

Monokarboksylaattikuljettajaisoformien MCT1 ja MCT4
ilmentyminen sian mahassa ja ohutsuolessa

Jussi Pakkanen

Syventävien opintojen tutkielma 2009

Helsingin yliopisto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Peruseläinlääketieteen laitos

Eläinlääketieteellisen fysiologian oppiaine

Sisällysluettelo	
1. Johdanto	3
2. Kirjallisuuskatsaus	3
2.1. Sian ruoansulatus	3
2.1.1. Sian rehut	3
2.1.2. Ruokasulan liikkuminen ruoansulatuskanavassa	5
2.1.3. Ravintoaineiden pilkkoutuminen ja imeytyminen sian ruoansulatuskanavassa	7
2.1.3.1. Hiilihydraatit	7
2.1.3.2. Proteiinit	8
2.1.3.3. Rasvat	8
2.1.4. Orgaanisten happojen muodostuminen sian ruoansulatuskanavassa	9
2.2. Monokarboksylaattikuljettajat ravintoaineiden imeytymisessä	11
2.2.1. Yleistä monokarboksylaattikuljettajista	12
2.2.2. Monokarboksylaattikuljettajien merkitys maitohapon ja haihtuvien rasvahappojen imeytymisessä	14
3. Aineisto ja menetelmät	16
3.1. Aineisto	16
3.2. Näytteenotto ja -käsittely	16
3.3. Kudosten homogenisointi ja proteiinipitoisuuden mittaaminen	17
3.4. MCT-proteiinien mittaaminen	18
4. Tulokset	20
4.1. MCT1	20
4.2. MCT4	22
5. Pohdinta	24
6. Kirjallisuusluettelo	27

1 JOHDANTO

Tämän tutkielman tarkoituksena oli selvittää monokarboksylaattikuljettajaisoformien MCT1 sekä MCT4 ilmentymistä sian mahassa ja ohutsuolessa. Tämä on ensimmäinen kerta kun sian mahalaukusta on määritetty MCT-proteiineja ja ensimmäinen kerta kun sian ohutsuolessa on systemaattisesti mitattu MCT-proteiineja koko ohutsuolen alueelta. Mahassa kudokset otettiin sekä proksimaalisesta, rauhasettomasta osasta, että distaalista, rauhasellisesta osasta. Ohutsuolessa kudokset otettiin tasaisin välimatkoin selvittääksemme onko ilmenemisessä eroja eri suolen osien välillä.

Kirjallisuuskatsauksen ensimmäisessä osassa esitellään yleisellä tasolla sian ravinnon laatua, ruoansulatuselimistön fysiologiaa sekä orgaanisten happojen muodostumista ruoansulatuskanavassa. Kirjallisuuskatsauksen toisessa osassa esitellään keskeisimmät monokarboksylaattikuljettajat ja arvioidaan näiden osuutta maitohapon sekä haihtuvien rasvahappojen imeytymisessä.

Tässä tutkimuksessa saatuja tuloksia on esitelty jo aiemmin osana tieteellistä artikkelia (Sepponen ym. 2007). Kyseisessä artikkelissa on lisäksi esitelty tämän tutkimuksen näytteille tehtyjä jatkomäärittämiä MCT2:n ja kaitsijaproteiini CD147:n osalta.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1. Sian ruoansulatus

2.1.1. Sian rehut

Kaikkiruokainen sika pystyy käyttämään ravinnokseen hyvin monenlaista ravintoa. Suomessa sianrehujen perustana ovat kotimaiset viljat, tärkeimpänä ohra. Ne riittävät energianlähteeksi ja vastaavat noin puolta sian aminohappotarpeesta. Vilja on aina murskattava tai jauhettava ennen ruokintaa, koska siat eivät pureskele rehua niin hyvin, että ravintoaineet sulaisivat yhtä tehokkaasti kokonaisista jyvistä. Jauhatustavalla ja

myllyn säädöillä voidaan vaikuttaa rehun partikkelikokoon ja tätä kautta muun muassa viljan sulavuuteen ja kulkeutumiseen sian ruoansulatuselimistössä.

