

LAKTAATTIKULJETTAJAT MCT1 JA MCT2 AASIN
PUNASOLUN SOLUKALVolla

Viivianna Leppänen

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

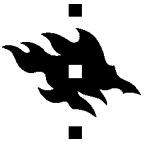
Hevosten sisätaudit

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2014



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Viivianna Leppänen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Laktaattikuljettajat MCT1 ja MCT2 aasin punasolun solukalvolla			
Oppiaine - Läroämne - Subject Hevosten sisätaudit			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum - Month and year 04/2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 24
Tiivistelmä - Referat - Abstract <p>Kovassa rasituksessa lihassoluissa muodostuu laktaattia niiden joutuessa työskentelemään anaerobisesti. Kun laktaatin tuotto ylittää kulutuksen, alkaa kudokseen kertyä laktaattia ja vetyioneja. Tästä seuranneen lisääntyneen happamoitumisen on epäilty olevan lihaksen väsymisen taustalla, mutta aiheesta väitellään yhä. Tutkimusta on tehty laktaatin liikkeistä niin eläin- kuin ihmispuolella. Hevonen on ollut hyvä tutkimuskohde sen laktaattiin käsittelyyn liittyvien erityisominaisuuksien ansiosta: Hevonen tuottaa ja kestää suuria määriä laktaattia liikuntarasituksen aikana, ja osalla hevosista yli puolet veren laktaatista voi sijaita punasoluissa. Hevosen punasolun solukalvolla laktaattikuljetukseen osallistuvat monokarboksylaattikuljettajat MCT1 ja MCT2. Hevonen on ainut tutkituista eläinlajeista jonka punasolun solukalvolta MCT2 on löydetty. Se vastaa kuljetuksesta veren alhaisissa laktaattipitoisuuksissa. Korkeissa pitoisuuksissa kuljetuksesta vastaa MCT1-kuljettaja, mutta sen esiintyminen vaihtelee hevositysilöiden kesken. Hevoset voidaankin jakaa tämän kuljetusaktiivisuuden perusteella ryhmiin.</p> <p>Aasi kuulu hevosen kanssa Equus-perheeseen, mutta hevoseen verrattuna aasin jalostuksen suunta on ollut yksipuolinen. Tutkimuksen tarkoituksena olikin selvittää, onko aasilla samankaltaisia erityisominaisuuksia punasoluissa kuten hevosilla, käyttöominaisuuksista huolimatta. Hypoteesina oli, että aasin punasolun solukalvolla löytyy MCT2-kuljettaja. Koska yhteyttä kuljetusaktiivisuuden ja suorituskyvyn välillä ei ole voitu kiistatta todistaa, hypoteesina oli että myös MCT1 löytyy punasolusta, ja siinä esiintyy yksilöiden välistä vaihtelua.</p> <p>Aineistona oli 30 aasien punasolunäytettä. Näytteet käsiteltiin western blot –menetelmän mukaan, käyttäen proteiinien erotuksessa geielektroforeesia (SDS-PAGE). Hevosspesifisten vasta-aineiden avulla määritettiin näytteistä MCT1:n ja MCT2:n esiintyminen ja suhteellinen määrä. Kaikilta aaseilta löytyi MCT2-kuljettaja ja 57 % aaseista MCT1-kuljettaja. MCT1-proteiinia oli enemmän ruunien kuin tammojen punasolujen solukalvoilla (p = 0,045).</p> <p>Hypoteesin mukaisesti kaikilta aaseilta löytyi punasoluista MCT2. Tämän perusteella kuljettajan esiintyminen voisi olla hevoseläinten, ei pelkästään hevosten erityisominaisuus. MCT1-kuljettajaa oli myös aasien punasoluissa, mutta hevosiin verrattuna sitä esiintyi pienemmällä yksilömäärällä. Samankaltaista selkeää kaksijakoisuutta ei MCT1-kuljettajan perusteella nähty, mutta hevostutkimuksissakin selkeä ero on havaittu MCT1-kuljettajan apuproteiinin (CD147) määrityksissä. Aasien rasitustesteissä ei ole mitattu yhtä korkeita laktaattipitoisuuksia kuten hevoselta, joten MCT1-kuljettajan merkitys aasille voisi olla vähäisempi. Pienempien laktaattipitoisuuksien taustalla voi olla aasien juostessa käyttämien lihasten pienempi anaerobisten lihassyiden määrä. Toisaalta aasin rasitustesteissä riittävä rasituksen taso on ollut haastava toteuttaa. Ruunien suuremmat MCT1-proteiinimäärät tammoihin verrattuna eivät ole yhteneviä hevoslöydösten kanssa, joten tämän tuloksen selvittäminen ja varmistaminen vaatisi lisätutkimuksia.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords aasi, laktaatti, monokarboksylaattikuljettaja, MCT1, MCT2, punasolu			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden (EE) -talon Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja Riitta-Mari Tulamo Ohjaajat Anna Mykkänen ja Ninna Koho			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	2
2.1 Laktaatin tuotto	2
2.1.1 Lihassytyypit	3
2.2 Laktaatin kertyminen ja sen vaikutus lihaksen toimintaan	4
2.3 Laktaatin liikkuminen solukalvon läpi	4
2.3.1 Diffuusio	4
2.3.2 AE1	5
2.3.3 Monokarboksylaattikuljettajat	5
2.4 Laktaatin käyttö elimistössä	6
2.5 Punasolun laktaatin kuljetusaktiivisuus	7
2.5.1 Aktiivisuus eläinlajien välillä	7
2.5.2 Aktiivisuus hevosyksilöiden välillä	8
2.6 Aasi	9
2.6.1 Aasi – <i>Equus asinus</i>	9
2.6.2 Fysiologinen vaste rasitukseen	9
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	10
3.1 Näytteet	10
3.2 Western blot	10
3.2.1 Punasolumembraanien eristäminen	10
3.2.2 Punasolumembraanien proteiinipitoisuuden määrittäminen	11
3.2.3 SDS-PAGE	11
3.4.3.1 Näytteiden valmistaminen	11
3.4.3.2 Geelien valaminen	11
3.4.3.3 Elektroforeesi	12
3.2.4 Siirto kalvolle (blottaus, blotting)	13
3.2.5 Ponceau-S värjäys	14
3.2.6 Kalvon esikäsittely (blokkaukset, blocking)	14
3.2.7 MCT2-vasta-ainetestaus	14
3.2.8 Kalvojen kuvaus	15
3.2.9 MCT1-vasta-ainetestaus	15
3.2.10 Proteiinimäärän varmistaminen (loading control)	16

3.2.11 Intensiiteettien määrittäminen	17
3.3 Tilastolliset menetelmät	17
4 TULOKSET	17
5 POHDINTA	19
6 KIRJALLISUUSLUETTELO	21

1 JOHDANTO

Liikuntasuorituksen aikana kertyvän laktaatin liikkeitä ja vaikutuksia lihaksen toimintaan on tutkittu paljon niin ihmis- kuin eläinpuolella. Hevonen on ollut suosittu tutkimuskohde urheilijaominaisuuksiensa vuoksi; Suorituskyvyn takana ovat hevoselle tyypilliset anatomiset ja fysiologiset ominaisuudet, kuten suuret keuhkot, iso sydän, pernan punasoluvarasto ja lihassolujen suuret glykogeenivarastot. Hevoset pystyvät liikuntasuorituksen aikana varastoimaan yli puolet veren laktaatista punasoluihin, ja näin sen kuljetus pois työskentelevistä lihaksista vereen säilyy tehokkaana (Pösö ym. 1995, Rainger ym. 1995, Bayly ym. 2006). Tämä ominaisuus voi lisätä lihasten korkean puskurointikyvyn ohella hevosen kykyä sietää suuria määriä laktaattia (McCutcheon ym. 1987, Bayly ym. 2006). Tärkeitä tekijöitä laktaatin siirtymisessä punasoluun ovat monokarboksylaattikuljettajat. Hevosten punasolujen solukalvoilla laktaatin kuljettamiseen osallistuu MCT1-kuljettajan lisäksi MCT2-kuljettaja, mitä muilta eläinlajeilta ei ole löydetty (Koho ym. 2002).

