

TARTU ÜLIKOOL

Spordibioloogia ja füsioteraapia instituut

Martiina Niilits

**Morfoloogilised muutused skeletilihaskoe eritüübilistes
lihaskiududes sarkopeenia puhul**

**Sarcopenia and morphological changes in different skeletal
muscles fiber types**

Magistritöö

Kehalise kasvatuse ja spordi õppekava

Juhendajad:
PhD, P.Kaasik

PhD, E-M. Riso

Autori allkiri

Tartu 2015

SISUKORD

SISUKORD	2
TÖÖS KASUTATAVAD LÜHENDID	3
LÜHIÜLEVAADE.....	4
ABSTRACT	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Sarkopeenia üldiseloostus.....	6
1.2 Skeletilihase satelliitrakkude ja lihasku tuumade hulga regulatsiooni roll sarkopeenia tingimustes.....	7
1.3 Lihaskoe funktsionaalne võimekus sarkopeenia puhul ning seosed lihasku languse funktsionaalsete võimetega.	10
2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED	12
3. METOODIKA.....	13
3.1 Katse korraldus	13
3.2 Protseduuri kirjeldus ja koeprouvide eraldamine	13
3.3 Histokeemia	13
3.4 Statistiline töötlus	14
4. TÖÖ TULEMUSED	15
4.1 Sarkopeenia indeks ja muutused lihasku vananemisel.....	15
4.2 Eritüübiliste lihasku rakkude ristlõikepindalad täiskasvanud ja vanadel katseloomadel	15
4.3 Vananemisega kaasnevad muutused lihasku rakkude tuumapopulatsioonis ja lihasku domeenis.....	19
5. TULEMUSTE ARUTELU	21
6. JÄRELDUSED.....	25
KASUTATUD KIRJANDUS	26

TÖÖS KASUTATAVAD LÜHENDID

mATP – müosiini ATP-aas

m. EDL – *m. Extensor digitorum longus*

m. PLA – *m. Plantaris*

m. SOL – *m. Soleus*

LÜHIÜLEVAADE

Eesmärk: Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada vananemisega kaasnevate muutuste spetsiifikat eritüübiliste lihasrakkude tasemel.

Metoodika: Eksperimendid viidi läbi täiskasvanud (vanusega 16-24 nädalat) ja vanadel (vanusega 125-135 nädalat) Wistar liini rottidel. Koepreparaadid eraldati *m. Plantaris*'est ja *m. Extensor digitorum longus*'est kui kiire iseloomuga lihastest ning *m. Soleus*'est kui aeglase iseloomuga lihastest. Lihaskiud tüpiseeriti mATP-aasi histokeemia alusel (eelinkubatsioon vastavalt pH 4.3 ja 10.2). Koestruktuurid analüüsiti valgusmikroskoobil.

Tulemused: Vanade katseloomade tagajäsemete suhteline haardejõud moodustas 65% täiskasvanud katseloomade vastavatest näitajatest. Vananemisel langes *m. Plantaris*'e, *m. Soleus*'e ja *m. Extensor digitorum longus*'e suhteline lihaskaal vastavalt 19,7%, 16,9% ja 17%. Vananevas skeletilihases väljendub sarkopeenia kiiretes lihastes kiirete lihaskiudude mõõtmete vähenemises, aeglase lihaskiudude mõõtmeid vananemisprotsessid ei mõjutanud. Lihaskiudude tuumade hulk lihasrakkude ristlõikepindala kohta langes *m. Plantaris*'e kiiretes ja aeglastes kiududes, *m. Soleus*'e aeglastes ja *m. Extensor digitorum longus*'es vastavalt kiiretes lihaskiududes. Lihastuuma domeeni suurus vananemisel ei muutunud.

Kokkuvõte: Meie tulemused näitasid vanadel katseloomadel tagajäsemete haardejõu ning skeletilihaste suhtelise kaalu langust. Lihaskiudude jaotuvus ristlõikepindalade alusel näitas vanade katseloomade skeletilihaste kiiretes lihaskiududes nihet väiksema ristlõikepindala suunas. Vananevas skeletilihaskoes toimub lihases domineeriva lihaskiu tüübi spetsiifiline tuumade hulga langus, kuid lihastuuma domeeni suurst vananemisprotsessid ei mõjutanud.

Märksõnad: vananemine, sarkopeenia indeks, lihaskiu tüübid, lihastuuma domeen, lihaskiu tuumad.

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to explain the specifics of age-related changes in different types of muscle cells.

Methods: Experiments were carried out using adult (16-24 weeks old) and old (125-135 weeks old) Wistar rats. Tissue samples were separated from *m. Plantaris* ja *m. Extensor digitorum longus* as fast muscle and from *m. Soleus* as a slow muscle. Muscle fiber types were indentified by mATP-ase histochemistry (pre-incubation at pH 4.3 and 10.2) and analyzed with light microscopy.

Results: In aged animals the relative hindlimb grip strength was decreased to 65% compared with respective value from adult animals group. In aged muscles the relative muscle weight was decreased in *m. Plantaris* by 19,7%, *m. Soleus* by 16,9% and in *m. Extensor digitorum longus* by 17%. Aged-caused atrophy was pronounced in fast-type of muscle fibers in *m. Plantaris* and in *m. Extensor digitorum longus*, at the same slow-type of muscle fibers in fast and slow twitch muscles were not affected by age-related changes. The myonuclear number per cross-sectional area of fibers was decreased in both fiber type (fast and slow) in *m. Plantaris*, in fast type of fibers in *m. Extensor digitorum longus* and in slow-type of fibers in *m. Soleus*. The size of myonuclear domain in studied muscles was not affected by processes accompined with ageing.

Conclusions: Our results showed in aged conditions the reduction in relative hindlimb grip strength and in relative muscle weights. In aged animals group the distribution of fast muscle fibers by cross-sectional area, showed the shift towards smaller cross-sectional area in fast muscles (*m. Plantaris* and *m. Extensor digitorum longus*). The myonuclear number decreased in dominant fiber type of respective muscles. The size myonuclear domain was not altered in aged conditions.

Keywords: aging, sarcopenia index, skeletal muscle fiber types, myonuclear domain, myonuclear number

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Sarkopeenia üldisloomustus

Üheks olulisemaks sotsiaalseks probleemiks arenenud ühiskonnas on kujunenud vananemise käigus asetleidev lihasmassi kadu ja seeläbi lokomotoorse funktsiooni langus. Sarkopeenia on üheks suuremaks terviseriski faktoriks ja mängib olulist rolli inimeste toimetuleku languses. Sarkopeenia all on sagedamini mõistetud vananemisega seotud lihasmassi, lihasjõu ja liigutusfunktsiooni langust, kuid samal ajal on autorite hulgas eriarvamused sarkopeenia mõiste kasutamise üle laiemas ja kitsamas teaduslikus mõttes. Peamiselt on selle põhjusteks diagnostiliste kriteeriumite puudus (Visser, 2009) ja tõsiasi, et vanusega kaasnev lihasjõu langus ei ole otseselt seotud kehakaaluga, vaid on rohkem sõltuvuses skeletilihaste jõugenerereerimisvõime langusest (Clark & Manini, 2008; Visser 2009). Sellest tulenevalt ei ole seosed skeletilihaste funktsionaalsuse ning koe kvaliteedi ja jõunäitajate languse vahel kaugeltki selged. Noore ja eaka organismi vahel on skeletilihaste regeneratsiooni- ja taastumisvõimes suured erinevused, eriti skeletilihase kontraktiilse aparraadi tasemel (Seene et al., 2012; Yarasheski 2003).

Skeletilihaste langenud regeneratsioonivõime ja aeglustunud kohanemisvõime on peamiseks takistusteks lihasfunktsiooni kvaliteedi säilitamisel ning samuti takistuseks võimaluste leidmisel lihasfunktsiooni kvaliteedi taastamisel. Vananemisega kaasneb lihasmassi ja -jõu langus (Hall et al., 2011; Manini & Clark 2011; Seene et al., 2012). On selge, et lihasfunktsioonil on kriitiline tähtsus lokomotsiooni, kehalise toimetuleku ja vitaalsuse säilitamisel vanemas eas, kuid samas on seosed lihaskoe struktuursete muutuste ja jõunäitajate languse vahel ebaselged (Goodpaster et al., 2006; Newman et al., 2006 Visser et al., 2005). Kuna on näidatud, et jõunäitajate langus vananemisel toimub suuremal määral võrreldes lihasmassi langusega, siis võib see olla seotud ulastuslikuma kontraktsiooniomaduste muutuse dünaamikaga, mille aluseks on koestruktuuride kvaliteedi langus (Goodpaster et al., 2006).

Varasemates uuringutes on näidatud, et vananemisega kaasnevad muutused lihasvalkude ainevahetuses nihkega degradatsiooni ülekaalu suunas ning lihaskoe regeneratsioonivõimes (Kaasik et al., 2007; Nair, 2004). Ka näitavad kirjanduse andmed, et vananemise käigus tõuseb pro-põletikuliste tsütokiinide (interleukin-1, interleukin-6 and tuumori nerkoosi faktor alfa) tase (Ferrucci et al., 1999; Visser et al., 2002), kuid hilisemate

uuringute tulemused viitavad, et kehaline koormus, eriti jõutreening võib olla pidurdavaks faktoriks tsütokiinide taseme tõusul (Moore et al., 2011). Senised tulemused näitavad, et adekvaatselt suunatud kehaline koormus võib parandada skeletilihaskude (sealhulgas spetsiifiliselt kontraktiilse aparadi) regeneratsioonivõimet ja seeläbi aidata oluliselt kaasa kahjustatud lihaskoe taastamisele (Seene et al., 2008; 2009; 2010). Insuliini-laadne kasvufaktor I ja skeletilihase satelliittrakud mängivad kesksel rollil lihaskoe regeneratsioonivõime staatuses ja parandamisel nii vananemisel kui ka lihaskahjustuste korral. Jõutreeningu kõrval on näidatud vastupidavustreeningu arendavat mõju saavutusvõimele, sealhulgas kontraktiilse aparadi ja rakkudevahelise maatriksi struktuuridele (Riso et al., 2010).

1.2 Skeletilihase satelliittrakkude ja lihasraku tuumade hulga roll sarkopeenia tingimustes

Kuna skeletilihaskud on post-mitootilised, siis sõltub nende regeneratsioonivõime satelliittrakkude hulgast ja aktivatsioonivõimest (Mauro 1961; Moss & Leblond, 1970; 1971). Noore ja täiskasvanud skeletilihase puhul rakendub satelliittrakkude mehhanism lihaskasvu tagamisel läbi tuumapopulatsiooni uuenemise sõltuvalt nende stimulatsioonist. Täiskasvanud diferentseerunud skeletilihaskud on hulktoomsed ning iga lihasraku tuum juhib ja kontrollib ümbritsevat sarkoplasma ruumi, mida nimetatakse lihastuumade domeeniks – lihasrakku saab tinglikult käsitleda kui lihastuumade domeenide kompleksi (Hall & Ralston, 1989). Samas on lihasvalkude ainevahetuse tase ja selle muutused limiteeritud olemasoleva tuumapopulatsiooni poolt läbi lihastuumade domeeni konstantsuse (Moss & Leblond, 1970) ning tõusnud valguvajaduse rahuldamine toimub läbi täiendavate lihastuumade liitumisel lihasrakkudega (Brooks et al., 2009; Kadi & Thornell, 2000). Lokomotoorse funktsiooni sooritamisel, eriti suurenenud funktsionaalse aktiivsuse tingimustes ilmnevad olulisel määral lihasrakkude struktuursed ja molekulaarsed kahjustused, mis on eriti ilmekalt väljendunud vanemas eas. Seepärast on regulaarselt toimuvad regeneratiivsed protsessid hädavajalikud säilitamiseks kostruktuuride kvaliteeti ja seeläbi funktsionaalsust. Muutused skeletilihase satelliittrakkude hulgas ja/või nende aktivatsioonivõimes on üheks võtmeküsimuseks vanadusega seotud lihasnõrkuse ning lihasmassi ja -jõu languse puhul. Varasemad uuringud näitavad, et funktsionaalse aktiivsuse tõusu poolt esilekutsutud lihasmassi kasv ja lihastuumade hulga suurenemine on seotud satelliittrakkude arvu ja nende aktivatsioonivõime

tõusuga (Hikida et al., 1998; Kadi & Thornell, 2000; Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006).

Kirjanduse andmed lihastuumade hulga muutuste kohta on mõneti vastukäivad, kuna valdav enamus avaldatud tulemustest baseeruvad loomeksperimentidel ja samal ajal on inimuuringute tulemused muutuste proportsionaalsuse kohta vasturääkivad. Käesoleva ajani ei ole inimestel vananemise tingimustes veenvalt näidatud, et lihasatroofia tingitud muutused on proportsionaalses seoses muutustega lihastuumade tasandil (Ohira et al., 1999). Lihastuumade hulga muutuste regulatsioonis on olulisel kohal nii rakusisesed kui rakuvälised regulatiivsed mehhanismid, mis aga omakorda tingivad eripärasid tuumade hulga muutuste dünaamikas. Nii on laboratoorsetel katseloomadel (Fisher 344 liini rotid) näidatud lihastuumade domeeni suuruse vähenemist funktsionaalsest inaktiivsusest tingitud lihasatroofia puhul (Hikida et al., 1997). Üheks avaldatud andmete mitmekesisuse ja vastukäivuse põhjuseks on lihasraku tuumade hulga ja lihastuumade domeeni suuruse lihase- ja lihasraku tüübi spetsiifilisus. On teada, et aeglase kokkutõmbemise iseloomuga lihaskiududes on tuumade hulk suurem ning sellest tulenevalt väiksem lihastuumade domeeni suurus (Edgerton & Roy, 1991; Hikida et al., 1997). Kirjanduse andmetel võib funktsionaalsel aktiivsusel ja selle iseloomul olla oluline roll lihasraku tuumade domeeni konstantsuse säilitamisel või selle muutustes. On leitud, et treenimata eakatel inimestel ei pruugi tuumade/sarkoplasma suhe konstantsena säilida (Hikida et al., 1998), kuid piisava kestvusega jõutreeningu tulemusena (16 nädalat) saavutasid eakad vaatlusalused positiivse efekti nii jõunäitajate kui lihasraku mõõtmete alusel (Hikida et al., 2000). Kirjeldatud tulemused viitavad eakate skeletilihaskoe võimekusele säilitada lihasmassi ning kontrollida lihasraku tuumade regulatsiooni vastusreaktsioonina rakendatud koormusele. Brack et al (2005) on leidnud, et on olulised erinevused skeletilihase satelliitrakkude arvus suure ja väikese ristlõikepindalaga lihaskiudude vahel, mis on üheks määravaks tuumade hulga regulatsioonimehhanismi avaldumise aluseks.

Kirjanduse andmed üksikute lihaskiudude tasandil ei lisa piisava kindlusega selgust lihasraku tuumade hulga ja rakkude mõõtmete ning nende muutuste omavaheliste seoste kohta areneva lihasatroofia tingimustes. Eksperimentides, kus lihasatroofia esilekutsumiseks kasutati denervatsiooni, närviimpulsside blokeerimist ja funktsionaalse koormuse elimineerimist ei leitud usaldusväärset seost lihasatroofia arengu ning lihasraku tuumade hulga vähenemise vahel (Gundersen & Bruusgaard, 2008). Uurijad on samas seisukohal, et ebakõlad lihastuumade domeeni konstantsuse säilimise põhimõttes leiavad aset lihaskoe kohanemisreaktsioonide varajastes faasides (Kadi et al., 2004). Kui normaalfüsioloogilistes või areneva hüpertroofia tingimustes on lihasraku tuumade hulga säilitamise või suurendamise aluseks satelliitrakkude mehhanism, siis lihasatroofiaga kaasneva lihastuumade hulga langus toimub läbi apoptoosimehhanismi. Apoptoosi, kui “programmeeritud

rakusurma” kontseptsiooni on lihtsam mõista monotuumsetes rakkudes asetleidvate protsesside alusel, kuid käesolevaks ajaks on vastuseta küsimus – kuidas on apoptoosimehhanism reguleeritud hulktuumsete rakkude puhul ning millisel põhjusel apoptoosiliste protsesside sihtmärgiks on kindlad rakutuumad. Lisaks lihasraku tüübi spetsiifilisele vastusreaktsioonide kompleksile on esitatud kirjanduse andmete alusel atroofia areng ja sellega kaasnevad struktuursed ning metaboolsed muutused sõltuvad spetsiifiliselt ka mõjustuse alusmehhanismidest. Kui funktsionaalse inaktiivsuse puhul on enamõjustatud aeglase kontraktsioonikiirusega lihaskiud, kus toimub ulatuslikum lihastuumade hulga ja lihastuumade domeeni suuruse langus (Zhong et al., 2005), siis ülemäärase glükokortikoidsete hormoonide taseme korral ilmneb ulatuslik ja kiiresti arenev atroofia kiireima kontraktsioonikiirusega glükolüütilistes lihaskiududes (tüüp IIB) (Kaasik et al., 2007; Seene et al., 2012).

Satelliitrakkude populatsioon moodustab sünnihetkel ca 15% lihasraku tuumade arvust (Thornell et al., 2003) ja täiskasvanud lihases ca 1-6% (Roth et al., 2000). Kirjanduse andmetel ei ole selget konsensust vananemisega kaasnevatest muutustest nii satelliitrakkude hulgas kui nende aktivatsioonis. Loomakatsetele toetudes on näidatud satelliitrakkude hulga langust vananevas organismis (Brack et al., 2005), kuid samas on inimestel läbiviidud uuringute põhjal demonstreeritud satelliitrakkude populatsiooni vähest tundlikkust vananemisega kaasnevate muutuste suhtes (Nnodim et al., 2000). Sarnaselt loomeksperimentide tulemustele, on ka inimeste skeletilihaste uuringute andmed vasturääkivad erinevate lihaste omavahelises võrdluses (Dryer et al., 2006; Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006; Verdijk et al., 2007).

Vasturääkivuste põhjustena võib esile tuua: uuritavate erinevad vanusekategoriad, ebaadekvaatne liikidevaheline tulemuste üldistamine, vähene tähelepanu uuritavate skeletilihaste ehituslikele ja ainevahetuslikele eripäradele ning üldistamine kiire kokkutõmbesiloomuga lihaskiudude puhul. Kirjanduse andmed noorte uurimisaluste kohta näitavad, et skeletilihase satelliitrakkude hulk erineb lihaskiu tüüpide puhul nii laboratoorsetel katseloomadel (Gibson & Schultz, 1983), kui inimestel (Kadi et al., 2004). Verdijk et al (2007) on leidnud, et vananeva organismi puhul toimub satelliitrakkude hulgas ulatuslik langus II tüüpi lihaskiududes, mis viitab II tüüpi lihasrakkude regeneratsioonivõime langusele. Samad autorid on seisukohal, et satelliitrakkude hulga langus on sõltuvuses atroofia-astmest, kuna tulemused näitavad ulatuslikumat satelliitrakkude hulga vähenemist suurema atroofia-astmega lihastes. On veenvalt näidatud, et nii skeletilihase satelliitrakkude hulga ja nende aktivatsioonivõimekus muutuvad vanuse kasvades ja seetõttu on oluline seada

fookus vanadusega seotud lihaskoe muutuste preventtsiooni ja pidurdamise efektiivsusele (Kadi & Thornell, 2000).

1.3 Lihaskoe funktsionaalne võimekus sarkopeenia puhul ning seosed lihasmassi languse funktsionaalsete võimetega

On üldteada, et üheks vananemisega kaasnevaks muutuseks tugi-liikumisaparaadis on lihasmassi vähenemine. Läbiviidud uuringute tulemused näitavad, et lihasmassi vähenemine toimub 3-8% ulatuses dekaadi kohta alates 30-st eluaastast ning muutuste dünaamika kiireneb alates 60-st eluaastast (Clark & Manini, 2008; Frontera et al., 1991). Kuna lihasmass ja selle funktsionaalsus on määrava tähtsusega jõuvõimete avaldumisel, siis on jõunäitajate muutuste seostamine lihasmassi languse ulatusega informatiivne näitaja kirjeldamiseks mobiilsust, funktsionaalset staatust ning elukvaliteeti läbi elukaare ja eriti vanemaealistel (Foldvari et al., 2000; Clark & Manini, 2010).

Kirjanduse andmed näitavad, et vananemisega kaasnev jõunäitajate langus toimub võrreldes lihasmassi tasemel asetleidvate muutustega kiiremas dünaamikas (Delmonico et al., 2009; Goodpaster et al., 2006). Samuti on kirjanduse andmetel näidatud, et lihasmassi ja funktsionaalsuse muutustes on oluline rõhutada eripärasid tugiliikumisaparaadi regionaalsest aspektist lähtudes – nii on leitud, et alajäsemete funktsionaalne võimekus on heas seoses muutustega igapäevases toimetulekus ja reieluu kaela murdudega (Philips et al., 1998). Eakate vaatlusaluste uuringutes, kasutades ultraheli meetodikat on leitud, et eakatel naisvaatlusalustel oli *m. quadriceps femoris*'e mass 33% ulatuses madalam võrreldes noorte vaatlusalustega (Young et al., 1984) ning eakatel meesvaatlusalustel oli alajäsemete lihasmass oluliselt vähenenud, kuid samal ajal oli ülakeha lihasmass vanuse poolt vähemal määral mõjutatud (Candow & Chilibeck, 2005). Erinevat dünaamikat lihasmassi vähenemise ja jõunäitajate languse vahel põhjendavad uurijad närvi-lihasaparaadi düsfunktsiooni (Hook et al., 2001) ning langenud Ca^{2+} tundlikkusega (Hunter et al., 1999).

Lihaskude degeneratsioon on omakorda seotud α -motoneuronite degeneratsiooniga ning mootorsete ühikute hävimisega (Lexell et al., 1998; Marcell, 2003). Juba 1970-ndatel aastatel läbiviidud elektromüograafia-alased uuringud näitasid eakate skeetilihastes kuni 25% mootorsete ühikute hulga langust (Brown 1972; McComas et al., 1973). Lihaskude langusele suunatud uuringute kõrval on huvitavad eksperimendide tulemused, kus fookus on suunatud väsimustaluvusele sõltuvalt uurimisaluste vanusest ja soost. Nii on

uurijate poolt demonstreeritud, et eakatel vaatlusalustel on vaatamata jõunäitajate langusele säilinud hea võimekus väsimust taluda (Chung et al., 2007; Rubinstein & Kamen, 2005), kuid samas on kirjanduse andmed võrdlemisi konfliktised, mis võib olla tingitud meetoodilistest erinevustest lihaskontraktsiooni/-lõõgastumise protokollides, tahtelise või elektriliselt stimuleeritud lihastöö kasutamises ning võimalikes sugudevahelistes eripärades (Callahan et al., 2009; Wust et al., 2008).

On leitud, et vanemaealistel vaatlusalustel oli väsimustaluvus 50% maksimaalse tahtelise jõu tingimustes oluliselt parem võrreldes noorte vaatlusalustega ning elektriliselt esilekutsutud isomeetriliste kontraktsioonide puhul oli vanemaealiste naiste väsimustaluvus kõrgem kui samaealiste meesvaatlusaluste puhul (McPhee et al., 2014). Eeltoodud tulemuste mõnevõrra konfliktsele iseloomule toovad selgust uuringute tulemused, kus on näidatud, et kehalise võimekuse ja lihasmassi seosed avalduvad suhtelise, mitte absoluutse lihasmassi ja erinevate võimekuse liikide võrdluses (Bijlsma et al., 2013).

2. TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli selgitada vananemisega kaasnevate muutuste spetsiifikat eritüübiliste lihasrakkude tasemel.

Püstitatud eesmärgi täitmiseks seati järgmised ülesanded:

1. Määrata täiskasvanud ja vanade katseloomade tagajäsemete maksimaalse haardejõu näitajad.
2. Määrata täiskasvanud ja vanade katseloomade skeletilihaste sarkopeenia indeks.
3. Määrata täiskasvanud ja vanade katseloomade skeletilihaste eritüübiliste lihaskiudude morfoloogilised karakteristikud.

3. METOODIKA

3.1 Katse korraldus

Eksperimendid viidi läbi täiskasvanud (16-24 nädala vanused) ja vanadel (120-135 nädala vanused) *Wistar* liini rottidel, keskmise kehakaaluga vastavalt $402,5 \pm 10,2$ g ja $518,4 \pm 63,6$ g. Katseloomad viibisid kogu eksperimendi vältel identsetes keskkonnatingimustes: nad olid paigutatud puuridesse neljakaupa ning valguse- ja pimeduse tsükkel oli 12 h/12 h. Toitu ja vett said katseloomad *ad libitum*. Täiskasvanud ja vanade katseloomade kehakaalud kaaluti (täpsusega ± 1 g). Eksperimendid viidi läbi vastavalt Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi loomkatsete läbiviimise komisjoni loale nr. 48/2006, 17.02.06.

3.2 Protseduuri kirjeldus ja koeproovide eraldamine

Kõik loomad viidi lihaste eemaldamiseks narkoosi ja ohverdati ning eraldati järgmised lihased: *m. Soleus* (m. SOL), *m. Plantaris* (m. PLA), *m. Extensor digitorum longus* (m. EDL), lihased puhastati nähtavast rasvast ning sidekoest ja kaaluti (täpsusega ± 1 mg). Arvutati m. SOL, m. PLA, m. EDL suhteline lihaskaal (lihase ja kehakaalu suhe, mg/g). Histoloogilisteks uuringuteks kasutati katseloomadelt eraldatud lihaste (m. SOL, m. PLA, m. EDL) keskmise osa umbes 5 mm paksust tükki, mis fikseeriti korgil spetsiaalse kinnistiga *Tissue Tek O.C.T. Compound (Miles Inc, USA)*. Koetükk külmutati eelnevalt vedelas lämmastikus jahutatud isopentaanis ning säilitati edasisteks analüüsideks -80° C juures.

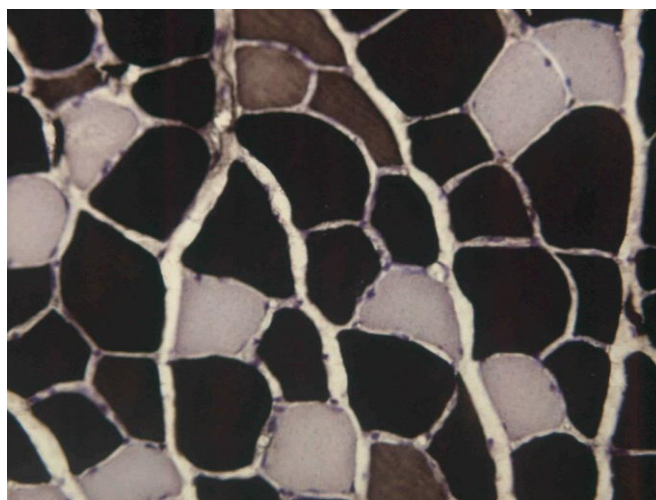
3.3 Histokeemia

Koeproovidest lõigati krüomikrotoomi abil $10 \mu\text{m}$ paksused lõigud, mida analüüsiti histokeemiliselt. Lihaskiud identifitseeriti vastavalt Brooke ja Kaiser (1970) modifitseeritud meetodil (Sakas et al., 2003) müosiini ATP-aasi (mATP) aktiivsuse värvusintensiivsuse hindamise alusel pärast eelinkubatsiooni kas happelises (pH 4,3) 5 minutit, toatemperatuuril või aluselises (pH 10,2) keskkonnas 25-30 minutit, 37° C juures. Inkubatsioonikeskkond oli järgmine: 40 mM glütsiini, 20mM CaCl_2 ja 2,5 mM ATP. Inkubatsiooni järel pesti lõike 3 korda (30 sek) 1% CaCl_2 lahusega. Värvus kutsuti esile 1% $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ lahusega (5sek), mis järel

lõike loputati 10 korda (30 sek) destilleeritud veega. Lõpuks värviti raku tuumad üle Mayeri 0,1 % hematoksüliiniga (inkubeerimise aeg 2 min 30 sek) ja pesti destilleeritud veega (5 sek). Preparaadid kuivatati toatemperatuuril.

Preparaatide säilitamiseks veetustati kasutades etanooli järgnevaid lahuseid (70% C₂H₅OH ja 100% C₂H₅OH, küüloom). Lihaskiud klassifitseeriti vastavalt tavapärastele kriteeriumitele: aeglased lihaskiud värvuvad happelises keskkonnas (pH=4,3) ja kiired lihaskiud värvuvad aluselises keskkonnas (pH=10,2).

Histoloogiliste preparaate analüüsil kasutati valgusmikroskoopi (Olympus BX-41), koos spetsiaalse digitaalse kaameraga (Colorview IIIu) ja analüüsi tarkvaraga (A'Cell, Olympus). Preparaate analüüsiti 200- ja 400-kordse suurendusega. Kvalitatiivsed histokeemilised uuringud viidi läbi lihase ristlõikepindalade analüüsil. Skeetilihase rakkude ristlõikepindalad grupeeriti sammuga 500 µm². Edasiste analüüside välistatavateks kriteeriumiteks oli denervatsioonist ja põletikust tingitud patoloogiliste tunnuste esinemine koepreparaatidel (Joonis 1).



Joonis 1. *M. plantaris*'e normaalfüsioloogiline koepreparaat, mATP-aasi värving, pH=10,2, suurendus 400x, heledalt värvunud rakud – aeglased, tumedalt värvunud rakud – kiired.

3.4 Statistiline töötlus

Katseloomade kehakaalu, lihaste kaalu ja alajäsemete haardejõu näitajate ja lihasraku tuumade hulga muutuste statistiline usaldusväärus hinnati Studenti t testi alusel, ristlõikepindalade jaotuse muutuste statistilist usaldusväärust hinnati Pearsoni χ^2 testi alusel ja sarkopeenia indeks on väljendatud kui lihaste kaal suhtestatuna kehakaaluga.

4. TÖÖ TULEMUSED

4.1 Sarkopeenia indeks ja muutused lihasjõus vananemisel

Meie tulemused näitasid, et uuritud skeletilihaste kaal vanade katseloomade (120-135 nädala vanused Wistar liini rotid) puhul on oluliselt suurem võrreldes täiskasvanud katseloomade (16-24 nädala vanused Wistar liini rotid) vastavate lihaste kaaluga. Samal ajal näitasid meie eksperimentide tulemused, et lihasmassi seisundi hindamine lihaste kaalude absoluutnäitajate alusel ei kajastu vananemise käigus asetleidvaid protsesse. Nii näitavad meie tulemused sarkopeenia indeksi kui uuritavate lihaste kaalu ja kehakaalu suhet, kui lihasmassi füsioloogilist olemust kajastava integraalse näitaja langust kõigi uuritavate skeletilihaste (m. PLA, m. EDL, m. SOL) puhul (Tabel 1).

Katseloomade tagajäsemete haardejõu näitajate analüüs näitas, et haardejõu absoluutnäitajate võrdluses vanade ja täiskasvanud katseloomade vahel olulisi erinevusi ei ilmnenud. Küll aga oli vanade katseloomade puhul statistiliselt olulisel määral langenud tagajäsemete suhteline haardejõud (Tabel 1).

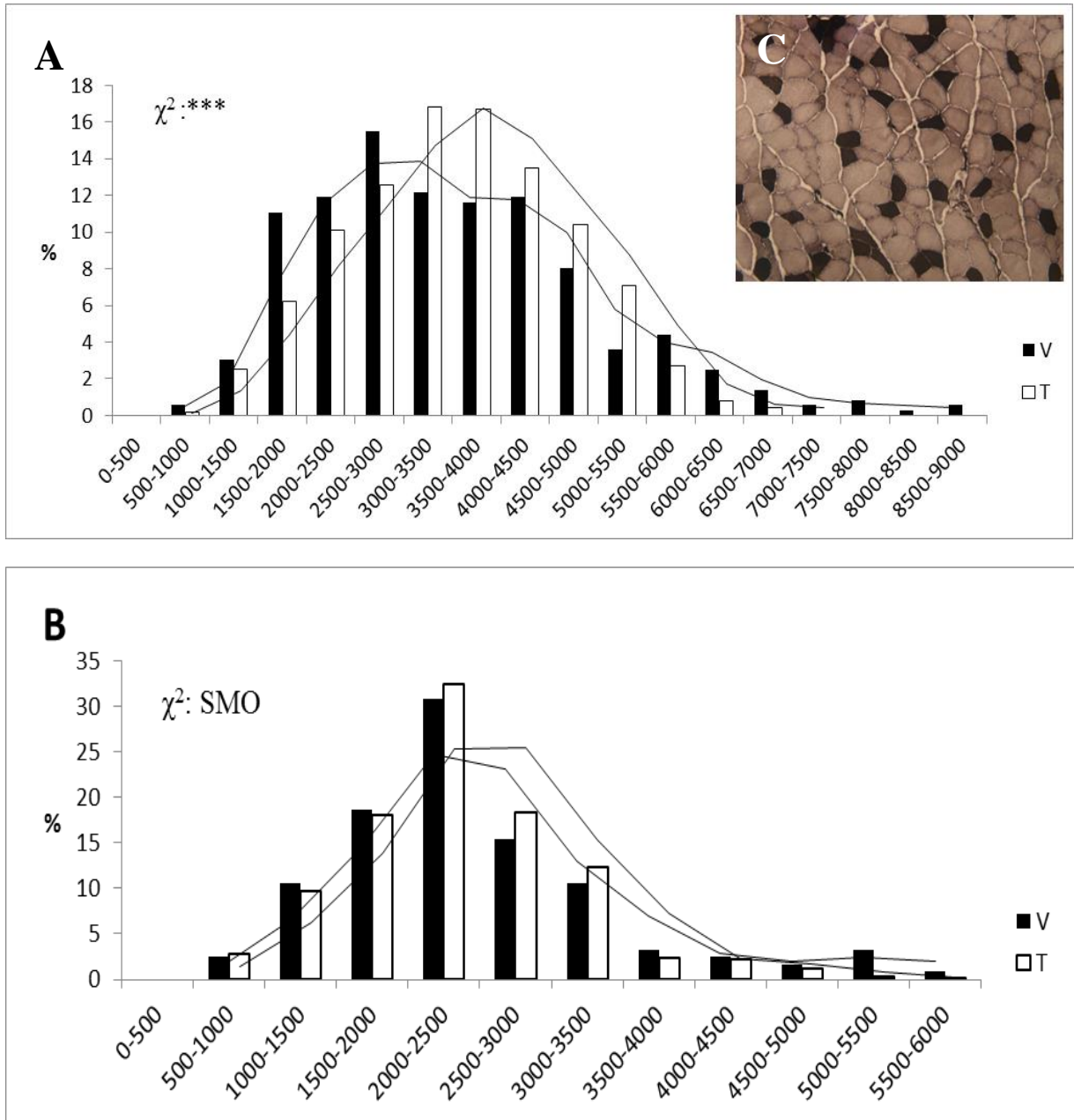
Tabel 1. Katseloomade kehakaal, tagajäsemete suhteline haardejõud ja *m. Plantaris*'e, *m. Soleus*'e, *m. Extensor digitorum longus*'e sarkopeenia indeks; $m \pm \bar{x}$; * $p < 0,05$.

	Kehakaal (g)	m. PLA (mg/g)	m. SOL (mg/g)	m. EDL (mg/g)	Jõud (kg)	Suhteline jõud (kg/kg)
Täiskasvanud n=5	402,5±10,2	0,97±0,008	0,41±0,013	0,48±0,011	1,06±0,035	2,65±0,109
Vanad n=5	518,4±63,6	0,78±0,064*	0,34±0,032*	0,40±0,024*	0,96±0,101	1,73±0,264*

4.2 Eritüübiliste lihasrakkude ristlõikepindalad täiskasvanud ja vanadel katseloomadel

Meie katsetulemused näitasid, et vananemise käigus toimub lihasatroofiale viitav skeetilihasrakkude ristlõikepindalade langus, on nii lihase- kui lihasraku tüübi spetsiifiline. Eksperimentide tulemused näitasid, et lihasrakkude ristlõikepindala langus on eelkõige kiirete lihaskiudude populatsioonis (m. PLA, m. EDL) (Joonis 2A, 4A). Meie tulemused kiire kokkutõmbe iseloomuga lihasrakkude kohta näitasid, et kui täiskasvanud katseloomade

lihases jagunesid lihasrakkude ristlõikepindalad valdavalt vahemikku 2500-5500 μm^2 (vastavalt 64,5 % lihasrakkude koguhulgast), siis vanade katseloomade puhul olid rakud ulatuslikumal määral esindatud pindalavahemikus 1500-4500 μm^2 (kogu rakkude hulgast 74,2 %) (Joonis 2A, 4A). Mõlema uuritud lihase m. PLA ja m. EDL kiirete kiudude ristlõikepindalade jaotuvuses ilmnis oluline nihe väiksema ristlõikepindalaga rakkude suunas (Joonis 2A ja 4A).



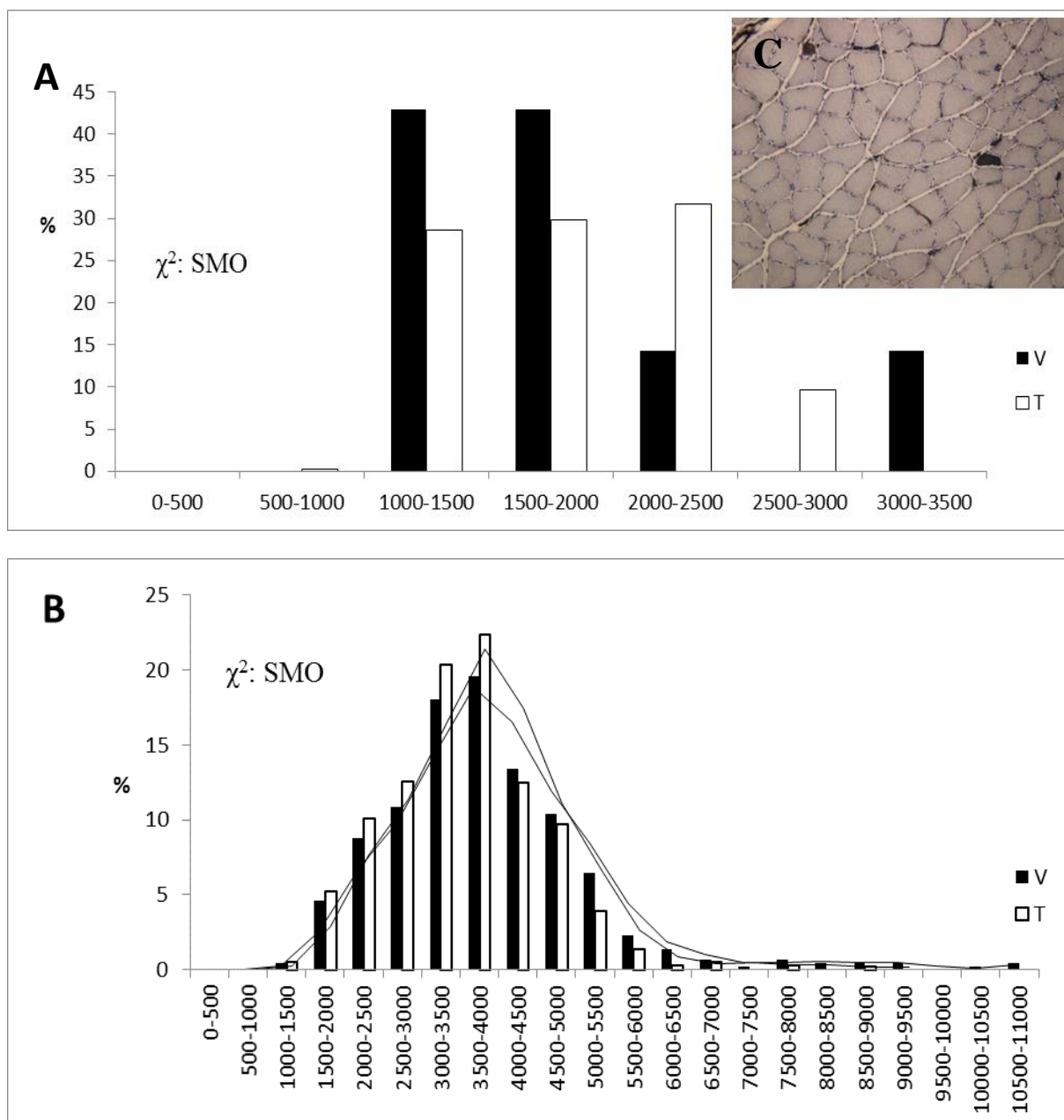
Joonis 2. *M. Plantaris*'e lihaskiudude ristlõikepindalade jaotuvused.

A – kiired lihaskiud, V- vanad, n=361; T- täiskasvanud, n=473; ***p<0,01.

B – aeglased lihaskiud; V, n=123; T, n=134; SMO - statistiliselt mitteoluline.

C – *m. Plantaris*'e koepreparaat mATP-aasi värving, pH=4,3, suurendus 200x.

Kiire iseloomuga lihaste (m. PLA ja m. EDL) aeglast tüüpi lihaskiudude ristlõikepindalad ja nende jaotuvuskõverad täiskasvanud katseloomade vahel oluliselt ei erinenud (Joonis 2B, 4B). M. PLA puhul jaotusid lihaskiud mõlemas uuritavas grupis ristlõikepindalade alusel jaotuskõvera vahemikku 1500-3500 μm^2 (vastavalt 75,6% ja 81,3% lihasrakkude koguhulgast). M. EDL'i puhul baseeruvad tulemused vähesel lihaskiudude arvu. Tulemused näitasid, et aeglase iseloomuga lihaskiud jagunesid ristlõikepindalade alusel vahemikku 500-1500 μm^2 vanade katseloomade puhul. Täiskasvanud katseloomade preparaate alusel jäid need vahemikku 1000-1500 μm^2 (Joonis 2B, 4B).



Joonis 3. *M. Soleus*'e lihaskiudude ristlõikepindalade jaotuvused.

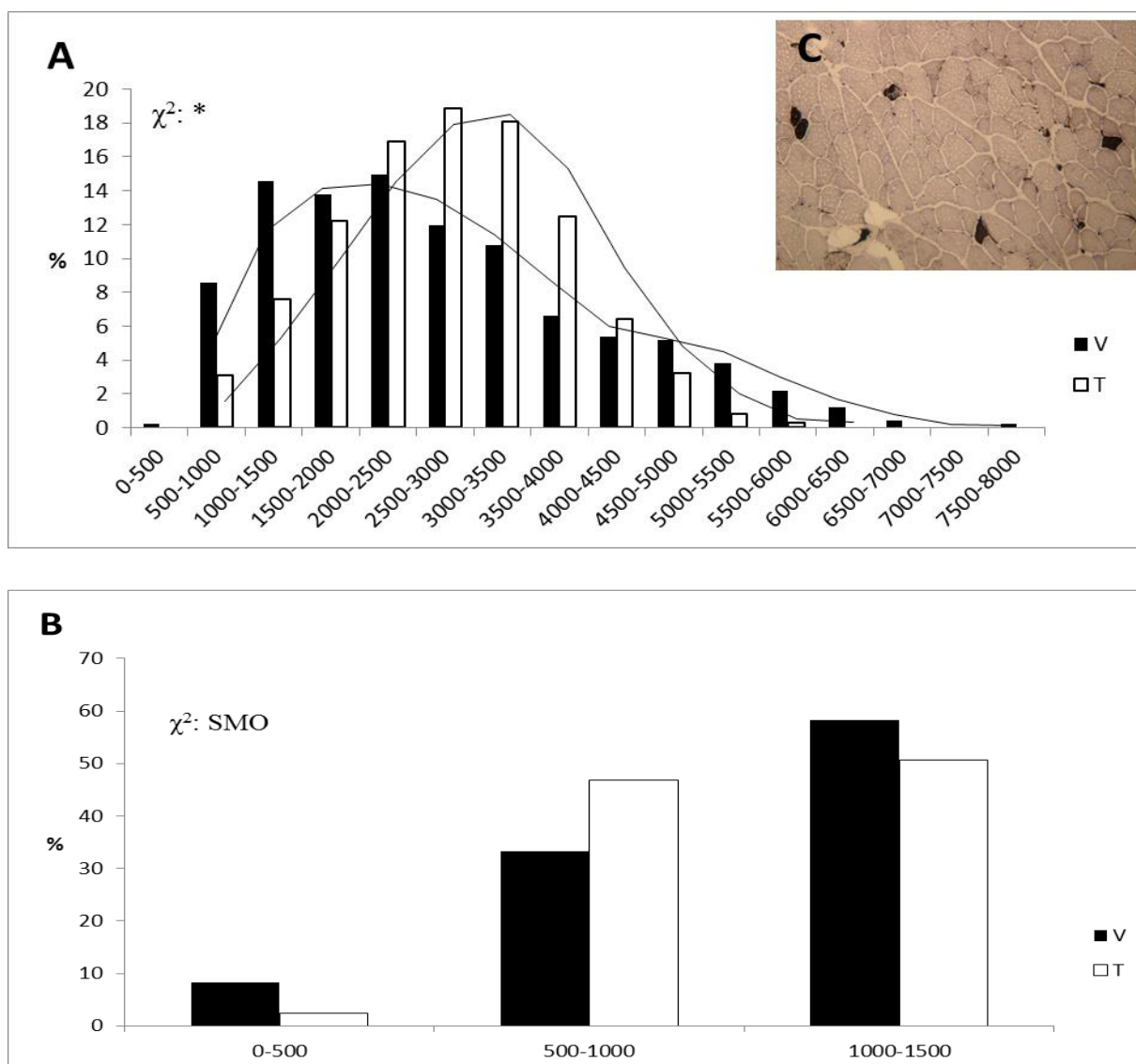
A – kiired lihaskiud, V- vanad, n=8; T- täiskasvanud, n=11; SMO - statistiliselt mitteoluline.

B – aeglased lihaskiud; V, n=433; T, n=397; SMO - statistiliselt mitteoluline.

C – *m. Soleus*'e koepreparaat mATP-aasi värving, pH=10,2, suurendus 200x.

Aeglase lihase (m. SOL) tasemel oli meie tulemuste põhjal vananemise protsesside mõju täheldatav kiire rakupopulatsiooni puhul lihaskiudude jaotuvuses ristlõikepindalade vahemikus 1000-2000 μm^2 vanadel ja vastavalt 1000-2500 μm^2 täiskasvanud katseloomadel (Joonis 3A). M. SOL aeglast tüüpi lihaskiudude puhul ristlõikepindalade alusel jaotuskõveras gruppidevahelisi erinevusi ei ilmnunud (Joonis 3B).

Muutused m. PLA ja m. EDL kiire kokkutõmbe iseloomuga lihaskiudude jaotuvuses olid statistiliselt olulised, m. SOL aeglase ja kiire kokkutõmbe iseloomuga lihasrakkude ning m. PLA ja m. EDL aeglaste lihasrakkude jaotuvuses statistiliselt olulisi muutusi ei täheldatud.



Joonis 4. *M. Extensor digitorum longus*'e lihasrakkude ristlõikepindalade jaotuvused.

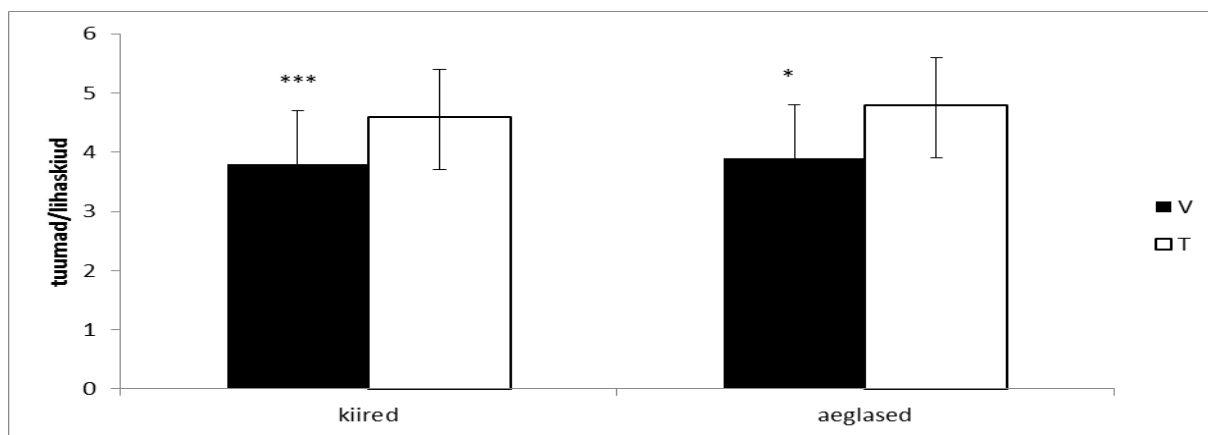
A – kiired lihaskiud V- vanad, n=500; T- täiskasvanud, n=427; *p<0,05.

B – aeglaste lihaskiud; V, n=12; T, n=14; SMO - statistiliselt mitteoluline.

C – *m. Extensor digitorum longus*'e koepreparaat mATP-aasi värving, pH=4,3, suurendus 200x.

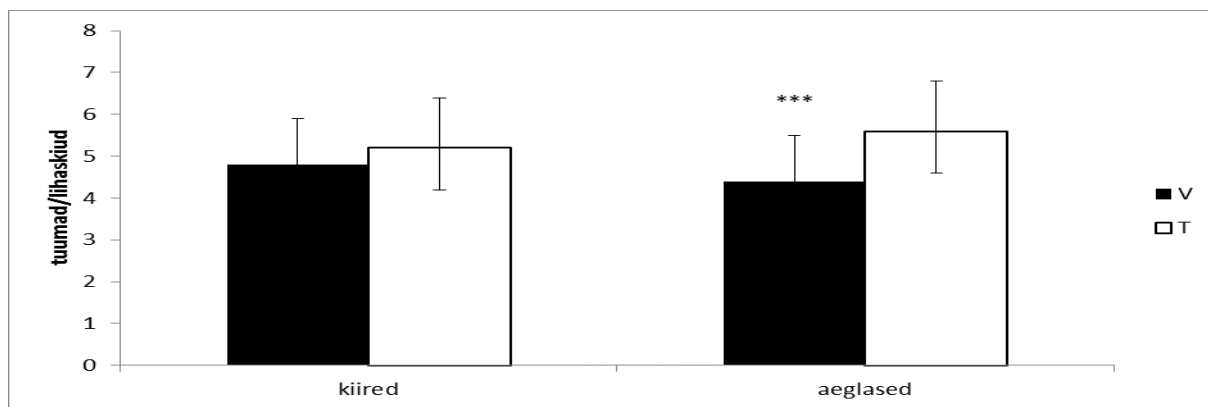
4.3 Vananemisega kaasnevad muutused lihasrakkude tuumapopulatsioonis ja lihastuuma domeenis

Läbiviidud histokeemiliste uuringute tulemused näitasid, et vananemise käigus toimub lihasraku tuumade hulga (analüüsid lähtudes tuumade arvust lihasrakkude ristlõikepindala kohta) langus. Meie uuringute tulemuste alusel olid tuumapopulatsiooni muutuste suhtes tundlikumad kiire kokkutõmbe iseloomuga lihaskiud (m. PLA; Joonis 5; m. EDL, Joonis 6).

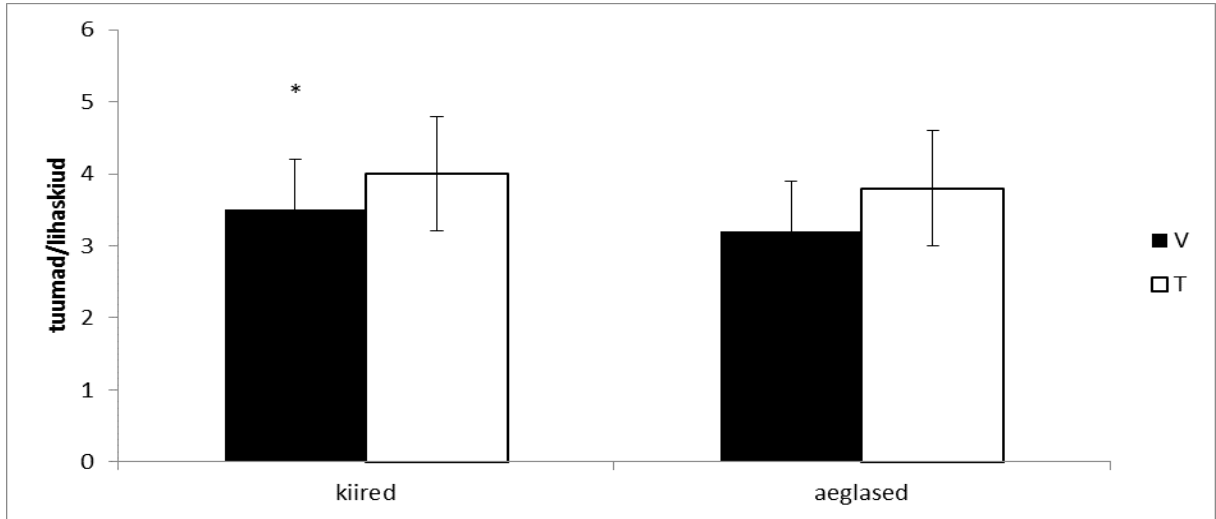


Joonis 5. *M. Plantaris*'e lihasraku tuumade arv lihaskiu ristlõikepindala kohta. V- vanad, T- täiskasvanud; * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$.

Uuritud lihaste omavahelisel võrdlusel ilmnes, et m. PLA puhul oli kiiretes lihaskiududes asetleidva tuumade hulga languse kõrval statistiliselt oluline langus ka aeglase kokkutõmbe iseloomuga lihaskiudude populatsioonis (Joonis 5). M. EDL'i puhul oli meie katsetulemustele toetudes lihasraku tuumade hulk langenud ainult kiire iseloomuga lihaskiududes (Joonis 7). M. SOL'e eritüübiliste lihasrakkude puhul näitasid meie eksperimentide tulemused tuumapopulatsiooni langust aeglase iseloomuga lihaskiudude populatsioonis (Joonis 6).

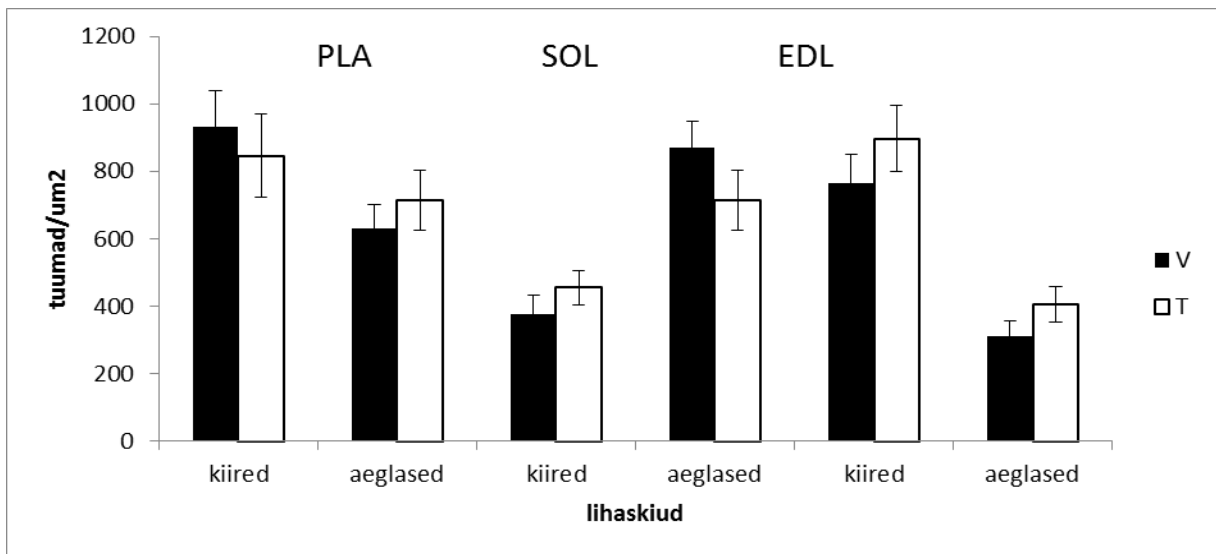


Joonis 6. *M. Soleus*'e lihasraku tuumade arv lihaskiu ristlõikepindala kohta, V- vanad, T- täiskasvanud; *** $p < 0,01$.



Joonis 7. *M. Extensor digitorum longus*'e lihaskiudade arv lihaskiud ristiõikepindala kohta, V- vanad, T- täiskasvanud; * $p < 0,05$.

Lihasmassi kasvu- ja ainevahetuspotentsiaali kajastav arvutuslik näitaja – lihastuuma domeeni konstantsuse printsiip säilib meie katsetulemustele toetudes vananevas skeletilihases (Joonis 8). Tulenevalt ulatuslikumast tuumade hulga langusest *m. SOL* aeglase iseloomuga lihaskiududes, näitas lihastuuma domeeni suurus meie eksperimentis tendentsi tõusule.



Joonis 8. *M. Plantaris*'e, *m. Extensor digitorum longus*'e, *m. Soleus*'e lihastuuma domeeni suurus. V- vanad, T- täiskasvanud.

5. TULEMUSTE ARUTELU

Vananemise käigus kaotavad inimesed ligikaudu 1/3 oma lihaskoe massist läbi protsesside, mida kirjeldatakse kui sarkopeeniat (Rosenberg, 1997) või seniilset lihasatroofiat. Lihasmassi vähenemise aluseks võib olla nii lihasrakkude hulga kui nende mõõtmete vähenemine või mõlemad degeneratiivsed protsessid korraga ning oluline on märkida, et lihasatroofiaga kaasnev jõuvõimekuse languse dünaamika on atroofia kujunemisprotsessidega võrreldes ulatuslikum (Goodpaster et al., 2006). Sarkopeenia on oma olemuselt progresseeruva iseloomuga ning võrreldes teiste lihasatroofia liikidega kauakestev. Samuti on jätkuvalt ebaselge, kui suur roll on vananemise käigus asetleidvate funktsionaalsete võimete langusel sarkopeenia edasisel forsseerumisel. Meie tulemused näitasid, et katseloomade tagajäsemete suhteline haardejõud (jõud suhtestatud kehamassiga) on vanadel katseloomadel langenud ca 45% ulatuses võrreldes täiskasvanud katseloomadega. Samas langes meie eksperimentides ka oluliselt uuritud üksikute skeetilihaste kaal kehakaalu suhtes, kuid võrreldes jõunäitajate langusega oli lihasmassi langus väljendunud vähesemal määral. Meie katsetulemused kinnitavad varem leitud, et struktuursete komponentide degeneratsiooni ja funktsionaalsete võimete languse dünaamika ning ulatus erinevad üksteisest olulisel määral. Katsetulemuste kirjeldamise oluliseks limiteerivaks faktoriks on jõunäitajate kajastamine tagajäsemete kohta summaarselt. Meie poolt kasutatud uurimismetoodika ei võimalda eristada jõunäitajaid üksikute lihaste tasemel, mis samas annaks täpsemat informatsiooni vananemisega kaasnevate muutuste kohta jõugenererimisvõimes, kuna tagajäsemete lihased/lihaskiud on erineva kokkutõmbe iseloomuga. Inimuuringutes on näidatud nii funktsionaalse võimekuse kui ka morfoloogiliste protsesside tasemel vananemisest tingitud suuri erinevusi sõltuvalt uuritavate lihaste lokalisatsioonist (Kadi et al., 2004; Petrella et al., 2006). Samal ajal on inimeste skeetilihaste lihaskiutüüpide esindatus märksa heterogeensem ülesehitusega võrreldes laboratoorsete katseloomadega, kus lihaskiu tüüpide esindatus konkreetsetes lihastes on homogeensem. Nimetatud olude valguses on täpsema informatsiooni saamiseks vajalikud uuringud skeetilihase üksikute lihaskiudude tasandil.

Varasemad uuringud on veenvalt näidanud, et vananevas organismis asetleidev lihasmassi langus toimub läbi üksikute lihasraku mõõtmete vähenemise (Larsson, 1978). Samas on erinevad uurijad näidanud, et sarkopeenia indeks on seotud nii uuritavate lihaste kontraktsiooniomaduste kui ka lihases esindatud lihaskiu tüüpidega. Tulenevalt skeetilihaskoe heterogeensest ehitusest on erinevate uurijate poolt saadud andmed teaduskirjanduses ka mõneti ebaselged ja vastukäivad. Suuremal määral on uurijad üksmeelel,

et vananevas organismis on enam mõjutatud kiire kokkutõmbe iseloomuga lihaskiud (Brooks et al., 2009), samas kirjanduses on piisavalt andmeid aeglase iseloomuga skeletilihaste ja lihaskiudude atrofeerumise kohta vananevas lihaskoes (Edström & Ulfhake, 2005). Meie eksperimentide tulemused vanadel katseloomadel (Wistar liini rotid) näitasid, et lihasatroofia väljendub eelkõige m. PLA ja m. EDL kiire iseloomuga lihaskiutüübi populatsioonis. Vanade katseloomade kiirete lihaskiudude ristlõikepindalade jaotuvuskõverate võrdluses täiskasvanud loomadega ilmnes statistiliselt oluline nihe väiksema ristlõikepindalaga rakkude suunas ning suurenes heterogeensus rakkude suuruses. Meie tulemused näitasid, et lihasatroofia arengule suunatud protsesside korral tõusis uuritavates lihastes ülemääraselt suurte (ristlõikepindalad üle $6500 \mu\text{m}^2$) lihasrakkude arv. Ülemäärase ristlõikepindalaga rakkude esinemine on meie arvates mitte hüpertroofia protsesside väljendus, vaid lihasatroofia arenguga kaasnev patoloogiline reaktsioon, mida tuleb pidada „pseudohüpertroofiaks“. Kiirete lihaste aeglase lihaskiudude ristlõikepindalade analüüsil statistiliselt olulisi kõrvalekaldeid võrreldes täiskasvanud katseloomade vastavate andmetega rakkude suuruse jaotuvuses ei ilmnunud ning samuti ei näidanud tulemused lihasrakkude mõõtmete heterogeensus suurenemist. Vanade ja täiskasvanud katseloomade aeglase iseloomuga (m. SOL) lihase aeglastes lihaskiududes olulisi erinevusi raku suuruse jaotuvuses ei ilmnunud. Eksperimentide tulemused aeglase lihase (m. SOL) kiire iseloomuga rakupopulatsiooni kohta lubavad spekuloida tendentsi kiirete rakkude atroofia suunas, kuid limiteerivaks teguriks on siinjuures väike kiirete rakkude arv aeglases lihases (Joonis 3A). Sarnane tulemuste interpretatsiooni limiteeriv faktor ilmnes m. EDL aeglase lihaskiudude analüüsil (Joonis 4B).

Vananemise käigus asetleidev progresseeruva iseloomuga lihasatroofia on oma olemuselt otseselt seotud lihasrakkude ainevahetuse muutustega skeletilihastes (Pehme et al., 2004). Lihasrakkude ainevahetus ja muutused selles on omakorda kontrollitud ning reguleeritud rakutuumades toimuvate protsesside poolt. Täiskasvanud skeletilihasrakud on postmitootilises seisundis ning tuumade hulga regulatsioon ja rakkude elutegevuse juhtimine toimub läbi müogeensete satelliitrakkude (Mauro 1961; Moss & LeBlond, 1970; 1971). Oma uurimistöös seadsime eesmärgiks uurida skeletilihasrakkude tuumapopulatsiooni reaktsioone vananemise tingimustes ning seoseid lihasatroofia arenguga läbi lihastuumade domeeni suuruse. Teaduskirjanduse andmed näitavad, et aeglase iseloomuga skeletilihasrakkudes on raku tuumade hulk suurem võrreldes kiirete lihaskiududega (Hikida et al., 1997). Meie oma uuringutulemustes olulist erinevust kiirete ja aeglase lihaskiudude võrdlusel rakutuumade arvus ei täheldanud. Vasturääkivusel lihastuumade arvus meiepoolse uuringu ja seni avaldatute vahel võivad olla tingitud nii uurimisobjekti spetsiifikast (segalihased, domineeriva

kiutüübiga lihased), kui ka uurimismetoodikast (kiutüüpide määramise meetoodika, tuumade markeerimise meetoodika). Samas näitasid meie eksperimentide tulemused lihasraku tuumade hulga langust uuritud skeetilihastes (m. PLA, m. SOL, m. EDL) domineeriva lihaskiu tüübi puhul. Nii langes tuumade arv kiiretes lihaskiududes m. PLA ja m. EDL puhul ning aeglastes lihaskiududes m. SOL puhul. Meie eksperimentide tulemustel langes usaldusväärselt ka tuumade hulk m. PLA aeglase iseloomuga lihaskiududes. Meie eksperimendi puhul on tulemuste interpreteerimisel limiteerivaks teguriks lihaskiudude tüpiseerimine kahte peamisse kiutüüpi – kiireteks ja aeglasteks, mis ei luba hinnata tuumade arvu kiirete lihaskiudude alatüüpide tasemel. Samas on kiirete lihaskiudude alatüüpidesse tüpiseerimine kantud erinevatest meetoodilistest aspektidest, mille tulemusena võib uuringute tulemuste esitamine viia ebatäpsete järeldusteni. Teiseks oluliseks uuringutulemuse selgitamise piiravaks faktoriks on vähene mitte-domineerivate lihaskiudude arv uuritud lihastes. Meie läbiviidud katsetest moodustas aeglaste lihaskiudude populatsioon kiire iseloomuga lihases (m. EDL, m. PLA) ainult ca 3,2% täiskasvanud ja 2,3% vanade katseloomade uuritud rakkude koguhulgast. Sarnaselt mõjutab uurimistulemusi ja nende interpreteerimist vähene kiirete rakkude hulk aeglase iseloomuga lihases (m. SOL) (vastavalt ca 1,7% täiskasvanud ja ca 2,6% vanade katseloomade puhul).

Kirjanduses on avaldatud andmed, et vananemisega kaasnev lihasatroofia võib areneda olulise muutuseta lihasraku tuumade arvukuses (Petrella et al., 2006), samas on varem ka näidatud hoopis lihasraku tuumade arvukuse tõusu vananemisel (Kadi et al., 2004; Verdijk et al., 2007). Andmete vastukäivus võib olla põhjendatud võrdlemisi väikese arvu uuringutega, mis lähtuvad lihasraku tüüpide spetsiifikast ning lihaste domineeriva mittedomineeriva rakutüübi kallutatud vahekorra. Kui varasemad uuringud näitavad, et vananemisprotsesside poolt on enam mõjutatud kiire kokkutõmbe iseloomuga lihaskiud (Noir, 2004; Pehme et al., 2004), siis meie eksperimentide tulemuste alusel langes tuumade arv ka aeglase lihase (m. SOL) aeglastes lihaskiududes. Kuna hulktuumsetes kontrollib üksik raku tuum mõttelist ruumala tsütoplastmast, siis on rakkude mõõtmete ja tuumade arvukuse seostamisel kasutusele võetud arvutuslik mõiste lihastuuma domeen (Edgerton & Roy, 1991), mis normaalfüsioloogilistes tingimustes on konstantse iseloomuga. Küll aga on kirjanduse andmetel leitud muutusi lihastuuma domeeni suuruses erinevates, valdavalt patoloogilistes eksperimentaalsetes tingimustes. Lihasraku tuumade arvukuse ja sarkopeenia indeksi omavaheline seostamine lihastuuma domeeni kaudu annab uurijatele hea võimaluse esile tuua eripärasid kohanemisprotsesside dünaamikas. Uuringud on näidanud, et funktsionaalse aktiivsuse langusest tingitud atroofiaga kaasneb lühiajalises dünaamikas lihastuuma domeeni

suuruse langus, mis viitab selgelt lihasrakkude ristlõikepindalade tasemel toimuvate degeneratiivsete muutuste intensiivsemale dünaamikale (Hikida et al., 1997). Valdavalt on kirjanduses toodud andmete alusel muutusi lihastuumade domeeni suuruses demonstreeritud lühiajaliste (kestvusega kuni 3 nädalat) kohanemisprotsesside dünaamikas. Meie katsete tulemustel muutusi lihastuumade domeenis uuritavate skeletilihaste eritüüpiliste kiupopulatsioonide puhul ei täheldatud. M. SOL aeglase iseloomuga lihaskiudude (lihases domineeriv) puhul lubavad meie eksperimentide tulemused spekulatsioonid lihastuumade domeeni suuruse tõusu üle, mille aluseks on oluline tuumade arvukuse langus vastavates lihaskiududes (Joonised 6 ja 8). Valdav enamik kirjanduses avaldatud andmetest ning samuti käesolevas töös kajastatud tulemustest lähtuvad lihastuumade domeeni ning tuumade hulga analüüsil saadud summaarsetest andmetest, mis ei kirjelda piisava informatiivsusega kohanemisprotsesse vastavalt lihasrakkude ristlõikepindalade jaotuvusele. Meie tulemused näitavad, et vananemise käigus leiab lisaks lihasrakkude atroofia arenemisele paralleelselt aset ka üksikute lihasrakkude mõõtmete ulatuslik suurenemine, mis summeerituna võib viia eksperimentide tulemuste vastukäivale käsitlusele. Meie andmed näitavad erinevusi lihastuumade domeeni suuruses kiire ja aeglase iseloomuga lihaskiudude omavahelises võrdluses uuritavates lihastes (Joonis 8), kuid arvestades mittedomineerivate lihaskiudude väikest esindatust vastavates lihastes ei anna tulemused alust spekulatsioonid lihastuumade domeeni suuruse usaldusväärsete erinevuste üle.

6. JÄRELDUSED

Meie töö tulemuste põhjal saame teha järgmised järeldused:

1. Vanadel katseloomadel tagajäsemete haardejõud kehamassi suhtes on madalam võrreldes täiskasvanud katseloomadega.
2. Vanade katseloomade skeletilihaste suhteline kaal on madalam võrreldes täiskasvanud katseloomade skeletilihaste suhtelise kaaluga.
3. Skeletilihase rakkude atroofia väljendub vananemisel kiire iseloomuga lihastes kiire lihasraku tüübi populatsioonis. Aeglase iseloomuga rakupopulatsioonis vananemine atroofiale suunatud muutusi esile ei kutsunud.
4. Tuumade hulk langes vananemisel kiire iseloomuga skeletilihases kiiret tüüpi rakupopulatsioonis ja aeglase iseloomuga skeletilihases aeglast tüüpi rakupopulatsioonis. Uuritud skeletilihaste eritüübilistes lihaskiududes säilib vananemisel lihastuuma domeeni suuruse konstantsus.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Bijlsma AY, Meskers CG, van den Eshof N, Westendorp RG, Sipilä S, et al. Diagnostic criteria for sarcopenia and physical performance. *Age*. 2014;36:275–285.
2. Brack, AS, Bildsoe, H. and Hughes, SM. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci*. 2005;118:4813-4821.
3. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: How many and what kind. *Arch Neurol*. 1970;23:369-379.
4. Brooks NE, Scuenke MD and Hikida RS. Ageing influences myonuclear domain size differently in fast and slow skeletal muscle rats. *Acta Physiol*. 2009;197:55-63.
5. Brown WF. A method for estimating the number of motor units in the thenar muscle and the changes in motor unit count with aging. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1972;35(6): 845-852.
6. Callahan DM, Foulis SA, Kent-Braun JA. Age-related fatigue resistance in the knee extensor muscles is specific to contraction mode. *Muscle Nerve*. 2009;39:692-702.
7. Candow DG, Chilibeck PD. Differences in size, strength, and power of upper and lower body muscle groups in young and older men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60(2):148-156.
8. Chung LH, Callahan DM, Kent-Braun JA. Age-related resistance to skeletal muscle fatigue is preserved during ischemia. *J Appl Physiol*. 2007;103:1628-1635.
9. Clark BC, Manini TM. Sarcopenia \neq dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63:829–834.
10. Clark BC, Manini TM, Functional consequences of sarcopenia and dynapenia in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(3):271-276.
11. Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, et al. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(6):1579-1585.
12. Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle Nerve*. 2006;33(2):242-253.
13. Edgerton, VR and Roy, RR. Regulation of skeletal muscle fiber size, shape and function. *J Biomech*. 1999;124:123-133.

14. Edström E, Ulfhake. Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*. 2005;4:65-77.
15. Ferruci L, Harris TB, Guralnik JM, Tracy RP, Corti MC, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older person. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47:639-646.
16. Foldvari M, Clark M, Laviolette LC, Bernstein MA, Kaliton D, et al. Association of muscle power with functional status in community-dwelling elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000;55(4):M192-199.
17. Frontera WR, Hughes VA, Lutz KT, Evans WJ. A cross-sectional study of muscle strength and mass in 45-78 year old men and women. *J Appl Physiol*. 1991;71(2):644-650.
18. Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, et al. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61:1059-1064.
19. Gibson, MC and Schultz E. Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve*. 1983;6:574-580.
20. Gundersen, K and Bruusgaard JC. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J Physiol*. 2008;586:2675-2681.
21. Hall, ZW and Ralston E. Nuclear domains in muscle cells. *Cell*. 1989;59:771-772.
22. Hall DT, Ma JF, Marco SD, Gallouzi IE. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. *Aging (Albany NY)*. 2011;3:702-715.
23. Hikida RS, Van Nostran S, Murray JD, Staron RS, Gordon SE et al. Muonuclear loss in atrophied soleus muscle fibres. *Anat Rec*. 1997;247:350-354.
24. Hikida RS, Walsh S, Barylski N, Campos G, Hagerman FC and Staron RS. Is hypertrophy limited in elderly muscle fibers? A comparison of elderly and young strength trained men. *Basic Appl Myol*. 1998;8:419-427.
25. Hikida RS, Staron RS, Hagerman FC, Walsh S, Kaiser E, et al. Effects of high-intensity resistance training on untrained older men, II. Muscle fiber characteristics and nucleocytoplasmic relationship. *J Gerontol*. 2000;55A:B347-B354.
26. Hook P, Siramoju V, Larsson L. Effects of aging on actin sliding speed on myosin from single skeletal muscle cells of mice, rats and humans. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280:C782-C788.
27. Hunter SK, Thompson MW, Ruell PA, Harmer AR, Thom JM, et al. Human skeletal sarcoplasmic reticulum CA^{2+} uptake and muscle function with aging and strength training. *J Appl Physiol*. 1991;86(6):1858-1865.

28. Kaasik P, Umnova M, Pehme A, Aru M, Selart A, et al. Ageing and dexamethasone associated sarcopenia: peculiarities of regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;105(1-5):85-90.
29. Kadi F, Thornell LE. Concomitant increases in myonuclear and satellite cell content in female trapezius muscle following strength training. *Histochem Cell Biol.* 2000; 113: 99-103.
30. Kadi F, Johansson F, Johansson R, Sjöström M and Hendriksson J. Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochem Cell Biol.* 2004;121:329-334.
31. Larsson L. Histochemical characteristics of human skeletal muscle during ageing. *Acta Physiol Scand (Suppl.)*. 1978;457:1-36.
32. Lexell L, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fibre types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83- year-old men. *J Neurol Sci.* 1988;84:275-294.
33. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961;9:493-495.
34. Manini TM, Clark BC. Dynapenia and aging: an update. *J Gerontol A Biol Sci.* 2012;67(1):28-40.
35. Marcell TJ. Sarcopenia: causes, consequences and preventions. *J Gerontol A Biol Med Sci.* 2003;56(10): M911:916.
36. McComas AJ, Upton AR, Sica RE. Motorneurone disease and ageing. *Lancet.* 1973;2:1477-1480.
37. McPhee JS, Maden-Wilkinson TM, Narici MV, Jones DA, Degens H. Knee extensor fatigue resistance of young and older men and women performing sustained and brief intermittent isometric contractions. *Muscle Nerve.* 2014;50: 393-400.
38. Moore DK, Atherton PJ, Rennie MJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Resistance exercise enhances mTOR and MAPK signalling in human muscle over that seen at rest after bolus protein ingestion. *Acta Physiol.* 2011;201:365-372.
39. Moss FP, Leblond CP. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol.* 1970;44:459-462.
40. Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscle of growing rats. *Anat Rec.* 1971;170:421-435.
41. Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:953-963.

42. Newman AB, Kupelian V, Visser M, Simonsick EM, Goodpaster BH, et al. Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2006; 61:72–77.
43. Nnodim JO. Satellite cell numbers in senile rat levator ani muscle. *Mech Ageing Dev.* 2000;112:99-111.
44. Ohira Y, Yoshinaga T, Ohara M, Nonaka I, Yoshioka T, et al. Myonuclear domain and myosin phenotype in human soleus after bed rest with or without loading. *J Appl Physiol.* 1999;87:1776-1785.
45. Pehme A, Alev K, Kaasik P, Seene T. Age related changes in skeletal-muscle myosin heavy-chain composition: effect of mechanical loading. *J Aging Phys Act.* 2004;12(1):29-44.
46. Phillips SK, Woledge RC, Bruce SA, Young A, Levy D, et al. A study of force and cross-sectional area of adductor pollicis muscle in female hip fracture patients. *J Am Geriatr Soc.* 1998;46(8):999-1002.
47. Petrella JK, Kim J, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E937-E946.
48. Riso E-M, Ahtikoski AM, Takala TES, Seene T. The effect of unloading and reloading on the extracellular matrix in skeletal muscle: changes in muscle strength and motor activity. *Biol Sport.* 2010;27(1):89-94.
49. Roth SM, Martel GF, Ivey FM, Lemmer JT, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Skeletal muscle satellite cell populations in healthy young and older men and women. *Anat Rec.* 2000;260:351-358.
50. Rosenberg IH. Sarcopenia: and clinical relevance. *J Nutr.* 1997;127:990S-991S.
51. Rubinstein S, Kamen G. Decreases in motor unit firing rate during sustained maximal-effort contractions in young and older adults. *J Electromyogr Kinesiol.* 2005;15:536-543.
52. Sakkas GK, Ball D, Mercer T, Naish, PF. An alternative histochemical method to simultaneously demonstrate muscle nuclei and muscle fibre type. *European J Appl Physiol.* 2003;89(5):503-505.
53. Seene T, Umnova M, Kaasik P, Alev K, Pehme A. Overtraining Injuries in Athletic Population. In: Tiidus editor. *Skeletal Muscle Damage and Repair.* Champaign (IL):Human Kinetics. 2008;173–184;305–307.
54. Seene T, Kaasik P, Umnova M. Structural rearrangements in contractile apparatus and resulting skeletal muscle remodelling: effect of exercise training. *J Sports Med Phys Fitness.* 2009;49(4):410-423.

55. Seene T, Pehme A, Alev K, Kaasik P, Umnova M, et al. Effects of resistance training on fast- and slow-twitch muscles in rats. *Biol Sport*. 2010;27(3):221-229.
56. Seene T, Kaasik P, Riso E-M. Review on aging, unloading and reloading: Changes in skeletal muscle quantity and quality. *Arch Gerontol Geriatr*. 2012;32(12):905-11.
57. Zhong H, Roy RR, Siengthai B, Edgerton VR. Effects of inactivity on fiber size and myonuclear number in rat soleus muscle. *J Appl Physiol*. 2005;99:1494-1499.
58. Thornell LE, Lindstrom M, Renault V, Maouly V, Butler-Browne GS. Satellite cells and training in the elderly. *Scand J Med Sci Sports*. 2003;13:48-55.
59. Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HHCM, et al. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1): E151-157.
60. Visser M, Pahor M, Dennis R, Taaffe DR, Goodpaster BH, et al. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α with muscle mass and muscle strength in elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2002;57:M326-M332.
61. Visser M, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Newman AB, Nevitt M, et al. Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60:324-333.
62. Visser M. Towards a definition of sarcopenia--results from epidemiologic studies. *J Nutr Health Aging*. 2009;13:713-716.
63. Wust RC, Morse CI, de Haan A, Jones DA, Degens H. Sex differences in contractile properties and fatigue resistance of human skeletal muscle. *Exp Physiol J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;93:843-850.
64. Yarasheski KE. Exercise, aging and muscle protein metabolism. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58(10):M918-922.
65. Young A, Stokes M, Crowe M. Size and strength of the quadriceps muscles of old and young women. *Eur J Clin Invest*. 1984;14:282-287.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Martiina Niilits

(sünnikuupäev: 29.06.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Morfoloogilised muutused skeletilihaskoe eritüübilistes lihaskiududes sarkopeenia puhul,

mille juhendajateks on Priit Kaasik ja Eva-Maria Riso,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärk kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 20.05.2015