

TARTU ÜLIKOOL
Kehakultuuriteaduskond
Spordibioloogia ja füsioteraapia instituut

Mari Kipri

**Tropomüosiini subühikute ja troponiin T kiirete isovormide
sisaldus kompensatoorse hüpertroofia tingimustes**

Magistritöö
Liikumis- ja sporditeaduste erialal

Juhendaja: Ph.D, P. Kaasik

TARTU 2010

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1. Regulaatorsete valkude roll lihaskontraktsioonis	5
2. Troponiini kompleks	6
2.1 Troponiin C	6
2.2 Troponiin I	7
2.3 Troponiin T	8
3. Tropomüosiin	9
4. Muutused skeletilihaskudes elektrostimulatsiooni puhul	10
5. Skeetilihase hüpertroofia	10
5.1 Kompensatoorne hüpertroofia	11
5.1.1 Tenotoomia	12
TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED	14
TÖÖ TEOSTAMISE METOODIKA	15
1. Katse korraldus	15
1.1 Tenotoomia protseduuri kirjeldus	15
2. Koeproovide eraldamine	15
2.1 Koestruktuuri histoloogiline hindamine	16
2.2 Tropomüosiini subühikute eraldamine	16
2.3 TnT kiirete isovormide eraldamine Western blottingul	17
3. Statistika	17
TÖÖ TULEMUSED	18
TÖÖ TULEMUSTE ARUTELU	22
JÄRELDUSED	25
KASUTATUD KIRJANDUS.....	26
SUMMARY	33

KASUTATUD LÜHENDITE LOETELU

Tn – troponiin

TM – tropomüosiin

ATP – adenosintriifosfaat

i/p – intraperitoneaalne

SDS-PAAG – naatrium dodeetsüülsulfaat polüakrüülamiidgeel

KH – kompensatoorne hüpertroofia

SISSEJUHATUS

Skeletilihaskude saab esile tõsta läbi tema kõrge heterogeensuse, mis seisneb ehituslike ja ainevahetuslike omaduste mitmekesisuses ning see tingib omakorda kõrge plastilisuse astme, mis läbi skeletilihasrakud on võimelised suurtes piirides vastama funktsionaalse aktiivsuse eripäradele, olles oluliseks nurgakiviks kogu organismis asetleidvate kohanemisreaktsioonide väljendusele. Üheks skeletilihaskoe head kohanemisvõimet kajastavaks omaduseks on seisund, mida on kirjeldatud kui kompensatoorset hüpertroofiat, mis seisneb konkreetsete lihaste puhul kroonilise võimendatud koormuse tulemusena lihasmassi ulatuslikus juurdekasvus. Seniavaldatu valguses võib konstanteerida, et väljakujunenud kompensatoorse hüpertroofia tingimustes on lisaks olulisele lihashüpertroofia arengule aset leidnud ka olulised kvalitatiivsed muutused lihasrakkude molekulaarstruktuuri tasemel, mis on omakorda aluseks mõjustatud lihaskoe kontraktilsete omaduste muutustele. Siiski on kirjanduses avaldatud andmed kompensatoorse hüpertroofia arengumehhanismide kohta seotud valdavalt kontraktilsete valkude tasandil toimuvate kohanemisreaktsioonide eripärade väljaselgitamisega. Lähtudes asjaolust, et lihaskude kohaneb funktsionaalsete seisundite muutustega mitte läbi üksikute komponentide teineteisest sõltumatu adaptatsiooni, vaid läbi terviklike muutuste kompleksi, mis on koe kõrge funktsionaalsuse aluseks, on teenimatult vähem tähelepanu pälvinud vastusreaktsioonid reguleerivate valkude kompleksi tasemel.

Käesolev töö käsitleb reguleerivate valkude kompleksi üksikute valkude ja nende isovormide sisalduse muutusi ning omavahelisi seoseid, mis leiavad aset täiendava kroonilise iseloomuga koormuse poolt esilekutsutud kompensatoorse hüpertroofia tingimustes eritüübilistes lihastes.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Regulaatorsete valkude roll lihaskontraktsioonis

Selgroogsete skeletilihased koosnevad aeglast ja kiiret tüüpi lihaskiududest (Eddinger *et al.*, 1985; Sosnicki *et al.*, 1989). Nii aeglast kui kiired lihased sisaldavad erinevaid müosiini ja troponiini isovorme. Aeglastes lihaskiududes avalduvad I tüüpi ning kiiretes lihaskiududes II tüüpi müosiini isovormid ning nendele müosiini isoensüümidele on iseloomulik erinev ATP hüdrolüüsi kiirus (Barany, 1967). Lihaskontraktsiooni kiirus sõltub rakus domineeriva ensüümi ATP-aasest aktiivsusest (Cooke, 1986).

Skeletilihase kontraktsioonil osalevad lisaks kontraktiilsetele valkudele (müosiin ja aktiin) ka peene filamendi koosseisus oleva regulaatorsete valkude kompleksi valgud: troponiin (Tn) ja tropomüosiin (TM), millede funktsioon sõltub intratsellulaarse Ca^{2+} kontsentratsioonist (Tobacman, 1996; Gordon *et al.*, 2000). TM on keerdunud kaksikspiraalne α -heeliks, mis koosneb omavahel pea-saba suunas seotud mittekovalentsetest molekulidest, mis on põimunud ümber aktiinifilamendi (Li *et al.*, 2002). Tn koosneb kolmest subühikust: Ca^{2+} ioone siduv troponiin C (TnC), lihaskontraktsiooni inhibeeriva toimega troponiin I (TnI) ja TM siduv troponiin T (TnT). Ca^{2+} puudusel on müosiini ja aktiini vaheliste sidemete formeerumine blokeeritud ning seetõttu ei saa toimuda ka skeletilihase kontraktsiooni. Kui Ca^{2+} vabaneb sarkoplasmaatilisest retiikulumist, siis troponiin C seob vabanenud Ca^{2+} , mis kutsus esile struktuursed muutused regulaatorsete valkude kompleksis, mis võimaldavad ristsillakeste mehhanismi avaldumise (Geeves & Holmes, 1999).

Müosiini peake, mis on Mg^{2+} ATP-aasist sõltuv molekulaarne mootor, on võimeline kontakteeruma aktiinifilamendiga, mis põhjustab peenete ja jämedate müofilamentide libisemise teineteise suhtes, mille tulemuseks on lihaskontraktsioon (Huxley, 1957). Ca^{2+} ionide tagasilikumisel TnC N-terminali Ca^{2+} siduvatelt aladelt sulguvad TnC hüdrofoobsed lõhed, mis kutsus esile TnI liikumise TnC aktiinile ning sellest tingitud muutused Tn · TM kompleksis takistavad aktiini ja müosiini filamentide kontakteerumist. Erinevad uuringud, mis käsitlevad struktuuri ning on kooskõlas biokeemiliste analüüsidega, on näidanud, et valkude Tn · TM · aktiini filamendid võivad esineda kolmes erinevas seisundis, olles samal ajal seotud jämedate filamentidega (Maytum *et al.*, 1999; Craig & Lehman, 2001; Geeves & Lehrer, 2002):

1) *Blokeeritud seisund* – Ca^{2+} ionide puudumisel Tn · TM valkude kompleks katab aktiini filamendil asetsevad aktiini aktiivtsentrid, mis takistavad ühinemist müosiinimolekuli peaosakestega.

2) *Suletud seisund* – Ca^{2+} ionide juuresolekul Tn · TM valkude kompleks liigub aktiini filamendi vaokestesse, vabastades enamuse, kuid mitte kõiki aktiini filamendil paiknevaid aktiini aktiivtsentreid.

3) *Avatud seisund* – Tn · TM valkude kompleks vabastab kõik aktiini filamendil asetsevad aktiini aktiivtsentrid ning saab toimuda skeletilihase kontraktsioon. Seega sõltub arendatav kontraktsioonijõud Ca^{2+} ionide kontsentratsioonist ning lihaskiu ristisillakeste arvust (Geeves & Lehrer, 2002).

2. Troponiini kompleks

Troponiin (Tn) on üks reguleerivatest valkudest molekulmassiga 80 kDa ning kujutab endast ekvimolaarset kompleksi kolmest komponendist, mis täidavad lihaskontraktsiooni regulatsioonis erinevaid funktsioone. Troponiin on 265 Å pikkune kompleks, mis koosneb kolmest subühikust: TnI, TnC, ja TnT C-terminali piirkonnast, mis moodustab globulaarse peaosa ning ülejäänud TnT molekul moodustab kepikujulise 160 Å pikkuse saba, mis seostub TM pea-saba regiooniga (White *et al.*, 1987; Collins, 1991). Tn subühikud on kodeeritud erinevate geenide poolt. Sarnaselt kontraktiilsetele valkudele eksisteerivad Tn komponendid mitmetes isovormides, mis on lihasrakutüüpidele spetsiifilised (Perry, 1998). Samuti on leitud, et müokardis ekspresseeritakse spetsiifilisi TnT ja TnI isovorme. Kirjanduse andmed näitavad, et aeglase kokkutõmbeiselooga lihasrakkudes ning müokardis esindatud TnC isovormid on sarnase struktuuri ja funktsionaalsusega (Wilkinson, 1980; Perry, 1998). Sõltuvalt skeletilihase tüübist, ekspresseeritakse erinevaid Tn isovormide omavahelisi kombinatsioone.

2.1 Troponiin C

Troponiin C (TnC) on troponiini kompleksi väikseim komponent molekulmassiga 20 kDa. TnC on Ca^{2+} siduv Tn kompleksi subühik, mis koos TnI ja TnT osaleb nii skeletilihase kui ka südamelihase kontraktsiooni regulatsioonil. Ca^{2+} tingitud konformatsioonilised muutused TnC kutsuvad esile struktuurseid muutusi erinevates valkudes ning peene filamendi struktuuris, mis omakorda kutsub esile interaktsiooni nende ja jämeda filamendi vahel (Herzberg *et al.*, 1986; Houdusse *et al.*, 1997). TnC koosneb kahest globulaarse regiooni NH_2 ja COOH terminalist, mis seotakse omavahel pikaks spiraaliks. Selle spiraali iga keeru regioon sisaldab kahte Ca^{2+} siduvat punkti. COOH-terminali punktidel (III-IV) on kõrge Ca^{2+} sidumisvõime ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) ning nad võivad intratsellulaarselt lõõgastunud seisundis siduda ka

Mg^{2+} . Neid punkte, mis seovad Ca^{2+} ja Mg^{2+} , nimetatakse struktuurseteks punktideks seetõttu, et nad parandavad TnC-TnI vahelist interaktsiooni ning parandavad TnC kinnitumist peenele filamendile (Zot & Potter, 1982). NH_2 -terminali punktidel (I-II) on madalam Ca^{2+} sidumisvõime ($\sim 10^5 M^{-1}$), kuid nad seovad rohkem Ca^{2+} kui Mg^{2+} (Potter & Gergely, 1974).

Eelnevad uuringud on näidanud, et ekspresseeritakse kahte erinevat koespetsiifilist TnC isovormi, mis on struktuurselt sarnased. Kiires skeletilihases on immunotsütokeemiliselt identifitseeritud kiire skeletilihase TnC (TnC_s) ning aeglast/kardiaalset TnC (TnC_c) ekspresseeritakse aeglase iseloomuga skeletilihases ja südamelihases (Dhoot & Perry, 1979). Kiire skeletilihase isovormis (TnC_s) on neli Ca^{2+} siduvat punkti: kaks nendest on madala sidumisvõimega punktid I ja II, mis reguleerivad lihase kontraktsiooni (Potter & Gergely, 1974) ning kaks kõrge sidumisvõimega punkti III ja IV, mis säilitavad TnC reguloorses kompleksis (Zot & Potter, 1982).

2.2 Troponiin I

Troponiin I (TnI) on troponiini kompleksi komponent molekulmassiga 24 kDa, millel on inhibeeriv mõju aktomüosiini Mg^{2+} ATP-aasi aktiivsusele. Ca^{2+} puudumisel on TnC nõrgalt seotud TnI, mis seostub aktiiniga ning omakorda inhibeerib aktiini aktiivsentrite vabanemist (Perry, 1999). TnI inhibeerivat funktsiooni on näidatud mitmetes uuringutes (Ngai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2002). Ca^{2+} ionide sidumine TnC reguloorse alaga suurendab TnC koostoimet koos TnI, mille tulemusel eemaldub aktiini filamendilt TnI inhibeeriv piirkond. Seetõttu Ca^{2+} seotud TnC neutraliseerib inhibeeriva mõju aktomüosiini Mg^{2+} -ATP-aasi aktiivsusele, kutsudes esile muutusi aktiini ja reguloorsete valkude kompleksis. On hästi teada TnI ja TnC omavaheline interaktsioon, millel on lihaskontraktsiooni regulatsioonis tähtis roll (struktuurne ja funktsionaalne). TnC ja TnI vahel võib esineda vähemalt kolme tüüpi koostoimet: esimesel juhul sõltub funktsionaalne efektiivsus TnC Ca^{2+} või Mg^{2+} sidumisvõimest Ca^{2+} - Mg^{2+} aladega ning ilmneb TnC C-terminalide ja TnI N-terminalide vahel (millega omakorda seostub ka TnT). Teisel juhul on ta metallidest sõltumatu ning kolmandal juhul sõltub TnC Ca^{2+} sidumisvõimest Ca^{2+} spetsiifiliste aladega TnC N-terminalide ja TnI C-terminalide vahel. Nagu eelpool kirjeldatud, võib viimane tõenäoliselt olla põhiline kontraktsioonijõu aktiveerija (Gomes *et al.*, 2002). Seega, olenevalt Ca^{2+} olekust, võivad TnI inhibeerivad alad seostuda aktiiniga (ning inhibeerida ATP-aasi aktiivsust) või koos TnC vabastada pärssiva toime ning esile kutsuda kontraktsiooni (Gomes *et al.*, 2002).

TnI esineb imetajate skeletilihases kolmes peamises isovormis – kiires, aeglates ja südamelihasele omases vormis (vastavalt TnI_f, TnI_s, TnI_c) (Syska *et al.*, 1974; Härtner & Pette, 1990). On hästi teada, et läbi TnI isovormide ekspressiooni hinnatakse müofilamentide jõu arendamisel Ca²⁺ tundlikkust, kooperatiivsust ja pH tundlikkust (Westfall *et al.*, 1999). Lisaks on näidatud, et TnI pärssivad omadused võivad sõltuda isovormide ekspressioonist. Uuringud valkude isovormide tasemel TnI kiire skeletilihase, kardiaalse ning aeglase skeletilihase pärssivatest aladest näitavad, et TnI_f omab parimat inhibeerivat toimet aktomüosiini ATP-aasile (Talbot & Hodges, 1981).

2.3 Troponiin T

Troponiin T (TnT) on troponiini kõige suurem komponent molekulmassiga 37 kDa. TnT on kui struktuurne “liim”, mis hoiab Tn · TM · aktiini kompleksi koos läbi TM, TnI, TnC ja aktiiniga seostumise (Tobacman, 1996; Perry, 1998). Uuringud on näidanud, et kui TnI, TnC ja TM on komplekselt koos, siis TnT kannab üle Ca²⁺ tundlikkuse aktomüosiini ATP-aasile (Potter *et al.*, 1995). Seega, TnT roll tundub olevat vähemalt kahekordne; N-terminali saba piirkond kinnitab troponiini tropomüosiiniga ning seostab seda peene filamendiga, samal ajal kui TnT C-terminal seob TnI · TnC Ca²⁺ sõltuval viisil (Schaertl *et al.*, 1995).

TnT esineb selgroogsete skeletilihases kolmes peamises vormis – kiires (TnT_f), aeglates (TnT_s) ja südamelihasele (TnT_c) omases vormis (Härtner *et al.*, 1989).

Uuringud on näidanud, et TnT erinevate isovormide kompositsioon erinevate skeletilihaskiu tüüpides võib omada suurt funktsionaalset tähtsust. 1970-ndatel aastatel arvati, et kiired lihased sisaldavad üht TnT isovormi ning aeglated lihased teist TnT isovormi (Dhoot & Perry, 1980). Edasistes uuringutes on leitud, et üks kiire lihas või isegi üks lihaskiud kiires lihases võib sisaldada erineva arvu TnT isovorme (Schachat *et al.*, 1985; Härtner *et al.*, 1989; Härtner & Pette, 1990). Skeletilihases esinevate TnT isovormide arv varieerub suuresti sõltuvalt uurimisobjektist ja uuritavatest lihastest, kusjuures erinevate autorite poolt kasutatav isovormide nomenklatuur võib üksteisest erineda.

Roti skeletilihases on kirjeldatud vastavalt nelja kiiret TnT isovormi ning kolm aeglast TnT isovormi eraldati hiljuti, kasutades standardset elektroforeetilist valkude eraldamise meetodit (Bastide *et al.*, 2002). Varasemad uuringud on aga näidanud, et täiskasvanud roti skeletilihastest on leitud viis kiiret isovormi (Sabry & Dhoot, 1991a) ning üks aeglane isovorm (Sabry & Dhoot, 1991b). Kischel ja kaasautorid (2005) uurisid roti skeletilihastes TnT aeglaste isovormide (TnT_s) ekspressiooni ja funktsionaalseid omadusi. Aeglasest *m. soleus*’est klooniti neli TnT_s cDNA-d. Leiti, et eelnevalt kirjeldatud kolm isovormi on

sarnased hiire skeletilihastes leiduvate isovormidega TnT_{1s}, TnT_{2s} ja TnT_{3s}. Uus roti isovorm, mis avastati, on pisut kõrgema molekulaarkaaluga kui TnT_{3s}. Seda neljandat isovormi pole varem skeletilihastes uuritud ning seetõttu nimetatakse seda TnT_{xs}. Nii ekspressioonimustrilt kui ka funktsionaalsetest omadustest tulenevalt võib aeglased TnT isovormid jagada kahte rühma: kõrge molekulaarkaaluga (TnT_{1s}, TnT_{2s}) ning madala molekulaarkaaluga (TnT_{xs}, TnT_{3s}) isovormid. Võrreldes nelja aeglast TnT isovormi, siis eelkirjeldatud madala molekulaarkaaluga aeglase TnT_x isovormi ekspresseeritakse kiiretes skeletilihastes, samal ajal kui kõrgema molekulaarkaaluga isovormid on suuremal määral aeglases *m. soleus*'es (Kischel *et al.*, 2005).

3. Tropomüosiin

Tropomüosiin (TM) on regulatoorne valk, molekulmassiga 35 kDa. Tropomüosiin paikneb aktiini monomeeride vahelises vaokeses ja koosneb kahest subühikust: α -tropomüosiin ja β -tropomüosiin (Cummins & Perry, 1973). Skeletilihastes esineb tropomüosiin $\alpha\alpha$ - või $\beta\beta$ -homodimeerina kiirelt kontraheeruvast lihases ja $\alpha\beta$ -heterodimeerina aeglaselt kontraheeruvast lihases (Swynghedauw, 1986).

Tropomüosiin on piklik polümeer, mis koosneb kahest α -heeliksist, mis on mähitud ümber aktiini filamendi ning katavad osaliselt aktiinile kinnitumise kohti. Tropomüosiini filamendid koosnevad umbes 35 dimeerist ja seostuvad omavahel saba-pea põhimõttel ning on leitud, et sellel on oluline roll sarkomeeri peene filamendi jäikuse tagamisel (Kojima *et al.*, 1994), samuti osaleb TM aktiini ja müosiini vahelises interaktsioonis (Geeves & Lehrer, 1994).

Skeletilihases ekspresseeritakse kolme TM isovormi: α -aeglane, α -kiire ja β -isovormid, mis sisaldavad $\alpha\alpha$ - ja $\beta\beta$ -homodimeere või $\alpha\beta$ -heterodimeere. Kiiretes skeletilihastes on rohkem TM α -isovormi (Cummins & Perry, 1974) ning β -TM on iseloomulik aeglase kontraktsioonikiirusega skeletilihasele (Oe *et al.*, 2007).

α -TM on stabiilsem ja $\alpha\alpha$ -dimeer domineerib pea kõikides skeletilihastes. β -TM on suhteliselt ebastabiilne ning harva leitav nagu $\beta\beta$ -dimeergi, kuid $\alpha\beta$ -heterodimeer on stabiilne. Enamus imetajate skeletilihaseid sisaldab mõlemaid nii $\alpha\alpha$ - kui ka $\alpha\beta$ -TM (Lehrer & Qian, 1990; Jagatheesan *et al.*, 2003). $\alpha\beta$ - vs. $\alpha\alpha$ -TM füsioloogilist rolli pole siiani täpselt mõistetud, kuid on leitud $\alpha\beta$ -TM proportsiooni suurenemist suurte imetajate aeglastes skeletilihastes ning on täheldatud selle suurenemist ka patoloogiliste seisundite puhul (Heeley *et al.*, 1983; Perry, 2001). α -TM ja β -TM isovormid on identsed nii skeleti- kui ka südamelihases, ainuke erinevus seisneb $\alpha\alpha$ vs. $\alpha\beta$ proportsioonides. Väikeste imetajate

südamelihases ekspresseeritakse peaaegu puhast α -TM ning transgeensetel hiirtel, kellel oli ekspresseeritud β -TM, leiti olulisi muutusi Ca^{2+} tundlikkuses ning kaasneva müokardi funktsionaalsuse ebakõlasid, mis olid valdavalt letaalsed (Muthuchamy *et al.*, 1995).

Erinevate imetajate skeletilihastes esinevad TM subühikute isovormid on oma struktuursetelt ja molekulaarsetelt näitajatelt võrdlemisi sarnased, säilitades samas objektispetsiifika, mis omakorda võib olla erinevate isovormide eraldamise ja identifitseerimise takistuseks (Boussouf *et al.*, 2007).

4. Muutused skeletilihaskude elektrostimulatsiooni puhul

Elektriline stimulatsioon on lihase aktiivsuse esilekutsujana leidnud laialdast kasutamist ning kuna antud meetod võimaldab nn. koormust täpselt doseerida, siis on erinevad teadlased saavutanud ka tähelepanuväärseid tulemusi. Uuringud erinevate lihaste ja valkude tasandil on näidanud, et kõrg- (Gorza *et al.*, 1988; Schiaffino *et al.*, 1988) ja madalasageduslikul (Härtner *et al.*, 1989; Termin & Pette, 1992) elektrostimulatsioonil toimuvad skeletilihases erinevate valkude sisalduses ning ka erinevate valkude isovormilises koostises ulatuslikud muutused.

Kiire lihase (*m. extensor digitorum longus*) madalasageduslikul (10Hz) elektrostimulatsioonil toimuvad erinevate troponiini komponentide isovormides muutused, mille tulemusena erinevate troponiini komponentide isovormide koostis muutub sarnaseks aeglase lihase isovormide sisaldusega (Härtner *et al.*, 1989). Uuringud on näidanud, et kõige ulatuslikumad ja kiiremad muutused toimuvad TnT isovormides võrreldes teiste troponiini komponentidega (TnI ja TnC) (Härtner *et al.*, 1989; Härtner & Pette, 1990).

Teise regulatoorse valgu, tropomüosiini muutused madalasageduslikul (10Hz) elektrostimulatsioonil kiires lihases (*m. extensor digitorum longus*) on suhteliselt väikesed. Väheneb kiire skeletilihase α -TM ja tõuseb aeglase skeletilihase α -TM isovormide sisaldus, kuid α/β TM omavaheline suhe jääb samaks (Härtner *et al.*, 1989).

5. Skeletilihase hüpertroofia

Skeletilihas on väga plastiline kude, mis kohaneb hästi erinevate muutustega funktsionaalses aktiivsuses (Timson, 1990). Skeletilihaskoe kohanemine seisneb nii morfoloogiliste, biokeemiliste kui ka molekulaarsete omaduste heas reaktsioonivõimes vastavalt neuromuskulaarse kiiruse aktiivsuse muutuste eripäradele (Antonio & Gonyea, 1993). Skeletilihasele täiendava ja kroonilise iseloomuga koormuse rakendamine viib

mõjustatud lihaskoe puhul adaptatiivsete protsesside arengule, mille resultaati on kirjeldatud kui kompensatoorset hüpertroofiat (Denny-Brown, 1960; Mackova & Hnik, 1971; Hofmann, 1980).

Inimeste puhul on lihashüpertroofia esilekutsumine pikaajaline protsess, kontraktiilset aparaati mõjustatakse pikaajaliselt (kuid, aastaid). Seetõttu kasutatakse lihashüpertroofia esilekutsumiseks katseloomadel mitmesuguseid mudeluuringuid. Lihashüpertroofia uuringud jagunevad põhiliselt kolme kategooriasse: venitusest põhjustatud hüpertroofia, kompensatoorne hüpertroofia ja treeningust indutseeritud hüpertroofia.

5.1 Kompensatoorne hüpertroofia

Kompensatoorse hüpertroofia mudelit käsitles esimesena Denny-Brown (1960). Kompensatoorse hüpertroofia esilekutsumiseks ja mehhanismi uurimiseks skeletilihases loomkatsete puhul kasutatakse mitmeid erinevaid mudeleid:

1. Sünergistlihaste tenotoomia (Denny-Brown, 1960; Lesch *et al.*, 1968; Mackova & Hnik, 1971; 1973; Schiaffino *et al.*, 1976);
2. Sünergistlihaste kirurgiline eemaldamine või eraldamine (Ianuzzo & Armstrong, 1975; Timson *et al.*, 1985; Snow, 1990);
3. Passiivne lihase venitus (Sola *et al.*, 1973; Holly *et al.*, 1980; Alway *et al.*, 1989);
4. Erinevad treeningumudelid (Edgerton *et al.*, 1972; Gonyea & Ericson, 1976; Klitgaard, 1988).

Avaldatud andmed annavad kinnitust, et kehalise aktiivsuse erinevate mudelite (treeningute) rakendamine ei võimalda lihaskoe kohanemisreaktsioone sellisel ulatuslikul määral nagu kompensatoorse hüpertroofia mudelite puhul väljendunud lihashüpertroofia tasemega (Taylor & Wilkinson, 1986).

Põhiliselt kasutatakse lihases kompensatoorse hüpertroofia esilekutsumiseks kahte mudelit: tenotoomia (sünergistlihase kõõluse läbilõikamine) ning ablatsioon (sünergistlihase täielik eemaldamine) (Timson, 1990). Allesjäänud lihastel tuleb sel juhul kompenseerida lihastööst välja langenud lihase tegevus (Antonio & Gonyea, 1993). Siit tuleneb ka antud meetodi nimetus – allesjäänud lihas peab kompenseerima eemaldatud lihase töö, mille tulemusel tekib hüpertroofia.

Sünergistlike lihastega teostatud manipulatsioonide, lihase kõõluse läbilõikamise või lihase eemaldamise tagajärjel asetatakse sama lihasgrupi sarnast funktsiooni täitvad lihased suurenenud funktsionaalse aktiivsuse tingimustesse, kus kehaasendi säilitamiseks/liikumiseks

on allesjäänud lihased sunnitud kompenseerima funktsionaalselt elimineeritud lihaste tööd. Erinevate kompensatoorse hüpertroofia mudelite juures on oluline silmas pidada protsesside kujunemise ajalist dünaamikat. Funktsionaalse ülekoormuse kestusest lähtuvalt võib lihastele rakenduv koormus olla kas lühema- või pikemaajaline (Aru, 2004; Reisberg, 2004).

Kompensatoorse hüpertroofia mudelite puhul on oluline rõhutada, et erinevate mudelite kasutamine toob skeletilihases kaasa küll kulgemise ja ulatuse poolest varieeruvad, ent põhimõtteliselt samasuunalised adaptatiivsed nihked (Sugiura *et al.*, 1993; Pehme *et al.*, 2004a).

5.1.1 Tenotoomia

Tenotoomia mudeli kasutamine kompensatoorse hüpertroofia esilekutsumiseks skeletilihases tingib kiire lihaskaalu juurdekasvu algfaasis, mis uuringu hilisemas faasis stabiliseerub (Timson, 1990; Aru, 2004; Pehme *et al.*, 2004a; Reisberg, 2004).

M. gastrocnemius'e või *m. tibialis anterior*'i kõõluste läbilõikamist on kasutanud paljud uurijad kompensatoorse hüpertroofia esile kutsumiseks, mis põhjustab vastavalt *m. soleus*'e, *m. plantaris*'e või *m. extensor digitorum longus*'e kompensatoorse hüpertroofia (Mackova & Hnik, 1973; Schiaffino *et al.*, 1976; Seiden, 1976).

Uuringud katseloomadel näitavad, et ulatuslik lihaskaalu juurdekasv väljendub juba 4-7 päeva peale tenotoomia protseduuri (Lesch *et al.*, 1968; Seiden, 1976). Uuringute tulemustest nähtub, et funktsionaalse ülekoormuse edasisel kestmisel hüpertroofia areng aeglustub, kuid täiendavalt koormatud lihaste kaal jääb kontroll-lihastega võrreldes kõrgemaks (Lesch *et al.*, 1968; Mackova & Hnik, 1973; Seiden 1976; Pehme *et al.*, 2004a).

M. gastrocnemius'e kõõluse läbilõikamine põhjustab *m. soleus*'es olulise lihaskaalu juurdekasvu. On näidatud, et juba 4. tenotoomiajärgsel päeval saavutas aeglase lihase kaal maksimaalsed väärtused, suurenedes 48% võrreldes kontroll-lihasega (Mackova & Hnik, 1973). 7 päeva möödumisel operatsioonist oli *m. soleus*'e kaal kontroll-lihasest 30% suurem (Lesch *et al.*, 1968). Lihaskaalu juurdekasv aeglustus ja kaal stabiliseerus 2-3 nädala möödumisel tenotoomia protseduurist, kus *m. soleus*'e kaal jäi 10-15% kõrgemaks kui kontroll-lihasel (Mackova & Hnik, 1973). Sugiura ja kaasautorite (1993) uuring näitas, et *m. gastrocnemius*'e tenotomeerimise järgselt oli 5-nädalase ülekoormusperioodi vältel *m. plantaris*'e kaal 44,3% ning *m. soleus*'e kaal 37,4% suurem kui kontralateraalset lihasel (Sugiura *et al.*, 1993). Pehme ja kaasautorite (2004a) uuringu tulemused näitavad, et 30 päeva väldanud *m. plantaris*'e täiendav funktsionaalne koormamine sünergistliku *m.*

gastrocnemius'e kõõluse läbilõikamise teel põhjustas *m. plantaris*'e olulise kaalu suurenemise nii noortel (40%) kui vanadel (25%) katseloomadel (Pehme *et al.*, 2004a).

TÖÖ EESMÄRK JA ÜLESANDED

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada valgusisalduse muutusi imetajate skeletilihaste reguleerivate valkude kompleksi komponentides väljakujunenud kompensatoorse hüpertroofia tingimustes.

Töö eesmärgi täitmiseks seati järgmised meetodilised ülesanded:

- Funktsionaalse ülekoormuse rakendamisega kutsuda mõjustatud lihastes esile väljakujunenud kompensatoorne hüpertroofia.
- Optimeerida lihasvalkude eraldamise meetodikat, võimaldamaks reguleerivate valkude ja nende subühikute efektiivsemat separatsiooni ja kvantitatiivset identifitseerimist.

Töö eesmärgi täitmiseks püstitati järgmised ülesanded:

1. Selgitada tropomüosiini (TM) subühikute kompositsiooni muutuste eripärasid kompensatoorse hüpertroofia tingimustes kiire ja aeglase kokkutõmbe iseloomuga skeletilihases.
2. Selgitada troponiin T (TnT) kiirete isovormide sisalduse muutusi skeletilihastes kompensatoorse hüpertroofia tingimustes kiire ja aeglase kokkutõmbe iseloomuga skeletilihases.

TÖÖ TEOSTAMISE METOODIKA

Uuringud viidi läbi vastavalt EV Põllumajandusministeeriumi loomkatsete läbiviimise komisjoni loaga sätestatud tingimustel.

1. Katse korraldus

Eksperimendis kasutati täiskasvanud isaseid Wistar liini rotte. Katseloomad viibisid kogu eksperimendi vältel identsetes keskkonningimustes. Katseloomad jagati 2 gruppi (n=6) ning olid paigutatud puuridesse 2 kaupa, valguse pimeduse tsükkel oli 12h/12h ning kasutati konstantset dieeti (R70; Laktamiin; Stockholm, Rootsi). Toitu ja vett said katseloomad *ad libitum*.

1.1 Tenotoomia protseduuri kirjeldus

Enne operatsiooni viidi läbi katseloomade anesteesia, kasutades diasepaami (Diapam®) ja ketamiini (Ketaminol®) (vastavalt 2,5mg ja 6mg 100g kehakaalu kohta) intraperitoneaalselt (i/p). *M. soleus*'e ja *m. plantaris*'e kompensatoorne hüpertroofia kutsuti esile sünergistlihase – *m. gastrocnemius*'e – kõõluse läbilõikamise teel. Kontrollina kasutati kontralateraalsel jäset.

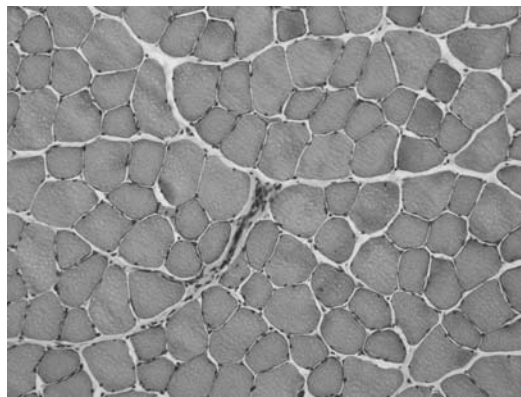
Operatsiooniväli puhastati, raseeriti. Sooritati optimaalse pikkusega sisselõige, säilitades ümbritsevas piirkonnas närvi- ja verevarustuse. Lõigati läbi *m. gastrocnemius*'e kõõlus, jättes sünergistlihaste kõõlused intaktseks. Katseloomad ohverdati 15. postoperatiivsel päeval.

2. Koeproovide eraldamine

Katseloomad anesteseeriti diasepaami (Diapam®) ja ketamiiniga (Ketaminol®) (vastavalt 2,5mg ja 6mg 100g kehakaalu kohta) i/p, ohverdati ning eraldati funktsionaalselt ülekoormatud *m. soleus* ja *m. plantaris* ning kaaluti. Koed puhastati rasvast ja sidekoest ning külmutati koheselt vedelas lämmastikus. Koeproovid säilitati –80°C juures kuni edasiste analüüsideni.

2.1 Kostruktuuri histoloogiline hindamine

Väljakujunenud hüpertroofia faasis oleva lihaskoe struktuurse terviklikkuse hindamiseks viidi läbi histoloogilised uuringud, kasutades uuritavate lihaste keskmist osa. Preparaatidelt lõigati -20°C juures $10\mu\text{m}$ paksused lõigud, kasutades krüomikrotoomi (Micron 560). Histoloogiliste preparaatide hindamisel kasutati valgusmikroskoopi Olympus BX-41 (Tokyo, Jaapan), koos spetsiaalse digitaalse kaameraga (ColorView IIIu) ning analüüsi tarkvaraga (Cell Analysis Processing). Kostruktuuride terviklikkus ja patoloogiliste tunnuste puudumine oli kriteeriumiks edasiste analüüside suhtes.



Joonis 1. Skeletilihase histoloogiline preparaat. Objektiivi suurendus 20X.

2.2 Tropomüosiini subühikute eraldamine

TM subühikud eraldati 7M Urea ja 2M Thiourea keskkonnas isoleeritud müofibrillidest 12,5% SDS-PAAG-il, lisades geeli 3,5M ureat, vältimaks TM subühikute ja TnT isovormide kontaminatsiooni (Cummins & Perry, 1974). Elektroforeesi tingimused: voolupinge 70V, kestus 4 tundi (Protean II, USA, Bio-Rad). Geelid värviti Coomassie Brilliant Blue R-250. Värvireaktsiooni hinnati densitomeetriliselt, kasutades selleks densitomeetrit LKB 2202 Lazer. TM subühikud tuvastati, teades molekulaarkaalusid, kasutades molekulaarkaalumarkerit (M 6539 Sigma, St. Louis, USA).

2.3 TnT kiirete isovormide eraldamine Western blottingul

TnT isovormid identifitseeriti immunokeemilisel meetodil vastavalt Western blotting protokollile. Selleks lahutati TnT isovormid elektroforeetilisel 12,5% SDS-PAAG-il järgmistes tingimustes: jooksupuhver (50 mM TRIS, 75 mM glütsiin), voolupinge 70V ja elektroforeesi kestus 4,5 tundi (Mini-Protean, USA).

Pärast elektroforeesi kanti valgubandid üle polüvinülideen difluoriid membraanile (PVDFT, Polyscreen TM, Biotechnology Systems, NEN Research Products, Du Point). Valgubandide ülekandmiseks kasutati Trans Blott Cell (Bio-Rad) süsteemi. Jooksupuhver (ülekandepuhver) sisaldas 20% etanooli ja 0,037% SDS. Ülekanne kestis 3 tundi, voolupinge 44V, voolutugevus 380 mA ning temperatuur +5°C.

Valgulaigud (blots) blokeeriti, loksutades membraani 1 tund toatemperatuuril 3% härja seerumi albumiiniga (BSA), mis lahustati fosfaadiga puhverdatud soola ja TWEEN-20 (PBS-T-20) lahuses (20 mM NaH₂PO₄ · H₂O, 80 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl ja 0,1% TWEEN-20).

Pärast membraani loputamist ja pesu (vastavalt 2x5 min ja 1x15 min) PBS-T-20-ga valgulaike inkubeeriti 45 min temperatuuril +22°C lahjendatud (6µl 3ml 10% BSA kohta PBS-T-20-s) monoklonaalse antikehaga TnT_{fast} isovormide vastu (JLT 8, SIGMA, USA).

Membraani pesti 2x25 minutit PBS-T-20-ga ja seejärel inkubeeriti valgulaike 45 minutit toatemperatuuril +22°C lahjendatud sekundaarse antikehaga (antimouse immunoglobuliin G) (0,5µl 7ml-s 1% BSA/PBS-T-20). Valgubandid visualiseeriti kemoluminestsents meetodil vastavalt ECLTM Western blotting protokollile (Amersham, Life Science).

Selleks pesti 1x15 minutit ja 4x5 minutit PBS-T-20 lahusega ning valgubandide tuvastamiseks ilmutati membraani 1 minut ECLTM Western blotting detekteerimisreagensis (lahuses) ja valguse emissioon tehti kindlaks pärast lühiajalist membraani eksponeerimist tundlikule autoradiograafia filmile (ReflectionTM NEF-496, NEN Research Products, Du Point).

3. Statistika

Andmed töödeldi statistiliselt, leiti tulemuste aritmeetiline keskmine ja standardviga. Andmete aritmeetiliste keskmiste võrdlusel kasutati paaride Student t-testi (usaldatavuse nivoo p<0.05).

TÖÖ TULEMUSED

1. Katseloomade kehakaal ning lihaste kaalud kompensatoorse hüpertroofia arengu tingimustes

Meie katsete tulemused näitasid, et sünergistlihaste funktsiooni elimineerimine katseloomade kehakaalule mõju ei avaldanud. Samas kutsus 15-päevalise funktsionaalse ülekoormuse rakendamine uuritavates lihastes esile märkimisväärse lihasmassi tõusu (46,5% *m. soleus*'e ja 27,2% *m. plantaris*'e puhul) (tabel 1). Objektiivsemat informatsiooni lihasmassi muutuste kohta rakendatud mõjustuse tulemusena annab uuritavate lihaste ja katseloomade kehakaalu omavaheline suhe, mis tõusis meie katsetulemuste põhjal mõlemas uuritavas lihases (tabel 1).

Tabel 1. Katseloomade kehakaal ja lihaste kaalud funktsionaalse ülekoormuse puhul. Kontroll – kontroll-loom/kontroll-lihas, KH – kompensatoorne hüpertroofia, n=6, x±m, # – p<0,05.

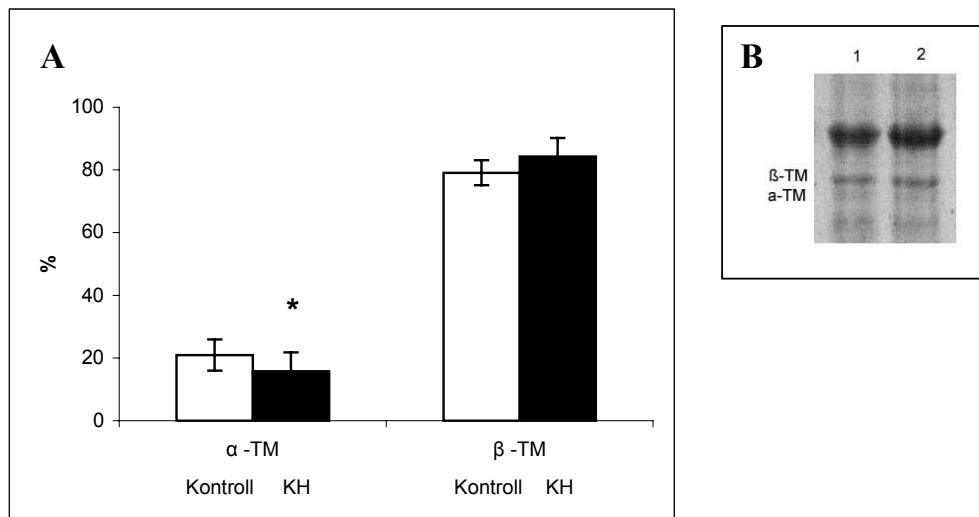
grupp	n	kehakaal (g) (KK)	<i>m. soleus</i>		<i>m. plantaris</i>		<i>m. soleus</i> 'e ja KK suhe	<i>m. plantaris</i> 'e ja KK suhe
			(mg)	(%)	(mg)	(%)		
Kontroll	6	268 ± 6.4	123.4 ± 5.2		252.6 ± 5.5		0.46 ± 0.02	0.94 ± 0.02
KH	6	278 ± 6.0	180.0 ± 3.3 #	46.5	321.4 ± 13.4 #	27.2	0.65 ± 0.05 #	1.16 ± 0.06 #

2. Muutused tropomüosiini subühikute sisalduses kompensatoorse hüpertroofia arengu käigus

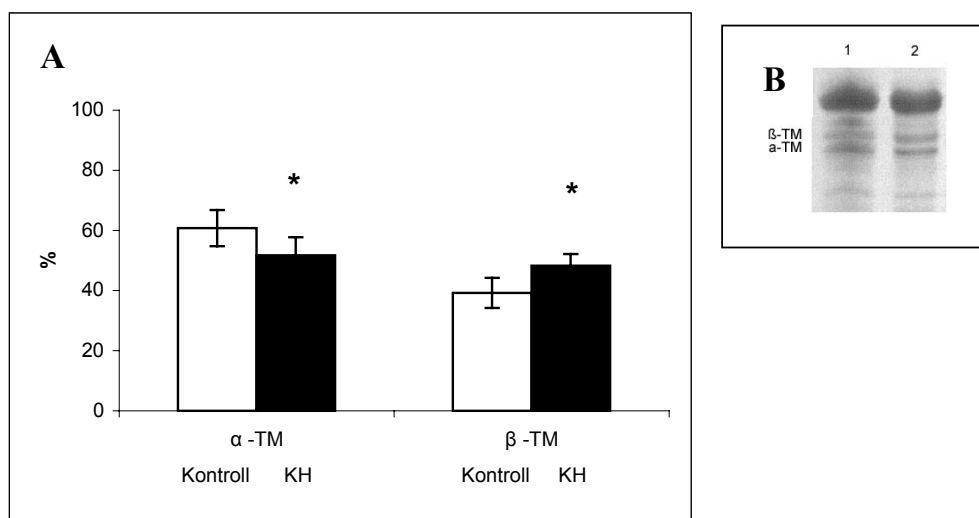
Uuritavatest skeetilihastest eraldati TM subühikud 12,5% PAAG-il. 3,5M uurea lisamine geeli parandas uurimisobjektiks olevate valkude migratsiooni. Meie katse tulemused näitasid, et aeglase kokkutõmbeiselooga skeetilihases (*m. soleus*) on domineerivaks TM subühikuks β-TM, moodustades kogu TM kompleksist 79,1% (joonis 2A). Sünergistlihaste funktsionaalse elimineerimise tulemusena areneva kompensatoorse hüpertroofia tingimustes vähenes kiiretes- ja segalihastes dominantse TM subühiku α-TM sisaldus 21,9%, moodustades hüpertrofeerunud lihaskoes 15,8% kogu TM kompleksist (joonis 2A, 2B).

Samal ajal näitasid meie eksperimentide tulemused, et *m. plantaris*'e puhul, mida võib vastavalt kontraktiilsete valkude isovormide sisaldusele klassifitseerida kui dominantsete

kiirete isovormidega segalihast, olid TM subühikud jaotunud võrdlemisi ühtlaselt, moodustades vastavalt 60,8% α -TM ja 39,2% β -TM puhul (joonis 3A). Kompensatoorse hüpertroofia arengule viivate protsesside käigus langes *m. plantaris*'es α -TM sisaldus ning samal ajal tõusis β -TM sisaldus (vastavalt 14,8% ja 22,9%) (joonis 3A, 3B).



Joonis 2. **A** – Funktsionaalse ülekoormuse mõju tropomüosiini (TM) subühikute sisaldusele *m. soleus*'es. Kontroll – kontroll-lihas, KH – kompensatoorne hüpertroofia. **B** – TM subühikute elektroforeetiline eraldamine. 1 – kontroll-lihas, 2 – kompensatoorne hüpertroofia, n=6, $\bar{x} \pm m$, * – $p < 0,05$.



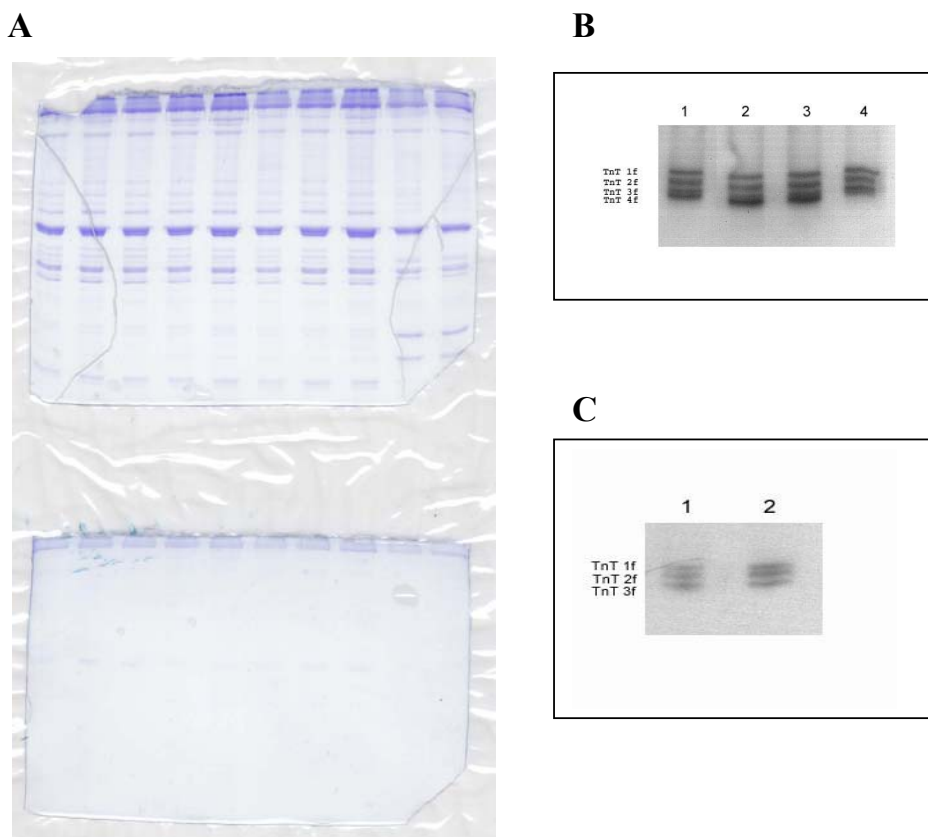
Joonis 3. **A** – Funktsionaalse ülekoormuse mõju tropomüosiini (TM) subühikute sisaldusele *m. plantaris*'es. Kontroll – kontroll-lihas, KH – kompensatoorne hüpertroofia. **B** – TM subühikute elektroforeetiline eraldamine. 1 – kontroll-lihas, 2 – kompensatoorne hüpertroofia, n=6, $\bar{x} \pm m$, * – $p < 0,05$.

3. Muutused troponiin T kiirete isovormide sisalduses kompensatoorse hüpertroofia arengu käigus

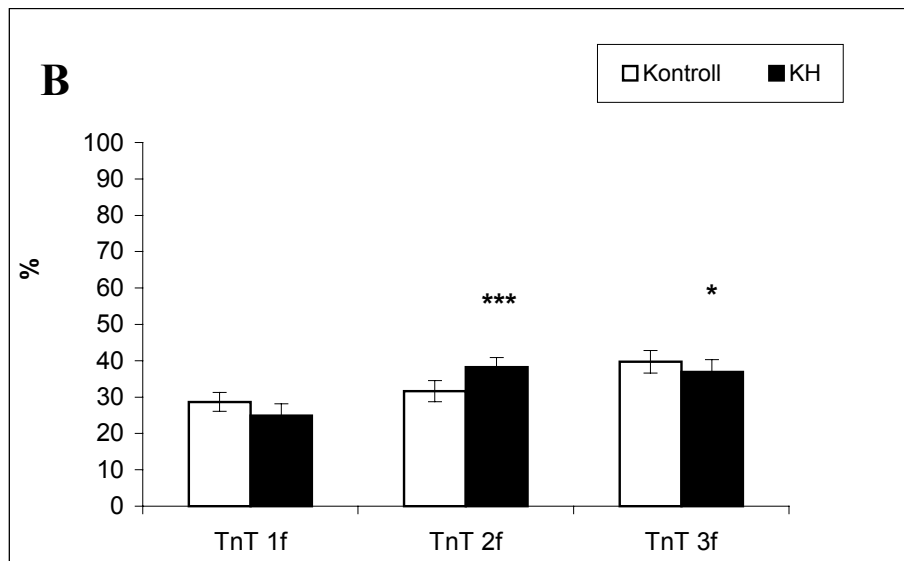
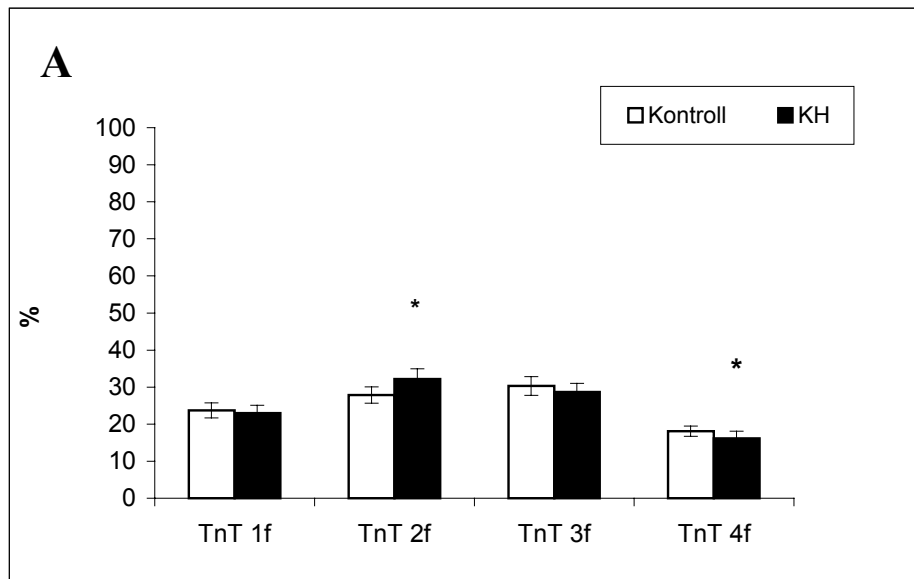
Meie katsetes eraldati TnT kiired isovormid kohandatud tingimustel elektroforeetilisel ning kanti nitrotselluloosmembraanile. Elektroforeetiline eraldamine ning ülekande puhtuse kontroll on toodud joonisel 4 (joonis 4A). Ülekantud valgubandid identifitseeriti monoklonaalseid antikehi kasutades ning visualiseeriti kemoluminestsents reaktsioonil (joonis 4B, 4C).

Meie andmed näitasid, et kiire kontraktiilse iseloomuga lihases (*m. plantaris*) oli esindatud 4 TnT kiiret isovormi, milledest suurema ülekaaluga oli TnT_{2f} sisaldus ning statistiliselt usutavalt langes TnT_{4f} sisaldus (joonis 5A).

Aeglase iseloomuga skeetilihases (*m. soleus*) õnnestus meie tulemuste põhjal eraldada ja identifitseerida 3 TnT kiiret isovormi (TnT_{1f}, TnT_{2f}, TnT_{3f}). Rakendatud funktsionaalse ülekoormuse tingimustes tõusis meie andmetel TnT_{2f} sisaldus ning samal ajal langes TnT_{3f} sisaldus (joonis 5B).



Joonis 4. Troponiin T kiirete isovormide eraldamine ning ülekande puhtuse kontroll (A) ja identifitseerimine Western blottingul (B, C). **B** – *m. plantaris*, 1 ja 4 – kontroll-lihas, 2 ja 3 – kompensatoorne hüpertroofia. **C** – *m. soleus*, 1 – kontroll-lihas, 2 – kompensatoorne hüpertroofia.



Joonis 5. Muutused troponiin T kiirete isovormide sisalduses kompensatoorse hüpertroofia arengu tulemusena. **A** – *m. plantaris*, **B** – *m. soleus*. n=6, $\bar{x} \pm m$, * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ Kontroll – kontroll-lihas, KH – kompensatoorne hüpertroofia.

TÖÖ TULEMUSTE ARUTELU

Täiendava funktsionaalse koormuse rakendamine skeletilihastele tingib vastusreaktsioonina kiire ja ulatusliku kompensatoorse hüpertroofia arengu. Arenev hüpertroofia aste ning väljendumise kiirus sõltub rakendatud manipulatsioonide ja koormuse spetsiifikast ning varieerub erinevate uuringute puhul (Bigard *et al.*, 2001; Pehme *et al.*, 2004a; Reisberg, 2004). Meie katsetulemuste põhjal oli lihasmassi juurdekasv aeglase kokkutõmbeiseloومuga lihases (*m. soleus*) 46,5% ja kiire iseloومuga segalihases (*m. plantaris*) 27,2%. Reisberg (2004) leidis oma tulemustele toetudes mõnevõrra madalama lihasmassi juurdekasvu, samas on kirjanduses andmeid, mis suurel määral ühtivad meie katse tulemustega (Sugiura *et al.*, 1993). Erinevad autorid on valdavalt üksmeelel, et lihasmassi juurdekasvule viivad adaptatiivsed protsessid on enam väljendunud aeglase iseloومuga lihase puhul ning protsesside intensiivsus on kõrgem kompensatoorse hüpertroofia kujunemise algfaasis, stabiliseerudes kirjanduse andmetel katseloomadel tehtud eksperimentides 20-30 päeva möödudes (Pehme *et al.*, 2004a; 2004b; Reisberg, 2004). Meie oma katsetes registreerisime uuritavad näitajad 15 päeva peale sünergistlihase funktsiooni elimineerimist, mis kujutab endast väljakujunenud kompensatoorse hüpertroofia faasi.

Tropomüosiin (TM) on madalamolekulaarne valk, mis on skeletilihastes assotseerunud peene filamendi valkude kompleksi ning täidab lihaskontraktsiooni seisukohalt valdavalt sidestavat ja struktuurset rolli. Tropomüosiin koosneb kahest subühikust α -TM ja β -TM, mille osakaal sõltub uuritava lihase ehituslikest ja ainevahetuslikest omadustest (Perry, 2001). Meie eksperimendis eraldati TM subühikud parema separatsiooni tagamiseks 12,5% SDS-PAAG-il 3,5M urea lisamisega geeli. Oma katsetulemuste põhjal leidsime, et mõjustamata skeletilihaste puhul on aeglases lihases (*m. soleus*) ülekaalus β -TM ja kiire iseloومuga skeletilihase puhul α -TM subühikud. Varasemalt on sarnast TM subühikute struktuurset lihaskiu spetsiifilist dominantsti demonstreeritud erinevate autorite poolt (Salviati *et al.*, 1982; 1983; Perry, 2001), kus saadud tulemused peegeldavad TM subühikute sisaldust üksikute lihaskiudude tasandil. Samal ajal näitavad kirjanduse andmed, et nii kontraktiilsete kui ka reguleerivate valkude sisaldus erinevates lihaskiu tüüpides võib olla liigi- ja lihasespetsiifiline (Bronson & Schachat, 1982; Schachat *et al.*, 1985; Schevzov *et al.*, 2005).

Funktsionaalse aktiivsuse mõju skeletilihase morfoloogilistele ja metaboolsetele karakteristikutele on uuritud suuremal määral läbi muutuste kontraktiilsete valkude ainevahetuses. Vähemal määral on tähelepanu pööratud liigutusliku aktiivsuse eripärade ja reguleerivate valkude kompleksi valkude tasandil toimuvatele kohanemisprotsessidele. Skeletilihaskoe kohanemisreaktsioonide ja mehhanismide uurimiseks on mitmete autorite

poolt kasutatud madal- või kõrgsageduslikku elektrilist stimulatsiooni, muutes sellega spetsiifilistele mootorsetele ühikutele iseloomulikku innervatsioonisagedust, millele lihaskiivad omakorda vastavad muutustega geeniekspressiooni tasemel ning selle tulemusena muutes oma iseloomulikku valgulist profiili. TM subühikute puhul on leitud, et madalsagedusliku elektrostimulatsiooni tulemusena tõusis kiires lihases β -TM sisaldus (Schachat *et al.*, 1985). Mõnedes hilisemates uuringutes on leitud, et madalsageduslik kiire lihase stimuleerimine muutis küll α -TM isovormide vahekorda, kuid mitte α/β TM isovormide suhet (Härtner *et al.*, 1989). Meie oma eksperimentides leidsime, et väljakujunenud kompensatoorse hüpertroofia tingimustes (15 päeva postoperatiivselt) tõusis β -TM subühikute sisaldus nii aeglase kui ka kiire iseloomuga skeletilihaste puhul. Uuritavate skeletilihaste omavahelisel võrdlusel näitasid meie tulemused, et aeglasemale subühikute sisalduse kompositsioonile viivad muutused olid mõnevõrra ulatuslikumalt väljendunud kiire iseloomuga lihase (*m. plantaris*) puhul. Sarnane kohanemisreaktsioonide suund (kiirelt aeglasemale) on uurijate poolt kinnitust leidnud kontraktiilsete valkude ja nende isovormide tasandil tehtud uuringutes. Eriti ilmekalt demonstreerivad eeltoodud fenomeni eksperimendid lihastel, milles on esindatud kõik peamised imetajate skeletilihastele iseloomulikud kontraktiilse valgu müosiini raskete ahelate (MyHC) isovormid (Pehme *et al.*, 2004a; 2004b).

Erinevates uuringutes on uuritud ja selgitatud funktsionaalse aktiivsuse ja kontraktiilse aparatuuri vahelisi kohanemise seoseid. Samal ajal on põhjuslike seoste ja järelduste tegemine, tuginedes kontraktiilsete valkude tasandil toimuvatele protsessidele, väheinformatiivne. Väga vähe on teada reguleerivate valkude komponente siduva troponiini T (TnT) sisalduse muutuste kohta erinevate funktsionaalsete seisundite puhul. Osa autoreid on arvamisel, et MyHC ja TnT erinevate isovormide koosinemise vahel on kooskõla ning muutused MyHC isovormide sisalduses võivad esile kutsuda muutusi TnT isovormide sisalduses (Galler *et al.*, 1997; Perry, 1998; Pette, 1998). Imetajate skeletilihastes on käesolevaks ajaks identifitseeritud TnT neli kiiret (TnT_{1f}, TnT_{2f}, TnT_{3f}, TnT_{4f}) ja kolm aeglast (TnT_{1s}, TnT_{2s}, TnT_{3s}) isovormi. Meie oma eksperimentides uurisime funktsionaalse ülekoormuse mõju TnT kiiretele isovormidele nii kiire kui aeglase iseloomuga lihases. Kasutades modifitseeritud ja uurimisobjektile kohandatud elektroforeesi (12,5% SDS-PAAG, pikendatud eraldusaeg valkude migratsiooni võimaldamiseks) ning Western blottingut, identifitseerisime oma katsetes kiire iseloomuga lihases (*m. plantaris*) kõik neli TnT kiiret ja aeglasel lihases (*m. soleus*) kolm kiiret TnT isovormi. Mõlema uuritud skeletilihase puhul oli TnT kiirete isovormide sisaldus kõige kõrgem TnT_{2f} puhul ja mõnevõrra madalam oli teiste TnT kiirete isovormide sisaldus. Sünergistlihase funktsionaalsuse elimineerimise tulemusena areneva kompensatoorse hüpertroofia tingimustes muutus meie katsetulemuste põhjal vastavalt TnT

kiirete isovormide proportsionaalne sisaldus mõlemas uuritavas lihases. Nii *m. plantaris*'e kui *m. soleuse*'e puhul tõusis TnT_{2f} sisaldus ning samal ajal langes vastavalt TnT_{4f} sisaldus *m. plantaris*'es ja TnT_{3f} sisaldus *m. soleus*'es. Uuringutes on näidatud kooskõla muutuste vahel MyHC Iib ja TnT_{4f} ning MyHC Iia ja TnT_{2f} isovormide vahel (Galler *et al.*, 1997). Pehme ja kaasautorite (2004a; 2004b) poolt näidatud MyHC Iia osakaalu suurenemine kompensatoorse hüpertroofia tingimustes ning meiepoolsed tulemused lubavad spekuloida võimalike tingimuslike seoste üle kontraktiilsete ja reguleerivate valkude isovormide koossekspresseerimise vahel. Kinnitust eeltoodule annavad meie katsete tulemused TM subühikute sisalduse muutuste tasandil. Kuna TnT roll lihaskontraktsiooni regulatsioonis on teiste reguleerivate valkude sidumises funktsionaalsesse kompleksi, siis võib meie katsetulemuste ja autorite poolt seni avaldatu põhjal esile tuua võimalikud üksteist mõjutavad seosed kontraktiilsete ja reguleerivate valkude subühikute ja isovormide vahel: MyHC Iia ↔ TnT_{2f} ↔ β-TM ja MyHC Iib ↔ TnT_{4f} ↔ α-TM.

Meie katsete tulemused näitasid, et skeletilihase reguleerivate valkude kompleksi subühikute ja isovormide kompositsioon muutus täiendava kroonilise koormuse rakendamisel aeglasemaks, mis on kooskõlas nii lihasvalkude kui lihaskiutüüpide tasandil tehtud uuringutega.

JÄRELDUSED

Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal saame teha järgnevad järeldused:

1. Väljakujunenud kompensatoorse hüpertroofia tingimustes langes α -TM sisaldus mõlemas uuritavas lihases ning β -TM tõusis nii kiire kui aeglase kokkutõmbeiseloomuga skeletilihases.
2. Kiire kontraktsiooni-iseloomuga lihases tõusis funktsionaalsest ülekoormusest tingitud kompensatoorse hüpertroofia puhul TnT_{2f} sisaldus ja langes TnT_{4f} sisaldus.
3. Aeglase kontraktsiooni-iseloomuga lihases tõusis funktsionaalsest ülekoormusest tingitud kompensatoorse hüpertroofia puhul TnT_{2f} ja langes TnT_{3f} isovormi sisaldus.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. **Alway SE, Winchester PK, Davis ME, Gonyea WJ.** Regionalized adaptations and muscle fiber proliferation in stretch-induced enlargement. *J Appl Physiol* 66: 771-781, 1989.
2. **Antonio JA, Gonyea WJ.** Role of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia in intermittently stretched avian muscle. *J Appl Physiol* 74: 1893-1898, 1993.
3. **Aru M.** Kompensatoorse hüpertroofiaga kaasnevad muutused lihasvalkude sisalduses ja lihaskoe ehituses. Bakalaureusetöö. Tartu, 2004.
4. **Barany M.** ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50: 197-216, 1967.
5. **Bastide B, Kischel P, Puterflam J, Stevens L, Pette D, Jin JP, Mounier Y.** Expression and functional implications of troponin T isoforms in soleus muscle fibers of rat after unloading. *Pflügers Arch* 444: 345-352, 2002.
6. **Bigard AX, Zoll J, Ribera F, Mateo P, Sanchez H, Serrurier B, Ventura-Clapier R.** Influence of overload on phenotypic remodeling in regenerated skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: 1686-1694, 2001.
7. **Boussouf SE, Maytum R, Jaquet K, Geeves MA.** Role of tropomyosin isoforms in the calcium sensitivity of striated muscle thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 28: 49-58, 2007.
8. **Bronson DD, Schachat FH.** Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J Biol Chem* 257: 3937-3944, 1982.
9. **Collins JH.** Myosin light chains and troponin C: structural and evolutionary relationships revealed by amino acid sequence comparisons. *J Muscle Res Cell Motil* 12: 3-25, 1991.
10. **Cooke R.** The mechanism of muscle contraction. *Crit Rev Biochem* 21: 53-118, 1986.
11. **Craig R, Lehman W.** Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments. *L Mol Biol* 311: 1027-1036, 2001.
12. **Cummins P, Perry SV.** The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem J* 133: 765-777, 1973.
13. **Cummins P, Perry SV.** Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. *Biochem J* 141: 43-49, 1974.
14. **Denny-Brown D.** Experimental studies pretraining to hypertrophy, regeneration and degeneration. Proceedings of the Association of Research Into Nervous and Mental

- Disorders, 1960 in Timson BF. Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement. *J Appl Physiol* 69: 1935-1945, 1990.
15. **Dhoot GK, Perry SV.** Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 278: 714-718, 1979.
 16. **Dhoot GK, Perry SV.** Factors determining the expression of the genes controlling the synthesis of the regulatory proteins in striated muscle, 1980 in Pette D. *Plasticity of muscle*: 255-267. Berlin & New York: Walter de Gruyter.
 17. **Eddinger TJ, Moss RL, Cassens RG.** Fiber number and type composition in EDL, SOL, and diaphragm muscles with aging in Fisher 344 rats. *J Histochem Cytochem* 33: 1033-1041, 1985.
 18. **Edgerton VR, Barnard RJ, Peter JB, Gillespie CA, Simpson DR.** Overloaded skeletal muscles of a nonhuman primate (*Galago senegalensis*). *Exp Neurol* 37: 322-339, 1972.
 19. **Galler S, Schmitt TL, Hilber K, Pette D.** Stretch activation and isoforms of myosin heavy chain and troponin T of rat skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 18: 555-561, 1997.
 20. **Geeves MA, Holmes KC.** Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* 68: 687-728, 1999.
 21. **Geeves MA, Lehrer SS.** Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch: the size of the cooperative unit. *Biophys J* 67: 273-282, 1994.
 22. **Geeves MA, Lehrer SS.** Cooperativity in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. *Results Probl Cell Differ* 36: 111-132, 2002.
 23. **Gomes AV, Potter JD, Szczesna-Cordary D.** The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* 54: 323-333, 2002.
 24. **Gonyea WJ, Ericson GD.** Experimental model for study of exercise-induced skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 40: 630-633, 1976.
 25. **Gordon AM, Homsher E, Regnier M.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 80: 853-924, 2000.
 26. **Gorza L, Gundersen K, Lomo T, Schiaffino S, Westgaard RH.** Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscles by chronic high-frequency stimulation in the rat. *J Physiol* 402: 627-649, 1988.
 27. **Heeley DH, Dhoot GK, Frearson N, Perry SV, Vrbova G.** The effect of cross-innervation on the tropomyosin composition of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 152: 282-286, 1983.

28. **Herzberg O, Moulton J, James MN.** A model for the Ca^{2+} -induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J Biol Chem* 261: 2638-2644, 1986.
29. **Hofmann WW.** Mechanisms of muscular hypertrophy. *J Neurol Sci* 45: 205-216, 1980.
30. **Holly RG, Barnett JG, Ashmore CR, Taylor RG, Mole PA.** Stretch-induced growth in chicken wing muscles: a new model of stretch hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 238: 62-71, 1980.
31. **Houdusse A, Love ML, Dominguez R, Grabarek Z, Cohen C.** Structures of four Ca^{2+} -bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca^{2+} -switch in the calmodulin superfamily. *Structure* 5: 1695-1711, 1997.
32. **Huxley AF.** Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* 7: 255-318, 1957.
33. **Härtner KT, Pette D.** Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem* 188: 261-267, 1990.
34. **Härtner KT, Kirschbaum BJ, Pette D.** The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem* 179: 31-38, 1989.
35. **Ianuzzo CD, Armstrong RB.** DNA proliferation in normal and diabetic muscle during short-term compensatory growth. *Int J Biochem* 6: 889-892, 1975.
36. **Jagatheesan G, Rajan S, Petrashevskaja N, Schwartz A, Boivin G, Vahebi S, De Tombe P, Solaro RJ, Labitzke E, Hilliard G, Wieczorek DF.** Functional importance of the carboxyl-terminal region of striated muscle tropomyosin. *J Biol Chem* 278: 23204-23211, 2003.
37. **Kischel P, Bastide B, Muller M, Dubail F, Offredi F, Jin JP, Mounier Y, Martial J.** Expression and functional properties of four low skeletal troponin T isoforms in rat muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: 437-443, 2005.
38. **Klitgaard H.** A model for quantitative strength training of hindlimb muscles of the rat. *J Appl Physiol* 64: 1740-1745, 1988.
39. **Kojima H, Ishijima A, Yanagida T.** Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12962-12966, 1994.
40. **Lehrer SS, Qian Y.** Unfolding/refolding studies of smooth muscle tropomyosin. Evidence for a chain exchange mechanism in the preferential assembly of the native heterodimer. *J Biol Chem* 265: 1134-1138, 1990.

41. **Lesch M, Parmley WW, Hamosh M, Kaufman S, Sonnenblick EH.** Effects of acute hypertrophy on the contractile properties of skeletal muscle. *Am J Physiol* 214: 685-690, 1968.
42. **Li Y, Mui S, Brown JH, Strand J, Reshetnikova L, Tobacman LS, Cohen C.** The crystal structure of the C-terminal fragment of striated-muscle alpha-tropomyosin reveals a key troponin T recognition site. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7378-7383, 2002.
43. **Luo Y, Leszyk J, Li B, Li Z, Gergely J, Tao T.** Troponin-I interacts with the Met47 region of skeletal muscle actin. Implications for the mechanism of thin filament regulation by calcium. *J Mol Biol* 316: 429-434, 2002.
44. **Mackova E, Hnik P.** Compensatory muscle hypertrophy in the rat induced by tenotomy of the synergistic muscles. *Experientia* 27: 1039-1040, 1971.
45. **Mackova E, Hnik P.** Compensatory hypertrophy induced by tenotomy of synergists is not true working hypertrophy. *Physiol Bohemoslov* 22: 43-49, 1973.
46. **Maytum R, Lehrer SS, Geeves MA.** Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* 38: 1102-1110, 1999.
47. **Muthuchamy M, Grupp IL, Grupp G, O'Toole BA, Kier AB, Boivin GP, Neumann J, Wieczorek DF.** Molecular and physiological effects of overexpressing striated muscle beta-tropomyosin in the adult murine heart. *J Biol Chem* 270: 30593-30603, 1995.
48. **Ngai SM, Pearlstone JR, Frah CS, Reinach FC, Smillie LB, Hodges RS.** Structural and functional studies on Troponin I and Tropomyosin interactions. *J Cell Biochem* 83: 33-46, 2001.
49. **Oe M, Ohnishi-Kameyama M, Nakajima I, Muroya S, Chikuni K.** Muscle type specific expression of tropomyosin isoforms in bovine skeletal muscles. *Meat Sci* 75: 558-563, 2007.
50. **Pehme A, Alev K, Kaasik P, Seene T.** Age-Related Changes in Skeletal Muscle Myosin Heavy-Chain Composition: Effect of Mechanical Loading. *J Aging Phys Act* 11: 29-44, 2004a.
51. **Pehme A, Alev K, Kaasik P, Julkunen A, Seene T.** The effect of mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle. *Int J Sports Med* 25: 332-8, 2004b.
52. **Perry SV.** Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 575-602, 1998.
53. **Perry SV.** Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem* 190: 9-32, 1999.
54. **Perry SV.** Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 5-49, 2001.

55. **Pette D.** Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol Scand* 162: 367-376, 1998.
56. **Potter JD, Gergely J.** Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *Biochemistry* 13: 2697-2703, 1974.
57. **Potter JD, Sheng Z, Pan BS, Zhao J.** A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca²⁺ regulation of muscle contraction. *J Biol Chem* 270: 2557-2562, 1995.
58. **Reisberg K.** Kompensatoorse hüpertroofia mõju lihasraku ehitusele ja lihastuuma domeenile erinevates skeletilihaskiu tüüpides. Magistritöö. Tartu. 2004.
59. **Sabry MA, Dhoot GK.** Identification and pattern of transitions of some developmental and adult isoforms of fast troponin T in some human and rat skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 12: 447-454, 1991a.
60. **Sabry MA, Dhoot GK.** Identification and pattern of transitions of cardiac, adult slow and slow skeletal muscle-like embryonic isoforms of troponin T in developing rat and human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 12: 263-269, 1991b.
61. **Salviati G, Betto R, Daniello-Betti D.** Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibres. An electrophoretic study of single fibres. *Biochem J* 207: 261-272, 1982.
62. **Salviati G, Betto R, Daniello-Betti D, Zeviani M.** Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-transport activity of single human muscle fibres. *Biochem J* 224: 215-225, 1983.
63. **Schachat F, Bronson DD, McDonald OB.** Heterogeneity of contractile proteins. A continuum of troponin-tropomyosin expression in mammalian skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 260: 1108-1113, 1985.
64. **Schaertl S, Lehrer SS, Geeves MA.** Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation. *Biochemistry* 34: 15890-15894, 1995.
65. **Schevzov G, Vrhovski B, Bryce NS, Elmir S, Qiu MR, O'Neill GM, Yang N, Verrills NM, Kavallaris M, Gunning BW.** Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *J Histochem Cytochem* 53: 557-570, 2005.
66. **Schiaffino S, Pierobon-Bormioli S, Aloisi M.** The rate of newly formed satellite cells during compensatory hypertrophy. *Virchows Arch B Cell Pathol* 21: 113-118, 1976.
67. **Schiaffino S, Ausoni L, Gorza L, Saggin K, Gundersen K, Lomo T.** Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 134: 575-576, 1988.

68. **Seiden D.** A quantitative analysis of skeletal muscle cell changes in compensatory hypertrophy and work-induced hypertrophy. *Am J Anat* 145: 459-468, 1976.
69. **Snow MH.** Satellite cells response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat Rec* 227: 437-446, 1990.
70. **Sola OM, Christensen DL, Martin AW.** Hypertrophy and hyperplasia in adult chicken anterior latissimus dorsi muscle following stretch with and without denervation. *Exp Neurol* 41: 76-100, 1973.
71. **Sosnicki AA, Lutz GJ, Rome LC, Goble DO.** Histochemical and molecular determination of fiber types in chemically skinned single equine skeletal muscle fibers. *J Histochem Cytochem* 37: 1731-1738, 1989.
72. **Sugiura T, Miyata H, Kawai Y, Matoba H, Murakami N.** Changes in myosin heavy chain isoform expression of overloaded rat skeletal muscles. *Int J Biochem* 25: 1609-1613, 1993.
73. **Swynghedauw B.** Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* 66: 710-771, 1986.
74. **Syska H, Perry SV, Trayer IP.** A new method for the isolation of troponin I (inhibitory protein) using affinity chromatography. Evidence for three different forms of troponin I in striated muscle. *FEBS Letts* 41: 253-257, 1974.
75. **Zot HG, Potter JD.** A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. *J Biol Chem* 257: 7678-7683, 1982.
76. **Talbot J, Hodges R.** Comparative studies on the inhibitory region of selected species of troponin-I. The use of synthetic peptide analogs to probe structure-function relationships. *J Biol Chem* 256: 12374-12378, 1981.
77. **Taylor NAS, Wilkinson JG.** Exercise-induced skeletal muscle growth: hypertrophy or hyperplasia? *Sports Med* 3: 190-200, 1986.
78. **Termin A, Pette D.** Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *J Physiol* 204: 569-573, 1992.
79. **Timson BF.** Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement. *J Appl Physiol* 69: 1935-1945, 1990.
80. **Timson BF, Bowling BK, Dudenhoefter GA, George JB.** Fiber number, area, and composition of mouse soleus muscle following enlargement. *J Appl Physiol*. 58: 619-624, 1985.
81. **Tobacman LS.** Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu Rev Physiol* 58: 447-481, 1996.

- 82. Westfall MV, Albayya FP, Metzger JM.** Functional analysis of troponin I regulatory domains in the intact myofilament of adult single cardiac myocytes. *J Biol Chem* 274: 22508-22516, 1999.
- 83. White SP, Cohen C, Phillips GN Jr.** Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325: 826-828, 1987.
- 84. Wilkinson JM.** Troponin C from rabbit slow skeletal and cardiac muscle is the product of a single gene. *Eur J Biochem* 103: 179-188, 1980.

SUMMARY

Tropomyosin subunits and troponin T fast isoforms content in condition of compensatory hypertrophy

Skeletal muscle can be highlighted through the high heterogeneity, consisting structural and metabolic diversity, which leads to high plasticity, so that skeletal muscle cells are capable to respond to functional activity specificities in a great extent. The state, that reflects skeletal muscles good adaptability and is described as compensatory hypertrophy, occurs in skeletal muscles where chronic overload can produce large increases in skeletal muscle mass.

The aim of present study was to examine the changes in the protein content of regulatory protein complex in the case of functional overloading in mammalian skeletal muscles.

Adult male Wistar rats were used. Compensatory hypertrophy was caused by synergist tenotomy. The *m. soleus* and *m. plantaris* were overloaded by unilateral removal of its synergist the gastrocnemius muscle. Duration of functional overload was 15 days.

Tropomyosin subunits were separated by 12,5% SDS-PAGE, troponin T isoforms were identified in immunochemical technique using Western blotting.

The results showed that functional overloading caused remarkable increase in weights of both slow-twitch (*m. soleus*) and fast-twitch (*m. plantaris*) muscles.

As a result of chronic overloading the content of α -TM decreased and the content of β -TM increased in the both studied muscles.

Our results showed that in hypertrophic fast-twitch skeletal muscle (*m. plantaris*) the content of TnT_{2f} was higher and TnT_{4f} was lower compared to their respective controls. At the same time in slow-twitch skeletal muscle (*m. soleus*) the content of TnT_{2f} increased and the TnT_{3f} decreased.

Previous and present data give us ground to speculate about the existence of relations between MyHC and regulatory proteins (TM and TnT): MyHC Ila \leftrightarrow TnT_{2f} \leftrightarrow β -TM and MyHC Iib \leftrightarrow TnT_{4f} \leftrightarrow α -TM.