Hevonen (*Equus caballus*) on monipuolinen urheilija; Nopeasta ja kestävästä preerian saaliseläimestä on jalostettu niin raskaita työhevosia, kevyitä kestävyysurheilijoita kuin nopeita sprinttereitä. Aasi (*Equus asinus*) kuuluu hevosen kanssa *Equus*-perheeseen. Sitä vuorostaan on käytetty lähinnä kestävyyttä vaativissa tehtävissä, kuten kuorman vetämisessä tai kantamisessa, joten oletettavasti myös jalostuksen ja valinnan suunta on ollut erilainen kuin hevosella. Aasilla on samankaltaisia urheilijaominaisuuksia kuten hevosellakin, mutta yhtä korkeita veren laktaattipitoisuuksia ei rasituksessa ole todettu (Mueller ym. 1994). Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää esiintyykö aasin punasolun solukalvolla MCT2-proteiini, mitä muilta eläinlajeilta hevosta lukuun ottamatta ei ole löydetty (Koho ym. 2002). Tarkoituksena oli myös tarkastella MCT1-kuljettajan esiintymistä solukalvolla, onko siinä samankaltaista vaihtelua yksilöiden kesken kuin hevosella (Mykkänen ym. 2010). Hypoteesina oli, että aasin punasolun solukalvolta löytyy MCT2 ja MCT1-proteiinin esiintymisessä olisi vaihtelua hevosen tapaan.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Laktaatin tuotto

Lihaskoivutsee mekaaniseen työhön ATP:tä, jota se itse muodostaa tilanteesta ja lihassyystä riippuen erilaisten metaboliareittien avulla (Nelson ja Cox 2013). Hapen läsnäollessa ATP:n lähteenä voivat olla esimerkiksi glukoosi, vapaat rasvahapot ja ketoaineet (Nelson ja Cox 2013). Glukoosista ATP:tä muodostetaan glykolyysissa, jossa yksi glukoosimolekyyli hajotetaan kahdeksi pyruvaatiksi ja saadaan kaksi ATP-molekyyliä yhtä glukoosia kohden (Nelson ja Cox 2013). Kun happea on tarjolla, pyruvaatti jatkaa sitruunahappokiertoa ja muodostuneet elektronit edelleen mitokondrion elektroninsiirtoketjuun (Nelson ja Cox 2013). Aerobisissa oloissa glykolyysissa muodostuu 30 – 32 ATP-molekyyliä (Nelson ja Cox 2013).

Liikunnan intensiteetin kasvaessa, happea ei pystytä toimittamaan työskenteleville lihassoluille riittävästi kasvaneeseen tarpeeseen nähden (Nelson ja Cox 2013). Lihassolu alkaa tällöin tuottaa ATP:tä anaerobisesti glukoosista ja glykogeenista (Nelson ja Cox 2013). Tässä glykolyysi etenee pyruvaatin muodostumiseen asti (Nelson ja Cox 2013). Hapen puuttuessa pyruvaatti pelkistetään laktaattidehydrogenaasi-entsyymin avustuksella laktaatiksi (Nelson ja Cox 2013). Anaerobisessa glykolyysissa syntyy vain muutama ATP, mutta metaboliareitin avulla pystytään reagoimaan nopeasti kasvavaan energiatarpeeseen (Nelson ja Cox 2013). Kun pyruvaattia tuotetaan, syntyy NAD⁺:n pelkistyessä vastaparina NADH:tä. Kun pyruvaatti vuorostaan pelkistetään laktaatiksi, hapettuu NADH NAD⁺:ksi, mikä mahdollistaa glykolyysin ja edelleen energiantuoton jatkumisen myös anaerobisissa olosuhteissa (Nelson ja Cox 2013).

Kun aerobinen liikunta muuttuu anaerobiseksi, saavutetaan anaerobinen kynnysarvo (Wilson ym. 1983). Sillä tarkoitetaan sitä työntasoa tai nopeutta, minkä jälkeen laktaatin tuotto ylittää kulutuksen (Wilson ym. 1983). On päätetty ja kokeellisesti vahvistettu, että laktaattipitoisuuden ylittäessä 4 mmol/l, laktaattia alkaa kertyä (Wilson ym. 1983). Laktaatin tuotto lihaksessa on riippuvainen liikunnan voimakkuudesta, eli tuotto lisääntyy intensiteetin kasvaessa (Juel 2008). Hevosella on mitattu rasituksen jälkeen lihasnäytteissä jopa yli 200 mmol/kg (ka) laktaattipitoisuuksia (Snow ym. 1985).

Laktaattia muodostetaan lihassolujen lisäksi muissakin kudoksissa lähinnä hapettomissa olosuhteissa, mutta esimerkiksi punasoluissa tuottoa tapahtuu olosuhteista riippumatta: Punasolulla ei ole mitokondrioita joissa pyruvaatin hapetus voisi jatkua (Nelson ja Cox 2013). Ihmisellä valtimoveren laktaattipitoisuus on alle 2 mmol/l, vaikka päivittäinen tuotto on luokkaa 1500 mmol/l (Levy 2006). Tästä kokonaistuotoksesta lihasten osuus on 25 %, ihon 25 %, aivojen 20 %, suoliston 10 % ja punasolujen 20 % (Levy 2006). Hevosen plasman laktaatin viitearvon ylärajana pidetään 1,5 mmol/l (Vetlab) ja aasin lepoarvoksi esimerkiksi Mueller ym. (1994) saivat alle 1 mmol/l tuloksia.

2.1.1 Lihassytyypit

Lihassolut voidaan jakaa erilaisten ominaisuuksien mukaan eri lihassolutyypeiksi (Valberg ja Essén-Gustavsson 1987, Nelson ja Cox 2013). Lihassytyyppien karkea jako on väsymättömät hitaasti supistuvat, ja nopeasti supistuvat jotka väsyvät nopeammin kuin hitaasti supistuvat (Nelson ja Cox 2013). Nykytietämyksen mukaan nisäkkäiden eri lihassytyyppejä on erotettavissa neljä, I, IIa, IIb ja IIx, kun apuna käytetään myosiinin raskaan ketjun eri isoformien esiintyvyyttä (Allen ym. 2008). Näistä hitaasti supistuva syytyyppi on I, ja nopeasti supistuvia ovat useimmiten tyypit IIa, IIb ja IIx, joskin tyyppi IIx ei väsy yhtä nopeasti kuin tyypit IIa ja IIb (Fitts 1994). Edellä mainituista korkein aerobinen kapasiteetti on siis yleensä syytyypillä I (Allen ym. 2008). Aerobiseen kapasiteettiin vaikuttaa lihassolun mitokondrioiden määrä ja kapillaariverkoston tiheys, jotka ovat runsaita juuri hitaasti supistuvien lihassyiden kohdalla (Allen ym. 2008, Nelson ja Cox 2013). Nopeasti supistuvilla lihassytyypeillä on vähemmän mitokondrioita ja kapillaarisuonia ympärillään, mutta ne kykenevät supistumaan voimakkaammin ja nopeammin (Nelson ja Cox 2013). Eri lihassytyyppien ominaisuudet voivat kuitenkin vaihdella esimerkiksi lajien välillä, joten suoraan myosiiniketjujen perusteella ei lihassytyyppejä voida jakaa aerobisiin ja anaerobisiin (Allen ym. 2008). Hevosen kohdalla syytyypillä IIb on havaittu suurin pitoisuus anaerobisessa glykolyysissä tarvittavaa laktaattidehydrogenaasia (Valberg ja Essen-Gustavsson 1987, Allen ym. 2008). Valberg ja Essen-Gustavsson (1987) saivat hevostutkimuksessaan liikunnan jälkeisten lihasnäytteiden perusteella positiivisen korrelaation tyypin IIb prosenttiosuuden ja kertyneen laktaattipitoisuuden välillä.

2.2 Laktaatin kertyminen ja sen vaikutus lihaksen toimintaan

Lihassolun negatiivinen kalvopotentiaali pyrkii kerryttämään positiivisesti varautuneita vetyioneja (H^+) solun sisään (Juel 2008). Vetyionit kertyvät soluun lähinnä joko vapautuessaan solun sisäisestä metaboliasta tai tulevat solun ulkopuolelta kuljetusproteiinien tai erilaisten yhdisteiden mukana (Juel 2008). Lihastyön aikana H^+ -ionien tuotto ja vapautuminen kasvaa huomattavasti (Juel 2008). Työskentelevässä lihaksessa syntyy laktaattia ja H^+ -ioneja lähes samaan tahtiin, joten tämän yhteyden avulla happamoitumista voidaan seurata laktaatin kertymisellä (Juel 2008).