Viljojen suhteellisen vähäistä valkuaispitoisuutta kompensoimaan sikojen ruokinnassa käytetään niin sanottuja valkuaisrehuja. Näitä ovat muun muassa palkoviljojen ja öljykasvien siemenet, öljykasvi-, meijeri-, teurastamo-, elintarvike- ja kalateollisuuden sivutuotteet sekä kuivatut rehuhiivat.

Teolliset rehut ovat sikojen ruokinnassa tarpeellisia kotoisten raaka-aineiden täydentämiseksi. Näihin rehuihin voidaan varsinaisten rehuraaka-aineiden lisäksi lisätä pieniä määriä rehuaranteita, kuten aminohappoja (lysiini, metioniini ja treoniini), entsyymejä (fytaasi) sekä probiootteja (maitohappobakteerit ym.). Lysiini, metioniini ja treoniini ovat sialle välttämättömiä aminohappoja, joiden lisääminen kotoisiin rehuihin parantaa niiden valkuaiskoostumusta. Fytaasin lisääminen parantaa viljojen fytaattimuotoisen fosforin sulavuutta. Probioottien käytöllä pyritään korvaamaan rehuissa aiemmin käytettyjen antibioottien vaikutusta.

Nykyaikainen sikojen ruokinta ottaa huomioon myös karkearehujen merkityksen hyvinvoinnin edistämässä sekä suoliston mikrobikannan säätelyssä. Kuitupitoisia karkearehuja sialle ovat muun muassa nurmi, säilörehu, kuiva heinä, oljet sekä juurekset. Kuidun anto vähentää mahahaavan riskiä ja toimii mahantäyteenä etenkin joutilasemakoille sekä virikkeenä kaikille sioille. Oljen orgaanisesta aineesta ja kuidusta sian suolistossa sulaa vain noin 10-15%, joten sen arvo on suurempi hyvinvoinnillisesti ajanvietteenä ja pehmikkeenä kuin ravitsemuksellisesti.

Sikojen ruokintakertojen määrä vuorokaudessa mitoitetaan sen mukaan, missä tuotantovaiheessa eläin on. Joutilaille emakoille riittää kaksi ruokintakertaa päivässä. Imettävät emakot tulisi ruokkia kolme kertaa päivässä, lihasiat 3-4 kertaa päivässä.

Rehu voidaan tarjota sialle joko kuiva- tai liemiruokana. Nestemäisissä rehuissa pH on luontaisesti alhainen maitohappokäymisen ansiosta. Lisäksi jos käytetään elintarviketeollisuuden nestemäisiä sivutuotteita, kuten ohravalukuaisrehuja (pH<4), laskee seoksen pH entisestään näissä säilöntäaineina käytettävien muurahaishapon ja natriumbentsoatin ansiosta. Käyminen myös saa aikaan rehuseoksen lämpenemisen,

jolloin maittavuus sialle paranee. Liemirehuseos pyritään tekemään täydennysrehujen (vilja, tiivisteet) avulla tasapainoiseksi sian ruokintaan ja pH-optimi 4,8 (4-5) saavutetaan esimerkiksi liemeen lisättävän muurahaishapon avulla.

2.1.2. Ruokasulan liikkuminen ruoansulatuskanavassa

Ruoansulatusprosessi alkaa suusta, jossa ruokaa lämmitetään, hienonnetaan ja siihen sekoittuu sylkeä. Sian hampaistossa näkyy historia sekaravintoa syövän ja maata tonkivan villisian ajalta. Nykyisessä siankasvatuksessa rehut ovat valmiiksi melko hienonnettuja ja energiarikkaita, jolloin ravinnon pureskeluaika on lyhyt karkearehuja lukuunottamatta ja pureskelun merkitys sian ruoansulatuksen kannalta vähäinen.

