

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Marian Tarrend

**Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkudele:  
transkriptsioonilised muutused ja nende seos  
sarkopeeniaga**

Magistritöö (40 EAP)

Biomeditsiin

Juhendajad  
Lumme Kadaja, PhD  
Lilian Kadaja-Saarepuu, PhD

TARTU 2016

## INFOLEHT

### **Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkudele: transkriptsioonilised muutused ja nende seos sarkopeeniaga**

Töös käsitletakse proinflammatoorsete tsütokiinide (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) toimet lihasrakkude diferentseerumisele ja energeetilisele metabolismile raku erinevatel arengustaadiumitel. Kasutati inimese skeetilihase *vastus lateralis* müoblastide ja müotuubide kultuure. Tsütokiinidega (kontsentratsioon kasvukeskkonnas 10 ng/ml) mõjutati rakke kuue päeva jooksul. Leiti, et TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  toimet väheneb müogeensete transkriptsioonifaktorite *MYOD* ja *MYOG* ekspressioon. Proinflammatoorsed tsütokiinid, kuid mitte IL-6, ilmselt vähendavad lihaste regeneratsioonivõimet, pidurdades müoblastide diferentseerumist müotuubideks ja seeläbi soodustades sarkopeeniat. IL-1 $\beta$  mõjutab ka kreatiinkinaasse energiaülekanandesüsteemi kujunemist ning takistab oksüdatiivse fosforüülimise aktivatsiooni.

Märksõnad: proinflammatoorsed tsütokiinid, lihasrakk, müogenees, energeetiline metabolism, sarkopeenia

CERCS teaduseriala: B580 Skeleti ja lihassüsteemi haigused, reumatoloogilised haigused

### **The effect of proinflammatory cytokines in muscle cells: transcriptional changes and the relation to sarcopenia**

Present study addresses the role of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in differentiation-related and metabolic processes of human muscle cells and in the development of intracellular energy transfer network at different stages of myogenesis. Primary cultures of myoblasts and myotubes originated from human *m. vastus lateralis* were used. In the presence of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 6 days) the expression level of myogenic transcription factors was significantly decreased. Thus, proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but not IL-6, can worsen muscle regeneration by impairment of differentiation of myoblasts into the myotubes and thereby promote sarcopenia. IL-1 $\beta$  affects the formation of creatine kinase energy transfer and prevents the activation of oxidative phosphorylation.

Keywords: proinflammatory cytokines, muscle cell, myogenesis, energy metabolism, sarcopenia

CERCS research project: B580 Skeleton, muscle system, rheumatology locomotion

# SISUKORD

INFOLEHT .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	9
1.1 Tsütokiinide üldisloomustus .....	9
1.2 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude diferentseerumisele .....	11
1.3 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude energeetilisele metabolismile...	13
1.3.1 OXPHOS reguleerimine mitokondritevälise kaltsiumi toimel .....	14
1.4 Proinflammatoorsete tsütokiinide roll sarkopeenia patogeneesis .....	15
1.4.1 Sarkopeenia mõiste, etiopatogenees .....	15
1.4.2 Proinflammatoorsed tsütokiinid ja sarkopeenia.....	16
1.5 Humaniinid ja nende seos vananemisega kaasnevate haigustega.....	18
1.6 Mitokondrid ja põletik .....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Reaktiivid.....	20
2.2.2 Uuritavad, koed ja rakukultuurid .....	20
2.2.3 Totaalse RNA eraldamine.....	21
2.2.4 RNA kvaliteedi hindamine ja kontsentratsiooni määramine .....	22
2.2.5 RNA pöördtranskribeerimine.....	24
2.2.6 Reaalaja-PCR.....	24
2.2.7 Tööprotokoll ja DNA dissotsiatsioonikõverate analüüs .....	26
2.2.8 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine .....	27
2.2.9 Amplikonide elektroforeetiline analüüs agarosgeelis.....	28
2.2.10 Andmete statistiline töötlus.....	28
2.3 TULEMUSED .....	29
2.3.1 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime müogeneesile .....	29
2.3.2 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonile .....	31

2.3.3 Humaniini ekspressiooni hindamine erinevas arengujärgus olevates rakkudes. Proinflammatoorsete tsütokiinide võimalik toime.....	35
2.3.4 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime mitokondrite funktsiooni reguleerivate valkude ekspressioonile ja mitokondrite biogeneesile.....	37
2.4 ARUTELU .....	39
KOKKUVÕTE .....	43
SUMMARY .....	44
KIRJANDUSE LOETELU .....	46
KASUTATUD RAAMATUD .....	56
LISAD .....	57
TÄNUAVALDUSED .....	59
LIHTLITSENTS .....	60

## KASUTATUD LÜHENDID

AK – adenülaatkinaas (ingl k. *adenylate kinase*)

cDNA – komplementaarne DNA (ingl k. *complementary DNA*)

CK – kreatiinkinaas (ingl k. *creatine kinase*)

CKB – ajutüüpi kreatiinkinaas (ingl k. *brain-type creatine kinase*)

CKM – lihastüüpi kreatiinkinaas (ingl k. *muscle-type creatine kinase*)

CT – lävetsükkel

DMEM – Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde (ingl k. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

ER – endoplasmaatiline retiikulum

ETA – elektrontransportahel (ingl k. *electron transport chain*)

Gp130 – glükoproteiin 130

HGF – hepatotsüütide kasvufaktor (ingl k. *hepatocyte growth factor*)

HIF-1 $\alpha$  – hüpkksia-indutseeritav faktor-1 $\alpha$  (ingl k. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

HK – heksokinaas (ingl k. *hexokinase*)

HNG – [Gly14]-humaniin

IGF-1 – insuliinisarnane kasvufaktor-1 (ingl k. *insulin-like growth factor 1*)

IL-1 $\beta$  – interleukiin 1 beeta

IL-6 – interleukiin 6

IL-6R – interleukiin 6 retseptor

ITS – insuliin/transferriin/seleniit

JAK – Janus kinaasid

MCP-1 – monotsüüt kemoatraktant valk-1 (ingl k. *monocyte chemoattractant protein-1*)

MHC – müosiini raske ahel (ingl k. *myosin heavy chain*)

mtDNA – mitokondriaalne DNA

MRF – müoogene reguletoorne faktor (ingl k. *myogenic regulatory factor*)

NRT – negatiivne pöördtranskriptsiooni kontroll (ingl k. *no reverse transcriptase*)

NF- $\kappa$ B – tuumafaktor kapp B (ingl k. *nuclear factor kappa B*)

NO – lämmastikmonooksiid (ingl k. *nitric oxide*)

OXPHEN – oksüdatiivne fenotüüp (ingl k. *oxidative phenotype*)

OXPHOS – oksüdatiivne fosforüülimine (ingl k. *oxidative phosphorylation*)

PGC-1 $\alpha$  – peroksüsoomi proliferaator-aktiveeritud retseptor gamma koaktivaator 1-alfa (ingl k. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PPAR – peroksüsoom proliferatsioon-aktiveeritud retseptor (ingl k. *peroxisome proliferator-activated receptor*)

ROS – reaktiivsed hapnikuühendid (ingl k. *reactive oxygen species*)

RT – pöördtranskriptsioon (ingl k. *reverse transcription*)

SR – sarkoplasmaatiline retiikulum

STAT – signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaator (ingl k. *signal transducer and activator of transcription*)

T<sub>m</sub> – sulamistemperatuur

TNF- $\alpha$  – tuumor nekroosifaktor alfa (ingl k. *tumor necrosis factor alpha*)

UCP – mitokondriaalne lahutajavalk (ingl k. *uncoupling protein*)

UV/VIS – ultraviolett/nähtav (ingl k. *ultraviolet-visible*)

## SISSEJUHATUS

Sarkopeenia on vananemisega kaasnev haigus, mille käigus väheneb erinevate faktorite mõjul lihasmass ja -jõud (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). Seni kirjanduses avaldatud andmed viitavad faktidele, mille kohaselt krooniline põletik on oluline mõjur vananemisega kaasneva sarkopeenia puhul (Morley *et al.*, 2001, 2014; Krabbe *et al.*, 2004; Michaud *et al.*, 2013). Epidemioloogilised uuringud näitavad seost põletikutsütokiinide kõrge taseme, mitokondrite funktsiooni halvenemise ja lihasnõrkuse vahel. Vananenud lihasrakkudele on iseloomulikud transkriptomii muutused, näiteks põletikuseoseliste geenide üleekspressioon (Sakuma ja Yamaguchi, 2012; Welle *et al.*, 2003b). Loomkatsetes on näidatud, et interleukiin 6 (IL-6) või tuumor nekroosifaktor alfa (TNF- $\alpha$ ) manustamine põhjustab lihasnõrkust (Goodman, 1991, 1994). Samas vajavad paljud küsimused vastuseid. Näiteks vajab täpsustamist tsütokiinide toime olenevus nende kontsentratsioonist. On teada, et kõrge kontsentratsiooni korral võivad nii IL-6 kui ka TNF- $\alpha$  lihasnõrkust põhjustada (Tsujinaka *et al.*, 1996; Langen *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2006), kuid kroonilise manustamise tagajärjel ja madalamate kontsentratsioonide puhul toimivad mõlemad kui kasvufaktorid (Warren *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2006). Teatakse, et proinflammatoorsed tsütokiinid osalevad inimese elueaga seostatavate põletikuliste haiguste patogeneesis, kuid nende mõju inimese skeletilihasele on vähe uuritud.

Molekulaarsed mehhanismid, mis mõjutavad rakusisest energiaülekannet sarkopeenia korral, ei ole täielikult välja selgitatud. Vähe on andmeid selle kohta, milliste geenide ekspressiooni muutuste kaudu kontrollitakse lihasraku struktuuri ja energeetilist metabolismi inimese arenevas ja vananenud rakus. Samuti on vähe uuritud inimese skeletilihaste adaptatsioonimehhanisme energiadefitsiidi ja põletiku tingimustes.

Käesoleva töö hüpoteesi kohaselt: proinflammatoorsed tsütokiinid mõjutavad inimese skeletilihaste regeneratsioonivõimet, reguleerides müoblastide diferentseerumist müotubideks, kusjuures need mõjustused on seotud tsütokiinide toimega rakkude energeetilisele metabolismile ning võivad varieeruda sõltuvalt inimese vanusest.

Hüpoteesist lähtuvalt oli töö eesmärgiks hinnata inimese skeletilihase *vastus lateralis* (külgmine paksilihas) rakkude diferentseerumisega seotud transkriptsioonilisi muutusi ja proinflammatoorsete tsütokiinide (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) rolli nende muutuste tekkes. Ühtlasi oli eesmärgiks analüüsida proinflammatoorsete tsütokiinide toimet energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonile.

Transkriptsioon on geenide avaldumise esimene samm, mida peetakse geeniekspressiooni peamiseks regulatsioonitasemeks. Sarkopeenia patogeneesis osalevate geenide uurimine on olulise tähtsusega, kuna see aitab mõista haiguse molekulaarseid mehhanisme ning võib olla abiks uute ravimeetodite väljatöötamisel. Raku energeetilist puudulikkust peetakse valdava enamuse lihashaiguste aluseks. Raku energeetilise puudulikkuse kujunemise mehhanismide, sealhulgas energiaülekandesüsteemide häirete uurimine, on eriala arengu seisukohalt ülioluline, kuna raku energeetilisest seisundist sõltub haiguse patofüsioloogiline mehhanism, samuti haiguse prognoos ja ravi efektiivsus (Neubauer *et al.*, 1997; Wiggers *et al.*, 2001). Rakkude energeetiline seisund sõltub oluliselt mitokondrite talitlusest. Sarkopeeniaga kaasnevad mitokondrite funktsiooni häired (Picard *et al.*, 2010). Seda silmas pidades käsitletakse teemat ka seoses mitokondriaalse DNA (mtDNA) ja mitokondrite biogeneesiga. Saadud uurimistulemused peaksid aitama täpsustada proinflammatoorsete tsütokiinide rolli inimese lihasrakkude diferentseerumisprotsessis ning rakusisese energiaülekandevõrgustiku kujunemises raku erinevatel arengustaadiumitel. Katseloomadel on neid probleeme mõnevõrra uuritud, kuid inimese skeletilihase *vastus lateralis* kohta sellealast informatsiooni pole. On ju nimetatud põlveliigese sirutusliigutusi teostav lihas oluline nii funktsionaalsest kui ka meditsiinilisest (atrofeerumine sarkopeenia ja gonartroosi puhul, põlvevalu) seisukohast. Müogeneesi häired võivad esile kutsuda lihaskoe kahjustusi. Teisalt viitab üha enam andmeid sellele, et krooniline põletik ja lihase funktsionaalsed kahjustused on omavahel tihedalt seotud ning põletikunäitajate ja liikumisvõime vahelisi seoseid peetakse vajalikuks rohkem uurida (Penninx *et al.*, 2004).

Uurimistöö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditsiini instituudis patofüsioloogia osakonnas. Töö teema on seotud käimasoleva institutsionaalse uurimistöö raames finantseeritud teadusprojektiga „Luu- ja lihaspatoloogiate siirdeuringud“ ning praeguseks lõppenud Euroopa Liidu 7. raamprogrammi projektiga MARMP09022 “MYOAGE – Eaga seotud lihaskõrgekuse mõistmine ja sellega võitlemine” (“MYOAGE – *Understanding and combating age related muscle weakness*“) ning ETF poolt finantseeritud teadusteemaga „Raku energeetiline puudulikkus kui südame- ja skeletilihase haiguste alus ja kaitsemehhanismide sihtmärk.“

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Tsütokiinide üldiseloostus

Tsütokiinid on väikesed valgud (ligikaudu 5–20 kDa), mis on olulised rakusignalisatsioon, kuna vahendavad lühiajaliselt ja/või lokaalselt mitmesuguseid bioloogilisi toimeid ja informatsiooni (Meditiinisinonastik, 2004). Tsütokiinid seostuvad spetsiifiliste retseptoritega ja stimuleerivad maksas akuutse faasi valkude tootmist vastusena nii süsteemsele kui ka lokaalsele põletikule. Teatud tsütokiine vabastatakse põletiku kohas vastusena suurenenud lümfotsüütide, neutrofiilide, monotsüütide ja teise sarnaste rakkude sissevoolule, et aidata kiirendada põletiku vähenemist (Bruunsgaard ja Pedersen, 2003). Tsütokiinideks loetakse interferoone, interleukiine, kasvaja nekroosifaktoreid, kolooniaid stimuleerivaid faktoreid, kemokiine, lümfokiine ja kasvufaktoreid. Lisaks võib tsütokiine jagada ka antiinflammatoorseteks (põletikuvastased) tsütokiinideks, proinflammatoorseteks (põletikku soodustavateks) tsütokiinideks ja regulatoorseteks tsütokiinideks (Shachar ja Karin, 2013).

Proinflammatoorsed ehk põletikutsütokiinid on tsütokiinid, mis põhjustavad süsteemset põletikku nii kudedes kui ka organites (Kregel ja Zhang, 2007; Zhang ja An, 2007). Põletikutsütokiine produtseerivad aktiveeritud makrofaagid, mis omakorda reguleerivad üles põletikulisi reaktsioone. Põletikureaktsiooni kaskaadis (Lisa 1) on kaks esimest lokaalselt produtseeritavat tsütokiini TNF- $\alpha$  ja interleukiin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  stimuleerivad omakorda IL-6 teket. IL-6 loetakse nii proinflammatoorseks kui ka antiinflammatoorseks tsütokiiniks (Senftleben *et al.*, 2001). Käesolevas töös on uuritud just nende kolme tsütokiini toimet ning alljärgnevalt on neid ka iseloomustatud.

### IL-1 $\beta$

Interleukiin-1 $\beta$  kuulub interleukiin-1 tüüpi tsütokiinide perekonda. Inimesel on IL-1 $\beta$  kodeeritud *IL1B* geeni poolt. Aktiveeritud makrofaagid produtseerivad kõigepealt IL-1 $\beta$  provalgu, mis hiljem protsessitakse proteolüütiliselt aktiivseks vormiks. IL-1 $\beta$  on põletikuvastuse mediaator, mis osaleb raku proliferatsioonis, diferentseerumisprotsessis ja apoptoosis (Clark *et al.*, 1986). IL-1 ja teiste tsütokiinide kõrge tase vanemaealiste inimeste veres on seotud kõrgema suremusega (Michaud *et al.*, 2013), kuid IL-1 toimet skeetilihase rakkudele vananemisega kaasneva sarkopenia puhul on seni vähe uuritud.

## **IL-6**

IL-6 valk on inimese organismis kodeeritud *IL6* geeni poolt. IL-6-l on ligandspetsiifiline retseptor (IL-6R). IL-6R puhul eristab teda teistest tsütokiinide retseptoritest see, et IL-6R on aktiivne nii membraaniseoseliselt kui ka lahustuvus vormis (Keller *et al.*, 1996).

Sellel interleukiinil on palju funktsioone. Tal on suur osatähtsus immuunsüsteemis (nt palaviku mediaatorina), luu ainevahetuses (nt osteoblastid sekreteerivad IL-6 valku, et stimuleerida osteoklastide moodustumist), reproduktsooniprotsessis, artriidi puhul, kasvajate tekkes ja ka vananemisel (Munoz-Canoves *et al.*, 2013).

IL-6 on tsütokiin, millel on erinevates organites ja kudedes erinevad funktsioonid. Lihasrakkudes mängib IL-6 rolli nii positiivse kui ka negatiivse faktorina. Näiteks suurendab IL-6 lihasrakkudes valkude lagundamist, mis võib viia täielikult lihasrakkudes olevate valkude proteolüüsini ja seeläbi põhjustab lihaste atroofiat (Haddad *et al.*, 1985; Goodman, 1994; Munoz-Canoves *et al.*, 2013). Teisest küljest käitub IL-6 lihases kui põletikuvastane müokiin. Müokiinid on need valgud, mida ekspresseerivad või vabastavad aktiivselt töötavad lihaskiud ja millel võib olla nii autokriinne, parakriinne kui ka endokriinne efekt (Pedersen ja Febbraio, 2008; Munoz-Canoves *et al.*, 2013). IL-6 on esimene müokiin, mille kohta avastati, et lihasrakud sekreteerivad seda verre lihaskontraktsioonide järgselt (Pedersen ja Febbraio, 2012). Samas on leitud, et suurenenud IL-6 tase vereringes treeningu järgselt ei põhjusta lihaskahjustusi (Fischer, 2006). IL-6 võib stimuleerida lihaskasvu ja reguleerib lihasrakkude proliferatsioonivõimet. Lisaks loetakse IL-6 poolseks positiivseks mõjuks lihasrakkude energeetilise metabolismi regulatsiooni, kuna aktiivselt kontraheeruv skeetilihas vabastab IL-6 (Munoz-Canoves *et al.*, 2013).

## **TNF- $\alpha$**

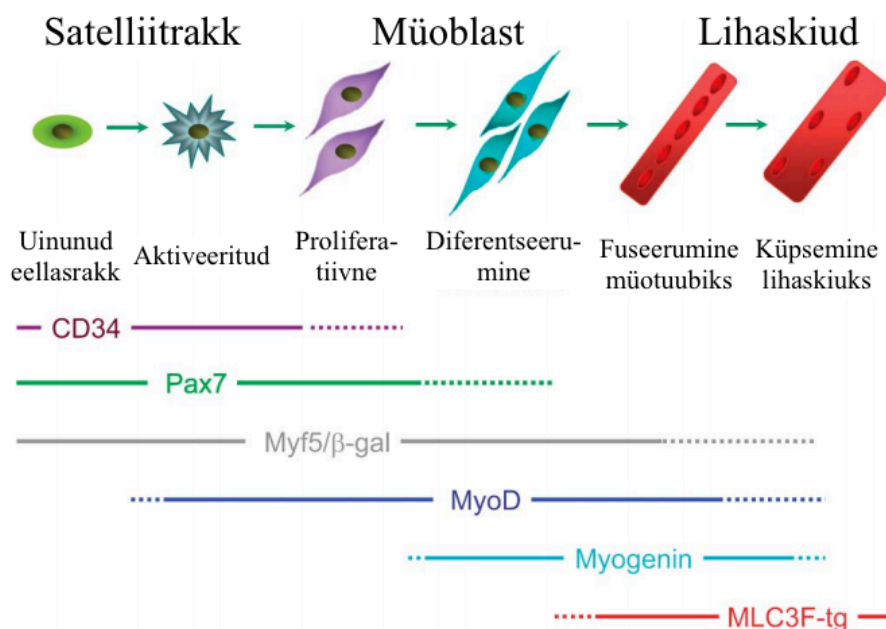
TNF- $\alpha$  kuulub tuumor nekroosifaktorite perekonda, mida kodeerib *TNF* geen. Seda tsütokiini sekreteerivad peamiselt makrofaagid. TNF- $\alpha$  funktsioneerib oma retseptorite TNFRSF1A/TNFR1 ja TNFRSF1B/TNFR2 kaudu. Antud tsütokiin osaleb väga paljudes lihasraku bioloogilistes protsessides (Marzetti *et al.*, 2013), sealhulgas raku proliferatsioonis ja diferentseerumises (Miller *et al.*, 1988) ning valkude lagundamisel (Goodman, 1991, 1994). TNF- $\alpha$  omab seost mitmete haigustega, sealhulgas autoimmuunhaiguste (Yilmaz *et al.*, 2015), insuliiniresistentsuse (Rue *et al.*, 2013) ja vähiga (Dülger *et al.*, 2004).

TNF- $\alpha$  mõju on palju uuritud seoses rasvumise ja diabeediga. Nimelt on ülekaalulistel inimestel ja närilistel rasvkoes TNF- $\alpha$  üleekspressioon. Kuna TNF- $\alpha$  indutseerib insuliiniresistentsust, siis arvatakse, et TNF- $\alpha$  toimib autokriinselt reguleerides

insuliinitundlikkust adipotsüütides (Hotamisligil *et al.*, 1994; Saghizadeh *et al.*, 1996). II tüüpi diabeediga patsientidel on TNF- $\alpha$  ekspressioon skeletilihases suurenenud (Saghizadeh *et al.*, 1996) ja TNF- $\alpha$  vähendab glükoosi ladustamist inimese kultiveeritud lihasrakkudes (Halse *et al.*, 2001). Lisaks on näidatud, et TNF- $\alpha$   $-/-$  hiired (puudub TNF- $\alpha$  funktsionaalsus) on insuliinresistentsuse eest kaitstud (Uysal *et al.*, 1997).

## 1.2 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude diferentseerumisele

Lihaskude ehk lihaskiudude diferentseerumine on protsess, mille käigus müoblastid muutuvad küpseteks müotuubideks. Müogeenset diferentseerumist reguleerivad mitmed müogeensed regulatoorsed faktorid (MRF), nagu näiteks Myf5, MYOD, müogeniin ja MRF4. Skeletilihasteks arenemise induktsioonil on hädavajalikud MYOD ja Myf5. Müogeniini ja MRF4 funktsiooniks on reguleerida hilisemat rakkude liitumist ja lõplikku diferentseerumist müotuubideks. Prolifereeruvatest müoblastidest saavad lõplikult diferentseerunud müotuubid, mis ekspresseerivad hiliseid MRF-e ja lihasspetsiifilisi geene nagu näiteks müosiini raskeid ahelaid (*MHC*) ja lihastüüpi kreatiinkinaasi (*CKM*) (Charge ja Rudnicki, 2004; Munoz-Canoves *et al.*, 2013).



**Joonis 1. Müogeense diferentseerumise etapid ja selles osalevad müogeensed regulatoorsed faktorid.** Müoblastist küpseks lihasrakuks diferentseerumisel mängivad rolli erinevad regulatoorsed faktorid (Zammit *et al.*, 2006; kohandatud).

Proinflammatoosed tsütokiinid (TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$ ) on seotud tuumafaktor kappa B (NF- $\kappa$ B) kanoonilise signaalirajaga (Lisa 2), mis vahendab proinflammatoorseid vastuseid (Senftleben *et al.*, 2001). Tavapärasel olekus on NF- $\kappa$ B tsütoplasmas inaktiivses olekus seotuna oma inhibiitorvalguga I $\kappa$ B $\alpha$ . TNF- $\alpha$  juuresolekul toimub rakusisesel signaalikaskaadi aktivatsioon, mille käigus I $\kappa$ B kinaasid fosforüülivad I $\kappa$ B $\alpha$ . Seejärel I $\kappa$ B $\alpha$  suunatakse lagundamisele, vaba NF- $\kappa$ B liigub tuuma ja reguleerib tsütokiinidega, kemokiinidega, kasvufaktoritega ja raku ellujäämisega seotud geenide transkriptsiooni (Karin, 1999; Pahl, 1999).

Arvatakse, et proinflammatoorsed tsütokiinid inhibeerivad lihasrakkude diferentseerumist läbi NF- $\kappa$ B aktivatsiooni. Veelgi enam, on leitud, et raku vastus TNF- $\alpha$  manustamisele erineb märkimisväärselt diferentseeruvates müoblastides ja lõplikult diferentseerunud müotuubides. Nimelt ei põhjustanud TNF- $\alpha$  lisamine müotuubidele mingit olulist *MHC* ega *CKM* aktiivsuse kadu, aga TNF- $\alpha$  mõju diferentseeruvatele müoblastidele (kontsentratsioonis 1-10 ng/ml) oli märkimisväärne, inhibeerides täielikult lihasrakkude diferentseerumise (Langen *et al.*, 2001).

Teine oluline signaalirada seoses lihasrakkude diferentseerumisega on JAK/STAT signaalirada. IL-6 põhjustab glükoproteiin 130 (gp130) molekulide dimeriseerumise. Signaaliülekanne rada algab IL-6 seondumisega tema retseptoriga IL-6R, peale mida toimub gp130 seondumine retseptoriga ja aktivatsioonikompleksi moodustumine. IL-6 seondumine retseptoriga aktiveerib gp130-ga seotud Janus kinaasid (JAK), mis fosforüülivad gp130 tsütoplasmaatilise osa nii, et tekivad seondumissaidid signaali transduktsiooni ja transkriptsiooni aktivaatori (STAT) faktoritele STAT1 ja STAT3. Fosforüülitud STAT faktoritest moodustunud homo- või heterodimeerid liiguvad tuuma, kus mõjutavad sihtmärkgeenide transkriptsiooni (Heinrich *et al.*, 1998).

IL-6 toimib samaaegselt proinflammatoorse tsütokiinina ja antiinflammatoorse tsütokiinina (Ferguson-Smith *et al.*, 1988), mistõttu on tema funktsioon mõnevõrra erinev klassikalisest proinflammatoorsest tsütokiinist. Nimelt on leitud, et IL-6 signaaliraja kaks komponenti, IL-6 ja STAT3, on mõlemad sõltumatult seotud lihasrakkude diferentseerumisega ja nende moodustumisega. IL-6 indutseerib transkriptsioonifaktori müogeniini ekspressiooni ning seeläbi soodustab lihasrakkude diferentseerumist. Samas teised IL-6 perekonda kuuluvad tsütokiinid nagu näiteks leukeemia inhibiitor faktor ja kardiotrofiin-1 inhibeerivad müogeenset diferentseerumist lihasrakkudes (Baeza-Raja ja Munoz-Canoves, 2004; Hoene *et al.*, 2013). Hiirtel tehtud *knockdown* katsed näitasid, et IL-6 ja STAT3 puudumine müoblastides viis müogeensete markerite *MYOG* ja *MHC-IIb* nõrgenenud ekspressioonini ja vähendas müotuubide moodustumist. Küll aga leiti, et IL-6 on oluline lihasrakkude

diferentseerumist soodustav faktor, mis funktsioneerib STAT3 sõltumatult (Hoene *et al.*, 2013).

### **1.3 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude energeetilisele metabolismile**

Lihaskud vajavad oma tööks pidevalt energiat, mida nad saavad läbi oksüdatiivse fosforüülimise (OXPHOS), mille käigus toimub mitokondrites ATP tootmine (Saks *et al.* 2008; Guzun *et al.*, 2015). Ühest küljest on OXPHOS oksüdatiivsete lihasrakkude jaoks põhiline energiaallikas, aga teisest küljest on mitokondrites paiknevad hingamisahela kompleksid põhiliseks reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) tekkeallikaks (Zhang *et al.*, 2009). Oksüdatiivne stress ja vabade radikaalide teke kahjustab mtDNA-d ja mutatsioonid mtDNA-s kuhjuvad ajaga (Zhang *et al.*, 1998; Short *et al.*, 2005). On teada, et mitokondrite väärtalitlus võib olla üheks põhjuseks skeletilihastes nõrkuse tekkimisel, aga täpset mehhanismi, kuidas ja mis põhjustel mõjutab vananemine nii lihasrakkude kui ka neis sisalduvate mitokondrite energeetilist metabolismi, veel ei teata (Picard *et al.*, 2010; Miljkovic *et al.*, 2015).

On näidatud, et mitokondrite hingamisahela kompleksides, täpsemalt I ja III kompleksis, toimub vananenud lihasrakus märkimismäärne aktiivsuse langus. See on tingitud ROS põhjustatud mtDNA mutatsioonidest, sest I ja III kompleksi mõned subühikud on kodeeritud mtDNA-lt (Peterson *et al.*, 2012; Duicu *et al.*, 2013).

Proinflammatoorsete tsütokiinide (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 ja IL-12) poolt põhjustatud krooniline põletik muudab lihasrakkude metaboolset profiili nii, et väheneb lihasrakkude oksüdatiivne metabolism ja suureneb glükolüüs. Nagu juba varasemalt mainitud, siis proinflammatoorne tsütokiin TNF- $\alpha$  aktiveerib NF- $\kappa$ B signaaliraja, mis aga kahjustab lihasraku oksüdatiivset metabolismi. On leitud, et TNF- $\alpha$  indutseeritav NF- $\kappa$ B signalisatsioon aktiveerib omakorda glükolüütilise regulaatori hüpoksia-indutseeritava faktori-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), mis indutseerib glükolüüsi ja suurendab lämmastikmonooksiidi (NO), ROS ja proinflammatoorsete tsütokiinide produktsiooni ning seeläbi põhjustab lihaskoe kahjustusi (Haddad ja Harb, 2005; Cramer *et al.*, 2003; Remels *et al.*, 2015). Lisaks suurendab TNF- $\alpha$  müotuubide glükoosi omastamist, laktaadi produktsiooni ja mitmete lihasraku glükolüütilist metabolismi reguleerivate efektorite ekspressioonitaset läbi HIF-1 $\alpha$  signaaliraja aktiveerimise (Remels *et al.*, 2015; Tepp *et al.*, 2016).

Samas mõned teised tsütokiinid (IL-6 ja IL-13) stimuleerivad oksüdatiivseid mehhanisme läbi STAT6 ja PGC-1 $\alpha$  aktiveerimise. PGC-1 $\alpha$  stimuleerib skeletilihastes rasvhapete oksüdatsiooni, mitokondrite biogeneesi, lihaskiudude vahetust glükolüütiliselt

oksüdatiivseteks ja ka angiogeneesi (Senoo *et al.*, 2015). PGC-1 $\alpha$  soodustab lihasrakkudes põletikuvastast keskkonda, aga samas ei suuda PGC-1 $\alpha$  ennetada akuutse süsteemse põletiku teket (Eisele *et al.*, 2015). Nende autorite tööde põhjal võib tõdeda, et oksüdatiivne metabolism on oluline antiinflammatoorse fenotüübi saavutamiseks, mis limiteerib lihasrakkudes põletikufooni ja suurendab reparatiivsete protsesside osakaalu.

### 1.3.1 OXPHOS reguleerimine mitokondritevälise kaltsiumi toimel

On teada, et tsütoplasmas paiknev kaltsium kontrollib mitokondrite hingamist kaltsium uniporterite abil. See toimub valgu kaudu toimuva kaltsiumioonide difusiooni abil mitokondrite maatriksisse, mille tulemusena aktiveeritakse dehüdrogenaasid (püruvaat dehüdrogenaas, isotsitraat dehüdrogenaas ja 2-oksoglutarat dehüdrogenaas) (Denton ja McCormack, 1985, 1990; Hansford ja Zorov, 1998). Hiljuti on avastatud uus mehhanism, mille vahendusel kaltsiumioonid stimuleerivad hingamist ilma kaltsiumi akumulatsioonita maatriksisse (Gellerich *et al.*, 2008, 2009, 2010; Seppet *et al.*, 2009).

See uus OXPHOS regulatsioonimehhanism ekstramitokondriaalsete Ca<sup>2+</sup> toimel seisneb Ca<sup>2+</sup>-ioonide seostumises mitokondri sisemembraani välisküljel oleva glutamaat-aspartaadi transporteri – aralari – saidiga, mille tulemusena aralar aktiveerub ja see omakorda suurendab OXPHOS aktiivsust (Gellerich *et al.*, 2009, 2010). Seega võib kirjeldatud mehhanism toimida kui nn gaasipedaal rakkude energeetilise puudulikkuse tingimustes, varustades rakke oksüdatiivse fosforüülimise käigus intensiivsemalt ATP-ga.

Arvatakse, et mitokondrite pinnal eksisteerivad erinevad regulatoorsed Ca<sup>2+</sup>-ioone siduvad kohad võivad olla teatud neurotoksiliste valkude märklauaks (näiteks muteerunud huntingtiin jt). Nende valkude seostumine Ca<sup>2+</sup>-ioone siduvate saitidega võib esile kutsuda kaltsiumi regulatsioonihäireid põhjustades raku energeetilist puudulikkust ja neurodegeneratsiooni (Gellerich *et al.*, 2013).

Käesolevas magistritöös uuriti geenide ekspressiooni määramise kaudu, et kas need ekstramitokondriaalse kaltsiumi poolt aktiveeritavad mehhanismid võivad toimida ka lihasrakkudes ja kas nad patoloogiliste seisundite (nt sarkopeenia, põletik) puhul häiruvad.

## 1.4 Proinflammatoorsete tsütokiinide roll sarkopeenia patogeneesis

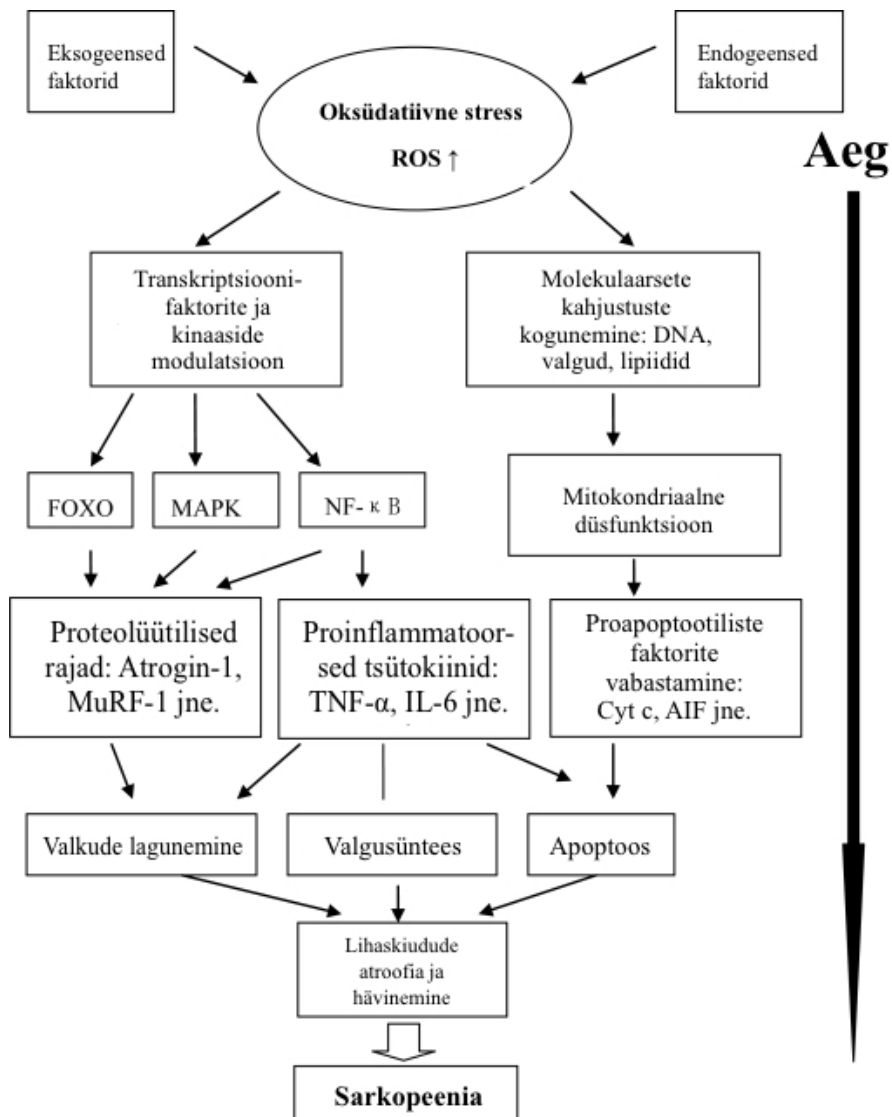
### 1.4.1 Sarkopeenia mõiste, etiopatogenees

Sarkopeenia on vananemisega kaasnev lihashaigus, mida iseloomustavad nii lihasmassi kui ka lihasjõu vähenemine (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). Lihasmassi vähenemine tekib nii lihaskiudude kao kui ka allesjäänud kiudude atroofia tõttu (Lexell *et al.*, 1983). Otsest rakulist ja molekulaarset mehhanismi, mis põhjustaks lihaskiudude kadumise ja atroofia, pole veel leitud, küll aga mängivad nende tekkes olulist rolli oksüdatiivne stress, krooniline põletik ja häired mitokondrite talitluses (Carter *et al.*, 2007). Kõigi nende faktorite mõjutustel võivad häiruda rakusisesed signaalrajad, mis häirivad valkude sünteesi ja proteolüüsi tasakaalu indutseerides apoptoosi (Meng ja Yu, 2010).

Sarkopeeniat iseloomustab II tüüpi lihaskiudude vähenemine (Larsson ja Karlsson, 1978; Lexell *et al.*, 1983; Grimby, 1995; Verdijk *et al.*, 2007), mida seostatakse müosiini raskete ahelate sünteesivõime langusega (Morley *et al.*, 2001). Arvatakse, et lihasmassi vähenemine ei ole eraldiseisev protsess, vaid on tugevasti seotud paralleelselt toimuva rasva massi suurenemisega (Roubenoff, 2007). Lihaskiudude vähenemine põhjustab vanades inimestes lihasnõrkust, suurendab riski kukkumisteks ja luumurdudeks ning vähendab üldist elukvaliteeti (Faulkner *et al.*, 2007).

Sarkopeenia on multifaktoriaalne geriaatriline haigus, mis võib, aga ei pruugi kaasneda loomuliku vananemisega (Rolland *et al.*, 2008). Selle kompleksse haiguse puhul on ühte kindlat põhjustajat raske esile tuua, sest nagu on näha joonisel 2, siis erinevaid sarkopeeniani viivaid faktoreid on palju. Sarkopeenia tekkepõhjused võivad olla:

- (1) vananemisega seotud (vähene füüsiline aktiivsus, mitokondrite düsfunktsioon, rakkude apoptoos);
- (2) vaskulaarsed (perifeersed arterite haigused, vähenenud kapillaaride funktsioon);
- (3) hormoonidega seotud (madal testosterooni, kasvuhormooni, insuliinisarnase kasvufaktori 1 (IGF-1), vitamiin D tase, kõrgenenud kortisooli tase);
- (4) neuronaalsed (motoneuronite lõpp-plaatide vähenemine, perifeerne neuropaatia);
- (5) kaalukaotusega seotud (erinevad dieetid, toitainete imendumishäired);
- (6) proinflammatoorsete tsütokiinidega (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) seotud (Morley, 2008).



**Joonis 2. Sarkopeenia tekkepõhjused.** Nagu jooniselt selgub, on sarkopeenia peamiseks põhjustajaks rakkude oksüdatiivne stress, mille käigus suureneb pidevalt reaktiivsete hapnikuühendite hulk. Skeletilihase oksüdatiivne stress ja põletik põhjustavad läbi mitmete erinevate signaaliradade aktiveerimisega/inaktiveerimisega mitokondrite väärtalitlust, vähenenud valgusünteesi, valkude intensiivsemat lagundamist ja apoptoosi. Kõigi nende muutuste tulemusena väheneb lihasmass ja on oht sarkopeenia tekkeks (Meng ja Yu, 2010; kohandatud).

#### 1.4.2 Proinflammatoorsed tsütokiinid ja sarkopeenia

Teatavasti täheldatakse vananedes kroonilist inflammatoorsete tsütokiinide taseme tõusu veres. Eakatel inimestel võib olla vähenenud süsteemne põletikuvastane toime mitmete keskkonnategurite mõjul (näiteks suitsetamise ja infektsioonide) ning kahaneva suguhormoonide taseme tõttu. Seda fenomeni suurendavad veelgi vananemisega kaasuvad

haigused. Eakate suremuse ja haigestumisega seostatakse multifunktsionaalseid tsütokiine TNF- $\alpha$  ja IL-6. Eakate inimeste uurimisel saadud tulemused näitavad TNF- $\alpha$  otseselt rolli ateroskleroosi, II tüüpi diabeedi ja Alzheimeri tõve tekkes. Vanusega seotud TNF- $\alpha$  taseme süsteemne kõrgenemine veres võib olla kõigi nende haiguste ühenduslüliks. Veelgi enam, TNF- $\alpha$  põhjustab katabolismist tingitud seisundit, mis väljendub lihasnõrkuses (Bruunsgaard ja Pedersen, 2003; Chung *et al.*, 2009).

Vananemise puhul on välja pakutud nn molekulaarne põletikuteooria (*molecular inflammatory theory of aging*), mis postuleerib, et vananemisega kaasuv krooniline madalatasemeline põletik on kui patofüsioloogiline ühenduslüli normaalse vananemise ja vananemisega seotud patoloogiliste seisundite vahel. Molekulaarne põletikuteooria põhineb kahel leiul: (1) koos vanusega suurenevad immuunsüsteemi regulatsioonihäired; (2) vananemise käigus muutuvad rakkude redoksstaatused. Mõlemad protsessid viivad rakkudes redokspotentsiaalide muutuseni, mis omakorda aktiveerib erinevaid põletikulisi mediaatoreid ning seega suureneb kehas süsteemne põletikutase. Vanusega seotud redoksstaatusetaasakaalutus on seotud ühelt poolt keha nõrgenenud võimega tulla toime oksüdatiivse stressiga, teiselt poolt suureneb vananedes pidevalt ROS tootmine (Brod, 2000; Chung *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2009).

Kõrget IL-6 sisaldust veres võiks pidada eakate nõrkuse ja trombembooliate tekkimise oluliseks riskifaktoriks. TNF- $\alpha$  ja IL-6 kõrge tase veres on vanadel inimestel seotud halva prognoosiga, viidates kaasuvatele haigustele ja kõrgemale suremusele. Elujõuetutel vanuritel võivad TNF- $\alpha$  ja IL-6 olla kui haigusmarkerid, kusjuures tsirkuleeriv TNF- $\alpha$  tundub olevat marker ennustamiseks populatsiooni suremust, samal ajal tervete vanurite puhul näib hoopiski IL-6 olevat olulisim riskifaktor. See leid näitab, et suhteliselt tervete eakate populatsioonis kujutab IL-6 sisalduse suurenemine veres endast süsteemset vastust lokaalsetele põletikufaktoritele. Samas vananemisega seotud põletikuliste haiguste arenedes suureneb veres TNF- $\alpha$  tase, mis kujuneb tugevamaks riskimarkeriks kui IL-6 (Bruunsgaard ja Pedersen, 2003).

Proinflammatoorsed tsütokiinid stimuleerivad proteolüüsi, tehes seda NF- $\kappa$ B signaalraja kaudu (Peterson ja Flood, 2012). Vananemisega seotud redokssensitiivne transkriptsioonifaktor NF- $\kappa$ B indutseerib põletikku ning seeläbi reguleeritakse üles IL-6 ja TNF- $\alpha$  (Chung *et al.*, 2009). Lisaks sellele toimivad ROS skeletilihastes kui sekundaarsed signaalrakud, aktiveerides NF- $\kappa$ B kas otseselt või kaudselt (Reid ja Li, 2001). Suurenenud oksüdatiivset stressi ja põletikku peetakse mitmete skeletilihastega seotud haigustega kaasnevaks.

On leitud, et TNF- $\alpha$  on üks esmastest signaalidest, mis indutseerib lihases apoptoosi. Nii apoptoos kui ka põletik on lähedalt seotud oksüdatiivsete kahjustustega ning samuti ka vananemisega seotud lihasmassi ja -jõu vähenemisega (Carter *et al.*, 2007). Põletikul arvatakse olevat negatiivne mõju skeletilihastele kas läbi otseste kataboolsete mõjutuste või läbi kaudsete mehhanismide (Roubenoff, 2003).

### **1.5 Humaniinid ja nende seos vananemisega kaasnevate haigustega**

Humaniin on 24-aminohappeline polüpeptiid, mis avastati 2001. aastal Alzheimeri tõvega inimese ajust. Praeguseks on humaniini avastatud erinevates kudedes ja organites, näiteks munandites, käärsooles, hüpotalamuses, südames, maksas, skeletilihastes, neerudes ja veresoonte seinas (Colon *et al.*, 2006; Muzumdar *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Humaniin mõjutab raku ellujäämist, ainevahetust, vastust stressoritele ning nii *in vivo* kui ka *in vitro* põletikku (Hashimoto *et al.*, 2001). On selgeks saanud, et humaniinil on teatud kaitsev neuroloogiline ja rakuline efekt, kuna humaniin on võtmefaktoriks oksüdatiivse stressi vähendamisel ja apoptoosi edasilükkamisel (Hashimoto *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2014). Kuna vananemine on seotud kroonilise süsteemse põletikuga, siis humaniin võib vähendada süsteemset põletikku reguleerides alla põletikulisi vastuseid (Zhao *et al.*, 2013). Zhang *et al.*, 2012 leidsid, et humaniin vähendab põletikku reguleerides alla neerusiseseid põletikumarkereid nagu monotsüüt kemoatraktant valk 1 (MCP-1), TNF- $\alpha$  ja osteopontiin ning vähendab makrofaagide infiltratsiooni hüperkolesteroleemilistes Apo-E puudulikkusega hiirtes. Seega vähendab humaniin varajases staadiumis oleva neeruhaiguse puhul mikrovereringehäireid, põletikku ja apoptoosi. Samuti avastasid ülalnimetatud teadlased, et HNG (humaniini vorm, kus 14. positsioonis olev seriin on asendatud glütsiiniga, olles seega rohkem kui 1000 korda rohkem raku kaitsev (Alonso *et al.*, 2001)) ravi supresseerib osaliselt proinflammatoorsete tsütokiinide sekretsiooni astrotsüütides tänu lipopolüsahhariididele (Zhang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013).

### **1.6 Mitokondrid ja põletik**

Kõrge ROS tase rakkudes ja krooniline põletik kahjustavad erinevaid makromolekule: lipiide, nukleiinhappeid ja valke. Lihasrakkudes on suureks ROS allikaks mitokondrid ja mtDNA on eriti vastuvõtlik oksüdatiivsetele kahjustustele (Mariappan *et al.*, 2009). Vananemisega on seotud ulatuslikud mitokondrite funktsionaalsed häired, näiteks väheneb mitokondrite mass

(Welle *et al.*, 2003a), tsitraaditsükli ensüümide aktiivsus (Crane *et al.*, 2010), ATP sünteesiaktiivsus (Short *et al.*, 2005) ja mitokondriaalse elektrontranspordiahela (ETA) funktsionaalsus (Hagen *et al.*, 2004).

Kroonilise põletikuga on seotud skeletilihase oksüdatiivse fenotüübi (OXPHEN) vähenemine. OXPHEN vähenemise käigus tekib oksüdatiivsete I tüüpi lihaskiudude asemel rohkem II tüüpi glükolüütilisi lihaskiude, väheneb mitokondrite sisaldus lihasrakkudes, väheneb mitokondriaalsete metaboolsete ensüümide aktiivsus ja ATP sisaldus (Gosker *et al.*, 2002; Hoeks ja Schrauwen, 2012). Skeletilihase OXHPEN staatust kontrollib PGC-1 signaalirada (Finck ja Kelly, 2006). PGC-1 isovormid *PGC-1 $\alpha$*  ja *PGC-1 $\beta$*  käituvad transkriptsiooniliste koaktivaatormolekulidena, kontrollides glükolüütiliste ja oksüdatiivsete lihaskiudude tasakaalu rakus ja ka mitokondrite võimekust tagada OXPHEN (Lin *et al.*, 2005).

Seoses mitokondritega on kõige rohkem uuritud proinflammatoose tsütokiini TNF- $\alpha$  mõju. Nimelt on leitud, et TNF- $\alpha$  muudab mitokondrite membraani läbilaskvust ning pärsib ETA tööd, mistõttu on mitokondrite talitus tugevalt häiritud (Moe *et al.*, 2004; Mariappan *et al.*, 2007). Samamoodi on TNF- $\alpha$ -l otsene negatiivne efekt lihasraku OXPHEN-le ja selle regulatsioonile. Nimelt kahjustab klassikaline NF- $\kappa$ B signaaliraja aktivatsioon skeletilihase oksüdatiivset fenotüüpi, vähendades mitokondriaalse hingamisahela võimekust normaalselt töötada (TNF- $\alpha$  inhibeeris mitmeid saite ETA II, III ja V kompleksides) (Remels *et al.*, 2013). Lisaks sellele on leitud, et TNF- $\alpha$  toimeline NF- $\kappa$ B aktivatsioon mõjutab mitte ainult mitokondrite funktsiooni vaid ka morfoloogiat. Nimelt võrreldes normaalsete mitokondritega muutis TNF- $\alpha$  lisamine kasvukeskkonda müotuubides mitokondrid lühemaks ja pundunuks (Remels *et al.*, 2013). Põletikutsütokiinid vähendavad mitokondriaalsete valkude ekspressiooni- ja aktiivsustasemeid läbi *PGC-1 $\alpha$*  ja *PGC-1 $\beta$*  mRNA tasemete vähendamise. TNF- $\alpha$  mitte ainult ei takista *PGC-1* mRNA ekspressiooni, vaid ka pärsib tugevalt PGC-1-koaktiveeritud signaaliülekaned lihasrakkudes. Samasuguseid efekte omab TNF- $\alpha$  ka teistes rakutüüpides, näiteks nii südamelihaskiududes kui ka rasvarakkudes (Palomer *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Remels *et al.*, 2013).

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

Käesolevas töös kirjeldatud meetodid olid osaliselt kasutusel ka bakalaureusetöö tegemisel. Seetõttu on nendele lisatud viide: (Tarrend, 2014).

### 2.1 Töö eesmärgid

2.1.1 Hinnata inimese skeetilihase *vastus lateralis* rakkude diferentseerumisega seotud transkriptsioonilisi muutusi ja proinflammatoorsete tsütokiinide (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) rolli nendes muutustes.

2.1.2 Analüüsida proinflammatoorsete tsütokiinide toimet energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonile lihasraku erinevatel arengustaadiumitel.

2.1.3 Leida uusi võimalikke seoseid põletiku ja vananemisega kaasneva sarkopeenia vahel.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Reaktiivid

$\beta$ -merkaptopetanol ja *SYBR Green I*<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich); tahke TBE originaal (NAXO Ltd) 5-kordse puhverlahuse (0.445M tris-boraati ja 10 mM EDTA) valmistamiseks; agaros; *TopVision LE GQ*, 2-kordne ja 6-kordne laadimispuhver; RNA suurusmarker *RNA Ladder, High Range* (Fermentas); DNA suurusmarker *Atlas Star 100 bp* ja DNA värv *TitanSight* (BioAtlas).

#### 2.2.2 Uuritavad, koed ja rakukultuurid

Käesolevas töös teostatud eksperimentaalsed uuringud on kooskõlas Euroopa Nõukogu inimõiguste ja biomeditsiini konventsiooniga ning WMA Helsingi deklaratsiooniga. Projektid, mille raames töö toimus, on saanud Tartu Ülikooli inimuuringu eetika komitee loa.

1) Noorte (20–30 a.) ja vanade (70–80 a.) inimeste reie nelipealihase (*m. vastus lateralis*) transkutaansed lihasbiopsiad ja nendest pärit müoblastide ja müotuubide kultuurid.

2) Eksperimentides kasutatavad rakukultuurid saadi dots. Andres Piirsoo töögrupilt. Inimese müoblastide primaarne kultuur saadi skeetilihase biopsiamaterjalist (Pääsuke *et al.*, 2016).

Inimese skeetilihast puhastati müoblastid välja kasutades CD56 antikehi ja magnetiga aktiveeritavaid mikrokerasid MACS (*magnetic-activated cell sorting*) meetodiga (Miltenyi

Biotec) ning puhastatud müoblastid pandi kasvama hepatotsüütide kasvufaktori (HGF) juuresolekul. Mononukleaarsete rakkude diferentseerumine indutseeriti DMEM (Dulbecco modifitseeritud Eagle'i sööde) kasvukeskkonnas penitsilliini+streptomütsiini ja ITS (insuliin/transferrin/seleniit) süsteemi juuresolekul kuue päeva jooksul. Müoblastid ühinesid sellises diferentseerumiskeskkonnas mitmetuumalisteks müotuubideks. Seda protsessi mõjutati proinflammatoorsete tsütokiinidega TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-6 (PeproTech) lisades neid eraldi rakkude kasvukeskkonda 6 päeva jooksul kontsentratsioonis 10 ng/ml (Poks ja Piirsoo, 2011). Diferentseerumist hinnati müotuubide moodustumise, fusiooniindeksi ja lihastuumade protsendi järgi.

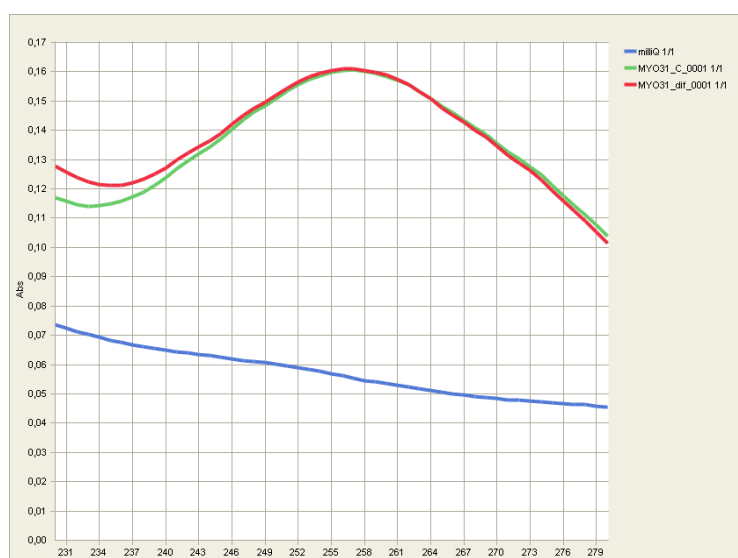
### 2.2.3 Totaalse RNA eraldamine

*RNA eraldamine lihaskoest.* Biopsiad toodi kliinikust spetsiaalses RNA-d säilitavas lahuses *RNAlater*<sup>®</sup> (Ambion). RNA eraldati lihaskoest toote *RNeasy*<sup>®</sup> *Fibrous Tissue Mini Kit* (Qiagen) abil järgides tootja protokoll (i>RNeasy<sup>®</sup> *Fibrous Tissue Handbook*, 2006, lk 14-19). Esmalt lisati lüüsimislahusele  $\beta$ -merkaptopetanooli (valkude struktuuris S-S e. väävelsildade lõhkumiseks ja samal ajal ka rakkude lüüsimisel vabanevate valkude ribonukleaaside inaktiveerimiseks denatureerimise teel). Seejärel tõsteti sinna 30–50 mg kudet, mida homogeniseeriti 10 kuni 30 sekundit, kasutades roteeruvate lõiketeradega homogenisaatorit (Janke ja Kunkel). Järgnes proteinaas K töötlus. RNA seoti etanooli juuresolekul eraldamiskoloni membraaniga, pesti selleks ettenähtud lahustega ning lõpuks elueeriti 35  $\mu$ l RNAasivaba veega. Sel viisil saadud totaalse RNA preparaati sisaldab eeldatavalt kõiki mRNA järjestusi, mille pikkus ületab 200 nukleotiidi. Kuna transport-RNA-d on valdavalt lühemad, siis on preparaati mRNA-rikastatud.

*RNA eraldamine müoblastidest ja müotuubidest.* RNA eraldati rakkudest *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen) abil ning järgiti tootja protokoll (i>RNeasy<sup>®</sup> *Plus Mini Handbook*, 2005, lk. 18-23). Ühe proovi kohta võeti ligikaudu 3 miljonit rakku. Peale  $\beta$ -merkaptopetanooli sisaldava lüüsimislahuse lisamist rakkudele, pipeteeriti moodustuv lüsaat homogeniseerimiseks spetsiaalsesse kolonni *QIAshredder* (Qiagen). Rakulüsaat voolutati kolonnist läbi tsentrifuugimise teel ja viidi üle *RNeasy spin column* (Qiagen) kolonni ning peale pesemisprotseduure elueeriti nukleiinhape 30  $\mu$ l RNAasivaba veega (vastavalt Tarrend, 2014).

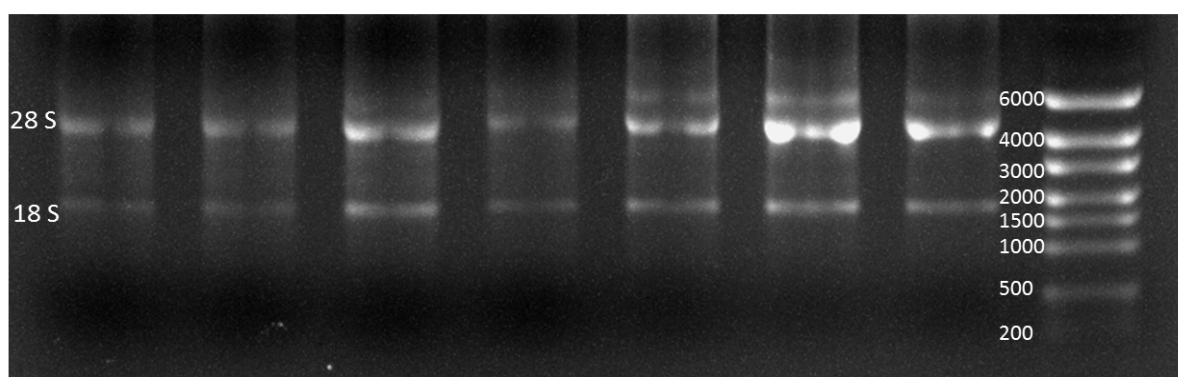
## 2.2.4 RNA kvaliteedi hindamine ja kontsentratsiooni määramine

RNA preparaadi puhtuse ja kontsentratsiooni hindamine neeldumisspektri alusel. RNA neeldumisspekter registreeriti toatemperatuuril vesilahuses UV/VIS spektrofotomeetriga *Multiskan GO* (Thermo Scientific) lainepikkuste vahemikus 230 kuni 280 nm (Joonis 3). RNA (ja DNA) neeldumismaksimum on 260 nm. Neeldumine lainepikkusel 230 nm näitab kontaminatsiooni selliste orgaaniliste ühenditega nagu näiteks tiotsüanaadid, fenolaadid ja karbohüdraadid. TRIzol reagent kui fenoolne ühend annab neeldumise 230 nm ja 270 nm juures. Neeldumine 280 nm juures näitab peamiselt valguliste kontaminantide sisaldust preparaadis. Neeldumiste suhet 260 nm ja 280 nm juures peetakse nukleiinhappe puhtust iseloomustavaks informatiivseks näitajaks. Eeldatakse, et nimetatud suhe peab olema ligikaudu 2 ning seda kriteeriumit arvestati käesolevas töös. RNA kontsentratsioonid mõõdeti neeldumismaksimumi (260 nm) juures järgnevalt: 96-kohalisele plaadile *UV-star* (Greiner bio-one) kanti 96 µl deioniseeritud (milliQ) vett, millele lisati 3 µl RNA vesilahust. 0-proovina (*blank*) lisati ühte plaadi süvendisse 99 µl deioniseeritud vett (milliQ). Arvutustel lähtuti neeldumiskõrbest, mille kohaselt küvetis (1 cm) oleva RNA vesilahuse kontsentratsioon 40 µg/ml annab neeldumise väärtuseks 1, kuid arutamisel võeti arvesse vedelikukihi vertikaalset mõõdet antud mahu juures. RNA kontsentratsiooni oli vaja teada, et laadida optimaalne kogus nukleiinhapet geelelektroforeesiks, samuti ka selleks, et võtta ettenähtud kogus RNA-d pöördtranskribeerimiseks.

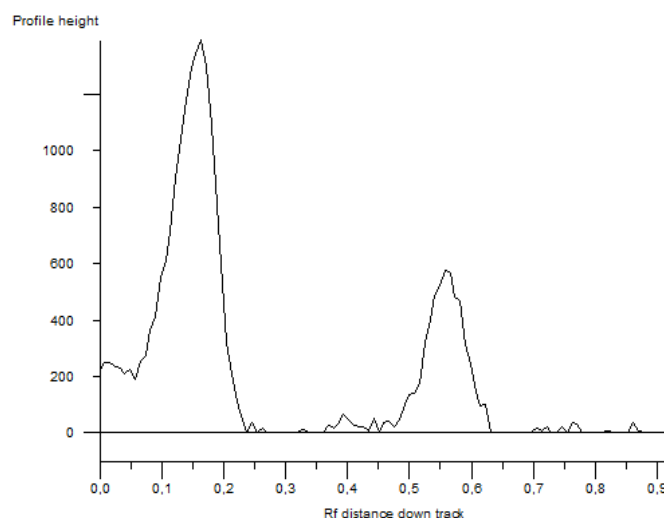


**Joonis 3. Müoblastidest (MYO31\_C) ja müotuubidest (MYO31\_dif) eraldatud RNA originaalspektrid.** Roheline joon vastab neeldumisele müoblastidest eraldatud RNA proovis, punane joon vastab neeldumisele müotuubidest eraldatud RNA proovis ja sinine joon näitab neeldumistaset 0-proovis (Tarrend, 2014).

*RNA kvaliteedi elektroforeetiline hindamine.* RNA kvaliteeti hinnati elektroforeesiga 0,8% agarosgeelis 1-kordses tris-boraat-EDTA (TBE) puhvril (50 mM Tris-boraat, pH 8,3). Kasutati elektroforeesisüsteemi *Multisub Mini* (Biocom Ltd). Agarosgeel valmistati *Fermentas Top Vision™ LE GQ* agarosist. Vedelale agarosgeelile lisati UV valguses nukleiinhappe visualiseerimiseks ühendit *TitanSight* (BioAtlas). RNA proovide geeli kandmiseks segati need 2-kordse laadimispuhvriga (Fermentas) vahekorras 1:1. Elektroforees toimus 45 minuti jooksul rakendades toitepinget 75 V (5 V/cm). Geelis olev RNA visualiseeriti ja pildistati geelidokumenteerimissüsteemiga SYNGENE (Joonis 4) ning analüüsiti GENETOOLS tarkvara abil (Joonis 5). Eelduseks oli, et nähtavate diskreetsete ribosomaalse RNA fragmentide 28S ja 18S intensiivsuste suhe oleks ligikaudu 2.



**Joonis 4. Näited totaalse RNA elektroforeesi tulemustest (0,8%-lises agarosgeelis).** Äärmisele parempoolsele rajale on laaditud RNA suurusmarker *Riboruler High Range* (Fermentas). Fragmentide pikkused on esitatud aluspaarides. 28S ja 18S tähistavad ribosomaalse RNA fragmente (Tarrend, 2014).



**Joonis 5. Näide ribosomaalse RNA fragmentide 28S (vasakul) ja 18S (paremal) suhte hindamisest GENETOOLS tarkvara (Syngene) abil.** Piikide kõrguste suhe näitab, et 28S ja 18S suhe on 2,3 ja seega vastab ülalmainitud nõutavale kriteeriumile (Tarrend, 2014).

### 2.2.5 RNA pöördtranskribeerimine

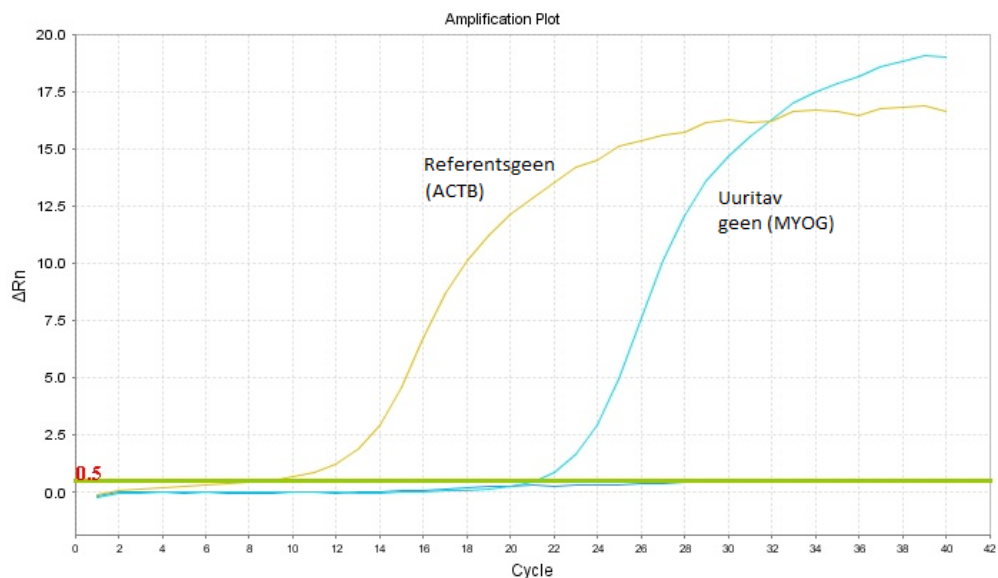
Totaalse RNA preparaati sisaldas kõiki mRNA järjestusi, mille pikkus ületab 200 nukleotiidi. Selleks, et uurida geenide ekspressiooni mRNA tasemel reaallaja-PCR abil, konverteeriti need üheaheeliseks komplementaarseks DNA-ks (cDNA), sest mRNA-d on ebastabiilsed ja võivad olla väga lühikese elueaga. RNA pöördtranskribeeriti (RT) cDNA-ks *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) abil järgides tootja protokoll (Quantitect Reverse Transcription Handbook, 2009, lk. 11-13), mille kohaselt RT protseduurile eelnes DNA eemaldamise protseduur. See seisnes selles, et RNA vesilahusele, mis sisaldas ligikaudu 1 µg RNA-d, *gDNA wipeout* reagenti ja vajadusel lisati veel RNAasivaba vett. Seejärel inkubeeriti proove 42 °C juures 2 minutit. Pöördtranskribeerimise läbiviimiseks oli välja töötatud funktsionaalne tööprotokoll Exceli tabeli formaadis. Osade proovide puhul (kui materjali oli piisavalt) teostati ka NRT reaktsioon kui negatiivne kontroll. Protokollis oli märgitud totaalse RNA sisaldused preparaadis ja pöördtranskribeerimiseks võetavad RNA kogused.

RT tulemusena saadud cDNA-d hoiti kuni reaallaja-PCR teostamiseni -20 °C juures (nagu ka Tarrend, 2014).

### 2.2.6 Reaalaja-PCR

Reaalaja-PCR meetodi puhul rakendati samu printsiipe kui bakalaureusetöö (Tarrend, 2014) teostamisel.

*Põhiprintsiibid.* Reaalaja-PCR meetod võimaldab teatavasti fluorestsentsi järgi kvantitatiivselt hinnata produkti akumulereerumist reaallajas. Käesolevas töös kasutati DNA visualiseerimiseks ühendit SYBR Green I. Põhimõtte seisneb selles, et SYBR Green I annab tugeva fluorestsentsi seondudes kaheaheelise DNA molekulidega. Kui SYBR Green on seondumata, siis fluorestsents puudub. Kuna PCR algfaasis on keskkonnas vähe kaheaheelist DNA-d, siis on fluorestsents nõrgem, kuid mida rohkem dsDNA-d tekib, seda tugevam on fluorestsents (Joonis 6). Antud juhul tuleb aga arvestada sellega, et fluorestsents võib tekkida ka mittespetsiifilise seondumise tulemusena (nt praimerite dimeeride tekke ja genoomse DNA sisalduse puhul). Selleks on otstarbekas disainida praimerid nii, et päri- ja vastassuunaline praimer ei saaks moodustada komplementaarseid järjestusi ning et vähemalt üks praimeritest oleks eksonite ristumiskohast. Spetsiifilise produkti kindlakstegemist võimaldab ka see, kui praimerid on erinevatest eksonitest.



**Joonis 6. Tüüpilised amplifikatsiooni originaalkõverad.** Need kõverad on saadud esitades lineaarses skaalas lävetsüklitele vastavad fluorestsentsi väärtused, mis on võrdelised tekkinud reaktsiooniproducti hulgaga. Etteantud läveks on 0.5. Uuritava geeni (*MYOG*) lävetsükli erinevus ( $\Delta CT$ ) referents ehk *housekeeping* geeniga võrreldes on 11 (Tarrend, 2014).

Käesolevas töös kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused ja vastavate ampliconide pikkused on esitatud alljärgnevas tabelis (Tabel 1).

**Tabel 1. Kasutatud praimerite nukleotiidsed järjestused, liigispetsiifilisus ja ampliconide pikkused.** Hs – *Homo sapiens*. Praimerite järjestused: pärisuunaline (ülemine) ja vastassuunaline (alumine). Ampliconi pikkused on esitatud aluspaarides.

Geen	Liik	Praimeri järjestus 5'→3'	Ampliconi pikkus (bp)
ACTB β-aktiin	Hs	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	140
		AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
HPRT1 Hüpoksantiin- ribosüültransferaas	Hs	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	101
		GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	
AK1 Adenülaatkinaas 1	Hs	AAGAGTTTGAGCGACGGATTG	127
		GTCTCCTCATTGTCGTCCACAC	
AK2 Adenülaatkinaas 2	Hs	CCCAGATTGGCTGAAAATTCT	130
		CACTCACCAGTTTCCCAGCAT	
HK1 Heksokinaas 1	Hs	GGACTGGACCGTCTGAATGT	100
		ACAGTTCCTTACCAGTCTGG	
HK2	Hs	CAAAGTGACAGTGGGTGTGG	87

Heksokinaas 2		GCCAGGTCCTTCACTGTCTC	
HNM Mitokondriaalne humaniin	Hs	AATCACTTGTTCCTTAAATAGGGACC	51
		GAACCCCTCGTGGAGCCATT	
MTRNR2L8/HN8 MT-RNR2-sarnane 8	Hs	CCTGCCCCGTGAAGAGGC	51
		CCATAGGGTCTTCTCGTCTTGTATAC	
MTRNR2L9/HN9 MT-RNR2-sarnane 9	Hs	TTCAGCTGTCTCTTACTTTCAACCAC	52
		GCCTCTTACGGGCAGGT	
CKM Lihastüpi kreatiinkinaas	Hs	GGCATCTGGCACAATGACAA	108
		GCGGAAAACCTCCTTCATGTT	
CKB Ajutüpi kreatiinkinaas	Hs	CGGTATCTGGCACAATGACAA	96
		TTCATGTTGCCCCCTTCT	
MYOD Müoogene diferentsioon 1	Hs	TGCCACAACGGACGACTTC	76
		CGGGTCCAGGTCTTCGAA	
MYOG Müogeniin	Hs	CAGTGCCTGGAGTTCAGCG	139
		TTCATCTGGGAAGGCCACAGA	
UCP2 Mitokondriaalne lahutajavalk 2	Hs	CCGGGGCCTCTGGAAAGGGA	283
		GGGCCCCTCCTTCTGGAGCA	
UCP3 Mitokondriaalne lahutajavalk 3	Hs	TCACCTCCAGGCCAGTACTT	228
		CGTTAGCTACCAGTGGCCTT	
PPARGC1A/PGC-1 $\alpha$ PPARG koaktivaator 1 alfa	Hs	TGCCCTGGATTGTTGACATGA	117
		TTTGTCAAGGCTGGGGGTAGG	
SLC25A12 Aralar 1	Hs	ATGCTTCAGGGCGCTTGA	63
		AGGCCCCCTCAGCCAAT	

### 2.2.7 Tööprotokoll ja DNA dissotsiatsioonikõverate analüüs

Töös oli reaallaja-PCR teostamiseks kasutusel *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen) ning järgiti tootja protokoll ( *QuantiTect® SYBR® Green PCR Handbook*, 2009, lk 12-14). Reaallaja-PCR teostati *StepOnePlus™* (Applied Biosystems) süsteemiga. Reaktsiooni maht igas PCR plaadi (Applied Biosystems) süvendis oli 11  $\mu$ l.

#### PCR režiim

Esmalt polümeraasi aktiveerimine 15 min 95 °C juures, seejärel 35-40 tsükli:

1. denaturatsioon 15 sekundit 94 °C juures;

2. praimerite seondumine 30 sekundit 56 °C juures;
3. DNA süntees 30 sekundit 72 °C juures.

PCR järgselt saab DNA dissotsiatsiooniprotokolli järgi välja selgitada ebasoovitavat praimerite dimeriseerumist. Praimerite dimeerid ilmnevad piikidena madalamatel temperatuuridel.

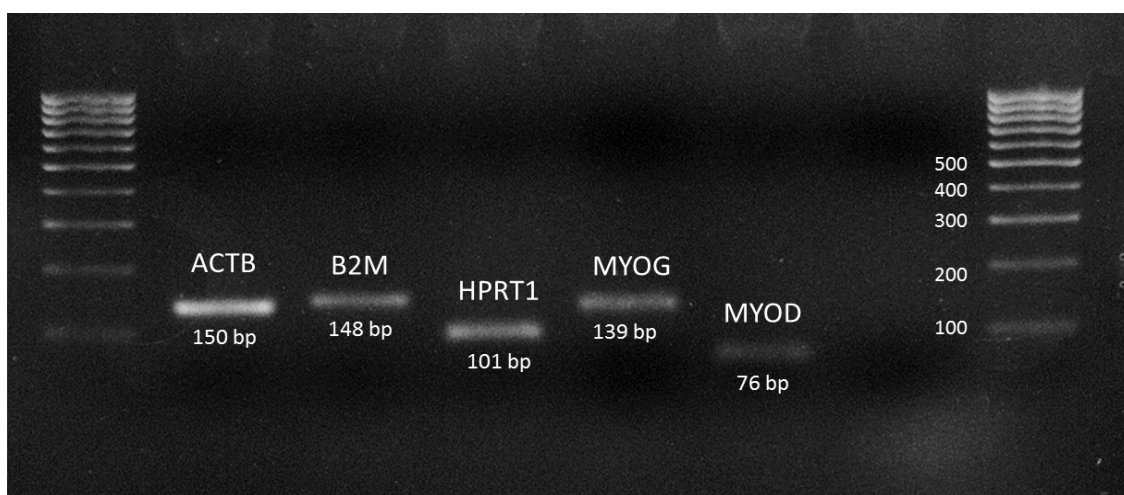
Antud töös teostati iga reaalaaja-PCR eksperimendi lõpus (tavaliselt peale 35. tsükli) nn dissotsiatsiooniprotokoll. Paljud reaalaaja-PCR instrumendid, sealhulgas *StepOnePlus™*, mis oli kasutusel antud töös, võimaldavad kohe pärast viimast PCR tsükli määrata reaktsiooniproductide dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuuri ( $T_m$ ). Et seda määrata, tõstab instrument ettenähtud vahemikus pidevalt temperatuuri ning samaaegselt registreerib fluorestsentsi. Viimase tugevus sõltub SYBR Green I seostumisest kaheaheelalise produktiga. Madalamatel temperatuuridel, kui ahelad ei ole lahti keerdunud, fluorestsents oluliselt ei vähene. Ahelate lahtikeerumise suurenedes ( $T_m$  piirkonnas) fluorestsents nõrgeneb kiiresti, sest dsDNA denatureerumise tõttu SYBR Green I enam ei seostu. Registreeritud fluorestsentsist arvutab tarkvara negatiivse tulelise temperatuuri järgi ja genereerib nn dissotsiatsioonikõverad, mis vastavad olukorrale, mil 50% DNA ahelatest on lahtikeerdunud.  $T_m$  sõltub põhiliselt konkreetsete praimerite omadustest ja mingil määral ka reaktsioonikeskkonnast. Dissotsiatsiooniprotokolli  $T_m$  järgi on võimalik kontrollida ampliconide spetsiifilisust.

### 2.2.8 mRNA taseme suhteline kvantiteerimine

Teatud momendil ületatakse lävi ehk etteantud fluorestsentsi tase (Joonis 6). Tsükli, mille ajal toimub selle läve ületamine, nimetatakse lävetsükliks (CT). Mida rohkem on paljundatavat algmaterjali, seda kiiremini akumulereerub eksponentsiaalselt kulgevas reaktsioonis kaheaheelaline produkt ja seda varasemas tsükli ületatakse lävi. Seega mRNA erinevate tasemete tõttu toimub läve ületamine erinevates tsüklikes. Siit tuleneb lävetsükli erinevuse mõiste ( $\Delta CT$ ). Suhtelisel kvantiteerimisel arvutatakse lävetsüklike erinevus referents- ehk *housekeeping* geenide suhtes. mRNA tasemete võrdlemisel erinevates kudedes ja rakutüüpides või normi ja patoloogia puhul on eelduseks see, et nende geenide ekspressioon peab jääma muutumatuks. Antud töös olid *housekeeping* geenidena kasutusel *HPRT1* ja *ACTB*. Nende sobivust müoblastide uuringuks on ka spetsiaalselt testitud (Stern-Straeter *et al.*, 2009). Erinevus kordades võrreldavate ekspressioonitasemete vahel arvutati  $\Delta\Delta CT$  meetodil (Livak ja Schmittgen, 2001).

## 2.2.9 Amplikonide elektroforeetiline analüüs agarosgeelis

Kuigi reaallaja-PCR puhul ei ole otsest vajadust lõpp-produkti elektroforeetiliseks hindamiseks, on vahel otstarbeks veenduda, kas kasutatud praimerite abil on saadud ettenähtud pikkusega amplikonid. Näide taolisest kontrollist on esitatud joonisel 7 (Tarrend, 2014). Võrreldes praimerite kohta käivat informatsiooni (Tabel 1) ja elektroforeetiliselt määratud amplikonide pikkusi, võib öelda, et nende geenispetsiifiliste praimeritega on saadud ettenähtud pikkusega järjestused.



**Joonis 7. Reaallaja-PCR amplikonide elektroforees 1.8%-lises agarosgeelis.** Äärmistel radadel on DNA suurusmarker *Atlas Star 100 bp* (BioAtlas). Kui vaadata praimerite kohta käivat informatsiooni (Tabel 1) ja elektroforeetiliselt määratud amplikonide pikkusi, võib öelda, et nende geenispetsiifiliste praimeritega on saadud ettenähtud pikkusega järjestused.

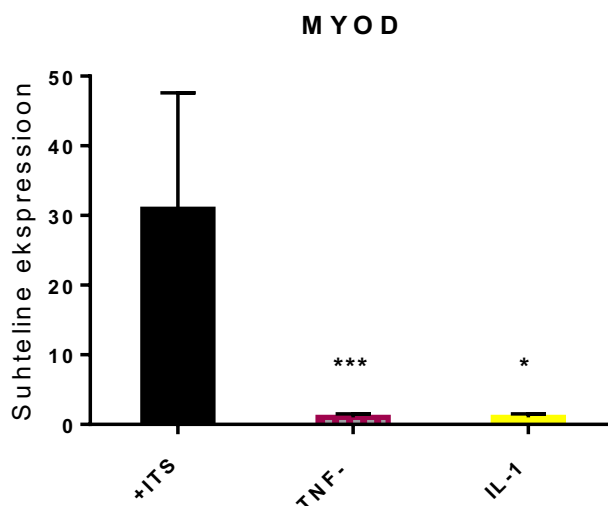
## 2.2.10 Andmete statistiline töötlus

Katseandmete organiseerimisel ja elementaarsel statistilisel töötlusel kasutati *MS Office Microsoft Excel 2016* ja detailsemal töötlusel *GraphPad Prism 5* tarkvara. Uuritud proovid ja saadud andmed on sisestatud ja säilitatakse patofüsioloogia uurimisgrupi ühiskasutuses olevas *MS Office Access* andmebaasis. Originaalfailid salvestati reaallaja-PCR süsteemiga ühendatud arvuti kõvakettale. Andmeid analüüsiti ühesuunalise või kahesuunalise paaritu t-testi abil. Mediaane võrreldi Mann-Whitney testiga. Analüüsitulemust loeti statistiliselt oluliselt erinevaks  $P < 0,05$  puhul. Tulemused on esitatud aritmeetiliste keskmistena koos standardveaga.

## 2.3 TULEMUSED

### 2.3.1 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime müogeneesile

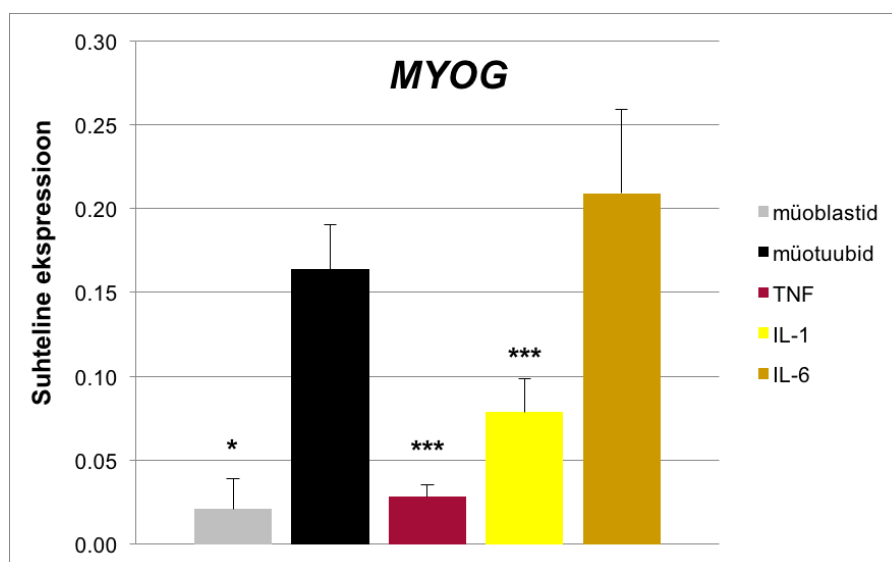
Praeguseks on teada, et mitmete interleukiinide ja TNF- $\alpha$  geenid on kroonilise põletiku puhul ülesreguleeritud (Degens, 2010). Samuti on tuvastatud, et C2 müoblastides inhibeeritakse TNF- $\alpha$  toimet müogeensete transkriptsioonifaktorite *MYOD* ja müogeniini ekspressioon (Szalay *et al.*, 1997). Seetõttu hakati käesolevas töös uurima proinflammatoorsete tsütokiinide TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-6 rolli inimese skeletilihase *vastus lateralis* pärit müoblastide diferentseerumisele rakukultuuris. Esmalt määrati müogeensete transkriptsioonifaktorite *MYOD* ja müogeniini ekspressioonitasemed reaalka-PCR abil. Lävetsüklite erinevuste võrdlemisel selgus, et müoblastides (-ITS) ja müotuubides (+ITS kontroll) *MYOD* mRNA tase oluliselt ei erinenud. Sellest nähtub, et *MYOD* roll on oluline müogeneesi mõlemas staadiumis. IL-6 toimet *MYOD* ekspressioon ei muutunud või oli pigem soodustatud. Võrreldes töötlemata rakkudega langes IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  toimet skeletilihase müogeneesi kontrolliva *MYOD* ekspressioonitase oluliselt (Joonis 8), mis annab tunnistust sellest, et need tsütokiinid pidurdavad lihasrakkude moodustumist ja seeläbi reparatsiooniprotsessi. Teised autorid on leidnud, et ka C2C12 rakkudes mõjutab TNF- $\alpha$  müogeneesi reguleerides *MYOD* taset alla nii mRNA kui valgu tasemel (Guttridge *et al.*, 2000).



**Joonis 8. *MYOD* mRNA taseme muutused rakukultuuris TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  toimet inimese skeletilihase müoblastide diferentseerumisel müotuubideks.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *ACTB* suhtes, mis on skaleeritud 1000 korda.

\* – statistiliselt oluline erinevus müotuubidest (+ITS kontroll),  $P = 0,041$ ; \*\*\* –  $P = 0,0006$ ;  $n = 6-8$ .

TNF- $\alpha$  destabiliseerib satelliitrakkude prolifereerumises ja diferentseerumises osaleva *MYOD* ja indutseerib apoptoosi just vanemaelistel. TNF- $\alpha$  toimet peetakse kontsentratsioonist ja ajast sõltuvaks. Seega süsteemse põletiku negatiivne mõju lihasele vananenud organismis ilmneb siis, kui see ületab teatud läve ja kestab pikemat aega (Degens, 2010). Teadaolevalt ei suuda *MYOD* kompenseerida müogeniini defitsiiti nende kahe valguga funktsionaalsete erinevuste tõttu (Myer *et al.*, 2001). Joonis 9 näitab, et *MYOG* avaldus tugevamini müotuubides, mis viitab antud müogeense transkriptsioonifaktori olulisusele just hilisemas lihasrakkude küpsemise faasis. Rakukultuuris jäi TNF- $\alpha$  juuresolekul müogeniini mRNA tase samaks nagu seda oli müoblastides. Seetõttu võis rakkude kasvukeskkonnas väheneda müotuubide formeerumine. Nimetatud põletikutsütokiin tõkestab lihasrakkude moodustumise inimese skeletilihases *vastus lateralis* müoblastidest müotuubide moodustumise faasis. Väidetavalt ei avalda TNF- $\alpha$  (lisatuna kasvukeskkonda 25 ng/ml) toimet kui rakud (inimese müoblastid) on juba täielikult müotuubideks diferentseerunud (Miller *et al.*, 1988).



**Joonis 9. *MYOG* mRNA taseme muutused rakukultuuris TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ja IL-6 toimel inimese skeletilihase müoblastide diferentseerumisel müotuubideks.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *ACTB* suhtes.

\* – statistiliselt oluline erinevus müotuubidest (+ITS kontroll),  $P = 0,035$ ; \*\*\* –  $P = 0,0005$ ;  $n = 6-8$ .

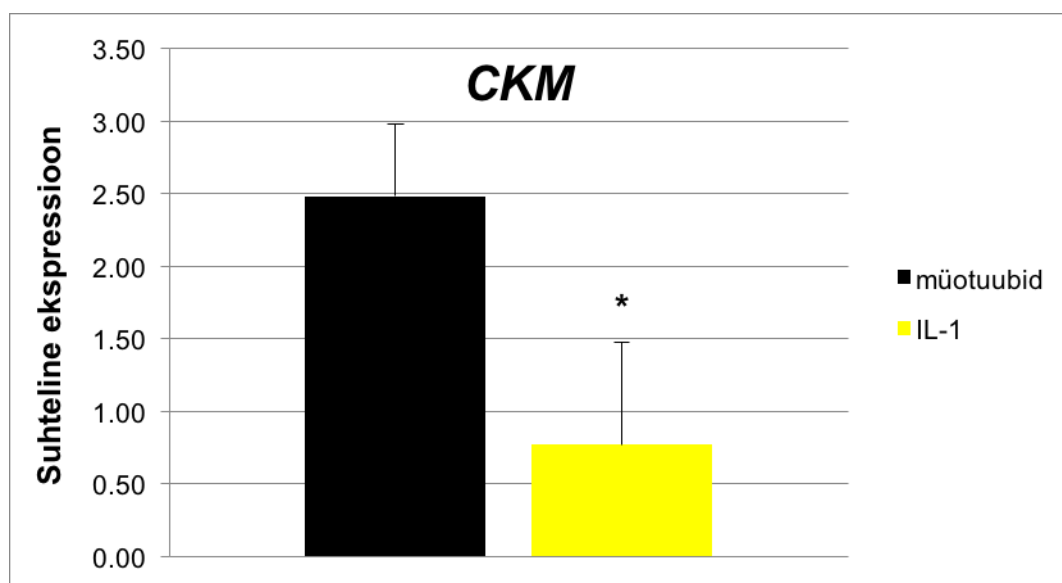
Joonis 9 näitab, et ka IL-1 $\beta$  toimel langes *MYOG* mRNA tase oluliselt. Tuginedes Milleri *et al.*, 1988 andmetele võib öelda, et IL-1 $\beta$  halvendab rakkude diferentseerumisvõimet inhibeerides müogeniini ekspressiooni vähendamise kaudu IGF-1-sõltuvat müogeneesi. Need käesolevas töös saadud tulemused on kooskõlas mitmete teiste autorite andmetega, mille alusel proinflammatoorseid tsütokiine seostatakse inimeste vananemisega kaasneva sarkopeenia kujunemisega (Hepple, 2003; Morley, 2008). Kroonilise südamepuudulikkusega

patsientide *vastus lateralis* lihastest saadud müoblastide ja müotuubide kultuuris on näidatud, et TNF- $\alpha$  mõjul (10 ng/ml; 72 tundi) langeb nii *MYOD* kui ka müogeniini mRNA tase (Sente *et al.*, 2016). Loomkatsed on samuti näidanud, et tsütokiinid on olulised atroofia mediaatorid (Costa *et al.*, 2014, Georgantas *et al.*, 2014).

### 2.3.2 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkude energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonile

Vananemisega kaasneva sarkopeeniaga seostatakse mitokondeid ja rakusiseste energiaülekandesüsteemide komponente. Sellest lähtuvalt uuriti käesolevas magistritöös nii kreatiinkinaase ja adenülaatkinaase kui ka alternatiivse heksokinaase energiaülekandega seotud geenide ekspressiooni müoblastides ja müotuubides.

Tulemustest selgus, et lihastüüpi kreatiinkinaasi isovormi kodeeriva geeni *CKM* ekspressioonitase langes oluliselt IL-1 $\beta$  toimel (Joonis 10). *CKM* produktiks olevat kreatiinkinaasi (CK) valku kasutatakse sageli lihasrakkude markerina ning *CKM* ekspressioonitase näitab ühtlasi rakkude diferentseerumise astet.



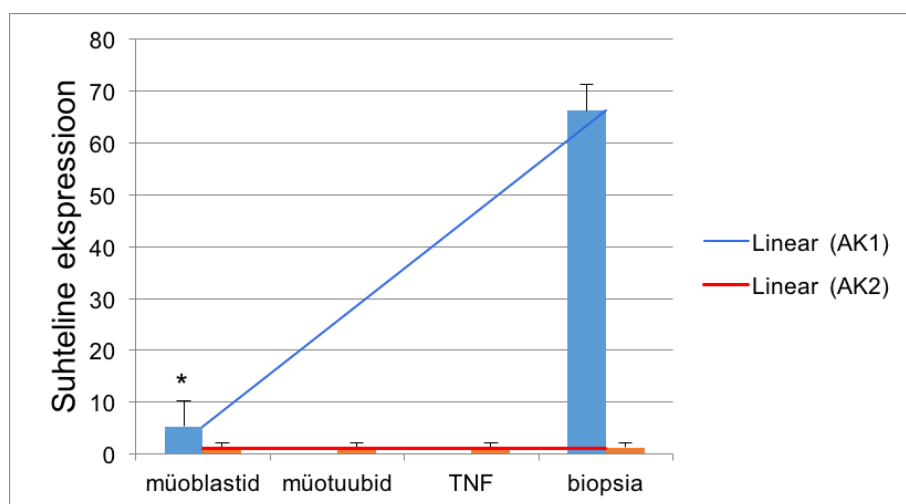
**Joonis 10. *CKM* mRNA taseme muutus rakukultuuris IL-1 $\beta$  toimel inimese skeletilihase müotuubide diferentseerumiskeskkonnas.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *HPRT1* suhtes.

\* – statistiliselt oluline erinevus müotuubidest (+ITS kontroll), P = 0,039; n = 5-7.

See leid toetab eespool kirjeldatud tulemust, mille kohaselt IL-1 $\beta$  lisamine rakukultuuri pärsib müotuubide moodustumist. Teisalt vähendab IL-1 $\beta$  manustamine ka tüüpiliste lihasvalkude sünteesi *in vivo*, nagu on näidatud roti *m. soleus* ja *m. gastrocnemius* puhul teiste töös (Cooney *et al.*, 1999).

Võrreldes küpsete lihasrakkudega (müotsüüdid) on arenevates lihasrakkudes (müoblastid ja müotuubid) *CKM* sisaldus siiski ülimaldal ning nendes domineerib hoopis *CKB* geeni poolt kodeeritav ajutüüpi kreatiinkinaasi isovorm, mille ekspressiooni ükski uuritavatest tsütokiinidest ei mõjutanud. Sellest nähtub samuti, et nad avaldavad toimet eelkõige lihasspetsiifilistele valkudele. Mitokondriaalse kreatiinkinaasi *CKMT2* geeni transkript ei olnud müoblastides detekteeritav ning väga madala taseme tõttu oli ka müotuubides proinflammatoorsete tsütokiinide poolt esile kutsutud muutusi raske kvantiteerida. Statistiliselt olulisi erinevusi seejuures ei tuvastatud. Küll aga olles võrrelnud bakalaureusetöö raames *CKMT2* mRNA taset *vastus lateralis* lihases noortel inimestel ja vanade inimeste sarkopeenilistes lihastes, ilmnes et sarkopeeniaga kaasnes drastiline *CKMT2* alaekspressioon (Tarrend, 2014).

CK isovormidel on oksüdatiivsetes lihastes oluline roll, kuna nad osalevad rakusiseses energiaülekanDES mitokondritest ATPaasideni. Samuti on teada, et nii transgeense volframiinpuudulikkusega hiirte kui ka inimeste *vastus lateralis* lihases on lihastüüpi kreatiinkinaas seotud endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stressiga. ER stressiga kaasnevad ka lihasrakkudes energeetilise metabolismi muutused: *Ckm/CKM* geenide alaekspressiooni tõttu väheneb sarkoplasmaatilises retiikulumis (SR) kreatiinkinaasi võime fosforüülda SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaasi poolt produtseeritud ADP-d. Seetõttu võib tekkida lokaalne ATP defitsiit ja kahjustuda energiat tarbivad SR-seoselised protsessid ja CK energiaülekanDESüsteem (Tarrend *et al.*, 2014; Lisa 3). Madala CK ekspressiooni tõttu alles diferentseeruvates rakkudes (Bolhuis *et al.*, 1985 ja käesoleva töö andmed) tõenäoliselt sedalaadi energiaülekanne ei toimi, kuid alternatiiviks võib sellisel juhul olla adenülaatkinaasne (AK) energiaülekanDESüsteem, mille põhikomponendid on *AK1* ja *AK2*. Bolhuis *et al.*, 1985 on näidanud, et erinevalt kreatiinkinaasist on *AK* arenevates rakkudes samas suurusjärgus küpsuse saavutanud rakkudega. *AK* süsteemi hindamiseks skeletilihase rakkudes mõõdeti *AK* geenide ekspressiooni müoblastides ja müotuubides ning  $\text{TNF-}\alpha$  toimet *AK1* ja *AK2* ekspressioonile. Saadud tulemused on esitatud joonisel 11.

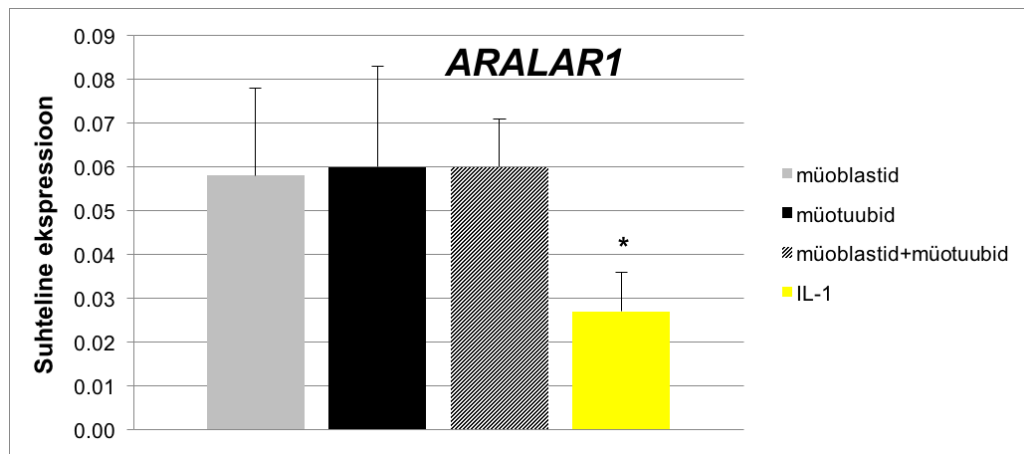


**Joonis 11. Inimeste kultiveeritud müoblastides ja *m. vastus lateralis* biopsias ning müotuubides määratud *AK1* ja *AK2* mRNA tasemed.** Y-teljel on esitatud ekspressioon HPRT1 suhtes. \* – statistiliselt oluline erinevus,  $P = 0,03$ .

Leiti, et inimese skeetilihase *vastus lateralis* müoblastides on olemas nii *AK1* kui ka *AK2* geeni transkriptid, kusjuures *AK2* mRNA tase (punane trendijoon, joonis 11) on oluliselt madalam kui *AK1* ning sama kõikides uuritud gruppides. *AK1* domineerib ja on lihaskiududes märksa kõrgem kui müoblastide kultuuris. Käesolevas töös reaalkaja-PCR abil *AK* mRNA ekspressiooni kohta käivad tulemused lähevad üldjoontes kokku Lee *et al.*, 1998 poolt tehtud *Northern blot* andmetega. Samuti on need kooskõlas CK ja AK süsteemi kohta käesolevas töös leitu ja Bolhuis *et al.*, 1985 poolt avaldatud andmete vahel.

Väga oluline on arvestada seda, et mitokondrite funktsiooni muutused vananevas lihases kulgevad põletikuliste protsesside toime foonil, mis on tüüpiline vanaduse puhul.

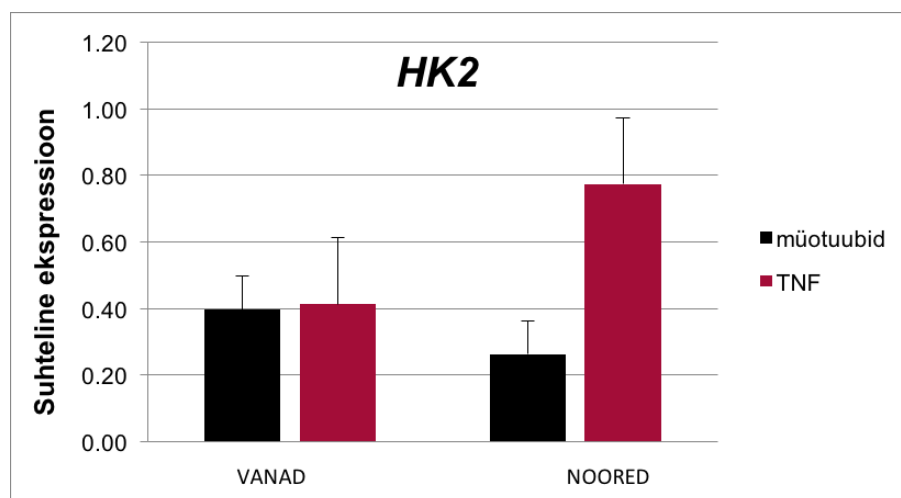
Kuna töö käigus leiti, et proinflammatoorsed tsütokiinid pidurdavad lihasrakkude arengut ja energiaülekanandesüsteemi kujunemist, mis omakorda vähendab mitokondrites OXPHOS protsessis ATP teket ja selle kasutamist lihastöök, siis pakkus huvi välja selgitada, kas mitokondritevälise kaltsiumi poolt aktiveeritav mehhanism (Peatükk 1.3.1) võib funktsioneerida ka lihasrakus. Lisaks huvitas, et kas proinflammatoorsed tsütokiinid mõjutavad selle võtmekomponendi ARALAR1 valgu mRNA taset. Vastavad tulemused on esitatud joonisel 12.



**Joonis 12. IL-1 $\beta$  efekt ARALAR1 ekspressioonile inimese skeletilihase müoblastides ja müotuubides.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *HPRT1* suhtes. \* – statistiliselt erinev võrreldes müoblastid+müotuubid rakkurühmaga,  $P = 0,037$ ;  $n = 7$  (müoblastid või müotuubid);  $n = 14$  (müoblastid+müotuubid);  $n = 9$  (IL-1 $\beta$ ).

Selgus, et *ARALAR1* mRNA ekspresseerub võrdsel määral nii müoblastides kui ka müotuubides, mis loob eeldused mitokondrite funktsiooni täiendavaks reguleerimiseks, näiteks juhul kui rakkude energiaga varustatus on piiratud. IL-1 $\beta$  toimel avaldus *ARALAR1* aga oluliselt nõrgemini, mis võib pärssida selle valguga seostumise võimet kaltsiumioonidega.

Teatavasti aktiveerib TNF- $\alpha$  glükolüütilise faktori HIF-1 $\alpha$ , mis omakorda suurendab ROS teket, põhjustab lihaskoe kahjustusi ja tõstab müotuubides glükolüütiliste ensüümide ekspressioonitaset (Remels *et al.*, 2015). Seoses sellega kontrolliti käesoleva töö raames TNF- $\alpha$  ja interleukiinide toimet *HK2* geeni ekspressioonile. Selle geeni puhul leiti, et vanade ja noorte inimeste lihastest pärit rakud vastavad TNF- $\alpha$  toimele erinevalt (Joonis 13).



**Joonis 13. *HK2* mRNA tase vanade ja noorte inimeste rakkudes tavalises kasvukeskkonnas (müotuubides) ja TNF- $\alpha$  juuresolekul.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *ACTB* suhtes.  $P = 0,133$ ;  $n = 10-15$ .

Selgus, et vanade inimeste sarkopeenilistest lihastest pärit rakkudes ei ole *HK2* ekspressioon TNF- $\alpha$  ega interleukiinide toime suhtes tundlik, kuid noorte lihastest saadud müoblastid reageerivad TNF- $\alpha$  juuresolekule *HK2* üleekspressiooni näol. Noorte inimeste puhul oli *HK2* mRNA tase ligikaudu 3 korda kõrgem võrreldes tavalises kasvukeskkonnas arenenud noorte lihastest pärit müotubidega (Joonis 13). Ühtlasi on jooniselt näha, et *HK2* tasemed mõlemas rakugrupis (ilma TNF- $\alpha$  lisamiseta, mustad tulbad) teineteisest palju ei erinenud.

Pääsuke *et al.*, 2016 on noorte ja vanade inimeste sarkopeenilise *m. vastus lateralis* puhul näidanud, et nii *in vivo* tingimustes (iseloomulik kõrge põletikutsütokiinide tase veres) kui ka nn replikatiivse vananemise puhul *in vitro* ei muutu *HK* totaalne aktiivsus.

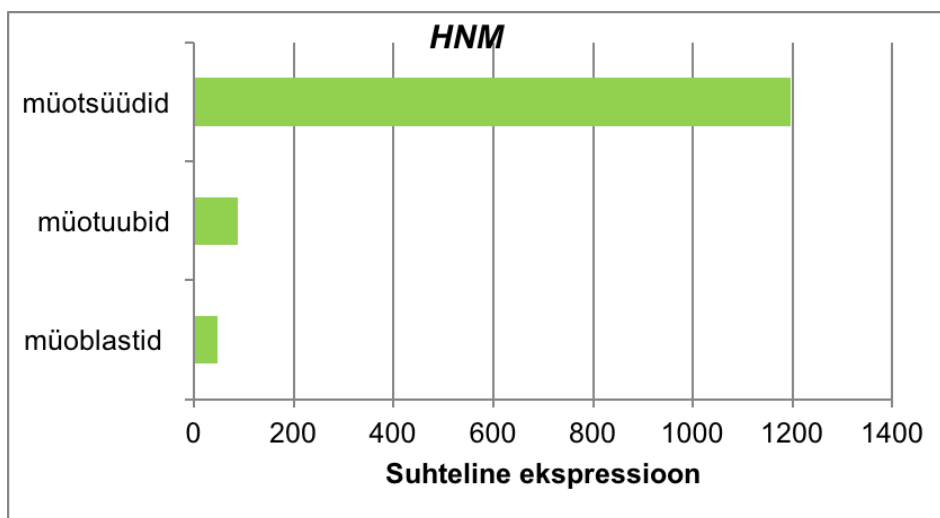
Käesolevas töös saadud andmed inimese *m. vastus lateralis* rakkude kohta annavad siiski alust arvata, et TNF- $\alpha$  lisamisel noorte inimeste lihastest saadud rakukultuurile hakkab *HK2* isovorm tugevamini avalduma, mis võib viidata rakkude n-ö säästmisele läbi *HK2* kaudu toimuva apoptoosi inhibeerimise ja glükolüüsi stimuleerimise (Marín-Hernández *et al.*, 2009; Roberts ja Miyamoto, 2015). Heksokinaasi II-tüüpi isovormi peetakse domineerivaks insuliin-tundlikes kudedes nagu lihas ning on sedastatud selle valgu kaudu toimuv energeetilise metabolismi ja raku kaitsemehhanismide integratsioon (Roberts ja Miyamoto, 2015).

Siit tulenes huvi uurida ise laialdasemalt raku kaitsemehhanisme vastuseks sarkopeeniaga kaasnevale kroonilisele põletikule ja proinflammatoorsete tsütokiinide toimele *in vitro*. Valik langes äsja avastatud süsteemset põletikku vähendavale humaniini (Peatükk 1.5).

### **2.3.3 Humaniini ekspressiooni hindamine erinevas arengujärgus olevates rakkudes. Proinflammatoorsete tsütokiinide võimalik toime**

Humaniini valk avastati suhteliselt hiljuti, kuid praeguseks juba teatakse, et mõned tema isovormidest esinevad ka skeletilihases (Bodzioch *et al.*, 2009). Humaniinile omistatakse rolle alates neuroprotektiivsest toimest (Niikura *et al.*, 2004) kuni eluea pikendamiseni (Fuku *et al.*, 2015), kuid inimese lihasrakkude, sealhulgas rakkude erinevate arenemisstaadiumitega ja põletikuga kaasnevate muutuste kohta teatakse väga vähe. Sellest tulenevalt hakati käesoleva töö raames hindama humaniini isovormide *HNM*, *HN8* ja *HN9* mRNA taset inimese skeletilihase *m. vastus lateralis* rakkudes. *HN8* mRNA müoblastides ja müotubides ei avaldunud. Ka *HN9* isovormi mRNA tase oli müoblastides ja müotubides väga madal ning ei võimaldanud täpset kvantiteerimist, kuid isovormi kodeeriva *MTRNR2* geeni transkriptsiooni uurimiseks tehti rida pilootkatseid. See isovorm on inimese skeletilihases küll tuvastatud, kuid muus osas on informatsioon puudulik. Huvitav on asjaolu, et humaniini *HNM* polüpeptiid transkribeeritakse mitokondriaalse genoomi *MTRNR2* geenilt, mille

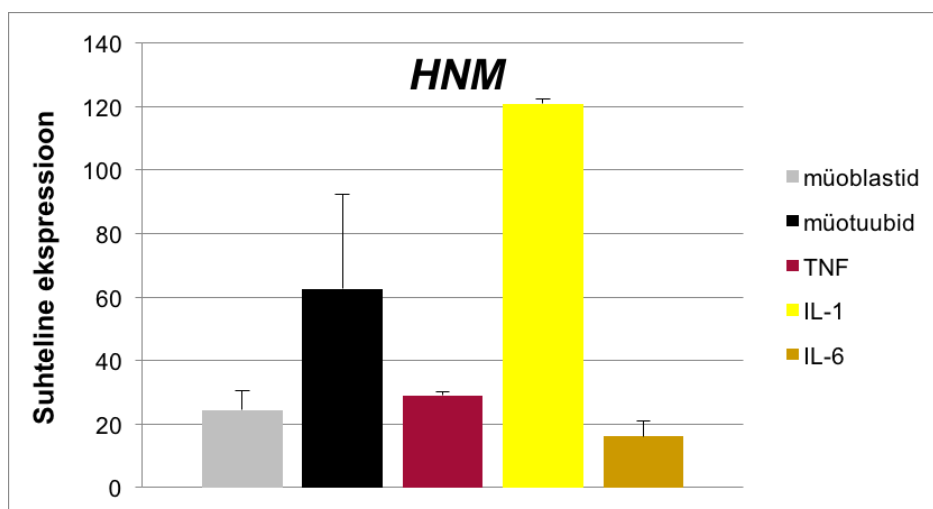
produktiks teati pikka aega olevat vaid ribosomaalne 16S RNA (Maximov *et al.*, 2002). Arvatakse, et *HNM* peptiidi produtseeritakse ka *in vivo* ja seda seostatakse Alzheimeri tõvega (Tajima *et al.*, 2002). Joonis 14 illustreerib käesolevas töös saadud esmaseid tulemusi *HNM* ekspressiooni kohta inimese lihasrakkudes.



**Joonis 14.** Näide *HNM* geeni ekspressiooni kohta terve noore inimese lihasraku erinevatel arenguetappidel. Müoblastid, müotuubid ja küpsuse saavutanud lihasrakud (müotsüüdid ehk lihaskiud) on pärit ühelt ja samalt indiviidilt.

Võrreldes müoblastidega on müotuubideks diferentseerunud rakkudes *HNM* mRNA tase 2 korda kasvanud. Lihaskiududes avaldub see polüpeptiid aga terve suurusjärgu ulatuses tugevamini kui müoblastides ja müotuubides (Joonis 14).

Joonis 15 illustreerib humaniini *HNM* isovormi üleekspressiooni IL-1 $\beta$  toimel võrreldes nii müoblastide kui ka müotuubidega (P-väärtused vastavalt 0,002 ja 0,068).

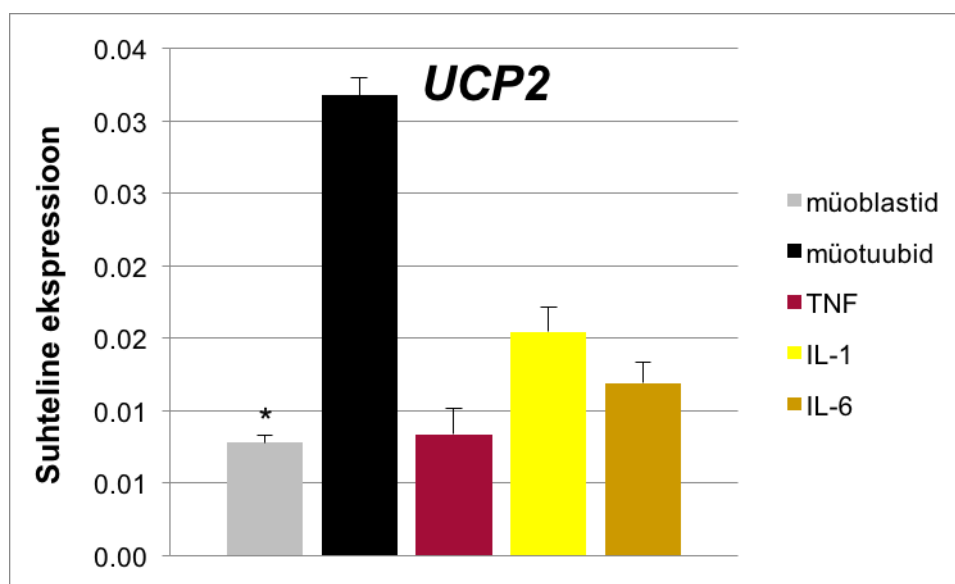


**Joonis 15.** *HNM* geeni mRNA tase rakkude erinevates kasvukeskkondades. Y-teljel on esitatud ekspressioon *HPRT1* suhtes (aritmeetilised keskmised koos standardveaga, TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  puhul on esitatud viga korduste vahel; n = 1–7).

Üleekspressiooni tingimustes võib humaniin avaldada selektiivset protektiivset toimet just IL-1 $\beta$  suhtes. *HNM* madal tase TNF- $\alpha$  juuresolekul võib olla seletatav sellega, et just *HK2*, mitte *HNM* reguleeritakse üles vastuseks TNF- $\alpha$  kahjustavale toimele. Seda näitavad ka käesoleva töö tulemused, kuigi efekt väljendub just noortelt doonoritelt pärit rakkudes (Joonis 13). IL-6 on tuntud ka oma positiivse toime poolest, mistõttu selle interleukiini juuresolekul *HNM* geeni transkriptsiooniliselt üles ei reguleerita. *HNM* ekspressiooni inimese skeletilihases mRNA tasemel on näidanud Bodzioch *et al.*, 2009. Nende autorite andmetele vastavalt ekspresseerub *HNM* skeletilihasega ligikaudu samal määral ka südames ja ajus.

#### 2.3.4 Proinflammatoorsete tsütokiinide toime mitokondrite funktsiooni reguleerivate valkude ekspressioonile ja mitokondrite biogeneesile

Varasemates töödes on näidatud, et tsütokiinide manustamine katseloomadele *in vivo* suurendab mitokondriaalse lahutajavalgu UCP2 ekspressiooni (Kontani *et al.*, 2002). Käesolevas töös kontrolliti, kas analoogne efekt avaldub ka rakukultuuris *in vitro* inimese *m. vastus lateralis* rakkudes. Jooniselt 16 on näha, et proinflammatoorsed tsütokiinid ei suurendanud UCP2 ekspressiooni rakukultuuris antud eksperimentaalsetes tingimustes.

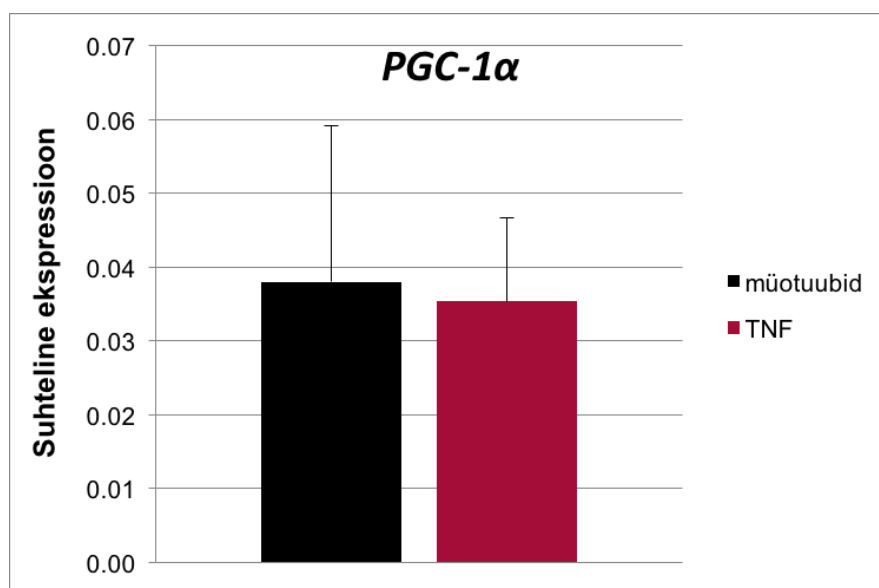


**Joonis 16.** *UCP2* geeni mRNA tase rakkude erinevates kasvukeskkondades. Y-teljel on esitatud ekspressioon *ACTB* suhtes. \* – statistiliselt oluline erinevus müotuubidest (+ITS kontroll),  $P = 0,045$ ;  $n = 43$  (müoblastid);  $n = 14$  (müotuubid);  $n = 17$  (TNF);  $n = 10$  (IL-1);  $n = 24$  (IL-6).

Leitud vastuolu teiste poolt saadud andmetega on seletatav sellega, et vastus tsütokiinide toimele on inimeste ja katseloomade puhul erinev. Kontani *et al.*, 2002 töö puhul oli tegu *in vivo* uuringuga rottidel. Sellelaadseid *in vivo* uuringuid, mis eeldaks tsütokiinide manustamist inimestele ei ole võimalik teha. Arvatakse, et transkriptsioonilised programmid, mis tagavad n-ö täieliku lihasku fenotüübi, aktiveeritakse ainult *in vivo* süsteemis, mitte rakukultuuris (Brun *et al.*, 1999). Käesoleva töö kirjanduse ülevaates (Peatükk 1.6) on välja toodud, et põletikutsütokiinide lisamine rakkude kasvukeskkonda hoopis vähendab mitokondriaalsete valkude ekspressiooni mRNA tasemel. Käesoleva töö tulemused (Joonis 16) näitavad samuti, et uuritud tsütokiinid pigem vähendavad kui suurendavad *UCP2* ekspressiooni, kuigi statistiliselt olulist erinevust ei olnud. Sellest lähtuvalt testiti ka mitokondrite biogeneesi hindamiseks *PGC-1 $\alpha$*  ekspressiooni valikuliselt TNF- $\alpha$  juuresolekul rakukultuuris (Joonis 17). Lihasspetsiifilise isovormi *UCP3* mRNA tase kultiveeritud müoblastides ja müotuubides oli ülimadal, mistõttu oli proinflammatoorsete tsütokiinide toimet *UCP3* ekspressioonile raske täpselt hinnata. Kõrgemas lihaskiududes on *UCP3* ekspressioon suurusjärgu poolest kõrgem.

Joonis 16 näitab ka seda, et müotuubides oli mitokondriaalse lahutajavalgu *UCP2* tase oluliselt kõrgem ( $P = 0,045$ ) kui müoblastides, mis on tõenäoliselt seletatav mitokondrite biogeneesiga.

*PGC-1 $\alpha$*  testimine näitas, et TNF- $\alpha$  rakukultuuri lisamine *PGC-1 $\alpha$*  ekspressioonitaset oluliselt ei muutnud ja seega ilmselt mitokondrite biogeneesi antud katsetingimustes ei mõjutanud.



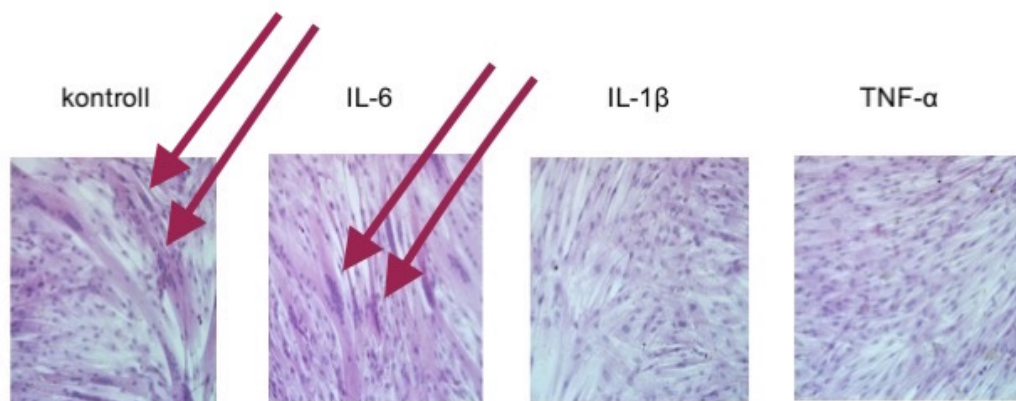
**Joonis 17. *PGC-1 $\alpha$*  mRNA tase tavalises kasvukeskkonnas (müotuubid) ja TNF- $\alpha$  juuresolekul.** Y-teljel on esitatud ekspressioon *ACTB* suhtes, mis on skaleeritud 1000 korda.  $n = 6$  (müotuubid),  $n = 8$  (TNF).

## 2.4 ARUTELU

Antud töös hinnati inimese skeletilihase *vastus lateralis* rakkude diferentseerumisega seotud transkriptsioonilisi muutusi ja kolme proinflammatoorse tsütokiini (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) rolli nende tekkes.

Esmalt uuriti proinflammatoorsete tsütokiinide toimet müogeneesile. Lihaskude diferentseerumisel müoblastidest müotuubideks osalevad mitmed müogeensed reguleerivad faktorid. Selles töös hinnati müogeniini ja *MYOD* ekspressiooni. *MYOD* ekspressioon müoblastides ja müotuubides oluliselt ei erinenud, mis näitab, et see diferentseerumismarker on oluline müogeneesi mõlemas staadiumis. Selgus, et TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  pidurdavad müotuubide moodustumist. On alust arvata, et need tsütokiinid vähendavad lihase regeneratsioonivõimet vananemisega kaasneva sarkopeenia puhul, kuna vananenud organismis on põletikutsütokiinide tase oluliselt kõrgem. Töös saadud tulemused (Peatükk 2.3.1) on kooskõlas Guttridge *et al.*, 2000 leitunga C2C12 hiire müoblastides.

Kuna see magistritöö tehti koostööprojekti raames, siis oli võimalus saada tulemusi võrrelda teiste andmetega. Dotsent Andres Piirsoo töögrupp on hinnanud proinflammatoorsete tsütokiinide toimet lihaskude diferentseerumisele mikroskoopia abil. Joonis 18 illustreerib tsütokiinide toimeefekti.



**Joonis 18. Tsütokiinide mõju müogeensele diferentseerumisele müoblastidest müotuubideks.** Võrreldes diferentseerumiskeskkonnas olevate kontrollrakkudega on näha, et IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  puhul pärast 6 päevast tsütokiinide juuresolekut müotuube peaaegu ei ole. IL-6 lisamisel müotuubide arv ei vähenenud. Nooled osutavad müotuubidele.

Fotodelt võib näha, et IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  pidurdavad müoblastide diferentseerumist müotuubideks, kuid IL-6 kas soodustab diferentseerumist või ei mõjuta seda üldse. Ülal näidatud mikroskoopia tulemused on heas kooskõlas töös saadud tulemustega (Peatükk 2.3.1). Kõne all olevaid tsütokiine seostatakse vananemisega kaasneva sarkopeeniaga (Hepple, 2003;

Morley, 2008). Saadud uurimistulemused aitavad täpsustada proinflammatoorsete tsütokiinide osatähtsust inimese lihasrakkude diferentseerumisprotsessis.

Lisaks uuriti veel tsütokiinide toimet mitokondritele ja lihasraku energiaülekanandesüsteemidega seotud geenide ekspressioonile. Tsütokiinid avaldasid mõju nii lihasrakus domineeriva kreatiin- kui ka alternatiivsele adenülaatkinaasile energiaülekanandesüsteemile. Nimelt vähendas IL-1 $\beta$  oluliselt lihasrakkude markerina kasutatava lihastüüpi kreatiinkinaasi ekspressioonitaset. See kinnitab, et IL-1 $\beta$  pärsib müotüübide moodustumist, kuna *CKM* ekspressioonitaset kasutatakse samuti diferentseerumismarkerina. Kuna kreatiinkinaasse energiaülekanandesüsteemiga seotud geenide ekspressioonitase lihasrakkudes on väga madal, siis tõenäoliselt võib seal hoopis funktsioneerida alternatiivne adenülaatkinaasne süsteem. Antud töö oluline ja uudne tulemus on, et inimese skeletilihase *vastus lateralis* müoblastides leiti *AK1* ja *AK2* geenide transkriptid.

On leitud, et kaltsiumioonid suudavad ajurakkudes stimuleerida mitokondrite hingamist ilma kaltsiumi maatriksisse akumuleerumiseta (Gellerich *et al.*, 2008, 2009, 2010; Seppet *et al.*, 2009) tänu aralari aktivatsioonile mitokondritevälise kaltsiumi poolt, mis võimaldab suurendada OXPHOS aktiivsust. Sellest lähtuvalt uuriti, kas see ekstramitokondriaalse kaltsiumi poolt aktiveeritav mehhanism võib toimida ka lihasrakkudes. Tulemusi analüüsid selgus, et aralari ekspressioonitase on ühesugune nii müoblastides kui ka müotüübides, mis näitab, et vajadusel (nt rakkude energeetilise puudulikkuse tingimustes) võiks see mehhanism käivituda ka alles arenevates lihasrakkudes varustades mitokondreid intensiivsemalt substraatidega.

Huvipakkuv oli ka humaniini ekspressioonitaseme määramine, sest humaniini seosest inimese lihasrakkude erinevate arengustaadiumite ja põletiku foonil toimuvate muutustega teatakse väga vähe. Töö käigus selgus, et noore terve inimese lihasrakkudes kasvab *HNM* mRNA tase müoblastidest diferentseerumisel küpseteks lihaskiududeks lausa suurusjärgu ulatuses. Humaniini isovormide ekspressiooni tuvastamine inimese skeletilihastest *vastus lateralis* pärit müoblastides ja müotüübides on täiesti uudne tulemus.

Mitokondriaalsed lahutajavalgud *UCP2* ja *UCP3* lahutavad mitokondrites toimuva OXPHOS-i ja ATP sünteesi, mille tulemusena vabaneb soojusenergia. *UCP2* on ekspresseeritud mitmetes kudedes nagu näiteks valges rasvkoes ja immuunsüsteemiga seotud organites (nt põrnas), kuid kõige enam on ta ekspresseeritud skeletilihastes, kus arvatavasti limiteerib ROS taset. *UCP3* on aga skeletilihasspetsiifiline ja arvatakse, et antud valk on seotud kogu keha energeetilise metabolismiga (Schrauwen ja Hesselink, 2002). Varasemates teadustöodes on

näidatud, et tsütokiinide manustamine katseloomadele *in vivo* suurendab *UCP2* ekspressiooni, aga kuna antud töös olid uurimise all inimese *vastus lateralis* lihasrakud, siis ilmselt, et katseloomadel ja inimesel saadud tulemused olid vastupidised – uuritud tsütokiinid pigem vähendasid kui suurendasid *UCP2* ekspressioonitaset. Võimalik, et see on seotud tsütokiinide mõjuga mitokondrite biogeneesile.

On teada, et PGC-1 $\alpha$  stimuleerib skeetilihastes mitokondrite biogeneesi, reguleerib OXPHOS-ga seotud geenide ekspressiooni ja koaktiveerib PPAR hormoonretseptoreid (Lin *et al.*, 2002; Gilde ja Van Bilsen, 2003). PPAR- $\gamma$  ja selle koaktivaator PGC-1 $\alpha$  moodustavad omaette signaaliraja, mille kaudu reguleeritakse lihasraku OXPHEN tasakaalu oksüdatiivse fenotüübi suurenemise poole ja mitokondriaalset biogeneesi (Remels *et al.*, 2007). Sellest lähtuvalt analüüsiti mitokondrite biogeneesi hindamiseks PGC-1 $\alpha$  mRNA taset. Selgus, et proinflammatoorse tsütokiini TNF- $\alpha$  lisamine rakukultuuri ei mõjutanud oluliselt PGC-1 $\alpha$  ekspressioonitaset. Seega võib öelda, et TNF- $\alpha$  antud katsetingimustes mitokondriaalset biogeneesi ei mõjutanud.

Teatavasti on sarkopeenia patogeneesiga seotud nii rakkude oksüdatiivne stress, krooniline põletik, suurenenud proteolüüs ja ka rakusiseste energiaülekanandesüsteemide häirumine (Peatükk 1.4). Käesoleva töö tulemused näitavad samuti proinflammatoorsete tsütokiinide TNF- $\alpha$  ja IL-1 $\beta$  negatiivset mõju nii lihasrakkude diferentseerumisele kui ka energiaülekanandesüsteemide kujunemisele.

Käesoleva magistr töö praktiline tähtsus seisneb alusuuringute ja kliiniliste uuringute kombinatsioonis, mis võimaldas kvantitatiivselt kirjeldada haiguslikke muutusi inimese skeetilihase rakkudes põletikutsütokiinide toimel. Nimetatud tsütokiinide mõju uurimine *in vitro* rakukultuuris andis uut informatsiooni selleks, et paremini mõista põletikuliste protsesside foonil toimuvaid energeetilise metabolismi ja lihase regeneratsioonivõimega seotud transkriptsioonilisi muutusi ja nende rolli vastavates molekulaarsetes mehhanismides.

Töö tulemused võimaldavad teha järgmised järeldused:

- 1) proinflammatoorsed tsütokiinid (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) pidurdavad müoblastide diferentseerumist müotubideks, mis võib mõjutada lihaste regeneratsioonivõimet;
- 2) interleukiin 1 $\beta$  mõjutab kreatiinkinaasi isovormide kaudu toimiva rakusisese energiaülekanandesüsteemi kujunemist, kuna selles protsessis suurt tähtsust omava lihastüüpi kreatiinkinaasi kodeeriva geeni ekspressioon reguleeritakse IL-1 $\beta$  toimel alla;

3) oksüdatiivse fosforüülimise regulatsioonimehhanism, mis on vahendatud mitokondritevälise kaltsiumi glutamaat-aspartaat transporterit (aralar) aktiveeriva toime kaudu, võib avalduda ka inimese skeletilihase rakkudes. IL-1 $\beta$  ilmselt takistab selle mehhanismi käivitumist, sest see interleukiin vähendab oluliselt *ARALAR1* ekspressiooni, mistõttu halveneb mitokondrite varustamine substraatidega.

## KOKKUVÕTE

Selles magistritöös käsitletakse proinflammatoorsete tsütokiinide toimet lihasrakkude diferentseerumisele ja energeetilisele metabolismile.

Reaalaja-PCR abil hinnati: 1) inimese skeletilihase *vastus lateralis* rakkude diferentseerumisega seotud transkriptsioonilisi muutusi ja proinflammatoorsete tsütokiinide (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) rolli nendes muutustes; 2) analüüsiti proinflammatoorsete tsütokiinide toimet energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonile lihasraku erinevatel arengustaadiumitel ja 3) otsiti uusi võimalikke seoseid põletiku ja vananemisega kaasneva sarkopeenia vahel.

Leiti, et proinflammatoorsed tsütokiinid IL-1 $\beta$  ja TNF- $\alpha$  võivad vähendada inimese skeletilihase regeneratsioonivõimet, pidurdades müoblastide diferentseerumist müotuubideks, sest nende tsütokiinide toimel reguleeritakse müogeensete transkriptsioonifaktorite *MYOD* ja müogeeniini mRNA tase alla. IL-6 ilmselt müogeneesiprotsessi oluliselt ei mõjuta. Diferentseerumisele avaldas see interleukiin pigem soodustavat kui pidurdavat toimet. Tsütokiinid mõjutasid ka skeletilihase energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonitaset. Oluliselt vähenes rakusiseses energiaülekandes osaleva sarkoplasmaatilise retiikulumi ja müofibrillaarse ATPaasiga seotud lihastüüpi kreatiinkinaasi isovormi kodeeriva *CKM* geeni ekspressioon. Veel leiti, et oksüdatiivse fosforüülimise regulatsioonimehhanism, mis on vahendatud mitokondritevahelise kaltsiumi glutamaat-aspartaat transporterit (*ARALARI*) aktiveeriva toime kaudu, võib avalduda ka inimese skeletilihase rakkudes. IL-1 $\beta$  ilmselt takistab selle mehhanismi käivitumist, sest see interleukiin vähendab oluliselt *ARALARI* ekspressiooni, mistõttu mitokondrite varustamine substraatidega jääb puudulikuks.

Kuigi rakukultuuris olid noorte inimeste ja vanade inimeste sarkopeenilistest lihastest pärit rakud täpselt ühesugustes tingimustes, leiti siiski, et mõnel juhul oli nende vastus tsütokiinide toimele erinev. Näiteks vastuseks TNF- $\alpha$  toimele reguleeritakse üles *HK2* geen, kuid see efekt väljendus vaid noortelt inimestelt pärit rakke uurides. Vananedes ilmselt väheneb vastutoime põletikutsütokiinide mõjule.

Käesoleva töö tulemused kinnitavad arusaama, et põletikulised protsessid võivad olla vananemisega kaasneva sarkopeenia oluliseks põhjuseks, kuna vananedes suureneb veres põletikutsütokiinide sisaldus. Saadud tulemused peaksid aitama paremini mõista põletikutsütokiinide osatähtsust vananemisega kaasneva sarkopeenia patogeneesis, mille olulised komponendid on rakkude energeetiline puudulikkus ja krooniline põletik, samuti lihaste halvenenud regeneratsioonivõime.

# **The effect of proinflammatory cytokines in muscle cells: transcriptional changes and the relation to sarcopenia**

Marian Tarrend

## Summary

Inflammatory processes may represent a major cause of sarcopenia, as ageing is associated with increased plasma levels of the inflammatory cytokines (Dirks and Leeuwenburgh, 2006; Franceschi *et al.*, 2007). Also, improvement of differentiation of muscle cell is important to prevent ageing-related muscle wasting, weakness and sarcopenia. Considering that circulating proinflammatory cytokines are elevated in ageing-related sarcopenia, present study addresses the role of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) in differentiation-related and metabolic processes of human muscle cells and in the development of creatine kinase and adenylate kinase intracellular energy transfer network at different stages of myogenesis. The effects of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 were assessed during differentiation in cell culture of muscle progenitor cells (myoblasts). The cells originated from human skeletal muscle *vastus lateralis* of young subjects and from elderly subjects with sarcopenic *m. vastus lateralis*. Cell cultures were obtained from docent Andres Piirsoo's workgroup in the frame of the co-project. Primary cultures of human skeletal muscle myoblasts were purified with CD56 antibodies microbeads on MACS (Miltenyi Biotec) and cultured in the presence of HGF. Serum free cultures were supplemented for 6 days with each cytokine (PeproTech) separately. Differentiation was estimated by myotube formation, fusion index and percent of myonuclei. The following hypotheses were controlled:

- 1) Proinflammatory cytokines affect the human skeletal muscle regeneration by modulating differentiation. This effect can occur mainly by slowing down transformation of myoblasts to the myotubes;
- 2) Transcriptional changes induced by the cytokines are related to cellular energy metabolism and the impact of each cytokine may depend on the age of tested persons.

Concomitantly, the following questions were set:

- 1) By which means the inflammatory cytokines can modulate mitochondria and energy transfer systems (e.g. uncoupling and regulation of oxidative phosphorylation and expression of creatine kinase, adenylate kinase and hexokinase isoforms);
- 2) How are the changes in energy metabolism linked to reduced myogenic and regenerative capacity of the muscle cells.

The results of the study show that in the presence of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) the expression levels of myogenic transcription factors *MYOD* and myogenin were significantly decreased. IL-6 induced the differentiation at the same or even marginally higher level compared to ITS supplemented medium. Thus, proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , but not IL-6, can reduce muscle regeneration by impairment of differentiation at the level of myotube formation and thereby promote sarcopenia. It was observable that the development of CK energy transfer system occurred in parallel with differentiation process. IL-1 $\beta$  severely affected the development of creatine kinase energy transfer system and prevents the activation of oxidative phosphorylation by extramitochondrial calcium. It was also established that TNF- $\alpha$  induced mild overexpression of *HK2*. This effect was more pronounced in the cells originated from healthy young subjects.

Taken together it can be concluded that inflammation may be an important cause of sarcopenia because differentiation of cultured myoblasts derived from human *m. vastus lateralis* was slowed down by proinflammatory cytokines. It can be suggested that ageing-related sarcopenia is associated with diminished ability of myoblasts to form myotubes and thereby slow down myogenesis and muscle regeneration.

IL-1 $\beta$  severely diminished the expression of important energy metabolism related genes and contributes to the development of cellular energy failure and thereby sarcopenia.

The study revealed that the functioning of novel regulatory mechanism of OXPHOS which consists of the beneficiary effect of calcium ions to transport glutamate into the muscle mitochondria can be switched on also in muscle cells but it is suppressed by IL-1 $\beta$ .

## KIRJANDUSE LOETELU

**Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (2001)** Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6923–6928.

**Baeza-Raja, B., Muñoz-Cánoves, P. (2004)** p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell.* 15(4): 2013-2026.

**Bodzioch, M., Lapicka-Bodzioch, K., Zapala, B., Kamysz, W., Kiec-Wilk, B., Dembinska-Kiec, A. (2009)** Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms. *Genomics.* 94(4): 247-256.

**Bolhuis, P.A., de Zwart, H.J., Ponne, N.J., de Jong, J.M. (1985)** Free-energy carriers in human cultured muscle cells. *Muscle Nerve.* 8(1): 22-26.

**Brod, S.A. (2000)** Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflamm Res.* 49(11): 561-570.

**Brun, S., Carmona, M.C., Mampel, T., Viñas, O., Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F. (1999)** Uncoupling protein-3 gene expression in skeletal muscle during development is regulated by nutritional factors that alter circulating non-esterified fatty acids. *FEBS Lett.* 453(1-2): 205-209.

**Brunsgaard, H., Pedersen, B.K. (2003)** Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.,* 23, pp. 15–39.

**Carter, C.S., Hofer, T., Seo, A.Y., Leeuwenburgh, C. (2007)** Molecular mechanisms of life- and health-span extension: role of calorie restriction and exercise intervention. *Appl Physiol Nutr Metab.* 32(5): 954-966.

**Charge, B. P., Rudnicki, M.A. (2004)** Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews,* Vol. 84 no. 1, 209-238.

**Chen, X.H., Zhao, Y.P., Xue, M., Ji, C.B., Gao, C.L., Zhu, J.G., Qin, D.N., Kou, C.Z., Qin, X.H., Tong, M.L., Guo, X.R. (2010)** TNF-alpha induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.,* 328, pp. 63–69.

**Chung, H.Y., Kim, H.J., Kim, K.W., Choi, J.S., Yu, B.P. (2002)** Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech.* 59(4): 264-272. Review.

**Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., Leeuwenburgh, C. (2009)** Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 8(1): 18-30.

**Clark, B.D., Collins, K.L., Gandy, M.S., Webb, A.C., Auron, P.E. (1986)** Genomic sequence for human prointerleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.* 14(20): 7897–7914.

- Colón, E., Strand, M.L., Carlsson-Skwirut, C., Wahlgren, A., Svechnikov, K.V., Cohen, P., Söder, O. (2006)** Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis. *J Cell Physiol.* 208(2): 373-385.
- Costa, A., Toschi, A., Murfunì, I., Pelosi, L., Sica, G., Adamo, S., Scicchitano, B.M. (2014)** Local overexpression of V1a-vasopressin receptor enhances regeneration in tumor necrosis factor-induced muscle atrophy. *Biomed Res Int.* 2014: 235426.
- Cooney, R., Kimball, S.R., Eckman, R., Maish, G. 3rd, Shumate, M., Vary, T.C. (1999)** TNF-binding protein ameliorates inhibition of skeletal muscle protein synthesis during sepsis. *Am J Physiol.* 276(4 Pt 1): E611-619.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N., Johnson, R.S. (2003)** HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 112(5): 645-657.
- Crane, J.D., Devries, M.C., Safdar, A., Hamadeh, M.J., Tarnopolsky, M.A. (2010)** The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65(2): 119-128.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J. P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., Zamboni, M.; European Working Group on Sarcopenia in Older People. (2010)** Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 39(4): 412-423.
- Degens, H. (2010)** The role of systemic inflammation in age-related muscle weakness and wasting. *Scand J Med Sci Sports* 20: 28–38.
- Denton, R.M., McCormack, J.G. (1985)** Ca<sup>2+</sup> transport by mammalian mitochondria and its role in hormone action. *Am J Physiol.* 249(6 Pt 1): E543-554.
- Denton, R. M., McCormack, J. G. (1990)** Ca<sup>2+</sup> as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 451–466.
- Dirks, A.J., Leeuwenburgh, C. (2006)** Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem.* 17(8): 501-508.
- Duicu, O.M., Mirica, S.N., Gheorgheosu, D.E., Privistirescu, A.I., Fira-Mladinescu, O., Muntean, D.M. (2013)** Ageing-induced decrease in cardiac mitochondrial function in healthy rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 91(8): 593-600.
- Dülger, H., Alici, S., Sekeroğlu, M.R., Erkog, R., Ozbek, H., Noyan, T., Yavuz, M. (2004)** Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with gastrointestinal cancer. *Int J Clin Pract.* 58(6): 545-549.
- Eisele, P.S, Furrer, R., Beer, M., Handschin, C. (2015)** The PGC-1 coactivators promote an anti-inflammatory environment in skeletal muscle in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 464(3): 692–697.

- Faulkner, J.A., Larkin, L.M., Clafin, D.R., Brooks, S.V. (2007)** Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(11): 1091-1096.
- Ferguson-Smith, A.C., Chen, Y.F., Newman, M.S., May, L.T., Sehgal, P.B., Ruddle, F.H. (1988)** Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. *Genomics* 2 (3): 203–208.
- Finck, B.N., Kelly, D.P. (2006)** PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.*, 116, pp. 615–622.
- Fischer, C.P. (2006)** Interleukin- 6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 12, 6–33.
- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G.C., Salvioli, S. (2007)** Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 128(1): 92-105.
- Fuku, N., Pareja-Galeano, H., Zempo, H., Alis, R., Arai, Y., Lucia, A., Hirose, N. (2015)** The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity? *Aging Cell.* 14(6): 921-923.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Nguyen, H.P., Trumbeckaite, S., Vielhaber, S., Seppet, E., Zierz, S., Landwehrmeyer, B., Riess, O., von Hörsten, S., Striggow, F. (2008)** Impaired regulation of brain mitochondria by extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in transgenic Huntington disease rats. *J Biol Chem.* 283(45): 30715-30724.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Arandarcikaite, O., Jerzembek, D., Vielhaber, S., Seppet, E., Striggow, F. (2009)** Extramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the nanomolar range regulates glutamate-dependent oxidative phosphorylation on demand. *PLoS One.* 4(12): e8181.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Trumbeckaite, S., Nguyen, H.P., Pallas, T., Arandarcikaite, O., Vielhaber, S., Seppet, E., Striggow, F. (2010)** The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7): 1018-1027.
- Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Gainutdinov, T., Muth, K., Seppet, E., Orynbayeva, Z., Vielhaber, S. (2013)** The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal. *IUBMB Life.* 65(3): 180-190.
- Georgantas, R.W., Streicher, K., Greenberg, S.A., Greenlees, L.M., Zhu, W., Brohawn, P.Z., Higgs, B.W., Czapiga, M., Morehouse, C.A., Amato, A., Richman, L., Jallal, B., Yao, Y., Ranade, K. (2014)** Inhibition of myogenic microRNAs 1, 133, and 206 by inflammatory cytokines links inflammation and muscle degeneration in adult inflammatory myopathies. *Arthritis Rheumatol.* 66(4): 1022-1033.
- Gilde, A.J., Van Bilsen, M. (2003)** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): regulators of gene expression in heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 178(4): 425-434.

- Gong, Z., Tas, E., Muzumdar, R. (2014)** Humanin and age-related diseases: a new link? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5: 210.
- Goodman, M.N. (1991)** Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Am J Physiol*. 260 (5 Pt 1): E727-730.
- Goodman, M.N. (1994)** Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 205(2): 182-185.
- Gosker, H.R., van Mameren, H., van Dijk, P.J., Engelen, M.P., van der Vusse, G.J., Wouters, E.F., Schols, A.M. (2002)** Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.*, 19 pp. 617–625.
- Grimby, G. (1995)** Muscle performance and structure in the elderly as studied cross-sectionally and longitudinally. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 50 Spec No: 17-22.
- Guttridge, D.C., Mayo, M.W., Madrid, L.V., Wang, C.Y., Baldwin, A.S. Jr. (2000)** NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 289(5488): 2363-2366.
- Guzun, R., Kaambre, T., Bagur, R., Grichine, A., Usson, Y., Varikmaa, M., Anmann, T., Tepp, K., Timohhina, N., Shevchuk, I., Chekulayev, V., Boucher, F., Dos Santos, P., Schlattner, U., Wallimann, T., Kuznetsov, A.V., Dzeja, P., Aliev, M., Saks, V. (2015)** Modular organization of cardiac energy metabolism: energy conversion, transfer and feedback regulation. *Acta Physiol (Oxf)*. 213(1): 84-106.
- Haddad, F., Zaldivar, F., Cooper, D.M., Adams, G.R. (1985)** IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J. Appl. Physiol*. 98: 911–917.
- Haddad, J.J., Harb, H.L. (2005)** Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Int Immunopharmacol*. 5(3): 461-483. Review.
- Hagen, J.L., Krause, D.J., Baker, D.J., Fu, M.H., Tarnopolsky, M.A., Hepple, R.T. (2004)** Skeletal muscle aging in F344BN F1-hybrid rats: I. Mitochondrial dysfunction contributes to the age-associated reduction in VO<sub>2</sub>max. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 59(11): 1099-1110.
- Halse, R., Pearson, S.L., McCormack, J.G., Yeaman, S.J., Taylor, R. (2001)** Effects of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes* 50: 1102–1109.
- Hansford, R.G., Zorov, D. (1998)** Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem*. 184(1-2): 359-369.
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Ito, Y., Sudo, H., Hata, M., Arakawa, E., Abe, Y., Kita, Y., Nishimoto, I. (2001)** Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci*. 21(23): 9235-9245.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., Graeve, L. (1998)** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 334 (Pt 2): 297-314.

- Hepple, R.T. (2003)** Sarcopenia--a critical perspective. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003(46): pe31. Review.
- Hoeks, J., Schrauwen, P. (2012)** Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective. *Trends Endocrinol. Metab.*, 23 pp. 444–450.
- Hoene, M., Runge, H., Häring, H.U., Schleicher, E.D., Weigert, C. (2013)** Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol.* 304(2): C128-136.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., Spiegelman, B.M. (1994)** Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4854–4858.
- Jost, P.J., Ruland, J. (2007)** Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood.* 109(7): 2700-2707.
- Karin, M. (1999)** The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 274(39): 27339-27342. Review.
- Keller, E.T., Wanagat, J., Ersler, W.B. (1996)** Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1:d340-357. Review.
- Kontani, Y., Wang, Z., Furuyama, T., Sato, Y., Mori, N., Yamashita, H. (2002)** Effects of aging and denervation on the expression of uncoupling proteins in slow- and fast-twitch muscles of rats. *J Biochem.* 132(2): 309-315.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H. (2004)** Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* May;39(5): 687-699. Review.
- Kregel, K.C., Zhang, H.J. (2007)** An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanism, functional effects, and pathological considerations *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292, pp. R18–R36.
- Langen, R.C., Schols, A.M., Kelders, M.C., Van Der Velden, J.L., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M. (2002)** Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(3): C714-721.
- Langen, R.C., Schols, A.M., Kelders, M.C., Wouters, E.F., Janssen-Heininger, Y.M. (2001)** Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *FASEB J.* 15(7): 1169-1180.
- Larsson, L., Karlsson, J. (1978)** Isometric and dynamic endurance as a function of age and skeletal muscle characteristics. *Acta Physiol Scand.* 104(2): 129-136.
- Lee, Y., Kim, J.W., Lee, S.M., Kim, H.J., Lee, K.S., Park, C., Choe, I.S. (1998)** Cloning and expression of human adenylate kinase 2 isozymes: differential expression of adenylate kinase 1 and 2 in human muscle tissue. *J Biochem.* 123(1): 47-54.

**Lexell, J., Henriksson-Larsén, K., Winblad, B., Sjöström, M. (1983)** Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. *Muscle Nerve*. 6(8): 588-595.

**Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-408.

**Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., Lowell, B.B., Bassel-Duby, R., Spiegelman, B.M. (2002)** Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 418(6899): 797-801.

**Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B.M. (2005)** Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.*, 1, pp. 361–370.

**Mariappan, N., Soorappan, R.N., Haque, M., Sriramula, S., Francis, J. (2007)** TNF- $\alpha$ -induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293: H2726–2737.

**Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., Ralph, S.J., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R. (2009)** HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem*. 9(9): 1084-1101. Review.

**Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T.W., Lorenzi, M., Behnke, B.J., Leeuwenburgh, C. (2013)** Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*. 45(10): 2288-2301.

**Maximov, V., Martynenko, A., Hunsmann, G., Tarantul, V. (2002)** Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy. *Med Hypotheses*. 59(6): 670-673.

**Meng, S.J., Yu, L.J. (2010)** Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 11(4): 1509-1526.

**Michaud, M., Balardy, L., Moulis, G., Gaudin, C., Peyrot, C., Vellas, B., Cesari, M., Nourhashemi, F. (2013)** Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc*. 14(12): 877-882.

**Miljkovic, N., Lim, J.Y., Miljkovic, I., Frontera, W.R. (2015)** Aging of skeletal muscle fibers. *Ann Rehabil Med*. 39(2): 155-162.

**Miller, S.C., Ito, H., Blau, H.M., Torti, F.M. (1988)** Tumor necrosis factor inhibits human myogenesis in vitro. *Mol Cell Biol*. 8(6): 2295-2301.

**Moe, G.W., Marin-Garcia, J., Konig, A., Goldenthal, M., Lu, X., Feng, Q. (2004)** In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287: H1813–1820.

**Moretti, E., Giannerini, V., Rossini, L., Matsuoka, M., Trabalzini, L., Collodel, G. (2010)** Immunolocalization of humanin in human sperm and testis. *Fertil Steril*. 94(7): 2888-2890.

**Morley, J. E., Anker, S. D., von Haehling, S. (2014)** Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 5(4):253-9.

**Morley, J.E., Baumgartner, R.N, Roubenoff, R., Mayer, J., Nair, K.S. (2001)** Sarcopenia. *J Lab Clin Med*. Apr;137(4): 231-243.

**Morley, J.E. (2008)** Sarcopenia: diagnosis and treatment. *J Nutr Health Aging*. 12(7): 452-456. Review.

**Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B.K., Serrano, A.L. (2013)** Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J*. 280: 4131–4148.

**Muzumdar, R.H., Huffman, D.M., Calvert, J.W., Jha, S., Weinberg, Y., Cui, L., Nemkal, A., Atzmon, G., Klein, L., Gundewar, S., Ji, S.Y., Lavu, M., Predmore, B.L., Lefer, D.J. (2010)** Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(10): 1940-1948.

**Myer, A., Olson, E.N., Klein, W.H. (2001)** MyoD cannot compensate for the absence of myogenin during skeletal muscle differentiation in murine embryonic stem cells. *Dev Biol*. 229(2): 340-350.

**Neubauer, S., Horn, M., Cramer, M., Harre, K., Newell, J.B., Peters, W., Pabst, T., Ertl, G., Hahn, D., Ingwall, J.S., Kochsiek, K. (1997)** Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 96(7): 2190-2196.

**Niikura, T., Chiba, T., Aiso, S., Matsuoka, M., Nishimoto, I. (2004)** Humanin: after the discovery. *Mol Neurobiol*. 30(3): 327-340. Review.

**Pahl, H.L. (1999)** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18(49): 6853-6866. Review.

**Palomer, X., Alvarez-Guardia, D., Rodriguez-Calvo, R., Coll, T., Laguna, J.C., Davidson, M.M., Chan, T.O., Feldman, A.M., Vazquez-Carrera, M. (2009)** TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc. Res.*, 81, pp. 703–712.

**Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. (2008)** Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 88(4): 1379-1406.

**Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. (2012)** Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8, 457–465.

**Penninx, B.W., Kritchevsky, S.B., Newman, A.B., Nicklas, B.J., Simonsick, E.M., Rubin, S., Nevitt, M., Visser, M., Harris, T., Pahor, M. (2004)** Inflammatory markers and incident mobility limitation in the elderly. *J Am Geriatr Soc*. 52(7): 1105-1113.

**Peterson, C.M., Johannsen, D.L., Ravussin, E. (2012)** Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *J Aging Res*. 2012: 194821.

- Peterson, L.J., Flood, P.M. (2012)** Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2012: 401264.
- Picard, M., Ritchie, D., Wright, K.J., Romestaing, C., Thomas, M.M., Rowan, S.L., Taivassalo, T., Hepple, R.T. (2010)** Mitochondrial functional impairment with aging is exaggerated in isolated mitochondria compared to permeabilized myofibers. *Aging Cell.* 9(6): 1032-1046.
- Poks, S., Piirsoo, A. (2011)** Põletikutsütokiinide IL-1 $\beta$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$  mõju inimese müoblastide diferentseerumisele. *Eesti Arst.* 90 (Lisa 1), 59-59.
- Pääsuke, R., Eimre, M., Piirsoo, A., Peet, N., Laada, L., Kadaja, L., Roosimaa, M., Pääsuke, M., Märtsion, A., Seppet, E., Paju, K. (2016)** Proliferation of Human Primary Myoblasts Is Associated with Altered Energy Metabolism in Dependence on Ageing In Vivo and In Vitro. *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 8296150.
- Reid, M.B., Li, Y.P. (2001)** Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2(5): 269-272.
- Remels, A. H., Gosker, H. R., Verhees, K. J. P., Langen, R. C. J., Schols A. M. W. J. (2015)** TNF- $\alpha$ -Induced NF- $\kappa$ B Activation Stimulates Skeletal Muscle Glycolytic Metabolism Through Activation of HIF-1 $\alpha$ . *Endocrinology.* 156(5): 1770-1781.
- Remels, A.H., Gosker, H.R., Bakker, J., Guttridge, D.C., Schols, A.M., Langen, R.C. (2013)** Regulation of skeletal muscle oxidative phenotype by classical NF- $\kappa$ B signalling. *Biochim Biophys Acta.* 1832(8): 1313-1325.
- Remels, A.H., Gosker, H.R., Schrauwen, P., Hommelberg, P.P., Sliwinski, P., Polkey, M., Galdiz, J., Wouters, E.F., Langen R.C., Schols, A.M. (2010)** TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *FASEB J.*, 24, pp. 5052–5062.
- Remels, A.H., Schrauwen, P., Broekhuizen, R., Willems, J., Kersten, S., Gosker, H.R., Schols, A.M. (2007)** Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD. *Eur Respir J.* 30(2): 245-252.
- Roberts, D.J., Miyamoto, S. (2015)** Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ.* 22(2): 248-257.
- Rolland, Y., Czerwinski, S., Abellan, Van Kan G., Morley, J. E., et al. (2008)** Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J Nutr Health Aging.* Aug-Sep; 12(7): 433-450.
- Roubenoff, R. (2007)** Physical activity, inflammation, and muscle loss. *Nutr Rev.* 65(12 Pt 2): S208-212.
- Rue, N., Vissing, J., Galbo, H. (2013)** Insulin resistance and increased muscle cytokine levels in patients with mitochondrial myopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 99(10): 3757-3765.

**Saghizadeh, M., Ong, J.M., Garvey, W.T., Henry, R.R., Kern, P.A. (1996)** The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest.* 97(4): 1111–1116.

**Saks, V., Beraud, N., Wallimann, T. (2008)** Metabolic compartmentation - a system level property of muscle cells: real problems of diffusion in living cells. *Int J Mol Sci.* 9(5): 751-767.

**Sakuma, K., Yamaguchi, A. (2012)** Sarcopenia and age-related endocrine function. *Int J Endocrinol.* 2012:127362.

**Schrauwen, P., Hesselink, M. (2002)** UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism. *J Exp Biol.* 205(Pt 15): 2275-2285.

**Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten F. R., Krähn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C. and Karin, M. (2001)** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293(5534): 1495-1499.

**Sente, T., Van Berendoncks, A.M., Fransen, E., Vrints, C.J., Hoymans, V.Y. (2016)** Tumor necrosis factor- $\alpha$  impairs adiponectin signalling, mitochondrial biogenesis and myogenesis in primary human myotubes cultures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 26:ajpheart.00831.

**Senoo, N., Miyoshi, N., Goto-Inoue, N., Minami, K., Yoshimura, R., Morita, A., Sawada, N., Matsuda, J., Ogawa, Y., Setou, M., Kamei, Y., Miura, S. (2015)** PGC-1 $\alpha$ -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. *J Lipid Res.* 56(12): 2286-2296.

**Seppet, E., Gruno, M., Peetsalu, A., Gizatullina, Z., Nguyen, H.P., Vielhaber, S., Wussling, M.H., Trumbeckaite, S., Arandarcikaite, O., Jerzembeck, D., Sonnabend, M., Jegorov, K., Zierz, S., Striggow, F., Gellerich, F.N. (2009)** Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 10(5): 2252-2303.

**Shachar, I., Karin, N. (2013)** The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications. *J Leukoc Biol.* 93(1): 51-61.

**Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., Nair, K.S. (2005)** Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(15): 5618-5623.

**Stern-Straeter, J., Bonaterra, G.A., Hörmann, K., Kinscherf, R., Goessler, U.R. (2009)** Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts. *BMC Mol Biol.* 10: 66.

**Szalay, K., Razga, Z., Duda, E. (1997)** TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. *Eur J Cell Biol* 74: 391–398.

**Tajima, H., Niikura, T., Hashimoto, Y., Ito, Y., Kita, Y., Terashita, K., Yamazaki, K., Koto, A., Aiso, S., Nishimoto, I. (2002)** Evidence for in vivo production of Humanin peptide,

a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Lett.* 324(3): 227-231.

**Tarrend, M. (2014)** Raku energeetilist seisundit reguleerivate geenide ekspressiooni hindamine reaalaaja-PCR abil. *Bakalaureusetöö.*

**Tarrend, M., Jääskeläinen, J., Roosimaa, M., Kadaja, L. (2014)** Endoplasmaatilise retiikulumi stressiga kaasnevad kreatiinkinaasse energiaülekandesüsteemi muutused skeletilihastes. *Eesti Arst: 93 (Lisa 1), 26-26.*

**Tepp, K., Timohhina, N., Puurand, M., Klepinin, A., Chekulayev, V., Shevchuk, I., Kaambre, T. (2016)** Bioenergetics of the aging heart and skeletal muscles: Modern concepts and controversies. *Ageing Res Rev.* 28: 1-14.

**Thompson, R.W., McClung, J.M., Baltgalvis, K.A., Davis, J.M., Carson, J.A. (2006)** Modulation of overload-induced inflammation by aging and anabolic steroid administration. *Exp Gerontol.* 41(11): 1136-1148.

**Tsujinaka, T., Fujita, J., Ebisui, C., Yano, M., Kominami, E., Suzuki, K., Tanaka, K., Katsume, A., Ohsugi, Y., Shiozaki, H., Monden M. (1996)** Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest.* 97(1): 244-249.

**Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., Hotamisligil, G.S. (1997)** Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-614.

**Verdijk, L.B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H.H., van Loon, L.J. (2007)** Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(1): E151-157.

**Warren, G.L., Hulderman, T., Jensen, N., McKinstry, M., Mishra, M., Luster, M.I., Simeonova, P.P. (2002)** Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 16(12): 1630-1632.

**Welle, S., Bhatt, K., Shah, B., Needler, N., Delehanty, J.M., Thornton, C.A. (2003a)** Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. *J Appl Physiol.* 94(4): 1479-1484.

**Welle, S., Brooks, A.I., Delehanty, J.M., Needler, N., Thornton, C.A. (2003b)** Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics.* 14(2): 149-159.

**Wiggers, H., Noreng, M., Paulsen, P.K., Böttcher, M., Egeblad, H., Nielsen, T.T., Bøtker, H.E. (2001)** Energy stores and metabolites in chronic reversibly and irreversibly dysfunctional myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol.* 37(1): 100-108.

**Zammit, P.S., Partridge, T.A., Yablonka-Reuveni, Z. (2006)** The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J Histochem Cytochem.* 54(11): 1177-1191.

**Zhang, C., Liu, V.W., Addressi, C.L., Sheffield, D.A., Linnane, A.W., Nagley, P. (1998)** Differential occurrence of mutations in mitochondrial DNA of human skeletal muscle during aging. *Hum Mutat.* 11(5): 360-371.

**Zhang, J.-M., An, J. (2007)** Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 45(2): 27–37.

**Zhang, H., Kong, X., Kang, J., Su, J., Li, Y., Zhong, J., Sun L. (2009)** Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol Sci.* 110(2): 376-388.

**Zhang, X., Urbietta-Caceres, V.H., Eirin, A., Bell, C.C., Crane, J.A., Tang, H., Jordan, K.L., Oh, Y.K., Zhu, X.Y., Korsmo, M.J., Bachar, A.R., Cohen, P., Lerman, A., Lerman, L.O. (2012)** Humanin prevents intra-renal microvascular remodeling and inflammation in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Life Sci.* 91(5-6): 199-206.

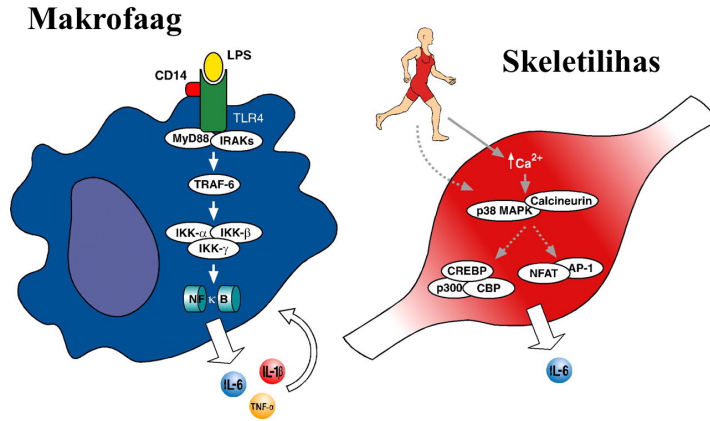
**Zhao, S.T., Zhao, L., Li, J.H. (2013)** Neuroprotective Peptide humanin inhibits inflammatory response in astrocytes induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res.* 38(3): 581-588.

**Yilmaz, V., Oflazer, P., Aysal, F., Parman, Y.G., Direskeneli, H., Deymeer, F., Saruhan-Direskeneli, G. (2015)** B cells produce less IL-10, IL-6 and TNF- $\alpha$  in myasthenia gravis. *Autoimmunity.* 48(4): 201-207.

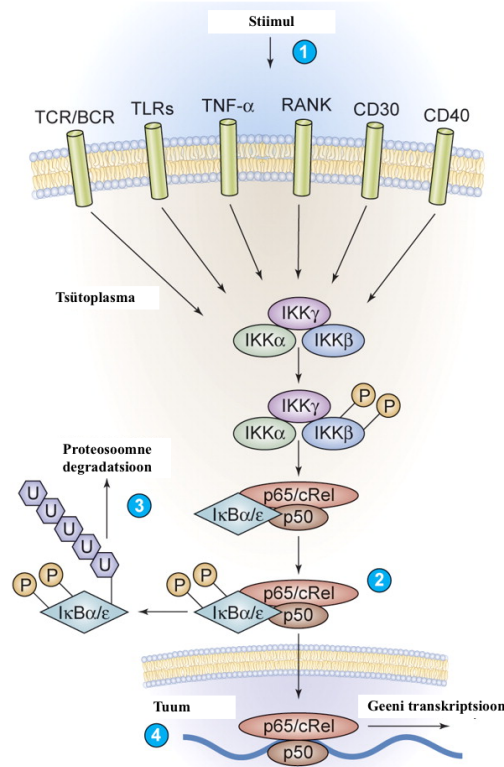
## **KASUTATUD RAAMATUD**

Bogovski, P., Kull, R. 2004. Meditsiinisõnastik. *Medicina* 794:2004.

# LISAD



**Lisa 1. Põletikureaktsiooni kaskaad makrofaagis ja kontraheerivas skeletilihases.** Põletikutsütokiinide TNF- $\alpha$ , IL-1 ja IL-6 transkriptsiooni reguleerib TLR retseptorist alguse saav signaaliülekanne rada, mille tulemusena aktiveeritakse NF- $\kappa$ B, viimane liigub tuuma ja reguleerib põletikutsütokiinidega seotud geenide transkriptsiooni (Pedersen ja Febbraio, 2008; kohandatud).



**Lisa 2. NF- $\kappa$ B proinflammatoorseid vastuseid vahendav kanooniline signaalirada.** NF- $\kappa$ B on tsitoplasmas inaktiivses olekus seotuna oma inhibiitorvalguga I $\kappa$ B $\alpha$ . Stiimulite mõjul toimub rakusiseses signaalikaskaadi aktivatsioon, mille käigus fosforüülitakse I $\kappa$ B kinaaside poolt I $\kappa$ B $\alpha$ , mis peale seda suunatakse lagundamisele. Vaba NF- $\kappa$ B liigub tuuma reguleerib erinevate geenide transkriptsiooni (Jost ja Ruland, 2007; kohandatud).

## STENDIETTEKANDED

### ÜLIÕPILASED

#### P15. Endoplasmaatilise retiikulumi stressiga kaasnevad kreatiinkinaase energia-ülekanandesüsteemi muutused skeletilihastes

Marian Tarrend<sup>2,4</sup>, Juuso Jääskeläinen<sup>1,3</sup>, Mart Roosimaa<sup>3,5</sup>, Lumme Kadaja<sup>3</sup> – <sup>1</sup>arstiteaduse üliõpilane, <sup>2</sup>geenitehnoloogia üliõpilane, <sup>3</sup>TÜ bio- ja siirdemeditiini instituut, <sup>4</sup>TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituut, <sup>5</sup>doktorant

**TAUST.** Vaatamata sellele, et skeletilihased vastutavad suuresti glükoosi kasutamise eest ja on seega tihedalt seotud haiguslike seisunditega (nt diabeet ja ülekaalulisus), ei leidu lihaskude kohta endoplasmaatilise retiikulumi (ER) stressiga seoses kuigi palju teavet. Eri stressi on aga seostatud vanaemisega kaasneva sarkopeeniaga [Deldicque, 2013]. Lihased sisaldavad ulatuslikku ER võrgustikku, mida nimetatakse sarkoplasmaatiliseks retiikulumiks (SR). Kuna kontraktsioonil toimub SRi lumenist reguleeritud kaltsiumi vabanemine, mistõttu seal peab säilima optimaalne Ca<sup>2+</sup> kontsentratsioon, siis kaasnevad SRi talitluse häiretega kontraktsioonikahjustused. SRi kaltsiumipumbaga (Ca<sup>2+</sup>-ATPaas, SERCA) kolokaliseerub lihastüüpi kreatiinkinaas (CKM), et kindlustada Ca<sup>2+</sup>-ioonide pumpamiseks vajaliku energiaallika – adenosiintrifosfaadi (ATP) – regenereerimist fosfokreatiini [Rossi jt, 1990; Wallimann jt, 1992]. ATP on vajalik ka teiste Eri protsesside (disulfiidsildade moodustumine valkude kokkupakkimisel, valkude glükosüleerimine jt) toimumiseks [Vishnu jt, 2010]. Seetõttu on CKMi ekspressioon ja lokaliseerumine SRi kompartmentis sealse Ca<sup>2+</sup>-ATPaasiga funktsionaalse seose tagamiseks väga oluline.

**EESMÄRK.** Hinnata CKMi ekspressiooni volframiini-puudulikkusega kaasneva Eri stressi ja vananemisega kaasneva sarkopeenia tingimustes.

**MATERJAL JA MEETODID.** Uuriti transgeensete volframiini-puudulikkusega (Wfs1) hiirte ja vanade inimeste (70–80aastased) sarkopeenilisi nelipealihaseid. Kontrollrühmade lihaskude pärinesid vastavalt Wfs1 hiirte muutmata genoomiga pesakonnakaaslastelt või noortelt inimestelt (20–30aastased). Geenide ekspressioonitasemed määrati reaalkaaja-PCR-meetodil.

**TULEMUSED.** Wfs1-hiirte lihastes oli Ckm geeni ekspressioonitase kontrollrühmast üle kahe korra madalam ( $p < 0,05$ ). Mitokondriaalset kreatiinkinaasi kodeeriva Ckmt2 tase oluliselt ei erinenud ( $p > 0,05$ ). Sarkopeeniaga kaasnes nii CKM geeni kui ka CKMT2 geeni alaekspressioon.

**JÄRELDUSED.** Tulemused näitavad, et Eri/SRi stressiga kaasneva Ckm/CKM geeni alaekspressiooni tõttu väheneb SRi kreatiinkinaasi võime fosforüülda SRi Ca<sup>2+</sup>-ATPaasi produtseeritud adenosiindifosfaati (ADP), mistõttu võib tekkida lokaalne ATP-defitsiit ning seetõttu kahjustada energiat tarbivad SRi-seoselised protsessid.

#### P16. Erinevate oklusioonikapede efektiivsuse võrdlus alalõualiigese patoloogiate puhul

Arko Lepik<sup>1,2</sup>, Krislin Tukia<sup>1,2</sup>, Jaan Ereline<sup>3</sup>, Dagmar Piikov<sup>2</sup>, Mati Pääsuke<sup>3</sup>, Ülle Voog-Oras<sup>2</sup> – <sup>1</sup>hambaarstiteaduse üliõpilane, <sup>2</sup>TÜ stomatoloogia kliinik, <sup>3</sup>TÜ spordibioloogia ja füsioteraapia instituut

**TAUST.** Valu mälumislihastes ja alalõualiigestes mõjutab oluliselt patsientide igapäevase eluga toimetulekut. Enam levinud konservatiivse ravi meetodiks on oklusioonikapede kasutamine.

**EESMÄRK.** Selgitada välja prefabritseeritud meditsiinilise kape ja prefabritseeritud spordikape efektiivsus mälumislihaste müalgia diagnoosiga patsientidel.

**MATERJAL JA MEETODID.** Uuringus osales 20 patsienti (18 naist, 2 meest) vanuses 21–26 aastat, kellel esines mälumislihaste valutikkus. Teostati alalõualiigese ja mälumislihaste kliiniline hindamine ning täideti igapäevaste toimingute (ADL) küsimustik. Patsientidele selgitati kapede kasutamist. Kümme patsienti kasutas prefabritseeritud spordikapet (PSK) ja ülejäänud kasutasid prefabritseeritud meditsiinilist kapet (PMK). Kapede kasutamise aeg oli keskmiselt 28 päeva.

**TULEMUSED.** Igapäevase elutegevuse piiranguid esines erineval määral kõikidel patsientidel. Suu maksimaalne avamine uuringu alguses ja lõpus oluliselt ei erinenud (54 mm ja 52 mm). Uuringu alguses ja lõpus esines pressoorse valu hindamisel oluline seos parema ja vasaku *m. masseter*'i vahel ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ). Uuringu alguses esines parema ja vasaku külgliigutuste vahel oluline seos ( $p < 0,001$ ). Uuringu lõpus esines seos suu maksimaalse avamise ja külgliigutuste vahel paremale ( $p = 0,012$ ) ja vasakule ( $p = 0,014$ ). Uuringu lõpus olid ADL-skaala näidud vähenenud nii PSK kui ka PMK kape kasutajatel.

**JÄRELDUSED.** Uuringust järeldub, et prefabritseeritud spordikapede toime efektiivsus võrreldes prefabritseeritud meditsiiniliste kapedega on lühiajalisel kasutusel sarnane. Uurimuse tulemuste põhjal võib järeldada, et spordikape on võimalik alternatiivne abivahend müalgia leevendamiseks lühiajalise kasutamise korral.

## TÄNUAVALDUSED

Minu magistritööd finantseeriti järgmiste projektide raames:

- IUT raames finantseeritud teadusprojekt „Luu- ja lihaspatoloogiate siirdeuringud“;
- praeguseks lõppenud Euroopa Liidu 7. raamprogrammi projekt MARMP09022 “MYOAGE – Eaga seotud lihasnõrkuse mõistmine ja sellega võitlemine”;
- ETF poolt finantseeritud teadusteema „Raku energeetiline puudulikkus kui südame- ja skeletilihase haiguste alus ja kaitsemehhanismide sihtmärk.“

Täna dots. Andres Piirsood ja tema töögruppi rakukultuuride valmistamise, mikroskoopia ja morfoloogilise analüüsi andmete eest.

Suur aitäh juhendajatele Lumme Kadajale ja Lilian Kadaja-Saarepuule igakülgse abi ja asjalike nõuannete eest!

## LIHTLITSENTS

### Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marian Tarrend

(sünnikuupäev: 05.02.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose “Proinflammatoorsete tsütokiinide toime lihasrakkudele: transkriptsioonilised muutused ja nende seos sarkopeeniaga”,

mille juhendajad on Lumme Kadaja ja Lilian Kadaja-Saarepuu,

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

Tartus, 27.05.2016