Laktaatin kertymisen ja solun happamoitumisen vaikutuksesta lihassolun toimintaan, ja yhteydestä lihaksen väsymiseen käydään edelleen keskustelua (ks. Fitts 1994, Allen ym. 2008). On esitetty että laktaatin tuotosta syntyvän vapaan protonin (H^+) kertyminen ja solun happamoituminen haittaa lihaksen toimintaa, ei niinkään itse laktaatin kertyminen (Fitts 1994). Happamoituminen ja H^+ häiritsevät solussa erilaisten sidosten muodostumista ja heikentävät kalsiumin toimintaa vähentäen siten lihaksen supistumiskykyä (Fitts 1994). Vasodilataation on myös epäilty olevan lihaksen väsymistä aiheuttava tekijä (Juel 2008). Happamuuden lisääntymisen on esitetty aiheuttavan vasodilataatiota eli verisuonten supistumista kalium-ionin välityksellä (Juel 2008). Happamuus voisi aktivoida ATP-herkkiä kaliumkanavia, muuttaa edelleen kalvopotentiaalia ja solunsisäistä kalsiumionipitoisuutta, tai vaikuttaa epäsuorasti kaliumionin jakautumiseen (Juel 2008). Todistettua mekanismia ei tiedetä, mutta Juel (2008) on myös todennut happamuuden negatiivista vaikutusta sillä perusteella, että liikuntaharjoittelu parantaa lihaksen kykyä ylläpitää happo-emäs-tasapainoa. Osa tutkijoista taas on sitä mieltä, että laktaatilla ja happamoitumisella on vain vähän, jos ollenkaan, vaikutusta lihaksen toiminnalle (Allen ym. 2008).

2.3 Laktaatin liikkuminen solukalvon läpi

2.3.1 Diffuusio

Maitohappo on melko vahva happo (pK_a -arvo 3,86), joten fysiologisessa pH:ssa (7.4) se esiintyy dissosioituneena negatiivisesti varautuneeksi laktaatiksi ja protoniksi 99,97 %:sti (Poole ja Halestrap 1993). Näin ollen vain alle promille on varauksettomana

maitohappona, jonka on mahdollista diffuusiolla kulkea solukalvon läpi (Poole ja Halestrap 1993, Juel 1997). Solussa kuitenkin laktaattipitoisuuden kasvaessa ja happamoitumisen myötä maitohappomuodon osuus ja sitä kautta diffuusio lisääntyy (Juel 1997).

2.3.2 AE1

Punasolun solukalvolla toimii anioninvaihtaja AE1 (band 3), joka vaihtaa kloridin tai bikarbonaatin laktaattiin (Alper 1991, Poole ja Halestrap 1993). Samaan geeniperheeseen kuuluvia anioninvaihtajia on löydetty myös esimerkiksi munuaisista ja valkosoluista (Alper 1991).

2.3.3 Monokarboksylaattikuljettajat

Solukalvon monokarboksylaattikuljettajia (MCT), eli SLC16 geeniperheen jäseniä, on löydetty ihmiseltä tähän mennessä 14 kappaletta MCT1 – MCT14 (Halestrap ja Meredith 2004, Halestrap 2013). Näiden esiintyminen vaihtelee lajien ja kudosten välillä (Halestrap ja Meredith 2004). Kalvoproteiineista MCT1 – MCT4 kuljettavat laktaattia ja osa lisäksi pyruvaattia, haihtuvia rasvahappoja ja ketoaineita (Halestrap ja Meredith 2004). Kuljetustapahtumassa kalvoproteiini siirtää monokarboksylaatti-anionin yhdessä protonin kanssa, tai vaihtaa sen toiseen monokarboksylaattiin, joten kuljetus on elektroneutraalia (Halestrap ja Meredith 2004). Kuljettajat toimivat kalvolla molempiin suuntiin, ja ne siirtävät substraatteja konsentraatiogradientin mukaisesti joko soluun tai solusta ulos (Halestrap ja Price 1999). Kuljetustyöhön ei siten tarvita muuta ulkopuolista energiaa (Halestrap ja Price 1999).

MCT1-proteiinia on useimmissa kudoksissa ja se on myös löydetty kaikilta tutkituilta lajeilta (Halestrap ja Meredith 2004). Ihmisellä MCT1 esiintyy pääosin hitaasti supistuvissa, aerobisissa lihassyissä, ja kuljettajan esiintymistä solukalvolla voidaan lisätä harjoittelulla (Juel 2008). MCT1 on löydetty myös hevosen lihaksista (Koho ym. 2006). Liikuntaharjoittelulla ei ole havaittu samankaltaista vaikutusta lihassolun solukalvon kuljettajatiheyteen kuten ihmisellä (Koho ym. 2006, Juel 2008, Revold ym. 2010). Kuljettajaa esiintyy myös punasolun solukalvolla (Halestrap ja Meredith 2004). MCT1-kuljettajan substraatteja ovat laktaatti, pyruvaatti ja ketoaineet, jotka se joko

kuljettaa yhdessä protonin kanssa (H^+) tai vaihtaa toiseen monokarboksylaattiin (Halestrap 2013).

MCT2-proteiinin esiintyminen näyttää vaihtelevan suuresti sekä lajien että kudosten välillä: Se esiintyy heikosti ihmisen kudoksissa, mutta tutkituista lajeista hevoselta, hiireltä, rotalta ja hamsterilta kuljettaja on löydetty (Koho ym. 2002, Halestrap ja Meredith 2004). Hevonen on tiettävästi ainut laji, jonka punasolun solukalvolta MCT2 on löytynyt (Koho ym. 2002). MCT2:n substraatit ovat samanlaiset kuin MCT1:n kohdalla, mutta se kuljettaa monokarboksylaattit vain yhdessä protonin (H^+) kanssa (Halestrap 2013). MCT2-proteiinilla on korkeampi affiniteetti laktaatin kuljetukseen verrattuna MCT1-proteiiniin (Halestrap ja Meredith 2004).

MCT3 sijaitsee verkkokalvon uloimmassa kerroksessa ja aivosuonipunoksen epiteelissä, eikä apikaalisesti kuten MCT1 (Halestrap ja Meredith 2004). MCT4 taas esiintyy erityisesti glykolyttisissä kudoksissa, ja se on löydetty esimerkiksi luustolihasista, rustosoluista, leukosyyteistä, istukasta ja vastasyntyneen sydänlihaksesta (Halestrap ja Meredith 2004).

MCT1, MCT3 ja MCT4 tarvitsevat CD147-apuproteiinin (basigin) päätyäkseen solukalvolle ja toimiakseen tarkoituksenmukaisesti (Halestrap ja Meredith 2004, Halestrap 2013). MCT2-kuljettajan apuproteiini on GP70 (embigin) (Wilson ym. 2005).

2.4 Laktaatin käyttö elimistössä

Laktaatti ei ole vain tarpeeton sivutuote, vaan sitä voidaan hyödyntää solujen energian tuottoon (van Hall 2010). Laktaattia voidaan käyttää suoraan ATP:n tuottoon esimerkiksi luurankolihasessa, sydänlihaksessa ja aivoissa (van Hall 2010). Hapen läsnä ollessa laktaattia kulutetaan lihassoluissa niin levossa kuin liikunnankin aikana, jopa samaan aikaan kuin sitä tuotetaan (van Hall 2010). Maksa, munuaiset ja rasvakudos taas voivat käyttää laktaattia glukoneogeeniin tai lipogeneesiin substraattina (Halestrap 2013). Kudoksissa esiintyy erilaisia monokarboksylaattikuljettajia solun tarpeen mukaan: Anaerobisissa lihassoluissa on paljon MCT4-proteiinia, mikä kuljettaa tuotettua laktaattia pois solusta kun taas

aerobisissa lihassyissä on runsaasti MCT1-proteiinia kuljettamaan laktaattia solun sisään hapetettavaksi (Halestrap ja Meredith 2004).

Laktaatin kuljetus soluihin ja niistä pois perustuu konsentraatiogradienttiin (van Hall 2010). Kudoksilla on laktaatin kuljettamiseen suuri kapasiteetti, eikä laktaattidehydrogenaasi rajoita sen pyruvaatiksi muuttamista fysiologisissa pitoisuuksissa, joten laktaatti voi olla joissain tilanteissa parempi energianlähde kuin glukoosi (van Hall 2010).

2.5 Punasolun laktaatinkuljetusaktiivisuus

2.5.1 Aktiivisuus eläinlajien välillä

Eläinlajit eroavat toisistaan punasolun aktiivisuudessa kuljettaa laktaattia solukalvon läpi (Väihkönen ym. 2001). Lajeilla joilla on korkea kuljetusaktiivisuus, kuljetuksesta vastaavat pääasiassa MCT-perheen proteiinit, kun taas matalan aktiivisuuden omaavilla päävastuussa ovat anioninvaihtaja (AE1) sekä diffuusio (Väihkönen ym. 2001). Väihkönen ym. (2001) tutkimat eläinlajit jakautuivat niin, että korkean kuljetusaktiivisuuden ryhmään kuului koira, ihminen ja hevonen, ja matalan aktiivisuuden ryhmään märehitjoiden edustajana poro.

Rainger ym. (1995) havaitsivat että rasituksen aikana hevosen kokoveren ja plasman laktaattipitoisuuden suhde vaihtelee yksilöittäin, välillä 0,46 – 0,73. Myös Pösö ym. (1995) tutkimuksessa yli puolet hevosen veren laktaatista sijaitsi punasoluissa, mutta yksilöiden välillä esiintyi suurta vaihtelua. On spekuloitu, että punasolut voisivat toimia laktaatin väliaikaisena säilytyspaikkana (Pösö ym. 1995). Tämän systeemin avulla konsentraatiogradientti pystyttäisiin säilyttämään lihassolun ja plasman välillä ja siten ylläpitämään tehokasta laktaatin kuljetusta ulos lihassolusta (Pösö ym. 1995). Tämä ominaisuus voisi lisätä lihasten korkean puskurointikyvyn ohella hevosen kykyä sietää suuria määriä laktaattia (McCutcheon ym. 1987, Bayly ym. 2006).

2.5.2 Aktiivisuus hevosityksilöiden välillä

Tutkituista lajeista hevonen on ainut, jonka yksilöt voidaan lajin sisällä jakaa punasolujen kuljetusaktiivisuuden perusteella kahteen ryhmään, hevosiin joiden punasolujen kuljetusaktiivisuus on korkea (K) ja hevosiin joiden kuljetusaktiivisuus on matala (M) (Väihkönen ym. 2001). Rasituksen jälkeen K-hevosten punasolut sisältävät enemmän laktaattia verrattuna M-hevosiin (Väihkönen ym. 2001, Koho ym. 2002). Koho ym. (2002) tutkimuksessa erot ryhmien välillä näkyivät kohtalaisesta rasituksesta lähtien, kun laktaattipitoisuus plasmassa oli 4 – 16 mmol/l.

K- ja M-hevosilla punasolun solukalvon kuljettajaproteiinikoostumus on erilainen, samankaltaisesti kuten korkean ja matalan kuljetusaktiivisuuden eläinlajien välillä (Väihkönen ym. 2001, Koho ym. 2002, Mykkänen ym. 2010). Hevosella MCT2 esiintyy punasoluissa ilman suurta vaihtelua yksilöiden kesken, mutta MCT1 ja CD147 määrät jakavat hevoset ryhmiin (Koho ym. 2002, Mykkänen ym. 2010). Kohon ym. (2002) ja Mykkäsen ym. (2010) mukaan varsinkin CD147 osalta erot näkyvät selvästi: K-hevosten CD147 määrät ovat merkittävästi suuremmat kuin M-hevosten. Mykkänen ym. (2010) tutkimuksessa CD147 ja MCT1 korreloivat keskenään. M-hevosten CD147 ja MCT1 määrät ovat vähäisiä tai jopa puuttuvat kokonaan (Mykkänen ym. 2010). Näiden yksilöiden kohdalla AE1 näyttää olevan tärkeässä roolissa korkeissa laktaattipitoisuuksissa monokarboksylaattikuljettajien sijasta (Väihkönen ym. 2001).

Ryhmiiin jakautumisessa eri hevosrotujen välillä ei ole suurta eroa (Mykkänen ym. 2010). Mykkäsen ym. (2010) tutkimuksessa CD147-apuproteiinin perusteella jaetuissa K- ja M-hevosryhmissä saatiin suomenhevosissa K-yksilöitä 85 %, amerikanravureissa 82 % ja englannintäysverisissä 88 %. MCT1-proteiinien määrät olivat rodunedustajissa samansuuntaisia CD147-apuproteiinin kanssa Mykkäsen ym. (2010) tutkimuksessa, mutta selkeä kaksijakoisuus havaittiin vain englannintäysverisen kohdalla. Englannintäysveritammoilla on havaittu olevan enemmän CD147-apuproteiinia verrattuna saman rodun oriiden ja ruunien punasoluihin, kun taas samaisessa tutkimuksessa suomenhevostammoilla oli solukalvolla enemmän MCT2-proteiinia verrattuna suomenhevosoriiden ja –ruunien punasoluihin (Mykkänen ym. 2010).

K- ja M-hevosten punasolujen laktaatinkuljetusaktiivisuuden erot näkyvät jo pikkuvarsoilla, joten tämän ominaisuuden oletetaan olevan synnynnäistä ja periytyvää (Väihkönen ym. 2002). Räsänen ym. (1995) havaitsivat yhteyden plasman ja kokoveren laktaattipitoisuuden suhteella ja suorituskyvyllä: Ne hevoset joiden punasoluihin laktaattia kertyi, suorittivat hyvin. Myöhemmissä tutkimuksissa ei kuitenkaan ole havaittu suoraa yhteyttä ryhmiin jakautumisessa ja hevosten suorituskyvyssä (Väihkönen ym. 2001, Mykkänen ym. 2010).

2.6 Aasi

2.6.1 Aasi – *Equus asinus*

Aasi on ainut märehittijöihin kuulumaton kookas kasvissyöjä, joka on sopeutunut hyvin karuihin ja kuumiin oloihin: Se kykenee hyväksikäyttämään heikkolaatuista ravintoa, ja sen elimistö pystyy edistämään lämmön poistumista sekä veden säästöä (Mueller ym. 1994). Aasia on jo pitkään käytetty tavaroiden ja ihmisten kuljetukseen ja vielä tänäkin päivänä se on tärkeä työeläin köyhillä ja karuilla alueilla (Rossel ym. 2008, Maloiy ym. 2009). Nykyinen kesyaasi on kesytetty afrikkalaisesta villiaasista (*Equus africanus*) noin 6 000 vuotta sitten (Rossel ym. 2008).

2.6.2 Fysiologinen vaste rasitukseen

Aasi muistuttaa aerobiselta suorituskyvyltään läheisesti hevosta (Mueller ym. 1994). Hevosen maksimaalinen hapenottokyky ($V_{O_{2max}}$) voi olla jopa 180 – 200 ml/kg/min, mikä on yli kaksinkertainen huippukuntoiseen ihmiseen verrattuna (Hinchcliff 2013). Mueller ym. (1994) saivat juoksumattotestissä tutkittujen aasien maksimaaliseksi hapenottokyvyksi 110 ± 2 ml/kg BW x min (ka), mikä on 22-kertainen lepotasoon verrattuna. Hapenoton nousun perusteella aasin aerobinen kapasiteetti on korkeampi kuin suurimmalla osalla nisäkkäistä (Mueller ym. 1994). Vastaavanlaisia tuloksia on saavutettu hevosilla ja poneilla tehdyissä tutkimuksissa (Mueller ym. 1994). Syke taas nousi leposykkeestä 5-kertaiseksi maksimaalisen liikunnan aikana, 223 ± 2 lyöntiin minuutissa, mikä vastaa sekin hevosten tutkimustuloksia (Mueller ym. 1994).

Mueller ym. (1994) havaitsivat, että kokoveren laktaattipitoisuus nousi aaseilla korkeimmillaan $10 \pm 1,4$ mmol/l (ka), eli noin 15-kertaiseksi lepotilaan verrattuna ($0,65 \pm 0,07$ mmol/l). Hevosella on mitattu maksimaalisen rasituksen jälkeen plasmasta 20 – 30 mmol/l laktaattipitoisuuksia (Väihkönen ym. 1999).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Näytteet

Punasolunäytteet olivat peräisin kolmestakymmenestä aasista, jotka olivat kotoisin aasien turvapaikasta Devonista (Donkey Sanctuary of England). Aasit olivat eri ikäisiä, vaihdellen välillä 2 – 43 vuotta. Näytteistä ruunia oli 16 ja tammoja 13.

3.2 Western blot

3.2.1 Punasolumembraanien eristäminen

Aasien EDTA-verinäytteet oli lähtömaassa sentrifugoitu ja erottuneet punasolunäytteet pakastettu. Matkalla Suomeen näytteet pääsivät sulamaan. Suomessa näytteet pakastettiin uudelleen (-80 °C). Kutakin punasolunäytettä oli n. 0,2 – 1,0 ml / aasi.

Punasolujen hajotus tehtiin jääkylmällä natriumfosfaattipuskurilla (5 mM Na_2HPO_4 / 5 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0). Näytteitä sulateltiin huoneenlämmössä ja kukin siirrettiin 20 ml:an natrium-fosfaattipuskuria. Näyte-puskuriliuos sentrifugoitui 15 min 48 000 G (+ 4 °C). Sakan päälle erottunut nestekerros poistettiin, mutta koeputken pohjalle jätettiin kuitenkin pieni määrä puskuria johon sekoitettiin näkyvä sakka.

Membraanit pestiin samalla hajotuspuskurilla kolme kertaa samoin kuten punasolujen hajotus suoritettiin. Ennen sentrifugointia (15 min 48 000 G, + 4 °C) lisättiin 20 ml puskuria ja kuten edellä, sakasta erottunut nestekerros poistettiin pipetoiden ja jäljelle jäänyt sakka sekoitettiin pieneen määrään pesupuskuria. Viimeisen pesun jälkeen erottunut nestekerros poistettiin huolellisesti, ja sakka sekoitettiin pieneen määrään jäänyttä pesupuskuria. Tämä sentrifugoitui Eppendorf-putkessa edelleen 20 min 13 000

rpm, jotta pesupuskuri saataisiin mahdollisimman tarkasti pois. Jäljelle jäi n. 200 µl kutakin näytettä.

3.2.2 Punasolumembraanien proteiinipitoisuuden määrittäminen

Proteiinipitoisuuden määrittäminen tehtiin spektrofotometrin avulla. Liuokset valmistettiin 96 kuoppalevyille ja käyttäen BCA reagenssia (Pierce, Rockford, Illinois, USA) ohjeen mukaan. Standardisuoraa varten käytettiin nollanäytteen lisäksi tunnettuja standardiliuoksia, joiden pitoisuus oli välillä 0,025 – 0,75 mg/ml. Vähintään kolme pistettä määritettiin, joista muodostettiin suora. Tarvittava määrä punasolumembraaninäytettä laimennettiin veteen 1:50. Kuhunkin kuoppaan laitettiin reagenssia 200 µl ja laimennettua näytettä 25 µl, tai standardisuoraa varten 25 µl tunnettua standardiliuosta näytteen sijasta. Kuoppalevyä ravisteltiin 30 s, minkä jälkeen se laitettiin parafilmillä peitettynä lämpökaappiin + 37 °C, 30 min.

Kuoppalevyn liuosten absorbanssi mitattiin ELISA Readerilla 560 nm aallonpituudella.

3.2.3 SDS-PAGE

3.2.3.1 Näytteiden valmistaminen

Tarvittava määrä kutakin näytettä valmistettiin ajoa varten. Ajogeelin jokaiseen kaivoon laitettiin proteiineja 40 µg 16 µl:n tilavuudessa. Proteiinipitoisuuden määrittämisen avulla laskettiin kunkin alkuperäisen punasolumembraaninäytteen tarve, ja tarvittavan tilavuuden saavuttamiseksi näyte laimennettiin vedellä. Puskuriliuokseen (Taulukko 1) lisättiin merkaptotetanolia 1:10. Lopullinen näyte-puskuriliuos valmistettiin laittamalla puolet puskuriliuosta ja puolet laimennettua punasolumembraaninäytettä.

3.2.3.2 Geelien valaminen

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE) varten valmistettiin tarvittava määrä geelejä. Geelit koostuivat 10 % alageelistä ja 4 % ylägeelistä, paksuudeltaan 0,75 mm. Geeliliuos valmistettiin taulukon 2. mukaan. Molempien geelien kohdalla ainekset sekoitettiin keskenään hyvin lukuun ottamatta

jähmettimiä. Ne lisättiin liuokseen juuri ennen valamista ja sekoitettiin huolellisesti. Alageeli valettiin lasien väliin noin 1 cm kamman alareunasta. Sen annettiin jähmettyä vedellä peitettynä noin 30 min. Ylägeeliliuos lisättiin muottiin yläreunaan asti, kun vesi oli poistettu. Päälle lisättiin kampa ja geelin annettiin jähmettyä noin 15 min.

Taulukko 1. Western blot –menetelmässä tarvittava näytepuskuriliuos (Laemmli) 2x.

SDS (g)	0,2
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (ml)	1,25
H ₂ O (ml)	2,24
Glyseroli (ml)	1
Bromofenolisininen 5 % (μl)	10

Taulukko 2. SDS-PAGE, ohje geelien tekoon.

Alageeli (10 %)	H ₂ O (ml)	4,95
	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (ml)	2,5
	Akryyliamidi/bis 40 % (ml)	2,5
<i>Jähmettimet:</i>		
	10 % APS (μl)	50
	TEMED (μl)	5
Ylägeeli (4 %)	H ₂ O (ml)	3,25
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (ml)	1,25
	Akryyliamidi/bis 40 % (ml)	0,5
<i>Jähmettimet:</i>		
	10 % APS (μl)	25 (30)
	TEMED (μl)	5 (6)

3.2.3.3 Elektroforeesi

Valmistetut näytteet (ks. 3.2.3.1 Näytteiden valmistaminen) keitettiin + 100 °C noin 5 min ja pyöräytettiin lopuksi kevyesti sentrifuugissa. Ajolaitteessa käytettiin 1x SDS-PAGE-ajopuskuria (Taulukko 3). Näytteiden ja niiden rinnakkaisnäytteiden lisäksi pipetoitiin myös molekyylipainostandardi (BioRad 161-0305) sekä tunnetut korkea- ja matalapitoiset proteiininäytteet jokaiselle geelille. Molekyylipainostandardia ei tarvinnut keittää, ja sitä laitettiin geelin kaivoon 2,5 μl, kun muita näytteitä pipetoitiin

16 µl. Ylägeeliä ajettiin 70 V 30 min ja alageeliä 200 V noin 25 min, kunnes väri oli geelin alalaidassa.

3.2.4 Siirto kalvolle (blottaus, blotting)

Irrotettuja geelejä ja nitroselluloosakalvoja pidettiin noin 15 min seuraavan vaiheen blottauspuskurissa (Taulukko 4). Siirtoa varten muodostettiin kalvon (anodipuoli) ja ajetun geelin (katodipuoli) ympärille ensin suodatinpaperien ja sen jälkeen kuitutyynyjen avulla kerrosrakennelma siirtoritulöiden väliin. Katodipuolelle kuitutyynyjä laitettiin kaksi ohutta ja anodipuolelle yksi paksumpi tyyny. Ilmakuplat poistettiin ennen ritulöiden sulkemista. Jäähdytystä varten siirtolaitteeseen asetettiin jäähdytyskappaleet ja magneettisekoittaja. Käytetyn blottauspuskurin tuli myös olla kylmää. Siirto suoritettiin 100 V 90 min.

Taulukko 3. Elektroforeesin ajopuskuriliuos (kantaliuos, 10x).

Tris base (g)	30,3
Glysiini (g)	144
SDS (g)	10
ad. H ₂ O (ml)	→ 1000

Taulukko 4. Siirrossa käytettävä blottauspuskuriliuos.

Kantaliuos, 10x	
Tris base (g)	30,3
Glysiini (g)	144
ad. H ₂ O (ml)	→ 1000
Blottauspuskuri 1x	
Blottauspuskuri, kantaliuos (ml)	100
Metanoli (ml)	200
ad. H ₂ O (ml)	→ 1000

3.2.5 Ponceau-S värjäys

Siirron jälkeen kalvot nostettiin Ponceau-S-väriliuokseen noin 2 minuutiksi. Kalvoja huuhdeltiin kolme kertaa vedellä, jotta juovat (band) olivat näkyvissä ja tausta vaalea. Kalvot kuvattiin (AlphaImager, ProteinSimple) lasilevyttä.

3.2.6 Kalvon esikäsitteily (blokkauk, blocking)

Kalvot laitettiin inkuboitumaan blokkaukspuskuriin (Taulukko 5) huoneenlämpöön noin tunniksi.

Taulukko 5. Blokkaukspuskuriliuos. 2,5 % maitojauhepuskuriliuos saadaan laimentamalla 0,1 % Tween-TBS-liuoksella tai valmistamalla suoraan.

0,1 % Tween-TBS-kantaliuos, 10x:	
Tris base (g)	24,44 (20 mM)
NaCl (g)	80,06 (137 mM)
pH 7,5 säädetään HCl:llä	
	ad. H ₂ O (ml) → 1000
0,1 % Tween-TBS:	
10xTBS (ml)	100
Tween (ml)	1
	ad. H ₂ O (ml) → 1000
10 % maitojauheliuos:	
Rasvaton maitojauhe (ei vähälakt.) (g)	20
	ad. 0,1 % Tween-TBS (ml) → 200

3.2.7 MCT2-vasta-ainetestaus

Primäärivasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua hevosspesifistä MCT2-vasta-ainetta (Sigma Genosys, Pampisford, Cambridgeshire, UK), joka laimennettiin blokkaukspuskuriin suhteessa 1:2000. Kalvot asetettiin parafilmiveneisiin ja päälle pipetoitiin 4 ml vasta-ainepuskuria. Jokaiselle kalvolle vasta-ainetta tuli siten 2 µl. Kalvoja inkuboitiin jääkaapissa (+ 4 °C) seuraavaan päivään.

Kalvot pestiin vasta-ainekäsittelyn jälkeen 0,1 % Tween-TBS –liuoksella (Taulukko 5). Kalvot huudeltiin astiassa ensin kaksi kertaa pienellä määrällä liuosta. Varsinainen pesu suoritettiin huoneenlämmössä laittamalla noin sentin kerros pesuliuosta kalvojen päälle ja astiat asetettiin kallistelijaan 15 min, 5 min ja 5 min. Pesuliuos vaihdettiin huuhtelukertojen välissä.

Kalvot käsiteltiin pesujen jälkeen sekundaarivasta-aineella, joka kiinnittyy primäärivasta-aineeseen. Sekundaarivasta-aineena toimi vuohessa tuotettu kanivasta-aine (Polyclonal goat anti rabbit immunoglobulins/HRP Dacocymation, DAKO, Glostrup, Tanska), jota käytettiin laimennoksella 1:2000. Laimennukseen käytettiin laimennettua blokkaustrupuria (2,5 % maitojauhe; Taulukko 5). Vasta-ainepuskuria pipetoitiin parafilmiveneisiin kalvojen päälle 4 ml, joten vasta-ainetta tuli kullekin kalvolle 2 µl. Kalvoja inkuboitiin huoneenlämmössä noin tunnin ajan. Kalvot pestiin kuten primäärivasta-ainekäsittelyn jälkeen.

3.2.8 Kalvojen kuvaus

Kuvaus tehtiin tehostetun kemiluminesenssin avulla, joten kuvausta varten valmistettiin substraatti valmiista sarjasta (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate; Pierce, Rockford, Illinois, USA). Yhdelle kalvolle tarvittiin 800 µl substraattia, jossa oli sekoitettuna 400 µl A + 400 µl B. Kalvot laitettiin lasilevyille ja valmis substraatti pipetoitiin sen päälle juuri ennen kuvausta. Kuvaus suoritettiin CCD-kameralla LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Dusseldorf, Saksa), sillä valotusajalla jolla juovat erottuivat selkeästi, mutta eivät kuitenkaan liian tummina.

3.2.9 MCT1-vasta-ainetestaus

Toisessa vasta-ainemäärityksessä primäärivasta-aineena käytettiin hevosspesifistä MCT1-vasta-ainetta (Sigma Genosys, Pampisford, Cambridgeshire, UK). Ennen uutta testausta kalvoista poistettiin primääri- ja sekundaarivasta-aineet (strippaus, stripping). Suljettuihin astioihin laitettiin kalvojen lisäksi strippauspuskuri (Taulukko 6) ja astiat laitettiin lämpökaappiin 37 °C sekoittajaan 30 min. Ennen lämpökaappiin laittoa astioita ravistettiin voimakkaasti käsin, ja sama toistettiin 5 min välein. Kalvot pestiin käytetyllä

blottauspuskurilla 2 h kallistelijassa ja puskurit vaihdettiin 30 min, 30 min ja loppuaikana 15 min välein.

Loppuosa tehtiin kuten MCT2-vasta-ainetestauksessa samoja puskureita ja sekundaarivasta-ainetta käyttäen. Kuvaus suoritettiin myös samalla tavalla, samoin substraatein.

Taulukko 6. Strippauspuskuriliuos.

Tris (g)	3,8 (65 mM)
SDS (g)	10 (2 %)
Säädä pH 6,7	
	ad. H ₂ O (ml) → 500
2-merkaptetaanoli (ml)	3,5 (100 mM)

3.2.10 Proteiinimäärän varmistaminen (loading control)

Ennen uutta vasta-ainelisäystä kalvoista poistettiin primääri- ja sekundaarivasta-aineet (strippaus, stripping) kuten edellä.

Kalvot esikäsiteltiin (blokkaukset) kuten aiemmin kuvattiin, mutta inkubointiaika oli 2 h. Käytetty primäärivasta-aine oli beta-aktiini-vasta-aine (Cell Signaling technology, USA). Se laimennettiin 1:1000 blokkaukspuskurilla (10 % maitojauhe; Taulukko 5). Vasta-ainepuskuria pipetoitiin 4 ml, joten vasta-ainetta tuli 4 µl jokaiselle kalvolle.

Loppuosa tehtiin kuten aiemmassa vasta-ainetestauksessa samoja puskureita ja sekundaarivasta-ainetta käyttäen. Kuvaus suoritettiin myös samalla tavalla, samoin substraatein.

3.2.11 Intensiiteettien määrittäminen

Saadut kuvat käsiteltiin ja juovien intensiteetti mitattiin AIDA-ohjelmalla (Raytest, Saksa). Juovan intensiteettiä verrattiin saman kalvon kontrolliin ja muihin näytejuoviin. MCT1- ja MCT2-vasta-ainetestaustulokset korjattiin varmistetulla proteiinimäärällä. Tulokseksi saatiin suhteellisia yksiköitä, jotka ovat aasien kesken vertailtavissa.

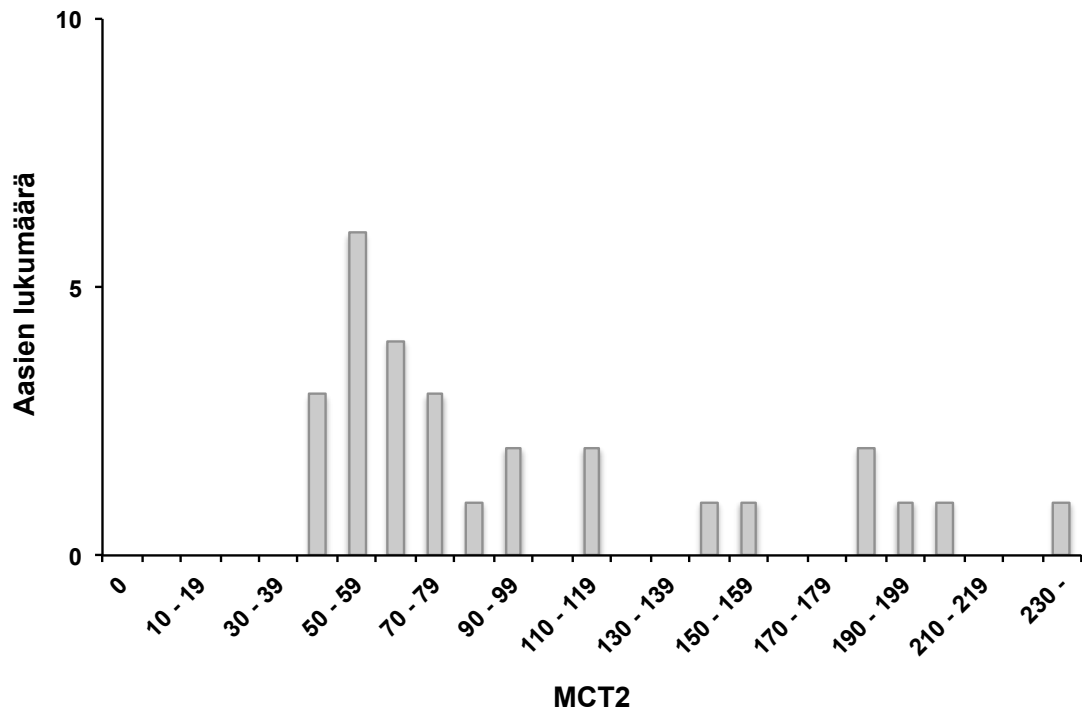
3.3 Tilastolliset menetelmät

Aineisto käsiteltiin SPSS-ohjelmalla. Tilastollisina testeinä käytettiin T-testiä ja Spearmanin korrelaatiokerrointa.

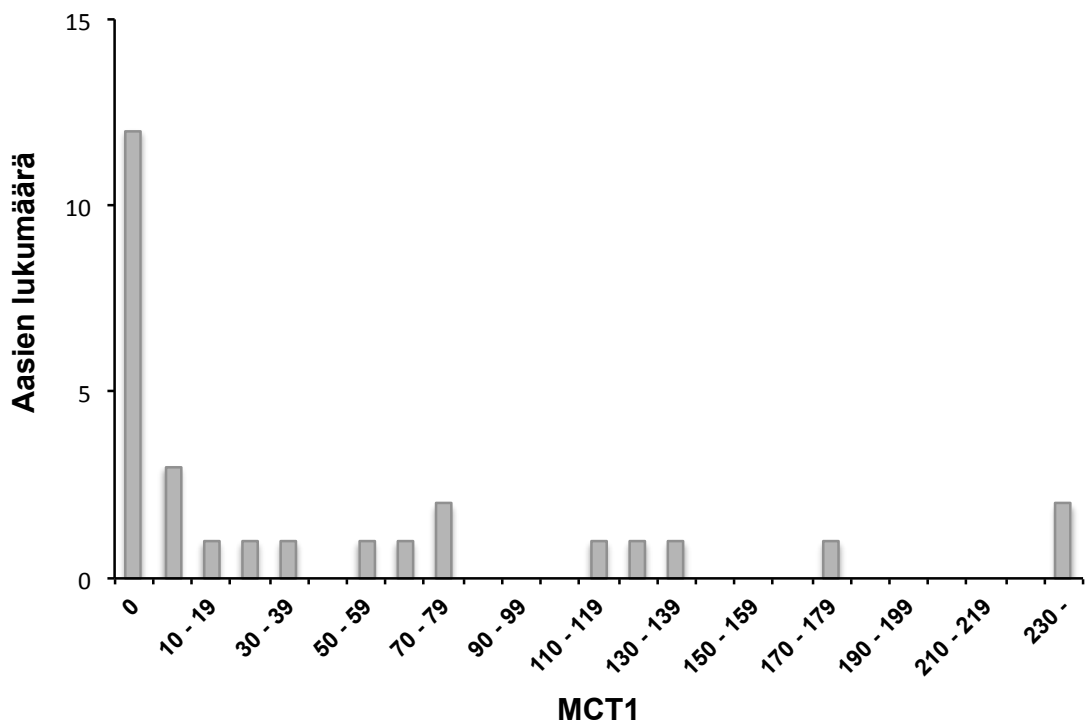
4 TULOKSET

Näytteitä oli yhteensä 30, joista kaksi hylättiin vasta-ainetestauksen ja kuvauksen jälkeen. Kyseessä olivat kaksi viimeistä näytettä, joiden käsittely tehtiin myöhemmin kuin muiden, eikä juovia saatu kuvauksessa riittävällä tarkkuudella erotettua taustasta. Analysoiduista 28 näytteistä ruunია oli 15 ja tammoja 13. Ikäjakauma oli 2 – 43 vuotta (keskiarvo 25 vuotta).

MCT2-proteiini esiintyi kaikkien aasien punasolumembraanilla (kuva 1). Keskiarvoksi saatiin MCT2-proteiinin osalta 99 +/- 58 yksikköä. MCT1-proteiinin keskiarvo oli 67 +/- 143 yksikköä. Aaseista 43 prosentilla ei esiintynyt ollenkaan MCT1-proteiinia (kuva 2).

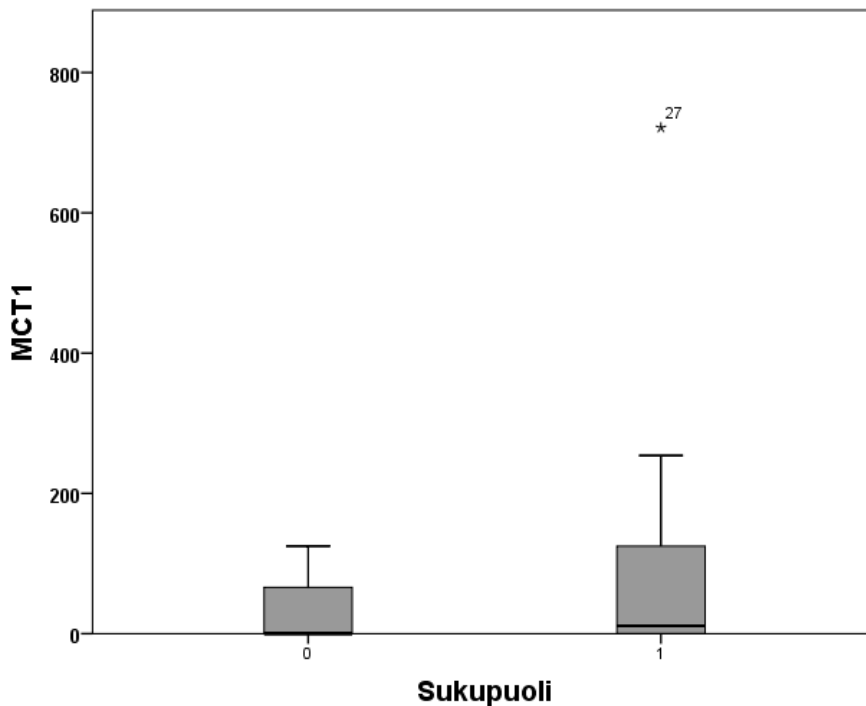


Kuva 1. MCT2-proteiinin määrä punasolun solukalvolla. X-akselilla proteiinin määrä suhteellisena yksikkönä, y-akselilla aasien lukumäärä.



Kuva 2. MCT1-proteiinin määrä punasolun solukalvolla. X-akselilla proteiinin määrä suhteellisena yksikkönä, y-akselilla aasien lukumäärä.

MCT1-proteiinin määrä oli merkittävästi suurempi ruunilla kuin tammoilla ($P = 0,045$) (kuva 3). MCT2:n osalta tammojen tulos oli 96 ± 60 yksikköä ja ruunien 100 ± 189 yksikköä, mutta merkittävää eroa sukupuolten välillä ei havaittu. Iän ja MCT1 tai MCT2 välillä ei havaittu korrelaatiota. Yksilöiden MCT2 ja MCT1 määrät eivät korreloineet.



Kuva 3. MCT1-proteiinin esiintyminen punasolun solukalvolla eri sukupuolilla. X-akselilla 0 = tamma ja 1 = ruuna, y-akselilla MCT1-proteiinin määrä suhteellisenä yksikkönä.

5 POHDINTA

Kaikkien aasien punasolujen solukalvolla esiintyi MCT2-proteiini. Tulos on yhtenäinen hevosille tehtyjen tutkimusten kanssa (Koho ym. 2002, Mykkänen ym. 2010). MCT2-kuljettaja punasolun solukalvolla voi olla *Equus*-perheen ominaisuus, kuten aasien ja hevosten samankaltaiset, mutta muista eläinlajeista eroavat tulokset fyysisen suorituskyvyn testauksissa (Mueller ym. 1994). Aasilla ei kuitenkaan ole mitattu yhtä suuria veren laktaattipitoisuuksia kuin hevoselta rasituksen jälkeen, ja anaerobinen

kynnysarvo saattaa olla matalampi kuin hevosella (Mueller ym. 1994). Hevosella MCT2 vastaa laktaatin kuljetuksesta lähinnä matalilla pitoisuuksilla, mikä puolustaisi kuljettajan paikkaa myös aasin punasolun solukalvolla (Koho ym. 2002). MCT2-proteiinin on havaittu olevan aktiivinen kaikilla hevosilla kuljetusaktiivisuudesta riippumatta (Koho ym. 2002).

MCT1-kuljettaja esiintyi aasien punasolukalvoilla havaittavilla pitoisuuksilla 57 prosentilla tutkituista. Matalan kuljetusaktiivisuuden hevosilla MCT1-proteiinin esiintyminen on merkittävästi vähäisempää verrattuna korkean kuljetusaktiivisuuden hevosiin, ja määrät korreloivat CD147-apuproteiinin kanssa (Mykkänen ym. 2010). Aiemmin Koho ym. (2002) on havainnut, että verinäytteiden perusteella tunnistettujen matalan kuljetusaktiivisuuden hevosilla CD147-apuproteiinin määrä on pienempi. Tutkimuksen aasien MCT1-kuvaajista ei saada kaksijakoisuutta näkyviin, mutta hevostenkin tutkimuksissa kaksijakoisuus on nähty selkeämmin CD147-apuproteiinin mukaan (Mykkänen ym. 2010). Aasit saadaan jaettua kuitenkin niihin joilla esiintyy MCT1 ja joilla ei esiinny. Vaikka kaikki aasit joilla MCT1 esiintyy laskettaisiin K-aaseiksi, olisi K-aasien osuus olisi huomattavasti pienempi kuin K-hevosten (Mykkänen ym. 2010). K-aasien osuus on pienempi, verrattiin sitä mihin tutkittuun hevosrotuun tahansa (Mykkänen ym. 2010). Mahdollinen jako voitaisiin muodostaa varmemmin rasiustestillä verinäytteineen ja määrittämällä myös apuproteiini CD147 (Koho ym. 2002, Mykkänen ym. 2010).

Hevosilla suorituskyvyn ja laktaatin kuljetusaktiivisuuden välillä on saatu ristiriitaisia tuloksia, joten kuljetusaktiivisuuden merkityksestä yksilölle ei ole saatu vielä selvyyttä (Räsänen ym. 1995, Mykkänen ym. 2010). Hevosten kohdalla MCT1-kuljettaja vastaa laktaatin pääasiallisesta kuljetuksesta vasta veren korkeissa laktaattipitoisuuksissa (Koho ym. 2002). Kuten edellä mainittiin, aasien rasiustestien veren laktaattipitoisuudet ovat olleet pienempiä hevosiin verrattuna, joten korkean kuljetusaktiivisuuden punasoluilla voisi olla vähäisempi merkitys aasien kohdalla (Mueller ym. 1994). Toisaalta aaseja ei ole välttämättä saatu tutkimuksissa rasiuttua riittävästi (Mueller ym. 1994). Vertailtaessa aasien ja hevosten lihasten lihassytyyppejä, esimerkiksi työntövoimaa tuottavassa *gluteus medius* -lihaksessa aasilla on vähemmän nopeita lihassyitä verrattuna hevosten vastaaviin, mikä voisi

osaltaan selittää aasien pienempiä laktaattipitoisuuksia rasituksessa (Snow ja Guy 1980).

Tutkimuksessa ruunien MCT1-proteiinimäärät olivat suurempia kuin tammojen. Hevosilla taas tutkimustulokset ovat olleet sukupuolten välillä tasaisia tai jopa päinvastaisia (Mykkänen ym. 2010). Aasien tulokselle saadaan toivottavasti selvennystä tulevaisuuden MCT1-proteiinin tutkimusten myötä.

6 KIRJALLISUUSLUETTELO

Allen D. G., Lamb G. D., Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiol Rev* 2008, 88: 287–332.

Alper S. L. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol*. 1991, 53: 549 – 564.

Bayly W.M., Kingston J.K., Brown J.A., Keegan R.D., Greene S.A., Sides R.H. Changes in arterial, mixed venous and intraerythrocytic concentrations of ions in supramaximally exercising horses. *Equine Vet J Suppl*. 2006, (36): 294 – 297.

Fitts R. H. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev*. 1994, 74(1): 49 – 94.

Halestrap A. P. The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease. 2013. *Mol Aspects Of Med*. 2013, 34: 337 – 349.

Halestrap A. P., Meredith D. The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic acid transporters and beyond. *Eur J Physiol* 2004, 447: 619 – 628.

Halestrap A. P., Price N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J*. 1999, 343: 281 – 299.

van Hall G. Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise. *Acta Physiol* 2010, 199 (4): 499 – 508.

Hinchcliff K. W. The horse as an athlete. Teoksessa: *The athletic horse: Principles and practice of equine sports medicine*. 2. p. Hodgson D. R., McGowan C., McKeever K. Saunders, 2013: 3 – 10.

Juel C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. *Physiol Rev*. 1997, 77, no 2: 321 – 358.

Juel C. Regulation of pH in human skeletal muscle: Adaptations to physical activity. *Acta Physiol* 2008, 193: 17 – 24.

Koho N. M., Väihkönen L. K., Pösö A. R. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. *Equine vet. J Suppl*. 2002: 555 – 559.

Koho N. M., Hyypä S., Pösö A. R. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. *Equine vet J Suppl* 2006, 36: 354 – 358.

Levy B. Lactate and shock state: the metabolic view. *Curr Opin Crit Care* 2006, 12: 315 – 321.

Maloiy G. M. O., Rugangazi B. M., Rowe M. F. Energy expenditure during level locomotion in large desert ungulates: The one-humped camel and the domestic donkey. *J Zool* 2009, 277: 248 – 255.

McCutcheon L.J., Kelso T.B, Bertocci L.A, Hodgson DR, Bayly WM, Gollnick PD. Buffering and aerobic capacity in equine muscle: variation and effect of training. Teoksessa: Gillespie J. R., Robinson NE (ed.) *Equine Exercise Physiology 2* proceedings of the second international conference on equine exercise physiology, San Diego, California, August 7 – 11, 1986. Davis, CA, ICEEP Publications; 1987: 348 – 358.

Mueller P. J., Jones M. T., Rawson R. E., Van Soest P. J., Hintz H. F. Effect of increasing work rate on metabolic responses of the donkey (*Equus asinus*). *J Appl Physiol*. 1994, 77(3): 1431 – 1438.

Mykkänen A. K., Pösö A. R., McGowan C. M., McKane S.A. Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red blood cells of three horse breeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. *Equine vet. J*. 2010 (Suppl. 38): 161 – 166.

Nelson D. L., Cox M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 6. p. W. H. Freeman and company, New York 2013.

Poole R. C ja Halestrap A. P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol. (Cell Physiol 33)* 1993, 264: C761 – C782.

Pösö A. R., Lampinen K. J., Räsänen L. A. Distribution of lactate between red blood cells and plasma after exercise. *Equine vet J* 1995, 27, S18: 231 – 234.

Rainger J. E., Evans D. L., Hodgson D. R., Rose R. J. Distribution of lactate in plasma and erythrocytes during and after exercise in horses. *Br vet J* 1995. 151: 299 – 310.

Revolv T. Mykkänen A. K., Karlström K., Ihler C. F., Pösö A. R., Essén-Gustavsson B. Effects of training on equine muscle fibres and monocarboxylate transporters in young Coldblooded trotter. *Equine Vet J* 2010, 42, S38: 298 – 295.

Rossel S., Marshall F., Peters J., Pilgram T., Adams M. D., O'Connor D. Domestication of the donkey: Timing, processes and indicators. *PNAS* 2008 vol. 105 no. 10: 3715 – 3720.

Räsänen L. A., Lampinen K. J., Pösö A. R. Responses of blood and plasma lactate and plasma purine concentrations to maximal exercise and their relation to performance in standardbred trotters. *Am J Vet Res* 1995, 56, no 12: 1651 – 1656.

Snow D. H. ja Guy P. S. Muscle fibre type composition of a number of limb muscles in different types of horse. *Res Vet Sci* 1980, 28: 137 – 144.

Snow D. H., Harris R. C., Gash S. P. Metabolic response of equine muscle to intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* 1985, 58 (5): 1689 – 1697.

Valberg S. ja Essén-Gustavsson B. Metabolic response to racing determined in pools of type I, IIA and IIB fibres. Teoksessa: Gillespie J. R. ja Robinson N. E. (ed.). *Equine exercise physiology 2: proceedings of the second international conference on equine exercise physiology, San Diego, California, August 7 – 11, 1986*. Davis, CA, ICEEP Publications, 1987: 290 – 301.

Väihkönen L. K., Hyypä S., Pösö A. Factors affecting accumulation of lactate in red blood cells. *Equine Vet J Suppl* 1999, 30: 443 – 447.

Väihkönen L. K., Ojala M., Pösö A. R. Age-related changes and inheritance of lactate transport activity in red blood cells. *Equine vet J* 2002, 34, S34: 568–572.

Väihkönen L. K., Heinonen O. J., Hyypä S., Nieminen M., Pösö A. R. Lactate-transport activity in RBCs of trained and untrained individuals from four racing species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001, 281: 19 – 24.

Wilson R. G., Isler R. B., Thornton J. R. Heart rate, lactic acid productin and speed during a standardized exercise test in standardbred horses. Teoksessa: Snow D. H., Persson S. G. B., Rose R. J. (ed.). *Equine exercise physiology 2: proceedings of the first international conference on equine exercise physiology, Oxford, Septemper 22nd – 24t, 1982*. Granta Editions, Cambridge, 1983: 487 - 496.

Wilson M. C., Meredith D., Fox J. E., Manoharan C., Davies A. J., Halestrap A.P. Basigin (CD147) Is the Target for organomercurial Inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: The ancillary protein for the insensitive mct2 is embigin (gp70). *J Biol Chem* 2005, 280 (29): 27213 – 27221.