

AUTONOMISEN HERMOSTON
TOIMINNAN JA TELOMEERIEN
PITUUDEN VÄLINEN YHTEYS TYYPIN 2
DIABETEKSEN RISKIRYHMÄSSÄ

Markus Takkunen
Opinnäytetyö
Lääketieteen koulutusohjelma
Itä-Suomen yliopisto
Kliinisen ravitsemustieteen yksikkö
Kesäkuu 2011

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen koulutusohjelma

Takkunen, Markus Juhani: Autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välinen yhteys tyypin 2 diabeteksen riskiryhmässä

Opinnäytetyö, 28 sivua

Opinnäytetyön ohjaajat: professori Matti Uusitupa ja tutkijatohtori Vanessa de Mello-Laaksonen

Kesäkuu 2011

Tiivistelmä

Tässä tutkimuksessa selvitettiin kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välistä yhteyttä Finnish Diabetes Prevention Study -tutkimuksen (DPS) aineiston pohjalta. Tutkimushypoteesina oli, että lyhyet telomeerit ovat yhteydessä heikentyneeseen autonomisen hermoston toimintaan. Asiaa ei ollut tiettävästi tutkittu aiemmin.

Yhteensä 206:lta alkuperäiseen tutkimukseen (DPS) osallistuneelta, jotka olivat osallistuneet kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toimintaa mittaaviin kokeisiin, oli määritetty telomeerien pituudet valkosoluista. Telomeerien pituudet oli määritetty käyttämällä qPCR-menetelmää (*quantitative real-time PCR*) ja tulokseksi oli saatu telomeerien pituutta kuvaava T/S-suhde. Parasympaattisen hermoston toimintaa oli tutkittu syväänhengityskokeella ja tulos oli muutettu sykevaihdelua kuvaavaksi E/I-suhteeksi. Sympaattisen hermoston toimintaa oli tutkittu aktiivisella ortostaattisella kokeella, jossa mitattiin verenpaineen muutosta seisomaan noustessa.

Aiemman tutkimuksen perusteella tiedettiin, että kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston häiriöt ovat yleisiä DPS-tutkimukseen osallistuneilla tyypin 2 diabetekseen alttiilla henkilöillä – tämän tutkimuksen aineistossa 23,8 prosentilla oli parasympaattinen dysfunktio ja sympaattinen dysfunktio oli puolestaan 8,3 prosentilla. Parasympaattisen hermoston toiminnan heikkenemisen tiedettiin olevan yhteydessä suurempaan painoon mutta ei suurempaan seerumin paastoglukoosipitoisuuteen.

E/I-suhde ei ollut yhteydessä telomeerien pituuteen, eikä parasympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä ollut ”terveitä” lyhyempiä telomeereja. Sympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä telomeerit olivat hiukan lyhyemmät kuin ”terveillä” ($p=0,041$). T/S-suhteen keskiarvo oli 12,5 prosenttia suurempi ”terveillä” kuin sympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä. Systolisen verenpaineen nousu ortostaattisessa kokeessa korreloi positiivisesti pitempien telomeerien kanssa ($r=0,147$, $p=0,036$). Vastaava korrelaatio oli selvempi, kun otettiin huomioon vain ne henkilöt, joilla autonomisen hermoston toimintaa mitanneiden tutkimusten ja telomeerinäytteen ottamisen välillä oli alle vuosi ja jotka kuuluivat alkuperäisen tutkimuksen interventoryhmään ($r=0,30$; $p=0,01$; $n=73$).

Kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toiminnan heikkeneminen ei siis ole – ainakaan kovin vahvasti – yhteydessä telomeerien lyhyteen käytetyn aineiston perusteella.

Avainsanat: telomeerit, telomeerien pituus, autonominen hermosto, tyypin 2 diabetes, heikentynyt glukoosinsieto, aktiivinen ortostaattinen koe ja syväänhengityskoe

Sisällys

1. JOHDANTO.....	4
2. TEOREETTINEN TAUSTA.....	6
2.1. Autonominen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely.....	6
2.1.1. Sympaattinen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely.....	6
2.1.2. Parasympaattinen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely.....	9
2.2. Telomeerit.....	11
2.3. Telomeerit, kardiovaskulaarinen autonominen säätely ja diabeteksen kehitys.....	13
3. AINEISTO.....	14
4. MENETELMÄT.....	15
4.1. Aktiivinen ortostaattinen koe.....	15
4.2. Syväänhengityskoe.....	16
4.3. Telomeerien pituuden määrittäminen qPCR:llä.....	16
4.4. Tilastolliset menetelmät.....	18
5. TULOKSET.....	18
6. POHDINTA.....	23
7. LÄHTEET.....	26

1. Johdanto

Tyypin 2 sokeritauti on hyvin yleinen sairaus Suomessa. Diabetesta sairastaa yli 500 000 suomalaista, joista arviolta 450 000 on tyypin 2 diabeetikkoja. Heistä moni sairastaa tautia tietämättään. Juuri tyypin 2 diabetes on yleistymässä huimaa vauhtia ja yhä nuoremmat sairastuvat siihen. Sokeritauti on suuri ongelma ja kustannuserä terveydenhuollolle niin meillä Suomessa kuin muissakin länsimaissa. Se altistaa monille sairauksille, kuten sydän- ja verisuonisairauksille, silmänpohjamuutoksille, munuaisvaurioille sekä erilaisille hermovaurioille. (Diabetesliitto, Käypä hoito 2009)

Samoin kuin muissakin elintapasairauksissa niin myös tyypin 2 diabeteksessa on keskeistä sairauden ennaltaehkäisy. 1990-luvulla alkanut ja vuosituhannen vaihteessa päätökseen viety Finnish Diabetes Prevention Study -tutkimus (DPS) osoitti, että tällainen ennaltaehkäisy on mahdollista ja hyvin tehokasta (Tuomilehto ym. 2001). Tutkimuksessa oli mukana 522 suomalaista, joilla oli heikentynyt glukoosinsieto ja muita diabeteksen riskitekijöitä. Tutkittavat satunnaistettiin kontrolli- ja interventioryhmään. Interventioryhmä sai henkilökohtaista ruokavalioneuvontaa ja ryhmäläisiä kannustettiin sekä ohjattiin liikkumaan enemmän. Kontrolliryhmä sai vain yleistä elämäntapaneuvontaa tutkimuksen alussa. Erot ryhmien välillä olivat selviä: interventioryhmässä paino laski enemmän ja rasittavan liikunnan määrä lisääntyi (Laaksonen ym. 2005). Tyypin 2 diabeteksen kumulatiivinen esiintyvyys oli 58 prosenttia pienempi interventioryhmässä neljäntenä tutkimusvuotena (Tuomilehto ym. 2001). Interventio oli tehokkainta tutkimuksen ensimmäisenä vuotena. Tällöin myös havaitut terveydelliset vaikutukset olivat suurimmat (Lindström ym. 2003).

DPS-tutkimus päätettiin ennenaikaisesti vuonna 2000, koska diabeteksen esiintyminen oli selvästi pienempi interventioryhmässä kuin kontrolliryhmässä (Lindström ym. 2003). Tutkimuksessa mukana olleiden seuranta kuitenkin jatkettiin intervention päättymisen jälkeen. Toisena vuotena intervention päättymisestä 268:lle alkuperäisessä tutkimuksessa mukana olleelle ja diabetekseen sairastumattomalle tehtiin tutkimukset autonomisen hermoston toiminnasta (mitattiin verenpaineen säätelyä ja sykevaihtelua). Tietojen perusteella arvioitiin kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston häiriöiden ja metabolisen oireyhtymän yhteyksiä. Laitisen ym. (2011) tutkimuksessa kävi ilmi, että parasympaattisen hermoston toimintahäiriö oli 25 prosentilla tutkittavista

syväänhengitystestillä mitattuna. Sympaattisen hermoston toimintahäiriöitä aktiivisella ortostaattisella testillä mitattuna oli kuitenkin vain kuudella prosentilla tutkittavista. Tutkimuksessa havaittiin, että ylipainolla oli yhteys heikentyneeseen parasympaattiseen kardiovaskulaariseen säätelyyn (etenkin miehillä) iän lisäksi. Havainnot viittaavat siihen, että kardiovaskulaariset autonomisen hermoston toiminnan häiriöt ovat yleisiä jo ennen varsinaisen diabeteksen kehittymistä ja että niiden taustalla on samoja tekijöitä (ikä, lihavuus, korkea plasman triglyseridipitoisuus) kuin tyypin 2 diabeteksen. Plasman glukoosipitoisuus ei kuitenkaan ollut yhteydessä autonomisen hermoston häiriöihin.

Sydän- ja verenkiertoelimistön toimintaan liittyvien testien lisäksi osalta tutkittavista on DNA-näytteistä määritetty telomeerien pituudet valkosoluissa. Telomeerit ovat DNA-ketjujen päissä olevia toistojaksoja, joiden lyheneminen on yhdistetty ikääntymiseen (esim. Hoffmann ym. 2009). Telomeerien pituudet määrittivät Iiris Hovatta ja Laura Kananen Helsingin yliopistossa Biomedicumissa qPCR-menetelmällä (*quantitative polymerase chain reaction*). Telomeerien pituudet määritettiin kahdesta eri verinäytteestä, joista toinen on otettu DPS-tutkimuksen alkupuolella ja toinen intervention jo loputtua.

Koska telomeerit ovat eräänlainen biologinen kello ja toisaalta autonomisen hermoston toiminnan heikkeneminen on sekin myös osaltaan ikääntymisprosessi, on näiden välisen yhteyden selvittäminen mielenkiintoista. Kun huomioidaan, että edellä mainitun mukaisesti kardiovaskulaariset autonomisen hermoston häiriöt ovat hyvin yleisiä DPS-kohortilla ja mahdollisesti myös muilla korkean tyypin 2 diabetesriskin henkilöillä, on yhteyden selvittäminen mahdollisesti myös yksi osa diabeteksen sekä kardiovaskulaarisen autonomisen hermostohäiriön patologisen taustan ymmärtämisestä. Tämän tutkielman tarkoitus onkin selvittää sydän- ja verenkiertoelimistöön liittyvän autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuksien välistä yhteyttä edellä kuvatuista aineistoista. Tätä asiaa ei ole tietyvästi aikaisemmin tutkittu.

2. Teoreettinen tausta

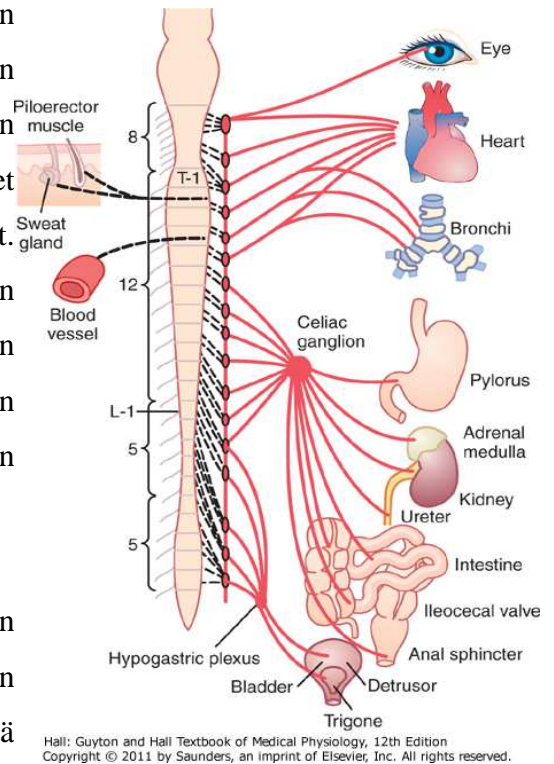
2.1. Autonominen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely

Autonomisella hermostolla tarkoitetaan tahdosta riippumatonta hermostoa. Se jaetaan parasympaattiseen ja sympaattiseen hermostoon sekä joissakin luokitteluissa mukaan lasketaan eenteerinen hermosto. Autonominen hermosto ohjaa monia tahdosta riippumattomia toimintoja, kuten syljeneritystä, ruuansulatusta, lisämunuaisytimen toimintaa ja lämmönsäätelyä. Tämän tutkielman kannalta olennaista on, miten parasympaattinen ja sympaattinen hermosto osallistuvat verenpaineen ja sykkeen säätelyyn. Käytetyt autonomisen hermoston toimintaa mittaavat testit perustuvat juuri näiden toimintojen mittaamiseen.

2.1.1. Sympaattinen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely

Anatomisesti sympaattisen hermoston tärkein rakenne on sympaattinen hermorunko, joka kulkee selkärangan molemmilla sivuilla. Se on yhteydessä selkäyttimeen monesta kohtaa koko selkäytimen pituudelta. Tämän hermorungon muodostavat useat sympaattiset hermosolmukkeet ja niitä yhdistävät hermosäikeet. Tämän lisäksi sympaattiseen hermorunkoon yhteydessä olevia sympaattisia hermosolmukkeita on myös muualla elimistössä ja niiden tehtävä on esimerkiksi osallistua ruuansulatukseen ja virtsaamisen säätelyyn. (KUVA 1.)

KUVA 1. Sympaattisen hermoston anatomia (Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology)



Sympaattiset hermoimpulssit kulkevat selkäytimen sivupylväästä peräisin olevia hermosyitä pitkin sympaattisen hermorungon solmukkeeseen ja sieltä mahdollisesti edelleen kohde-eliimiin. Impulssin välitykseen siis osallistuu vähintäänkin hermosolmuketta edeltävä ja hermosolmukkeen jälkeinen hermosolu, näin poiketen motorisesta hermotuksesta. Usein kuitenkin impulssi kulkee ylös- tai alaspäin sympaattista

hermorunkoa pitkin ennen kuin päätyy hermosolmukkeen jälkeiseen hermosyhyhyn. Varsinainen kohde-elintä hermottava hermosolmukkeen jälkeinen hermosyhy voi sijaita myös sympaattisen rungon ulkopuolella olevassa hermosolmukkeessa, kuten kuvassa 1 näkyy. (Guyton ja Hall 2011, kappale 60)

Varsinaisesti elimiä hermottavat sympaattiset hermosyyt voivat muodostaa omia kimppuja tai ne voivat kulkea kohteeseensa selkäydinhermoista alkunsa saavien hermojen mukana. Hermosolmukkeita edeltävät sympaattiset hermosyyt erittävät synapsirakoihin asetyyliholiinia ja näin aiheuttavat impulssin etenemisen hermosolmukkeiden jälkeisiin hermosyhyihin. Nämä sympaattiset hermosyyt erittävät hermopääteistään useimmiten noradrenaliinia, joka välittää viime kädessä sympaattisen hermoston impulssit kohde-eliimiin. Lisäksi noradrenaliinia erittyy vereen yhdessä adrenaliinin kanssa lisämunuaisytimestä, jonka voidaankin katsoa olevan sympaattinen hermosolmuke. (Guyton ja Hall 2011, kappale 60)

Sympaattisen, samoin kuin parasympaattisenkin, hermoston toimintaa ohjaa keskushermosto, mutta sydän- ja verenkiertoelimistön säätelyyn osallistuvat myös monet autonomiset heijasteet. Autonomisen säätelyn tarkoituksena on säilyttää jatkuvasti tarkoituksenmukainen verenkierron tila ja taata sopiva verenkierto varsinkin aivoihin. Ydinjatkeessa sijaitseva verenkierron säätelykeskus (vasomotorinen keskus) on keskeinen kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston ohjaaja. Sen toimintaan vaikuttavat etenkin hypotalamus ja hypotalamuksen kautta myös tietoiseen toimintaan erikoistuneet aivoalueet. Tämän takia myös tiedostetut tuntemukset, kuten stressi tai pelko, voivat vaikuttaa epäsuorasti verenkiertoon. Lisäksi monet lääkkeet voivat vaikuttaa sympaattisen tai parasympaattisen hermoston toimintaan ja esimerkiksi tupakka vaikuttaa molempiin samaan aikaan. (Guyton ja Hall 2011, kappale 60)

Lähes kaikkiin verisuoniin, lukuun ottamatta hiusverisuonia, kulkee sympaattisia hermosyhyitä. Myös joihinkin prekapillaarisfinktereihin menee sympaattisia säikeitä. Yleisesti hermoimpulssien vapauttama noradrenaliini aiheuttaa sileän lihaksen supistuksen verisuonien ympärillä ja näin pienentää verisuonten halkaisijaa. Joissakin tapauksissa sympaattinen vaikutus saattaa myös laajentaa verisuonia, mutta tällä ei ole merkitystä verenpaineen säätelyn kannalta. Isojen sekä varsinkin pienten valtimoiden supistuminen aiheuttaa verenkiertovastuksen nousun ja sitä kautta myös verenpaineen nousun. Samalla sympaattinen stimulaatio myös ohjaa verta kohti aivoja ja vähentää verenkiertoa esimerkiksi sisäelimissä ja

iholla. Laskimoiden supistuminen puolestaan lisää sydämeen palaavan veren määrää, mikä myös saa itsenäisenä tekijänä sydämen pumppaamaan enemmän verta. Sympaattisia hermoimpulsseja kulkee jatkuvasti verisuoniin, normaalitilanteessa siis vaikuttaa jatkuva sympaattinen tonus. Jos tämä tonus poistuu nopeasti, verisuonet laajenevat ja verenpaine voi laskea hyvinkin dramaattisesti. (Guyton ja Hall 2011, kappale 18)

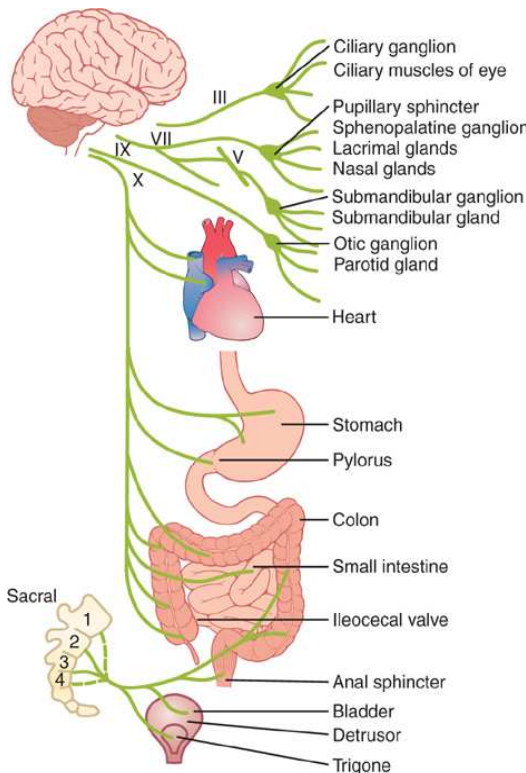
Toinen tärkeä osa sympaattisen hermoston välittämää verenkierron säätelyä on suora vaikutus sydämeen. Sympaattiset hermosyyt levittäytyvät koko sydänlihakseen ja johtoratajärjestelmään. Hermopäätteiden vapauttama noradrenaliini kiihdyttää sydämen sykettä herkitämällä ja nopeuttamalla sinussolmukkeen (*nodus sinuatrialis*) sekä myös muun johtoratajärjestelmän toimintaa. Sydämen sympaattinen stimulaatio pystyy nostamaan sykkeen moninkertaiseksi verrattuna leposykkeeseen. Varsinaiseen sydänlihakseen menevät hermosyyt puolestaan lisäävät sydämen supistusvoimaa huomattavasti. Sydämen sykkeen tihentymisen ja supistusvoiman kasvu johtavat verenpaineen nousuun ja kiertävän verimäärän kasvuun. Myös sydämessä vallitsee edellä kuvatun kaltainen tonus, jonka äkillinen poistuminen saa aikaan sykkeen hidastumisen ja supistusvoiman pienentymisen. Kolmantena sympaattisena säätelijänä myös lisämunuaisytimen erittämät noradrenaliini ja adrenaliini nostavat verenpainetta ja sykettä vaikuttamalla sekä verisuoniin että suoraan sydämeen. Tämä vaikutus on suoraan hermostolliseen säätelyyn verrattuna pitkäkestoinen, mutta noradrenaliinin ja adrenaliinin puoliintumisaika mitataan verenkierrossa vain useina kymmeninä sekunteina. (Guyton ja Hall 2011, kappaleet 9, 10, 18 ja 60)

Keskeinen osa verenpaineen säätelyä ovat baroreseptorit ja niihin liittyvät heijastekaaret. Baroreseptorit ovat verisuonien venytystä mittaavia reseptoreita, ja niitä on erityisesti aortankaareissa ja yhteisen kaulavaltimon haarautumiskohdassa (*sinus caroticus*). Verenpaineen nousu ja edelleen näiden reseptoreiden venytys aiheuttaa hermoimpulsseja, jotka lopulta päätyvät ydinjatkeen verenkierron säätelykeskukseen. Verenpaineen lasku vähentää kyseisiä hermoimpulsseja, jolloin verenkierron säätelykeskuksen aktivaatio lisääntyy baroreseptoreiden aiheuttaman inhibitorisen vaikutuksen poistuessa. Tämä edelleen johtaa sympaattisen hermoston stimulaatioon, joka saa aikaan verenpaineen nousun edellä kuvatuilla tavoilla. Esimerkiksi noustessa seisomaan verenpaine kaulavaltimoissa laskee, mikä aiheuttaa sympaattisen hermoston aktivaation. Jos näin ei tapahdu esimerkiksi autonomisen hermoston toiminnan häiriön takia, ihminen saattaa pyörtyä verenvirtauksen vähetessä aivoihin. Baroreseptoreiden lisäksi verenkierron hienosäätelyyn osallistuvat sydämen

eteisten ja keuhkovaltimoiden tilavuusreseptorit, jotka nekin ovat venytysreseptoreita. Jos eteisiin palaavan veren määrä lisääntyy, viestittävät tilavuusreseptorit siitä ydinjatkeeseen ja tämä aiheuttaa sykkeen kiihtymisen ja sydämen supistusvoiman kasvun. Toisin sanoen autonomisen hermoston ja varsinkin baroreseptoreiden ohjaama säätely on tärkeää normaalien ja tarkoituksenmukaisen verenpaineen ylläpitämiseksi lyhyellä tähtämellä (Cowley ym. 1973). Lisäksi on hyvä muistaa, että edellä mainituilla tekijöillä ei kuitenkaan ole merkittävää vaikutusta pitkäaikaiseen keskimääräiseen verenpaineeseen. (Guyton ja Hall 2011, kappale 18)

2.1.2. Parasympaattinen hermosto: kardiovaskulaarinen säätely

KUVA 2. Parasympaattisen hermoston anatomia (Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology)



Hall: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition
Copyright © 2011 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

Parasympaattinen hermosto on anatomisesti selvästi yksinkertaisempi kuin sympaattinen hermosto. Keskeisenä rakenteena on kymmenes aivohermo eli kiertäjähermo (*n. vagus*), joka välittää keskushermoston parasympaattiset hermoimpulssit muun muassa sydämeen ja ruuansulatuskanavaan. Myös muissa aivohermoissa on parasympaattisia osia, mutta niillä ei ole merkitystä verenkierron kannalta. Parasympaattisen hermoston rakenteenkin perusteella on helppo päätellä, että sen vaikutukset verenkiertoon välittyvät lähinnä sydämeen menevien hermosyiden kautta. Sakraalitason parasympaattiset hermot kylläkin lisäävät peniksen verenkiertoa, mutta koko elimistön verenkierron kannalta vain kiertäjähermot ovat olennaisia. (KUVA 2.)

Samalla tavalla kuin sympaattisessa hermostossa myös parasympaattisessa hermostossa hermoimpulssin välittää keskushermostosta hermosolmuketta edeltävä ja hermosolmukkeen jälkeinen hermosolu. Tosin joissakin aivohermoissa hermoimpulssi voi välittyä vain yhden hermosolun kautta. Poiketen sympaattisesta hermostosta, parasympaattiset hermosolmukkeet sijaitsevat yleensä kohde-elimissä ja hermosolmukkeen jälkeinen hermosolmu on hyvin lyhyt. Lopullisen vaikutuksen kohde kudokseen välittää sympaattisesta hermostosta poiketen asetyylikoliini. Sen vaikutus on usein

vastakkainen noradrenaliinin vaikutukselle. (Guyton ja Hall 2011, kappale 60)

Myös parasympaattisen hermoston kohdalla vaikuttaa samanlainen tonus kuin sympaattinen tonus. Jos tämä perustason parasympaattisen hermoston aktiivisuus poistuu, niin esimerkiksi suolen toiminta lähes pysähtyy ja sydämen lyöntitaajuus nopeutuu. Sympaattinen ja parasympaattinen tonus muodostavat yhdessä puskurivaikutuksen verenkierron säätelyssä, mikä mahdollistaa hienovaraisen ja nopean säätelyn tilanteessa kuin tilanteessa. (Guyton ja Hall 2011, kappale 60)

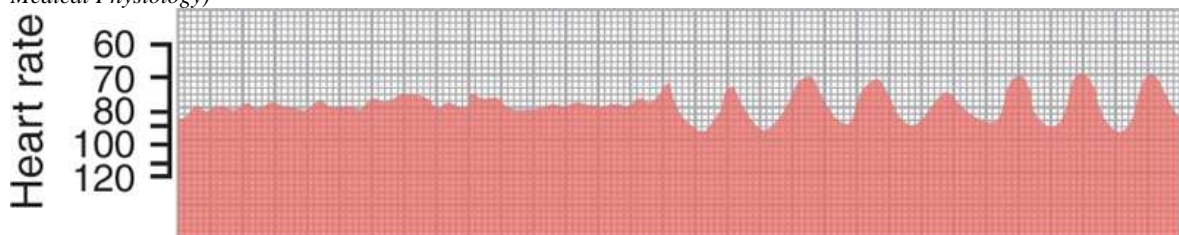
Parasympaattinen hermoston toimintaa verenkierron osalta johtaa ydinjatkeen vasomotorinen keskus. Vaikka tämä onkin – samalla tavalla kuin sympaattinen säätely – tahdosta riippumatonta, voi esimerkiksi tunnereaktio saada aikaan pyörtymisen. Kuitenkin keskeiset verenkierron säätelymekanismit ovat parasympaattisenkin hermoston osalta baroreseptoreista tulevat impulssit ja niihin liittyvät heijasteet. Verenpaineen nousu saa aikaan baroreseptoreiden aktivaation, joka välittyy aivoihin kiertäjäherron välityksellä (*n. vagus*) aortankaaresta ja kieli-kitaherrojen (*n. glossopharyngeus*) välityksellä yhteisen kaulavaltimon haarautumiskohdasta. Tämä saa aikaan sympaattisen hermoston inhibition ja toisaalta parasympaattisen hermoston aktivaation vasomotorisessa keskuksessa, mikä johtaa verenpaineen palauttamiseen normaalitasolle. (Guyton ja Hall 2011, kappaleet 60 ja 18)

Kiertäjäherron sydämeen menevät haarat päätyvät pääasiassa sinussolmukkeeseen (*nodus sinuatrialis*) ja vain vähäisessä määrin itse sydänlihakseen. Näiden haarojen hermo päätteiden vapauttama asetyylikoliini aiheuttaa sinussolmukkeen toiminnan hidastumisen, mikä johtaa hidastuneeseen sykkeeseen. Voimakas parasympaattinen stimulaatio voikin jopa pysäyttää sydämen hetkeksi. Itse sydänlihaksessa asetyylikoliini vähentää sydämen supistusvoimaa, mutta tämä vaikutus on paljon vähäisempi kuin sympaattisen hermoston toiminnan aiheuttama supistusvoiman lisäys. Toisin sanoen parasympaattinen hermosto pystyy hidastamaan verenkiertoa ja näin säästämään elimistön voimavaroja esimerkiksi levätessä. (Guyton ja Hall 2011, kappaleet 9 ja 10)

Respiratorinen (sinus)arytmia on yksi hyvin keskeinen parasympaattisen hermoston aiheuttama ilmiö. Tällä tarkoitetaan sydämen sykkeen nopeutumista sisään hengitettäessä ja hidastumista ulos hengitettäessä (KUVA 3.). Ilmiö johtuu siitä, että hengitystä säätelevä hengityskeskus sijaitsee ydinjatkeessa lähellä vasomotorista keskusta ja hermoimpulsseja

vuotaa hengityskeskuksesta vasomotoriseen keskukseen (Guyton ja Hall 2011, kappale 13). Tämä sykevaihtelu on yhdistetty sydämen parasympaattiseen säätelyyn (Task Force of the European Society of Cardiology... 1996, van Ravenswaaij ym. 1993). Toisin sanoen sisään hengitettäessä parasympaattinen hermosto on vähemmän aktiivinen kuin ulos hengitettäessä. Syke siis vaihtelee jatkuvasti hengitysrytmin mukaan, mutta vaihtelun suuruus on henkilökohtaista. Respiratorisen sykevaihtelun fysiologinen tausta ei ole kuitenkaan selvä. Yksi selitys voisi olla, että sykevaihtelu sovittaa sydämen rytmiä hengitysrytmiin ja näin saa verenkierron ja keuhkotuuletuksen toimimaan mahdollisimman tehokkaasti (Junichiro Hayano & Fumihiko Yasuma 2002). Tämä näkemys on kuitenkin kyseenalaistettu uusimmassa tutkimuksissa, eikä ole varmaa tietoa siitä, onko respiratorisella arytmiolla jokin fysiologinen tehtävä (Sin 2010).

KUVA 3. Sykerekisteröinti, aluksi henkilö on hengittänyt normaalisti ja sen jälkeen syvään (Guyton & Hall: *Textbook of Medical Physiology*)



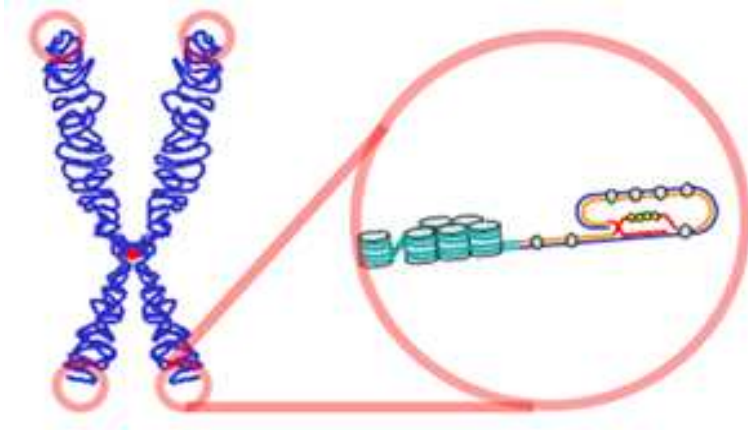
Hall: Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, 12th Edition
Copyright © 2011 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

2.2. Telomeerit

Telomeerit ovat DNA-ketjujen päissä olevia pitkiä toistojaksoja (ihmisellä useita tuhansia emäspareja pitkiä), joiden ensisijainen tarkoitus on estää kromosomien vapaisiin päihin kohdistuvat kemialliset reaktiot ja tällä tavalla muun muassa estää kromosomien liittymisen toisiinsa (KUVA 4.). Telomeereihin keskeisesti liittyvä ilmiö on niiden lyheneminen solunjakautumisessa. Tämä johtuu siitä, että DNA-polymeraasientsyymi ei pysty kahdentamaan DNA-ketjua aivan ketjun päästä alkaen ja siksi telomeerialue lyhenee aina, kun solu jakautuu. Lyhentymisen toimii näin eräänlaisena biologisena kellona – kun telomeerit lyhenevät tarpeeksi, DNA:n päät muuttuvat reaktiivisiksi ja solu ajautuu apoptoosiin. Telomeerien lyhenemisen on todella osoitettu tapahtuvan vanhetessa (Thomas ym. 2008, Hoffmann ym. 2009).

Ihmisellä DNA-kaksoisketjujen päissä on runsaasti toistuvaa TTAGGG-emäsjaksoa (komplementaarisessa säikeessä CCCTAA). Telomeerit muodostavat kromosomien päihin lenkin, joka suojaa kromosomeja esimerkiksi vääränlaisten entsyymien toiminnalta. Aivan telomeerin päässä sijaitsee lyhyehkö yksisäikeinen DNA-jakso, joka sisältää paljon guaniiniemästä (G). Tämän yksisäikeisen jakson tiedetään tunkeutuvan telomeerin kaksisäikeisen

KUVA 4. Telomeeri ja sen muodostama lenkki kromosomin päässä (Wikipedia)



jakson väliin ja muodostavan kyseenomaisen lenkin. Telomeerin loppuosa esiintyy myös avoimessa muodossa, jolloin telomeerien pidentäminen on mahdollista. Telomeerien varsinaisen DNA-ketjun puoleinen pää on pakkautunut nukleosomeihin niin kuin muukin DNA, mutta aivan telomeerien päässä toistojaksoja sitovat telomeereille spesifiset proteiinit TRF1 ja TRF2. TRF2 on osa rakennetta, joka estää kromosomien

liittymistä toisiinsa, kun taas TRF1 estää telomeerien pidentämistä. (Rhodes ym. 2002)

Jo 1980-luvulla on pystytty osoittamaan, että telomeereja pidentää ihmisellä telomeraasientsyymi (Morin 1989). Se on toimintaperiaatteeltaan käänteistranskriptaasi eli se muodostaa uutta DNA-ketjua RNA-ketjun pohjalta. DNA-polymeraasi pystyy sen jälkeen muodostamaan pidentyneelle ketjulle vastinketjun. Ilman telomeraasia esimerkiksi itusolujen telomeerit lyhenisivät liian lyhyiksi, eikä lisääntyminen olisi tällöin mahdollista. Telomeraasi ei kuitenkaan ole yleensä kovin aktiivinen normaaleissa soluissa ja sen takia telomeerit lyhenevät ihmisen vanhetessa. Sen sijaan syöpäsoluissa ja kuolemattomissa solulinjoissa telomeraasiaktiivisuus on kohonnut ja estää näin telomeerien lyhenemisen kriittiseen pisteeseen, jossa normaali solu kuolisi (Counter ym. 1992).

2.3. Telomeerit, kardiovaskulaarinen autonominen säätely ja diabeteksen kehitys

Ihmisen ikääntyessä sekä telomeerit lyhenevät että autonomisen hermoston toiminta heikenee. Myös tyypin 2 diabetes on yleisempi vanhemmilla kuin nuorilla. Esimerkiksi hengityksen aikaisen sykevaihtelun on jo pitkään tiedetty heikentyvän ikääntymisen myötä ja tämän on katsottu ilmentävän heikentyneitä parasympaattisen hermoston toimintaa. Sen lisäksi ortostaattinen hypotensio (verenpaineen lasku esim. seisomaan noustessa) on yleinen ilmiö vanhuksilla, vaikkakin sympaattisen hermoston aktiivisuus lisääntyy vanheudessa (Hotta & Uchida 2010). Tämä kuvastaa autonomisen kontrollin huonontumista: kun parasympaattinen vaikutus on syystä tai toisesta heikentynyt ja sympaattinen tonus suurentunut, on verenkierron säätelyvara pienentynyt, mikä voi johtaa ajoittaiseen hypotensioon. Telomeerien lyhentyminen kriittiseen pisteeseen saakka puolestaan aiheuttaa solujen kuoleamisen ja kudosten rappeutumisen ihmisen ikääntyessä.

Solunjakautumisten määrä ei ole ainoa tekijä, joka määrittelee telomeerien pituuden. Liikunnan on todettu lisäävän telomeraasientsyymin aktiivisuutta ja fyysinen aktiivisuus saattaa siten hidastaa ikääntymiseen liittyvää telomeerien lyhenemistä (Werner ym. 2009). Oksidatiivisen stressin on todettu aiheuttavan telomeerien lyhenemistä (Richter & von Zglinicki 2007). Toisin sanoen telomeerien lyheneminen voi nopeutua esimerkiksi huonojen elintapojen takia – telomeerit voivat siis välittää tyypin 2 diabeteksen kehittymistä ja siihen liittyviä ongelmia (Hansel ym. 2004). Tämä voisi tapahtua esimerkiksi telomeerien lyhentymisen kautta haiman beetasoluissa (Salpea ym. 2010).

Tyypin 2 diabetes on yhdistetty lyhyisiin telomeereihin (Salpea ym. 2010) ja tunnetusti myös neuropatioihin. Autonomisten neuropatioiden tiedetään liittyvän pitkään sairastettuun diabetekseen ja huonoon sokeritasapainoon (Töyry ym. 1996). Kardiovaskulaariset autonomiset hermostohäiriöt olivat myös yleisiä tässä tutkimuksessa käytetyn suomalaisen diabetestutkimuksen (DPS) aineiston perusteella (Laitinen ym. 2011). Nämä häiriöt todennäköisesti selittyvät jollain muulla tyypin 2 diabeteksen kehitykseen liittyvällä syyllä kuin sokeritasapainolla, koska suuremmalla verensokerilla ei ollut yhteyttä niiden ilmenemiseen.

Tämän tutkimuksen tarkoitus on selvittää näiden asioiden välistä yhteyttä: ovatko lyhentyneet telomeerit yhteydessä kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toiminnan heikkenemiseen?

3. Aineisto

Finnish Diabetes Prevention Study -tutkimukseen (DPS) valittiin vuosina 1993–1998 yhteensä 522 keski-ikäistä (40–64-vuotiasta) suomalaista, joilla oli korkea tyypin 2 diabetesriski. Valinta tapahtui etsimällä sopivia henkilöitä riskiryhmistä, esimerkiksi henkilöitä, joilla oli suvussa esiintynyt tyypin 2 diabetesta. Mukaan otettiin ylipainoisia (painoindeksi yli 25) henkilöitä, joilla oli heikentynyt glukoosinsieto glukoosirasituskokeessa, mutta jotka eivät kuitenkaan sairastaneet diabetesta. Heikentynyt glukoosinsieto määritettiin antamalla suun kautta 75 g glukoosia ja mittaamalla plasman glukoosi paastossa ja kaksi tuntia annostelun jälkeen. Valintakriteereinä olivat WHO:n vuoden 1985 kriteerit heikentyneelle glukoosinsiedolle eli plasman paastoglukoosi alle 7,8 mmol/l ja kahden tunnin kuluttua plasman glukoosi välillä 7,8–11,0 mmol/l. Paastoglukoosin arvo alle 7,8 mmol/l poikkeaa hiukan nykyisestä heikentyneen glukoosinsiedon määritelmästä alle 7,0 mmol/l (WHO 2006). Tutkittavat jaettiin satunnaistetusti kontrolli- ja interventioryhmään, kuitenkin niin, että varmistettiin ryhmien olevan samankaltaisia sukupuolijakauman, tutkimuspaikkakuntien ja keskimääräisen plasman glukoosipitoisuuden osalta. Interventioryhmä sai henkilökohtaista ravitsemusneuvontaa ja sitä ohjattiin liikkumaan enemmän sekä kannustettiin pudottamaan painoa tarkoituksena estää tyypin 2 diabeteksen puhkeaminen. Kontrolliryhmä sai vain yleistä terveysneuvontaa tutkimuksen alussa. Tutkittavien terveydentilaa seurattiin vuosittain terveystarkastuksella, kattavilla verikokeilla ja monilla muilla mittauksilla. Myös kahden tunnin glukoosirastuskoe suoritettiin tutkimuksen alun lisäksi vuosittain. Tutkimuksen päätepisteenä oli diabeteksen toteaminen.

DPS-tutkimus hyväksyttiin Kansanterveyslaitoksen tutkimuseettisessä työryhmässä Helsingissä ja kaikki tutkittavat antoivat kirjallisen hyväksynnän tutkimukseen osallistuessaan. Tutkimuksen kuvaus kokonaisuudessaan on Erikssonin ym. (1999) artikkelissa.

Autonomisen hermoston kuntoa mittaaviin testeihin valikoitui 268 henkilöä, joilla ei vielä ollut todettu diabetesta keskimäärin hiukan yli kaksi vuotta tutkimuksen interventiovaiheen päättymisestä (tutkimukset tehtiin vuosina 2002 ja 2003). Nämä tutkimukset eivät olleet osa alkuperäistä tutkimussuunnitelmaa. Tutkittavista 148 (55,2 %) kuului interventioryhmään ja 120 (44,8 %) puolestaan kontrolliryhmään. (Laitinen ym. 2011)

Suurimmalta osalta tutkittavista oli otettu kaksi verinäytettä, joista telomeerien pituudet määritettiin, ja näistä verinäytteistä myöhemmin otettu oli ajallisesti lähempänä autonomisen hermoston toimintaa mitanneita tutkimuksia. Tässä tutkimuksessa käytettiin siis telomeerien pituuksia, jotka oli määritetty 343 henkilöltä noin vuosi intervention päättymisestä (vuosina 2001 ja 2002). Näistä 343 henkilöstä 207 oli ottanut osaa kardiiovaskulaarisen autonomisen hermoston toimintaa mittaaviin testeihin. Yhdeltä näistä 207 henkilöstä puuttui kuitenkin aktiivisen ortostaattisen kokeen tulokset ja hänet suljettiin pois tutkimuksesta. Niinpä tässä tutkielmassa oli mukana yhteensä 206:n vielä diabetekseen sairastumattoman tutkittavan aineisto, jossa 114 (55,3 %) kuului interventioryhmään ja loput 92 (44,7 %) kontrolliryhmään. Tutkittavassa aineistossa oli vain 65 miestä (31,6 %).

4. Menetelmät

4.1. Aktiivinen ortostaattinen koe

Samana aamupäivänä (~ 8.00–11.00) suoritettiin ensin syväänhengityskoe ja sen jälkeen aktiivinen ortostaattinen koe keskimäärin hiukan yli kaksi vuotta interventiojakson (tai kontrollijakson) päättymisestä. Kaikkia tutkittavia käskettiin olemaan tupakoimatta ja välttämään kofeiinipitoisten juomien nauttimista 12 tuntia ennen kokeita. Kevyen aamupalan syöminen oli sallittua ennen kokeita viimeistään kaksi tuntia ennen testejä. Tutkittavia ei kielletty käyttämästä lääkkeitään.

Aktiivisessa ortostaattisessa kokeessa tutkittavat makasivat aluksi rauhassa viisi minuuttia ja sitten heiltä mitattiin verenpaine. Tämän jälkeen tutkittava nousi seisomaan ja häneltä mitattiin minuutin seisomisen jälkeen verenpaine. Mittauksia suoritettiin vain yksi makuultaan ja yksi seisaaltaan, ja mittauksiin käytettiin kalibroitua aneroidimanometriä. Näin mitatut verenpaineet vähennettiin toisistaan ja saatiin verenpaineen muutos.

Ortostaattisen hypotension kriteerit ovat yleisesti ottaen 20 mmHg:n lasku systolisessa verenpaineessa tai 10 mmHg:n lasku diastolisessa verenpaineessa kolmen minuutin

kuluessa seisomaan nousemisen jälkeen. Tutkittavilta ei kuitenkaan mitattu verenpainetta kolmen minuutin kohdalla vaan vain yhden minuutin kohdalla. Tässä tutkimuksessa käytettiin ortostaattisen hypotension rajoina samoja arvoja ja verenpaineen muutoksen katsottiin edustavan sympaattisen hermoston toiminnan tasoa. Toisin sanoen tutkittavilla, joilla verenpaine tippui yhtä paljon tai enemmän kuin yllä mainitut kriteerit määrittävät, katsottiin olevan sympaattisen hermoston toiminnan häiriö (dysfunktio). (The Consensus Committee of the American Autonomic Society... 1996)

4.2. Syväänhengityskoe

Syväänhengityskokeessa tutkimushoitaja tahdisti tutkittavan hengitystä sekuntikellon kanssa. Tutkittava hengitti syvään sisään 5 sekunnin ajan ja sen jälkeen 5 sekunnin ajan ulos. Tätä toistettiin vajaan minuutin ajan ja samalla suoritettiin EKG-rekisteröinti. EKG-nauhasta etsittiin manuaalisesti lyhin sykeväli ja pisin sykeväli (RR-väli). Lyhin sykeväli kuvaa siis nopeinta sydämen sykettä sisäänhengityksen aikana ja vastaavasti pisin sykeväli hitainta sydämen sykettä uloshengityksen aikana. Näiden RR-aikojen perusteella laskettiin suhdeluku: pisin uloshengityksen aikainen sykeväli jaettiin lyhyimmällä sisäänhengityksen sykevälillä ja näin saatiin E/I-suhde (*Expiration / Inspiration*).

Vähentyneen hengityksen aikaisen sykevaihtelun katsottiin heijastavan huonontunutta parasympaattisen hermoston toimintaa. Jos tutkittavan E/I-suhde oli 1,1 tai sen alle, katsottiin tutkittavalla olevan parasympaattisen hermoston toimintahäiriö (dysfunktio).

4.3. Telomeerien pituuden määrittäminen qPCR:llä

Keskimäärin hiukan yli vuosi interventiojakson (tai kontrollijakson) päättymisen jälkeen vielä diabetekseen sairastumattomilta otetuista verinäytteistä määritettiin telomeerien pituudet valkosoluista qPCR-menetelmällä (*quantitative real-time PCR*) (Laura Kananen ja Iris Hovatta). Lyhyesti kuvattuna telomeerien pituuden määrittäminen suoritettiin seuraavalla tavalla:

Telomeerien pituuden määrittäminen qPCR:llä mittaa telomeerien pituutta epäsuorasti, koska telomeerit ovat toistojaksoja eikä ole olemassa sellaisia alukkeita, jotka eivät sitoutuisi useampaan kohtaan telomeereja. Telomeereista syntyy näin ollen paljon eripituisia DNA-jaksoja PCR-monistuksessa. Alukkeiden huolellinen valitseminen on myös olennaista – ne eivät saa sitoutua toisiinsa sillä tavalla, että muodostuisi alukepohjaisia DNA-jaksoja PCR-monistuksessa.

DNA-näytteeseen lisättiin monistuksen yhteydessä fluoresoivaa merkkiainetta (tutkimuksessa käytetty iQ SyBrGreen supermix BioRad), huolellisesti valitut alukkeet ja taq-polymeraasientsyymi. Telomeerien lisäksi monistettiin hemoglobiinigeeniä, joka esiintyy vain yhtenä tunnetun pituisena geeninä DNA:ssa. Lisäksi tehtiin laimennussarja yhdestä DNA-näytteestä ja luotiin laimennettuja DNA-näytteitä monistamalla eri DNA-pitoisuuksia vastaavat standardikuvaajat, joihin muita DNA-näytteitä verrattiin. DNA:ta monistettiin, kunnes näytteen fluoresenssi ylitti kynnsarvon (erilliset näytteet hemoglobiinigeenille ja telomeereille) ja näin saatiin kutakin näytettä vastaava PCR-syklien lukumäärä. Näitä syklien lukumääriä verrattiin standardikuvaajiin ja standardikuvaajista luettiin kutakin näytettä vastaava laimennuskertoimen (hemoglobiinigeenille ja telomeereille erilliset kuvaajat). Laimennuskertoimien perusteella laskettiin suhdeluku (T/S) jokaiselle näytteelle niin, että telomeerien laimennuskertoimen jaettiin hemoglobiinigeenin laimennuskertoimella.

Kaikkia näytteitä oli kolme kappaletta (eli kolme telomeerinäytettä ja kolme hemoglobiini-näytettä) ja jos näytteet poikkesivat paljon toisistaan kyseisen henkilön näyte hylättiin. Käytettyjen 384-kuoppaisten levyjen mahdollista erilaisuutta kompensointiin sijoittamalla jokaiseen levyyn samanlaiset kontrollinäytteet, joiden T/S-arvojen perusteella kalibroitiin lopulliset T/S-arvot, jotka kuvastavat telomeerien pituutta (mitä suurempi T/S-arvo, sitä pitemmät telomeerit). Tarkempaa tietoa qPCR-menetelmän käytöstä telomeerien pituuden mittaamiseen löytyy Cawthonin (2002) artikkelista, jossa on käytetty pääpiirteittäin samaa menetelmää kuin Kananen ja Hovatta ovat käyttäneet.

Käytetyllä menetelmällä pystyy erottamaan toisistaan vähintään n. 11,4 prosenttia poikkeavat telomeerien pituudet 95 prosentin varmuudella. Tämän tarkkuuden pitäisi riittää hyvin tätä tutkimusta varten, etenkin kun telomeerien pituuksien tiedetään poikkeavan huomattavasti toisistaan samanlaisessakin ihmisryhmässä. (Cawthon 2002)

4.4. Tilastolliset menetelmät

Tässä tutkimuksessa käytettiin IBM SPSS Statistics 19 (Windowsille) -ohjelmaa. Tutkittavista muuttujista E/I-suhde ei ollut normaalisti jakautunut ja siitä käytettiin muunnosta $\lg(1/[E/I - 1])$. Myöskään telomeerien pituutta kuvannut suhde ei ollut normaalisti jakautunut ja siitä käytettiin muunnosta $\ln(T/S)$. Näin oli mahdollista käyttää parametrisia menetelmiä aineiston arviointiin.

Kahden riippumattoman otoksen t-testiä käytettiin eri ryhmien välisten erojen toteamiseen. χ^2 -testiä käytettiin ryhmien välisten erojen selvittämiseen luokkamuuttujien kohdalla. Korrelaatiokertoimet on ilmoitettu Pearsonin korrelaatiokertoimina, ja lisäksi on laskettu osittaiset korrelaatiokertoimet käyttämällä esimerkiksi ikää kontrollimuuttujana. SPSS:n univariate-menetelmää (kovarianssianalyysi) käytettiin faktorimuuttujien (esim. sukupuoli) huomioimiseen jatkuvien muuttujien yhteyksiä selvittäessä.

Tilastollisen merkitsevyyden rajana on tässä tutkimuksessa käytetty p-arvoa 0,05 ($p < 0,05$).

5. Tulokset

Interventio- ja kontrolliryhmä olivat samankaltaiset tutkittavien muuttujien osalta. Tutkittavia muuttujia olivat telomeerien pituus (T/S-suhde), parasympaattisen hermoston toimintaa kuvaava sykevaihtelusuhde (E/I-suhde) sekä aktiivisen ortostaattisen kokeen tulokset (verenpaineen muutos). Tilastollisesti merkitsevää eroa ei ollut myöskään sukupuolien välillä. Vain syväänhengityskokeen tulokset poikkesivat interventio- ja kontrolliryhmän välillä tilastollisesti merkitsevästi ($p=0,038$ logaritmiselle muunnokselle) ja E/I-suhde oli hiukan korkeampi kontrolliryhmässä, mitä voidaan pitää yllättävänä (TAULUKKO 1.). Tämä johtuu siitä, että tutkittavista ryhmistä oli suljettu alkuperäisen tutkimuksen (DPS) mukaisesti diabeetikot pois ja kontrolliryhmässä oli paljon enemmän diabetekseen sairastuneita. Siksi kontrolliryhmä vaikuttaa hiukan ”terveemmältä” sisäänhengityskokeen tuloksien perusteella.

TAULUKKO 1. Interventio- ja kontrolliryhmän fysiologiset ja biokemialliset tiedot. Kursivoidut tiedot ovat interventio-/kontrollijakson lopusta. Ilmoitettu muodossa n[%], mediaani {minimi ja maksimi} ja mediaani (25-persenttiili – 75-persenttiili). *Merkitsevä ero ($p=0,038$ logaritmiselle muunnokselle).

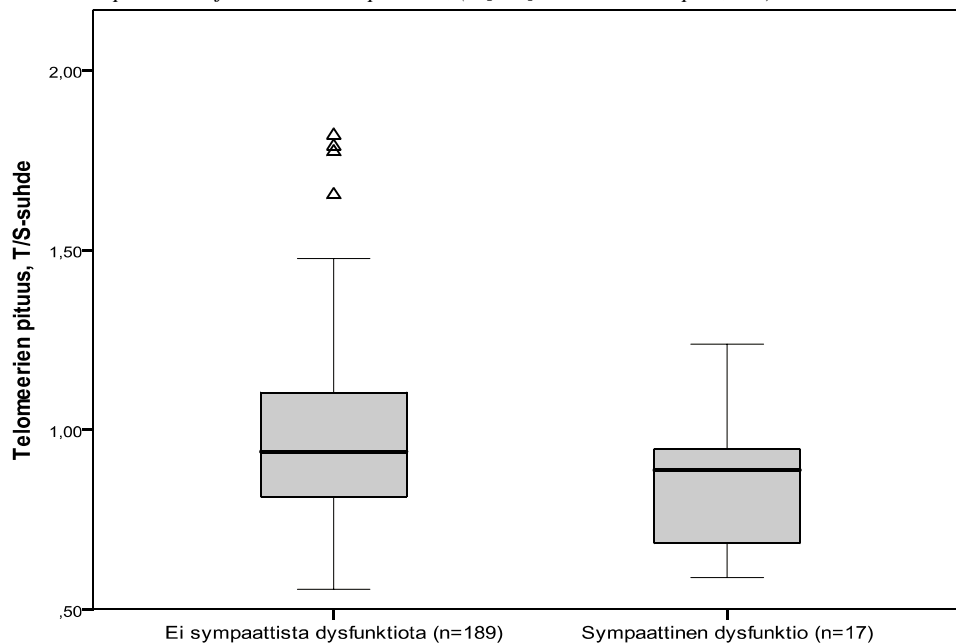
	Interventoryhmä	Kontrolliryhmä	Kaikki
Yhteensä (lkm)	114 [55,3%]	92 [44,7%]	206 [100%]
Miehiä (lkm)	40 [35,1%]	25 [27,2%]	65 [31,6%]
Sympaattinen dysfunktio (lkm)	12 [10,5%]	5 [5,4%]	17 [8,3%]
Parasympaattinen dysfunktio (lkm)	29 [25,4%]	20 [21,7%]	49 [23,8%]
Antipsykoottisia lääkkeitä käyttäviä (lkm)	2 [1,8%]	1 [1,1%]	3 [1,5%]
Verenpainelääkkeitä käyttäviä (lkm)	38 [33,3%]	31 [33,7%]	69 [33,5%]
Telomeerinäytettä vastaava ikä (vuotta)	64 {min. 45 ja max. 74}	63 {min. 46 ja max. 71}	64 {min. 45 ja max. 74}
Paino (kg)	80 (71 – 90)	80 (72 – 90)	80 (72 – 90)
Vyötärön ympäryys (cm)	97 (90 – 105)	97 (89 – 104)	97 (90 – 105)
BMI (kg/m ²)	28,6 (26,1 – 32,4)	28,8 (26,8 – 32,6)	28,8 (26,2 – 32,4)
Systolinen verenpaine maaten (mmHg)	139 (124 – 150)	136 (124 – 148)	138 (124 – 148)
Diastolinen verenpaine maaten (mmHg)	79 (72 – 85)	77 (71 – 84)	78 (72 – 84)
Kokonaiskolesteroli (mmol/l)	5,62 (4,95 – 6,12)	5,56 (5,06 – 6,08)	5,58 (5,02 – 6,10)
HDL-kolesteroli (mmol/l)	1,44 (1,20 – 1,60)	1,40 (1,16 – 1,65)	1,41 (1,19 – 1,62)
LDL-kolesteroli (mmol/l)	3,49 (2,88 – 3,99)	3,50 (3,02 – 3,93)	3,49 (2,98 – 3,94)
Triglyseridit (mmol/l)	1,35 (1,00 – 1,76)	1,38 (1,05 – 1,88)	1,36 (1,02 – 1,80)
Paastoglukoosi (mmol/l)	5,89 (5,57 – 6,48)	5,98 (5,48 – 6,43)	5,95 (5,56 – 6,45)
E/I-suhde	1,14 (1,09 – 1,21)*	1,17 (1,10 – 1,24)*	1,15 (1,10 – 1,22)
Systolisen paineen muutos, ortostaattinen koe (mmHg)	-1 (-8 – +4)	-3 (-10 – +4)	-2 (-8 – +4)
Diastolisen paineen muutos, ortostaattinen koe (mmHg)	8 (3 – 11)	8 (4 – 12)	8 (4 – 12)
Telomeerien pituus, T/S-suhde	0,92 (0,81 – 1,10)	0,94 (0,82 – 1,08)	0,93 (0,81 – 1,09)

Ajallisesti telomeeriverinäyte oli otettu keskimäärin vuotta ennen (min. 0,22 ja max. 2,01 vuoden ero) autonomisen hermoston toimintaa mitanneita kokeita. Tutkimuksen tutkittava-kohtainen kesto telomeeriverikokeeseen (keskimäärin 5,7 vuotta) taikka autonomisen hermoston testeihin (keskimäärin 6,7 vuotta) saakka ei korreloinut mitattujen suureiden kanssa. Interventiojakso tai kontrolliryhmällä kontrollijakso oli kestänyt tutkittavilla yhdestä kuuteen vuotta (mediaani 5 vuotta). Myöskään pelkässä interventoryhmässä ei ollut korrelaatiota tutkimuksen keston ja tutkittavien muuttujien välillä.

Sympaattinen dysfunktio ei ollut tilastollisesti merkitsevästi yleisempää miehillä kuin naisilla (7,7 % vs. 8,5 %), eikä parasympaattinen dysfunktio ollut tilastollisesti merkitsevästi yleisempää miehillä kuin naisilla (30,8 % vs. 20,6 %; $p=0,11$). Interventoryhmässä 10,5 prosentilla oli sympaattinen dysfunktio ja kontrolliryhmässä 5,4 prosentilla, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,19$). Vastaavat luvut parasympaattisen dysfunktion osalta olivat interventoryhmälle 25,4 prosenttia ja kontrolliryhmälle 21,7 prosenttia ($p=0,54$).

Telomeerien pituutta kuvaava T/S-suhde ($\ln[T/S]$) ei ollut tilastollisesti merkittävästi pienempi niillä henkilöillä, joilla oli parasympaattinen dysfunktio. Sen sijaan T/S-suhde ($\ln[T/S]$) oli merkitsevästi pienempi sympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä ($p=0,041$). T/S-suhde ilman logaritmistä muunnosta oli ”terveillä” keskimäärin 12,5 prosenttia suurempi kuin sympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä (ka. 0,97 vs. 0,86). (KUVA 5.)

KUVA 5. Boxplot-kuvaaja: telomeerien pituudet, ($\ln[T/S]$ -muunnokselle $p=0,041$)



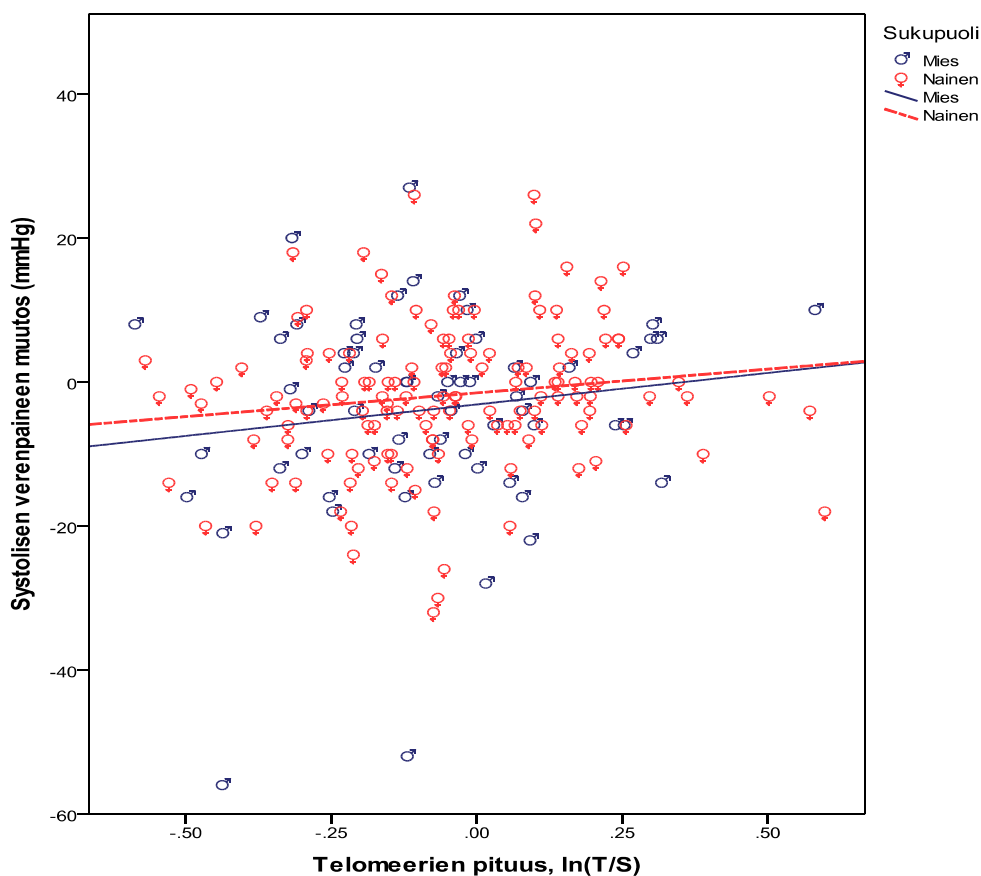
Korrelaatiokertoimet muuttujien välillä osoittivat samansuuntaisia tuloksia. T/S-suhde ei korreloinut E/I-suhteen kanssa (TAULUKKO 2.). Systolisen verenpaineen muutos ortostaattisessa kokeessa korreloi positiivisesti telomeerien pituuden kanssa, mutta diastolisen verenpaineen muutos ei ollut yhteydessä T/S-suhteeseen. Systolisenkin verenpaineen osalta korrelaatio oli hyvin lievä ($r=0,147$, $p=0,036$). Ikä korreloi odotetusti negatiivisesti telomeerien pituuden kanssa sekä myös E/I-suhteen kanssa (E/I-suhteen logaritmiselle käänteislukumuunnokselle $r=0,21$, $p<0,01$). Lisäksi pulssipaine (maaten) korreloi negatiivisesti systolisen, muttei diastolisen, verenpaineen muutoksen kanssa ($r=-0,168$, $p=0,016$).

TAULUKKO 2. Pearsonin korrelaatiokertoimia

		Systolisen verenpaineen muutos	Diastolisen verenpaineen muutos	lg[1/(E/I-1)], E/I-suhde	Telomeerinäytettä vastaava ikä
Telomeerien pituus, ln(T/S)	Korrelaatiokerroin	,147	-,042	,014	-,150
	P-arvo	,036	,546	,845	,031

Kun osittaisessa korrelaatiossa ikä oli kontrollimuuttujana, eivät yllä mainitut tulokset juuri muuttuneet. Systolisen verenpaineen muutoksen ja T/S-suhteen välillä säilyi edelleen samanlainen korrelaatio ($r=0,145$, $p=0,038$). Ikä ja paino kontrollimuuttujina pitivät korrelaatiot edelleen samanlaisina. Systolinen verenpaine maaten korreloi odotetusti negatiivisesti systolisen verenpaineen muutoksen kanssa ($r= -0,153$, $p=0,028$). Kun systolinen verenpaine ja ikä olivat kontrollimuuttujina, systolisen verenpaineen muutoksen ja T/S-suhteen välinen korrelaatio säilyi edelleen lähes samana ($r=0,159$, $p=0,023$). Myöskään pulssipaineen ottaminen kontrollimuuttujaksi ei juuri vaikuttanut korrelaatioon. Tutkittavilta oli interventio- ja kontrollijakson lopussa kyselylomakkeella selvitetty myös vapaa-ajan fyysisen aktiivisuuden määrä. Fyysinen aktiivisuus ei kuitenkaan ollut yhteydessä telomeerien pituuteen tai systolisen verenpaineen muutokseen, eikä sen lisääminen kontrollimuuttujaksi tuonut lisäinformaatiota.

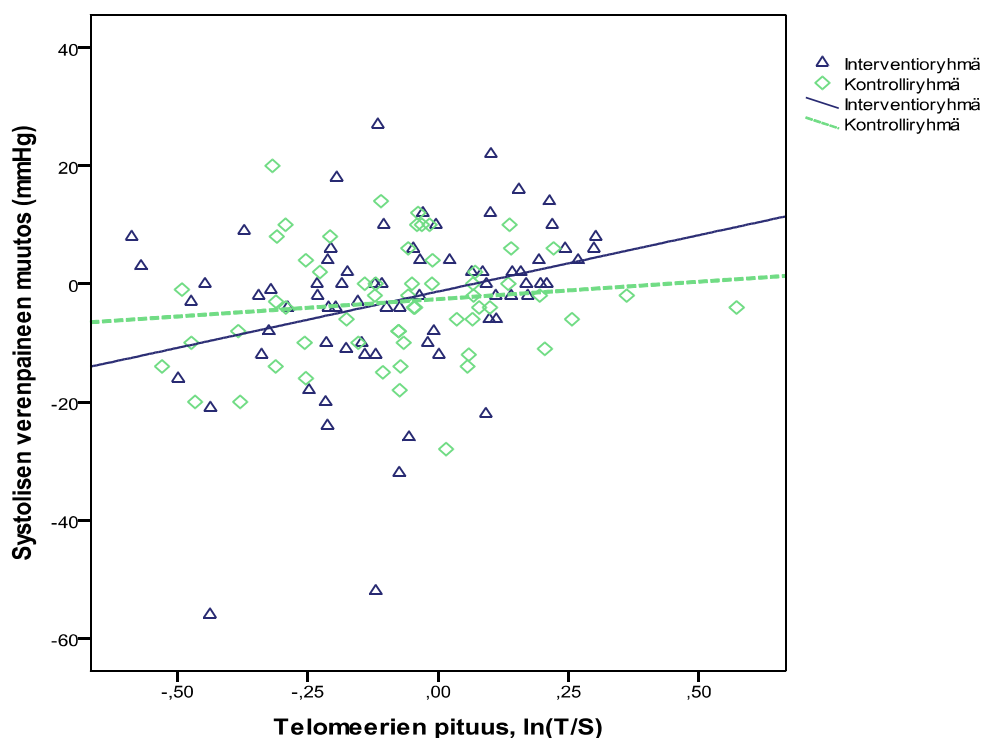
KUVA 6. Systolisen verenpaineen muutoksen ja telomeerien pituuden välinen yhteys. Miehillä $r=0,142$ ($p=0,26$, $n=65$), naisilla $r=0,146$ ($p=0,085$, $n=141$) ja kaikilla $r=0,147$ ($p=0,036$, $n=206$).



SPSS:n univariate-analyysia (kovarianssianalyysi) käytettiin tutkimaan, miten sukupuoli, interventio- tai kontrolliryhmä ja lääkkeiden käyttö vaikutti tutkittaviin yhteyksiin. Antipsykoottisten lääkkeiden käyttäjiä oli niin vähän, ettei heitä huomioitu tässä tutkimuksessa (TAULUKKO 1.). Univariate-analyysissa sukupuolella, tutkimusryhmällä tai verenpainelääkkeiden käytöllä ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta systolisen verenpaineen muutoksen ja telomeerien pituuden väliseen yhteyteen. Pelkässä interventioryhmässä korrelaatio systolisen verenpaineen ja T/S-suhteen välillä oli hiukan korkeampi ($r=0,22$, $p=0,018$). Pelkässä kontrolliryhmässä vastaavaa korrelaatiota ei ollut havaittavissa ($r=0,042$, $p=0,69$). Miesten ja naisten välillä vastaavaa eroa ei ollut (KUVA 6.).

Tutkimusryhmää kokeiltiin rajata sellaisiin henkilöihin, joilla telomeerinäytteenoton ja ortostaattisen kokeen välillä oli ollut alle vuosi. Näitä henkilöitä oli 132, joista 59 (44,7 %) kuului kontrolliryhmään. Korrelaatio T/S-suhteen ja systolisen verenpainemuutoksen välillä oli tällöin korkeampi ($r=0,24$, $p<0,01$) (KUVA 7.). Kun ikä ja systolinen verenpaine maaten otettiin kontrollimuuttujiksi osittaisessa korrelaatiossa, oli korrelaatiokerroin $r=0,25$ ($p<0,01$) ja vastaava kerroin pelkälle interventioryhmälle $r=0,31$ ($p=0,01$ ja $r^2=0,094$). Pelkälle interventioryhmälle samainen T/S-suhteen ja systolisen verenpaineen muutoksen välinen tavallinen korrelaatiokerroin oli $r=0,30$ ($p=0,01$).

KUVA 7. Systolisen verenpaineen muutoksen ja telomeerien pituuden välinen yhteys, kun huomioitu vain ne, joilla tutkimusten välillä oli alle vuosi. Interventioryhmälle $r=0,30$ ($p=0,01$, $n=73$), kontrolliryhmälle $r=0,133$ ($p=0,32$, $n=59$) ja kaikille $r=0,24$ ($p<0,01$, $n=132$).



6. Pohdinta

Keskeisin löydös tässä tutkimuksessa oli korrelaatio systolisen verenpaineen muutoksen (aktiivisessa ortostaattisessa kokeessa) ja telomeerien pituutta kuvaavan T/S-suhteen välillä. Korrelaatio oli kuitenkin hyvin heikko, selitysosuudeltaan vain 2,2 prosenttia. Yhteys oli kuitenkin selvästi voimakkaampi, kun analyysistä poistettiin henkilöt, joilla kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston kokeiden suorittamisen ja telomeeriverinäytteen ottamisen välinen aikaero oli yli vuoden. Silloinkin korrelaatiokerroin jäi vain 0,24:ään ($p < 0,01$). Jostain syystä vastaava korrelaatiokerroin pelkässä interventoryhmässä oli hiukan korkeampi ($r = 0,30$, $p = 0,01$), vaikkakaan eroa interventio- ja kontrolliryhmän välillä ei ollut havaittavissa kovarianssianalyyseissa (SPSS:n univariate). Ero saattaa johtua alkuperäisen tutkimuksen toteutustavasta, jossa diabetekseen sairastuneet suljettiin pois tutkimuksesta. Interventoryhmä saattoi olla siis hiukan heterogeenisempi tutkittujen muuttujien osalta kuin kontrolliryhmä, jossa mahdollisesti sympaattisesta dysfunktiosta kärsivät olivat karsituneet osittain pois diabetestapausten myötä. Toisaalta E/I-suhde oli ainoa tutkittavista muuttujista, joka oli tilastollisesti merkitsevästi erilainen ryhmien välillä. E/I-suhde oli yllättäen hiukan suurempi kontrolliryhmässä eli tutkittavat vaikuttivat paradoksaalisesti hiukan ”terveemmiltä” kontrolliryhmässä.

Telomeerit olivat myös keskimäärin hiukan pitempiä (12,5 %) niillä, joilla sympaattista dysfunktiota ei ollut, kuin sympaattisesta dysfunktiosta kärsivillä. Ero ei kuitenkaan ollut suuri (KUVA 5.), varsinkin kun otetaan huomioon, että T/S-suhteen minimi oli aineistossa 0,56 ja maksimi oli 1,82. Samanlaista eroa ei ollut havaittavissa parasympaattisesta dysfunktiosta kärsivien ja ”terveiden” välillä. Myöskään parasympaattisen hermoston toimintaa kuvannut E/I-suhde ei ollut yhteydessä telomeerien pituuteen tässä aineistossa.

Tässä tutkimuksessa havaittu sympaattisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välinen yhteys voi selittyä myös sympaattisesta hermostosta riippumattomilla syillä, kuten sydän- ja verenkiertoelimistön yleisellä kunnolla. Toisaalta aktiivisessa ortostaattisessa kokeessa verenpaine mitattiin vain yhden minuutin kohdalla, eikä mittausta suoritettu enää kolmen minuutin kohdalla niin kuin ortostaattisen hypotension tutkimukseen yleensä kuuluu (The Consensus Committee of the American Autonomic Society... 1996). Näin saattoi jäädä tunnistamatta joitakin henkilöitä, joilla todella oli sympaattinen dysfunktio.

Diastolisen verenpaineen muutos ei korreloinut telomeerien pituuksien kanssa, mikä osittain voi johtua siitä, että diastolisen verenpaineen muutos on systolisen verenpaineen muutosta pienempi seisomaan noustessa. Myös valtimonkovettumistautiin ja ikääntymiseen liittyvä valtimoiden suurempi jäykkyys saattaa selittää yhteyden puuttumista ja sitä, miksi systolisen verenpaineen muutoksen ja telomeerien pituuksien välillä on yhteys. Protogeroun ym. (2008) tutkimuksessa verenpainetaudista kärsivillä ja vailla lääkehoitoa olleella 39 (keskimäärin 53-vuotiaalla) tutkittavalla ei havaittu yhteyttä valtimoiden jäykkyyttä kuvastavan pulssiaallonopeuden ja diastolisen verenpaineen muutoksen (ortostaattisessa kokeessa) välillä. Systolisen verenpaineen lasku oli yhteydessä jäykistyneisiin valtimoihin ikä-, keskiverenpaine- ja sukupuolivakioidussa mallissa. Myös tässä tutkimuksessa pulssipaine, jonka suuri arvo kertoo valtimoiden jäykistymisestä, oli yhteydessä vain systolisen verenpaineen muutokseen ($r=-0,168$, $p=0,016$). Toisaalta laajassa, yli 3000 iästä (>55-vuotiaasta) henkilöä käsittäneessä, The Rotterdam Study -tutkimuksessa sekä systolisen että diastolisen verenpaineen lasku ortostaattisessa kokeessa oli yhteydessä jäykempiin valtimoihin ikä-, keskiverenpaine- ja sukupuolivakioidussa mallissa (Mattace-Raso ym. 2006). Täten telomeerien pituuksien ja diastolisen verenpaineen muutoksen välisen yhteyden puuttuminen ei välttämättä selity pelkästään valtimoiden jäykkyydellä. Yhteyden puuttuminen voi siis tarkoittaa, ettei telomeerien pituuksien ja sympaattisen hermoston toiminnan välillä ole yhteyttä.

Tulkintaa vaikeuttaa kuitenkin moni asia. Ensinnäkin autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välistä yhteyttä pystyttiin vertaamaan vain tyyppin 2 diabeteksen riskiryhmässä ja normaali väestö puuttui vertailusta kokonaan. Autonomisen hermoston häiriöt olivat kuitenkin yleisiä käytetyssä aineistossa ja siksi autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välisen yhteyden selvittäminen oli mielekästä juuri tällaisessa aineistossa. Lisäksi tulkintaa vaikeuttaa kontrolli- ja interventioryhmien eroavuus, joka oli tosin pieni (TAULUKKO 1.). Myös tutkittavien tutkimuksen (DPS) tutkittavakohtainen kesto vaihteli kohtuullisen paljon. Miehiä oli myös aineistossa suhteellisen vähän, vain 65.

Yksi iso ongelma oli telomeerinäytteenoton ja autonomisen hermoston kokeiden välinen aikaero. Se saattoi heikentää havaittuja yhteyksiä. Tähän viittaa myös hiukan korkeampi korrelaatiokerroin ($r=0,24$, $p<0,01$) systolisen verenpaineen muutoksen ja T/S-suhteen välillä, kun suljettiin pois tutkittavat, joilla tutkimusten välillä oli kulunut yli vuosi. Tämä on siinä mielessä kummallista, että valkosolujen telomeerien lyheneminen on melko

hidasta – vain muutamia kymmeniä emäspareja vuotta kohden (Hoffmann ym. 2009). Myöskään tutkittavassa aineistossa telomeerien muutosnopeus vuotta kohden ei ollut kovin suuri (julkaisematonta tietoa). Arviointia vaikeuttaa myös, että T/S-suhde ei kerro suoraan emäsparien määrää. Tosin telomeerit ovat yleensä useita tuhansia emäspareja pitkiä eli muutaman kymmenen emäsparin muutoksen vuotta kohden ei pitäisi vaikuttaa. Joka tapauksessa tarkempi yhteyden selvittäminen vaatisi suunnilleen samaan aikaan otetun telomeerinäytteen ja suoritettua aktiivisen ortostaattisen kokeen.

Lisäksi on hyvä huomata, että telomeerien pituudet määritettiin veren valkosoluista eikä tutkittavista kudoksista. Veren valkosolut ovat kuitenkin ainoa järkevä tapa tutkia telomeerien pituuksia suhteessa kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toimintaan. Tämä tutkimus oli myös poikkileikkaustutkimus ja perustui yksittäisiin mittauksiin. Koska autonomisen hermoston testit eivät olleet osa alkuperäistä tutkimussuunnitelmaa ja ne oli toteutettu interventiojakson jälkeen, oli käytännössä mahdotonta tutkia intervention vaikutusta mahdollisiin yhteyksiin. Kiinnostavaa olisi esimerkiksi ollut tutkia, onko telomeerien lyhenemisnopeus yhteydessä huonontuneeseen autonomisen hermoston toimintaan.

Jatkotutkimukseen lienee aihetta ja tätä tutkimusta voisi parantaa selvittämällä samoihin aikoihin otetun telomeerinäytteen ja suoritettua ortostaattisen kokeen tulosten välinen yhteys. Myöskään tutkittavien leposykkeitä ei ollut käytössä tätä tutkielmaa varten. Leposykkeiden ja telomeerien pituuksien välisen yhteyden selvittäminen on varmasti aiheellista jatkotutkimuksen kannalta. Tiheän leposykkeen ja lyhyiden telomeerien on nimittäin molempien todettu olevan yhteydessä suurentuneeseen sydänperäiseen kuolleisuuteen (Cooney ym. 2010, Fitzpatrick ym. 2007).

Yhteenvetona voi todeta, että kardiovaskulaarisen autonomisen hermoston toiminnan ja telomeerien pituuden välillä ei ollut vahvaa yhteyttä tässä aineistossa. Parasymptaattisen hermoston osalta yhteyttä ei ollut havaittavissa ollenkaan. Huomionarvoista on kuitenkin, että tässä tutkimuksessa sympaattinen dysfunktio oli yhteydessä jonkin verran lyhyempiin telomeereihin. Suurimmillaankin havaittu selitysosuus systolisen verenpaineen pienenemisen ja lyhyempien telomeerien välillä oli 9,4 prosenttia. Autonomisen hermoston toiminnan heikkeneminen ja telomeerien lyheneminen näyttäisivät siis olevan jossain määrin erillisiä biologisia ikääntymisprosesseja.

7. Lähteet

Richard M. Cawthon; Telomere measurement by quantitative PCR; Nucleic Acids Research 2002, Vol. 30, No. 10 e47

Allen W. Cowley, jr., Jean Francois Liard and Arthur C. Guyton; Role of the baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs; Circulation Research 1973;32;564-576

Christopher M. Counter, Ariel A. Avilion, Catherine E. LeFeuvrel, Nancy G. Stewart, Carol W. Greider, Calvin B. Harley and Silvia Bacchetti; Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity; The EMBO Journal 1992, vol. 11 s. 1921 - 1929

Marie Therese Cooney, Erkki Vartiainen, Tinna Laakitainen, Anne Juolevi, Alexandra Dudina and Ian M. Graham; Elevated resting heart rate is an independent risk factor for cardiovascular disease in healthy men and women; American Heart Journal, Volume 159, 2010, s. 612-619

Diabetesliitto, diabetestietoa http://www.diabetes.fi/diabetestietoa/tyyppi_2 (luettu 24.5.2011)

J. Eriksson, J. Lindström, T. Valle ym.; Prevention of Type II diabetes in subjects with impaired glucose tolerance: the Diabetes Prevention Study (DPS) in Finland Study design and 1-year interim report on the feasibility of the lifestyle intervention programme; Diabetologia 1999 42: 793-801

Annette L. Fitzpatrick, Richard A. Kronmal, Jeffrey P. Gardner ym.; Leukocyte Telomere Length and Cardiovascular Disease in the Cardiovascular Health Study; Am. J. Epidemiol. 2007, 165: 14-21.

Guyton A.C. ja Hall J.E.; Textbook of Medical Physiology; USA: Saunders Elsevier 2011; (kappaleet 60, 18, 9, 10 ja 13)

Boris Hansel, Philippe Giral, Estelle Nobecourt, Sandrine Chantepie, Eric Bruckert, M. John Chapman and Anatol Kontush; Metabolic Syndrome Is Associated with Elevated Oxidative Stress and Dysfunctional Dense High-Density Lipoprotein Particles Displaying Impaired Antioxidative Activity; The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004 vol. 89 s. 4963-4971

Harumi Hotta, Sae Uchida; Aging of the autonomic nervous system and possible improvements in autonomic activity using somatic afferent stimulation; Geriatrics & Gerontology International 2010; Vol. 10 s. S127-S136

Jedrzej Hoffmann, Young Erben, Andreas M. Zeiher, Stefanie Dimmeler, Ioakim Spyridopoulos; Telomere length-heterogeneity among myeloid cells is a predictor for chronological ageing; Experimental Gerontology 2009 Volume 44, 363-366

Käypä hoito, diabetes, Duodecim

<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/naytaartikkeli/tunnus/hoi50056> (päivitetty 15.9.2009)

Laaksonen DE, Lindström J, Lakka TA ym.; Finnish diabetes prevention study.; Physical activity in the prevention of type 2 diabetes: the Finnish diabetes prevention study; Diabetes 2005, 54:158-65

Laitinen T, Lindström J, Eriksson J ym.; Cardiovascular autonomic dysfunction is associated with central obesity in persons with impaired glucose tolerance; *Diabetic Medicine* 2011 28:699-704

Lindström J, Louheranta A, Mannelin M ym.; Finnish Diabetes Prevention Study Group; The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity;; *Diabetes Care* 2003, 26:3230-6.

Mattace-Raso, Francesco; van der Cammen, Tischa; Knetsch, Anneke ym.; Arterial stiffness as the candidate underlying mechanism for postural blood pressure changes and orthostatic hypotension in older adults: the Rotterdam Study; *Journal of Hypertension*, Volume 24, 2006, s. 339–344

Morin GB; Recognition and elongation of telomeres by telomerase; *Cell* 1989, 59 s. 521-529

Athanase D. Protogerou, George S. Stergiou, Panagiota Lourida and Apostolos Achimastos; Arterial stiffness and orthostatic blood pressure changes in untreated and treated hypertensive subjects; *Journal of the American Society of Hypertension*, Volume 2, 2008, s. 372-377

Daniela Rhodes, Louise Fairall, Tomas Simonsson, Robert Court & Lynda Chapman; Telomere architecture; *EMBO reports* 3 s. 1139–1145, 2002

Klelia D. Salpea, Philippa J. Talmud, Jackie A. Cooper, Cecilia G. Maubaret, Jeffrey W. Stephens, Kavin Abelak, and Steve E. Humphries; Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation; *Atherosclerosis*. 2010; 209: 42–50

Peter Y. W. Sin, Matthew R. Webber, Duncan C. Galletly ym.; Interactions between heart rate variability and pulmonary gas exchange efficiency in humans; *Experimental Physiology* 2010 Volume 95, 788–797

Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology; Heart Rate Variability, Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use; *Circulation*. 1996; 93:1043-1065

Philip Thomas, Nathan J. O' Callaghan and Michael Fenech; Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease; *Mechanisms of Ageing and Development* 2008, Volume 129, s. 183-190

The Consensus Committee of the American Autonomic Society and the American Academy of Neurology; Consensus statement on the definition of orthostatic hypotension, pure autonomic failure, and multiple system atrophy; *Neurology* Volume 46, 1996, s. 1470

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG ym.; Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance; *The New England Journal of Medicine* 2001, 344:1343-50

Töyry JP, Niskanen LK, Mäntysaari MJ, Länsimies EA, Uusitupa MI; Occurrence, predictors, and clinical significance of autonomic neuropathy in NIDDM. Ten-year follow-up from the diagnosis; *Diabetes*. 1996;45:308-15

Conny M. A. van Ravenswaaij-Arts; Louis A. A. Kollee; Jeroen C. W. Hopman; Gerard B. A. Stoeltinga; and Herman P. van Geijn; Heart Rate Variability; Annals of Internal Medicine 1993 vol. 118, 436-447

Christian Werner, MD; Tobias Fürster, MD; Thomas Widmann, MD ym.; Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall; Circulation. 2009;120:2438-2447

WHO 2006, Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf (haettu 30.5.2011)

Wikipedia, KUVA 3.; <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6a/Telomere.png> (haettu 3.6.2011)