Suuontelosta nielty ravinto siirtyy ruokatorvea pitkin mahaan, jonka tärkein tehtävä on ruokasulan varastointi ja annostelu pieninä erinä ohutsuoleen. Täysikasvuisen sian mahalaukun tilavuus on noin 8 litraa. Mahassa ravinto sekoittuu mahanesteiden kanssa vellimäiseksi, mikä on tarkoituksenmukaista tehokkaan digestion ja absorption kannalta. Viimeksi niellyt ainekset sijoittuvat mahan proksimaali- ja keskiosaan ja aiemmin syödyt levittäytyvät distaaliosaan ja reunoille. Mahan peristaltiikan ansiosta ruokasula lopulta sekoittuu ja siirtyy sopivina annoksina ohutsuoleen.

Rehun viipymäaikaan ruoansulatuselimistössä vaikuttavat rehun ominaisuudet sekä ruokintataso ja -välit. Sian mahassa ruokasulan viipymä on keskimäärin muita kotieläimiä pidempi. Sian mahalaukun tyhjeneminen on karkeasti ottaen kaksivaiheinen ja sen ensimmäinen nopea vaihe alkaa jo 2 minuutin viiveen jälkeen syömisen aloittamisesta ja jatkuu vaihtelevan pituisen ajan (Gregory ym. 1990). Kiinteä ravinto viipyy mahalaukussa pidempään kuin nestemäinen (Gregory ym. 1990; Clemens ym. 1975). Ruokailun aikana sekä kiinteän että nestemäisen ravinnon siirtyminen mahalaukusta ohutsuoleen noudattaa lineaarista kaavaa, kun taas syömisen loputtua sekä kiinteän että nestemäisen ravinnon poistuminen mahalaukusta hidastuu eksponentiaalisesti (Gregory ym. 1990). Nestemäisestä ravinnosta yli 50 % on ohittanut mahalaukun 2 tunnin kuluttua syömisestä (Clemens ym. 1975) ja 3 tunnin kuluessa lähes kaikki neste on poistunut mahalaukusta (Gregory ym. 1990). Kiinteän ruoan viipymään mahassa vaikuttaa rehun partikkelikoko siten, että karkeimmat ainekset viipyvät mahassa pisimpään. Erittäin karkeista partikkeleista (1 cm) noin 25 % on vielä

mahalaukussa vuorokauden kuluttua ruokailusta (Clemens ym. 1975). Hienojakoinen jauho viipyy mahassa noin 4 tuntia. Joidenkin kuitupitoisten ainesosien, kuten vehnäleseiden, lisääminen rehuun hidastaa mahan tyhjenemistä (Rainbird & Low 1986). Endokrinologisista tekijöistä ainakin kolekystokiniini (CCK) ja somatostatiini vaikuttavat mahan tyhjenemistä nopeuttavasti ruokailujen välillä (Gregory ym. 1995). Stressin vaikutusta sian mahan tyhjenemisnopeuteen ei ole tutkittu, mutta useissa kokeissa ihmisillä ja eläimillä on havaittu stressin vaikuttavan hidastavasti mahan tyhjenemiseen pääosin hypotalamuksen kortikoliberiinierityksen (CRH) suoran hermostollisen vaikutuksen seurauksena (Plourde 1999).

Ohutsuolen lihassupistusten tehtävänä on sekoittaa suolen sisältöä ja kuljettaa sitä eteenpäin maha-suolikanavassa. Suolen sisällön liikkeen voi jakaa karkeasti kahteen kategoriaan: segmentaatio ja peristaltiikka. Segmentaatiossa suolen poikittainen lihaskerros supistaa suolen pienellä alueella rengasmaisesti ja muodostaa suolen sisältöön segmenttejä. Seuraavat supistumiset tapahtuvat näiden segmenttien keskiosissa ja suolen sisältö sekoittuu näin tehokkaasti eteen- ja taaksepäin liikkuen. Samalla ruoansulatusentsyymit sekoittuvat massaan ja uutta suolen sisältöä joutuu kosketuksiin absorboivan epiteelin kanssa. Kun mahasta tulee uutta sisältöä suoleen, seuraa intensiivinen segmentaatiojakso, jota pian seuraa segmentaation hiipuminen ja peristaltiikan alkaminen. Jatkuva segmentaation ja lievän peristaltiikan vuorottelu vie suolen sisältöä pikkuhiljaa eteenpäin ja sallii aikaa ravintoaineiden imeytymiseen. Koska sian ohutsuoli on pitkä (noin 16-21 metriä), jakaantuu mahasta tullut sisältö kapeaksi nauhaksi, eikä ohutsuoleen ei kerry merkittävästi suolen sisältöä (Clemens ym. 1975; Meulen & Bakker 1991).

Sen sijaan suolen sisältöä kertyy paksusuoleen, jossa ruokasula voi viipyä jopa 60 tuntia (Clemens ym. 1975). Sisällön liikkeen paksusuoleessa tuleekin olla hidasta, jotta mikrobidigestiolle jää kylliksi aikaa. Täysikasvuisen sian paksusuolen pituus on noin viisi metriä. Paksusuolen segmentaatio muistuttaa ohutsuolessa tapahtuvaa, vaikkakin liikkeet ovat harvemmassa. Umpisuoleessa segmentaation keskeyttää 3-5 minuutin välein massaperistaltiikka, jolloin suurempi osa suolta supistuu yhtä aikaa ja umpisuolen sisältöä puristuu kooloniin. Koolonissa lihassupistukset jaetaan segmenttaatioon, peristaltiikkaan sekä antiperistaltiikkaan. Paksusuolen liikkeet vahvistuvat ruokailun aikana hermostollisten refleksien sekä endokrinologisten tekijöiden vaikutuksesta ja

uudelle sisällölle tulee tilaa maha-suolikanavaan. Sian peräsuoli on suuren osan aikaa tyhjiään. Kun paksusuolen liikkeet pakottavat suolen sisältöä peräsuoleen, sen seinämän paineelle herkistyneet solut saavat aikaan defekaatioprosessin alkamisen.

2.1.3. Ravintoaineiden pilkkoutuminen ja imeytyminen sian ruoansulatuskanavassa

Sika muistuttaa ruoansulatuskanavan rakenteeltaan ja toiminnaltaan ihmistä. Samankaltaisuus ylittää jopa ruoansulatuskanavan toimintaa ohjaaviin hormonaalisiin ja hermostollisiin mekanismeihin. Kuitenkin sialla umpisuoli on kehittynyt toisin kuin ihmisellä ja myös muu paksusuoli on kehittyneempi kasviravinnon hyväksikäytössä.

2.1.3.1. Hiilihydraatit

Hiilihydraatit muodostavat suurimman osan sian rehuista. Tärkein sianrehun hiilihydraatti on tärkkelys, jota sika sulattaa erittäin tehokkaasti. Muita rehusta saatavia hiilihydraatteja ovat kasvien soluseinien polysakkaridit eli kuidut. Sian sylki sisältää ruoansulatusentsyymejä, kuten amylaasia, lipaasia, maltaasia, fosfataasia ja peroksidaasia. Näistä merkityksellinen on kuitenkin vain amylaasi, joka aloittaa tärkkelyksen pilkkomisen maltoosiksi, maltotriiosiksi ja erilaisiksi dekstriineiksi.

Mahassa happamuus estää amylaasin toiminnan, mutta hiilihydraattien pilkkoutuminen voi jatkua jonkin aikaa fermentaation avulla, jolloin sokeista, tärkkelyksestä ja kuiduista muodostuu mikrobitoiminnan tuloksena maitohappoa sekä haihtuvia rasvahappoja. Mahan happamuudessa maitohappo sekä haihtuvat rasvahapot ovat pääasiallisesti dissosioitumattomassa muodossaan ja imeytyvät helposti diffuusion avulla verenkiertoon.

Ohutsuolen alkuosaan erittyy haimanesteen mukana amylaasia, joka jatkaa tärkkelyksen pilkkomista. Lisäksi ohutsuolen seinämä tuottaa karbohydraasi-entsyymejä, kuten laktaasia, trehalaaseja ja useita eri maltaaseja. Ohutsuolessa disakkaridit hajoavat monosakkarideiksi. Suurin osa rehuperäisistä hiilihydraateista imeytyy monosakkarideina verenkiertoon ohutsuolessa. Glukoosin, galaktoosin ja fruktoosin imeytymisnopeus on sialla huomattavasti muita monosakkarideja suurempi. Yli 90 % rehun sokereista ja tärkkelyksestä imeytyy ohutsuolessa, vajaat 10 % paksusuolessa.

Ohutsuolessa sulamatta jääneet hiilihydraatit joutuvat paksusuoleen, jossa voimakas mikrobifermentaatio muodostaa niistä haihtuvia rasvahappoja. Paksusuolen lähes neutraalin pH:n vuoksi haihtuvat rasvahapot ovat dissosioituneessa muodossa ja pystyvät imeytymään merkittävässä määrin vain erityisten kuljettajajärjestelmien avulla.

2.1.3.2. Valkuaisaineet

Sika pystyy käyttämään rehun valkuaisista vaihtelevasti hyväkseen. Maitopohjaisilla rehuilla on hyvä raakavalkuaisen sulavuus (90 %), kasvipohjaisissa valkuaisrehuissa se on 65-85 % ja huonoimmillaan sulavuus on paljon kuitua sisältävissä rehuissa.

Rehun valkuaisaineiden hajoaminen alkaa mahassa pepsiinin vaikutuksesta. Ohutsuolessa haimanesteen trypsiini, kymotrypsiini sekä karboksipeptidaasit jatkavat valkuaisaineiden pilkkomista pienemmiksi peptideiksi. Ohutsuolen seinämän aminopeptidaasit osallistuvat myös valkuaisaineiden hajoitukseen. Valkuaisaineet imeytyvät yksittäisinä aminohappoina tai lyhytketjuisina peptideinä verenkiertoon. Noin 95 % valkuaisesta imeytyy sian ohutsuolessa.

Paksusuoleen joutuneet imeytymättömät valkuaisaineet sekä endogeeniset typpelliset aineet muuttuvat mikrobifermentaation tuloksena ammoniakiksi/amiineiksi ja amideiksi tai joutuvat sulamattomana sontaan. Mikrobit käyttävät paksusuoleessa syntynyttä ammoniakkia omaan valkuaisuotantoon ja osa ammoniakista imeytyy myös verenkiertoon.

2.1.3.3. Rasvat

Sian ravinnosta saatavan rasvan tarve käsittää välttämättömät rasvahapot eli linoli-, linoleiini- ja öljyhapon. Triglyseridit muodostavat suurimman osan rehun rasvoista, lisäksi rehussa on fosfolipidejä, steroleja ja steroliestereitä. Rasvojen imeytyminen alkaa ohutsuolessa, jossa sappihapot fyysisesti emulsifioivat rasvoja ennen kuin haimanesteen lipaasi pystyy pilkkomaan triglyserideistä vapaita rasvahappoja ja monoglyseridejä. Lähes kaikki rehun sulava rasva imeytyy ohutsuolessa imusuonistoon ja tätä kautta verenkiertoon. Paksusuoleessa rasvan imeytyminen on vähäistä.

2.1.4. Orgaanisten happojen muodostuminen sian ruoansulatuskanavassa

Mahan proksimaaliosan cardia on sialla muista kotieläimistä poiketen laaja, käsittäen noin puolet mahalaukun pinta-alasta. Tässä osassa epiteeli on limaa erittävää. Mahanestettä ei cardiassa juuri erity, vaan ravinto varastoidaan sinne myöhempää digestiota varten. Mahan distaaliosa muodostuu funduksesta, corpuksesta ja pyloruksesta. Pääosa mahanesteen erityksestä tapahtuu funduksessa ja corpuksessa olevista rauhasista. Sialla mahanesteen erityks on tasaisempaa kuin muilla yksimahaisilla, koska sen mahaan varastoituu rehua pidemmäksi aikaa.

Viimeksi mahaan saapuneet ainekset sijoittuvat sentraalisesti mahan keskiosaan ja aiemmin syödyt levittäytyvät distaaliosaan sekä reunoille. Viimeisimpänä nielty ruoka kertyy kerroksittain, eikä mahan proksimaaliosan heikkojen supistusten vuoksi sekoitu heti muun mahansisällön kanssa. Tällöin sian mahansisältöön syntyy alueita, joissa pH on suhteellisen korkea, jopa 5,5 (Argenzio & Southworth 1974) ja rehun fermentaatio on mahdollista. Sikojen rehu sisältää luontaisesti vaihtelevia määriä fermentaatioon kykeneviä mikrobeja, kuten maitohappobakteereja. Mahaan muodostuu tätä kautta maitohappoa, jonka pitoisuudet vaihtelevat eri tutkimusten perusteella 7-120 mmol/l (Argenzio & Southworth 1974; Canibe & Jensen 2003; Højberg ym. 2003), sekä haihtuvia rasvahappoja, joiden osalta pitoisuudet vaihtelivat välillä 20-40 mmol/l (Argenzio & Southworth 1974; Canibe & Jensen 2003; Højberg ym. 2003; Meulen & Bakker 1991). Rehun ennestään sisältämät orgaaniset hapot lisäävät osaltaan niiden pitoisuutta mahansisällössä. Etenkin liemiruokinnassa rehun fermentoituminen ennen ruokintaa lisää orgaanisten happojen määrää sian mahalaukussa (Canibe & Jensen 2003; Winsen ym. 2001; Højberg ym. 2003). Eniten lisääntyy maitohapon määrä (Winsen ym. 2001; Højberg ym. 2003). Lopulta happaman mahanesteen sekoittuessa mahansisältöön fermentoivat mikrobit suurelta osin kuolevat. Rehun korkea kuitupitoisuus on myös yhteydessä mahan matalaan pH-arvoon (Argenzio & Southworth 1974; Meulen & Bakker 1991).

Pyloruksen kautta ohutsuoleen siirtyvä mahansisältö on hapanta pH:n vaihdellessa välillä 2,0-4,5 (Meulen & Bakker 1991; Argenzio & Southworth 1974) ja sisältää vähän eläviä mikrobeja. Ruoansulatusnesteiden vaikutuksesta pH kohoaa jo proksimaalisessa

duodenumissa tasolle 6,0-6,8 ja säilyy tällä tasolla koko ohutsuolen loppuosan (Argenzio & Southworth 1974; Meulen & Bakker 1991). Ohutsuolen sisällössä on vaihtelevia määriä maitohappoa. Pienimmät mitatut konsentraatiot ovat olleet 1 mmol/l, mutta jopa 100 mmol/l konsentraatioita on mitattu (Clemens ym. 1975; Argenzio & Southworth 1974; Højberg ym. 2003; Canibe & Jensen 2003). Maitohapon muodostuminen kiihtyy mentäessä kohti ohutsuolen loppua (Canibe & Jensen 2003), mutta maitohapon pitoisuus suolen sisällössä ei näytä eroavan merkitsevästi eri osissa ohutsuolta (Clemens ym. 1975; Canibe & Jensen 2003). Todisteita siitäkin, että maitohapon määrä pienenee kohti ohutsuolen loppua, on esitetty (Argenzio & Southworth 1974). Haihtuvia rasvahappoja ohutsuolessa on vain vähäisiä määriä, 0-15 mmol/l (Clemens ym. 1975; Argenzio & Southworth 1974; Højberg ym. 2003) lukuunottamatta ohutsuolen distaaliosaa, jossa pitoisuudet voivat olla jopa 40 mmol/l (Clemens ym. 1975; Argenzio & Southworth 1974; Højberg ym. 2003; Canibe & Jensen 2003). Eräässä kokeessa 4,5 tunnin kuluttua ruokinnasta ohutsuoesta mitattu haihtuvien rasvahappojen konsentraatio kasvoi kohti ohutsuolen loppua (Meulen & Bakker 1991). Tähän, kuten myös maitohapon lisääntyneeseen muodostumiseen ohutsuolen loppuosassa, on luultavasti johtanut suolensisällön takaisinvirtaus paksusuolesta ja mikrobifermentaation käynnistyminen tätä kautta ohutsuolen loppuosassa (Meulen & Bakker 1991).

Paksusuolen tehtävänä on veden ja ionien absorptio sekä hajoamattomien hiilihydraattien mikrobidigestio ja absorptio. Sian paksusuoli on muihin kotieläimiin verrattuna keskikokoinen, suurempi kuin lihansyöjien ja toisaalta pienempi kuin puhtaiden paksusuolifermentoitijien (hevonen ja jyräjät). Paksusuolen limakalvolla ei ole samaan tapaan absorboivaa pinta-alaa kuin ohutsuolessa, sillä paksusuolesta puuttuvat sekä nukkalisäkkeet että mikrovillukset. Ileumin laskukohta paksusuoleen on sialla umpisuolen ja koolonin rajana. Tässä kohden ohutsuoesta tuleva ruokamassa jakautuu umpisuoleen ja kooloniin. Sian koolon on kiertynyt suurelta osin spiraalimaiseksi ja sen proksimaaliosassa on hevosen umpisuolen lailla pitkittäislihaksisto keskittynyt tenioiksi aiheuttaen suolen seinämän laskostumia, haustroja.

Ruokinnan määrästä, ruokinta-ajankohdan tiheydestä ja rehun kuitupitoisuudesta riippuen 9-23 % sian ravinnosta saatavasta energiasta tuotetaan mikrobidigestion avulla (Kenelly ym. 1981). Märehtijöillä mikrobidigestio tapahtuu etumahoissa, kun taas sialla

paksusuolella. Näitä molempia yhdistää anaerobinen ympäristö sekä runsas haihtuvien rasvahappojen muodostuminen. Märehtijöillä elimistö käyttää hyväkseen mikrobien sisältämät proteiinit, toisin kuin siialla, jolla ne menevät hukkaan paksusuolesta ulosteiden mukana. Sen sijaan haihtuvat rasvahapot imeytyvät sian paksusuolesta lähes yhtä tehokkaasti kuin märehtijöiden etumahoista, tai jopa tehokkaammin (Argenzio & Southworth 1974). Elimistö käyttää paksusuolesta saatavia rasvahappoja sekä paksusuolen enterosyyttien että muiden kudosten energianlähteeksi.

Paksusuolen mikro-organismit fermentoivat rehun soluseinän hiilihydraatteja, kuten selluloosaa ja pektiinejä. Myös vaihtelevia määriä proteiineja ja helposti digestoituvia hiilihydraatteja joutuu paksusuoleen fermentoitavaksi pääasiassa siksi, että ne ovat päässeet ohi ohutsuolen ruoansulatusprosessista soluseinän hiilihydraattien suojassa. Tämän vuoksi osa suuren kuitupitoisuuden sisältävistä rehuista aiheuttaa normaalisti ohutsuolisulavien ravintoaineiden huonoa imeytymistä ohutsuolessa.

Ravinnon kuitupitoisuuden vaikutusta sian paksusuolen haihtuvien rasvahappojen tuotantoon on tutkittu paljon. Kuitupitoisuuden lisääminen ravinnossa stimuloi haihtuvien rasvahappojen muodostumista sian paksusuolella (Holtug ym. 1992; Breves ym. 1998). Selluloosan lisäämisellä ei ollut merkittävää vaikutusta haihtuvien rasvahappojen mooliosuuksiin paksusuolella (Breves ym. 1998), tosin kuitujen laadun on osoitettu aiheuttavan eroavaisuuksia näissä mooliosuuksissa (Holtug ym. 1992). Eräässä kokeessa havaittiin, että kuidun lisääminen ravintoon johti yleisesti huomattavasti korkeampaan asetaatti/propionaatti –suhteeseen (Kenelly ym. 1981). