al.* 2015. Aerobic interval training reduces inducible ventricular arrhythmias in diabetic mice after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 110, 44.

Scoote M, Poole-Wilson PA, and Williams AJ. 2003. The therapeutic potential of new insights into myocardial excitation-contraction coupling. *Heart (British Cardiac Society)* 89, 371-376.

- Severson DL. 2004. Diabetic cardiomyopathy: recent evidence from mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82, 813-823.
- Shao C, Rozanski GJ, Patel KP, and Bidasee KR. 2007. Dyssynchronous (non-uniform) Ca^{2+} release in myocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 234-246.
- Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, Blaustein MP, Boguslavskyi A, Bossuyt J, Bridge JHB, Chen-Izu Y, Clancy CE, Edwards A, *et al.* 2015. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and Na^+/K^+ -ATPase in the heart. *J Physiol* 593, 1361-1382.
- Sheikh AQ, Hurley JR, Huang W, Taghian T, Kogan A, Cho H, Wang Y, and Narmoneva DA. 2012. Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PLoS ONE* 7, e36840.
- Smail MMA, Qureshi MA, Shmygol A, Oz M, Singh J, Sydorenko V, Arabi A, Howarth FC, and Al Kury L. 2016. Regional effects of streptozotocin-induced diabetes on shortening and calcium transport in epicardial and endocardial myocytes from rat left ventricle. *Physiol Rep* 4,
- Stølen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, and Wisloff U. 2009. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca^{2+} control, and SR Ca^{2+} release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circulation Research* 105, 527-536.
- Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, and Frazier KS. 2012. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet. Pathol.* 49, 344-356.
- Teshima Y, Takahashi N, Saikawa T, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, and Sakata T. 2000. Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine sensitive Ca^{2+} -Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 655.
- Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, Chen-Izu Y, Cornea RL, Wehrens XHT, and Bers DM. 2016. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 98, 62-72.
- Walker CA & Spinale FG. 1999. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118, 375-382.
- Wang M, Zhang W, Zhu J, Fu G, and Zhou B. 2010. Breviscapine ameliorates cardiac dysfunction and regulates the myocardial Ca^{2+} -cycling proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Diabetol* 47, 209-218.
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosemblyt N, *et al.* 2003. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829-840.
- Widya RL, Meer, R. W. van der, Smit JWA, Rijzewijk LJ, Diamant M, Bax JJ, Roos Ad, and Lamb HJ. 2013. Right ventricular involvement in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 36, 457-462.

Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, and Ellingsen Ø. 2002. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 54, 162-174.

Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, and Meissner G. 2003. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 278, 23480-23486.

Zhang LQ, Zhang XQ, Ng YC, Rothblum LI, Musch TI, Moore RL, and Cheung JY. 2000. Sprint training normalizes Ca²⁺ transients and SR function in postinfarction rat myocytes. *J. Appl. Physiol.* 89, 38-46.

Zhao Y, Guo Y, Gu L, Fan X, Yang H, Chen Z, Zhou P, Yuan Q, Ji G, and Wang S. 2017. Sensitized signalling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in the absence or inhibition of FKBP12.6 in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 113, 332-342.

Liitteet

Liite 1
Liite 2

Pierce™ BCA Protein Assay Kit
Western blotting

ThermoFisher Scientific, tuotenumero 23225

1. Valmista standardit. Standardit ovat sarja tunnettuja laimennoksia BSA:sta (*bovine serum albumin*), esimerkiksi 0-10 mg/ml standardisarja.
2. Valmista reaktioliuos sekoittamalla reagenssi A ja reagenssi B (50:1). Liuosta tarvitaan 50 µl kaivoa kohden. Huomio: kun reagenssi B sekoitetaan reagenssi A:han, liuos muuttuu ensin sameaksi, mutta sitten kirkastuu ja muuttuu vihreäksi. Valmista reaktioliuosta tarpeeksi, jotta sitä riittää kaikkiin näytteisiin. Sekoitettu reaktioliuos säilyy usean päivän säilytettynä suljetussa astiassa huoneenlämmössä.
3. Pipetoi kuoppalevyn kaivoihin 1 µl jokaista BSA-standardilaimennosta triplikaateina
4. Pipetoi kuoppalevyn kaivoihin 1 µl näytettä triplikaatteina
5. Lisää 50 µl reaktioliuosta kaivoihin
6. Peitä levy ja inkuboi 30 minuuttia 37 °C asteessa.
7. Aseta spektrofotometri mittaamaan 562 nm, ja mittaa levyn näytteiden absorbanssi 10 minuutin sisällä. Laske näytteiden proteiinimäärä käyttämällä ohjelmaa BCA protein assay 384 levynlukijalla.

Huom. Väriin kehittyminen jatkuu vielä, kun näytteet ovat jäähtyneet huoneenlämpöiseksi. Väriin kehittyminen huoneenlämmössä on kuitenkin hidasta, minkä vuoksi merkittävää virhettä ei synny, jos 562 nm absorbanssi mitataan 10 minuutin kuluessa.

Liuokset ja puskurit

Homogenisointiliuos

62,5 nM	Tris-HCL	(0,76 g /100ml)	(Sigma-Aldrich)
1 µg/ml	leupeptiini	(100 µg /100 ml)	(Sigma-Aldrich)
1 µg/ml	pepstaatiini	(100 µg /100 ml)	(Sigma-Aldrich)
1 mM	PMSF	(0,0174 g /100 ml)	(Sigma-Aldrich)
milliQ-veteen, pH 6,8			

Laemmi-liuos

H ₂ O	3,0 ml	
0,5 M Tris, pH 6,8 (=SDS-D)	1,0 ml	(Sigma-Aldrich)
glyseroli	1,6 ml	(Sigma-Aldrich)
10 % SDS (=SDS-E)	1,6 ml	(Sigma-Aldrich)
0,5 % bromofenoli-sininen	0,4 ml	(Merck)
β-merkaptetaanoli	0,4 ml	(Sigma-Aldrich)
Kokonaismäärä	8,0 ml	

Lisää β-merkaptetaanoli vasta juuri ennen liuoksen käyttöä.

10 % APS (ammoniumpersulfaatti, Merck) 0,030 g / 300 µl H₂O

Ajopuskuri (10X)

Tris	15.13 g	(Sigma-Aldrich)
Glysiini	72 g	(Fisher Scientific, Loughborough, UK)
SDS	5 g	(Sigma-Aldrich)
H ₂ O	500 ml	

Siirtopuskuriliuos

Tris	3,03 g	(Sigma-Aldrich)
Glysiini	14,4 g	(Fisher Scientific, Loughborough, UK)
SDS	200 ml	(Sigma-Aldrich)
H ₂ O	1000 ml	(pH n. 8.1–8.4)

TBS-liuos

Tris	6,06 g	(Sigma-Aldrich)
NaCl	8,77 g	(VWR Chemicals, Helsinki, Suomi)
H ₂ O	1000 ml	(pH 7,5)

TBST-liuos

TBS + 0,1 % Tween-20 (Merck)

Protokolla

TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit (Bio-Rad)

Erottelugeeliliuos (*Resolver solution*)

Resolver A	2,5 ml/geeli
Resolver B	2,5 ml/geeli
10 % APS	25 µl/geeli
TEMED (Bio-Rad)	2,5 µl/geeli

Kokoojageeliliuos (*Stacker Solution*)

Stacker A	1 ml/geeli
Stacker B	1 ml/geeli
10 % APS	10 µl/geeli
TEMED (Bio-Rad)	2 µl/geeli

Valmistele geelikammiot. Valmista erottelugeeliliuos. Lisää 10 % APS ja TEMED juuri ennen liuksen käyttöä. Sekoita liuos hyvin kääntelemällä putkea, ja kaada liuos tasaisesti lasien väliin jättäen tilaa kokoojageelille. Pidä ylijäänyt liuos tallessa, jotta voidaan nähdä, milloin geeli on jähmettynyt.

Valmista välittömästi kokoojageeliliuos. Lisää 10 % APS ja TEMED juuri ennen liuksen käyttöä. Sekoita liuos kääntelemällä putkea, ja lisää liuos varovasti Pasteur-pipetin avulla lasien väliin erottelugeelin päälle. Lisää kampa ja vältä ilmakuplien muodostumista. Jos kuplia muodostuu, poista kampa ja asettele se uudelleen. Anna geelien jähmettyä noin 30 minuuttia. Laimenna ajopuskuri (10x -> 1x, 400 ml riittää kahdelle geelille). Sulata näytteet, kontrolli ja molekyylipainomarkkerit ja säilytä jäällä.

Poista kampa, kun geelit ovat jähmettyneet. Asenna geelit elektroforeesilaitteeseen, ja kaada laimennettua ajopuskuria niin, että kaivot täyttyvät. Lisää 5 µl molekyyli-markkeria ensimmäiseen kaivoon, näytteet seuraavaan kahdeksaan kaivoon ja kontrollinäyte viimeiseen kaivoon. Kontrollinäyte voi olla esimerkiksi sekoitus useaa eri näytteitä. Molekyyli-painomarkkerin paikkaa vaihtamalla eri geelit voi erottaa toisistaan.

Täytä ajolaitteen ulompi kammio ajopuskurilla niin, että elektrodit peittyvät. Sulje kansi, ja aja geeliä 200 V noin 35 minuuttia (tai tarvittaessa kauemmin).

Kun geeli on ajossa, leikkaa kaksi palaa suodatinpaperia ja yksi pala nitrosellulosa-membraania, ja liota niitä noin 15 minuuttia siirtopuskurissa. Käytä hanskoja ja käsittele membraania pinseteillä sormenjälkien välttämiseksi. Laita myös

kaksi karhunkieltä likoamaan siirtopuskuriin. Kun geelija on valmis, ota geelistä Stain-free-kuva ChemiDoc™ MP Imaging System –laitteella, ja leikkaa tämän jälkeen geeli pienemmäksi niin, että tutkittava proteiini jää geelin alueelle. Liota geeliä noin 15 minuuttia siirtopuskurissa.

Valmistele geeli-sandwich:

- Laita kasetti puhtaalle alustalle, musta puoli alas
- Laita yksi liotettu karhunkieli mustan puolen päälle
- Laita yksi suodatinpaperi karhunkielen päälle
- Laita lionnut geeli suodatinpaperin päälle
- Laita lionnut nitroselluloosamembraani geelin päälle (varmistu, ettei ilmakuplia jää membraanin ja geelin väliin)
- Laita yksi suodatinpaperi membraanin päälle
- Laita yksi karhunkieli suodatinpaperin päälle

Poista mahdolliset ilmakuplat painamalla varovasti rullalla geeli-sandwichin päältä.

Sulje kasetti ja aja siirtopuskurissa 100V 60 minuuttia. Pidä kasettia jäällä ajon aikana tai käytä jääpalaa.

VASTA-AINEKÄSITTELY

Kun siirtoajo on valmis, pura kasetit ja laita nitroselluloosamembraani TBS-liuokseen ja 15 minuutiksi sekoittajaan. Siirrä membraanit blokkauksiliuokseen (5 % maitojauhetta TBS:ssä) ja liota sekoittajassa 60 minuuttia. Poista blokkauksiliuos huolellisesti. Lisää primaarinen vasta-aineliuos ja liota + 4 °C asteessa yön yli sekoittajassa. Vasta-ainelaimennos riippuu käytetystä vasta-aineesta. Vasta-aine liuotetaan TBST+ 5% maitojauheliuokseen.

Pese membraani viisi kertaa TBST-liuoksella, 5 minuuttia kerrallaan ja lopuksi poista pesuliuos huolellisesti. Lisää sekundaarinen vasta-aine (TBST+ 5% maitojauhe) ja liota noin 60 min. sekoittajassa huoneenlämmössä. Käytä primaariseen vasta-aineseen sopivaa sekundaarista vasta-ainetta. Pese membraani viisi kertaa TBST-liuoksella, 5 minuuttia kerrallaan ja lopuksi jätä membraani TBST-liuokseen.

Kuvaa membraani ChemiDoc™ MP Imaging System –laitteella. Käytä sopivaa valotusaikaa.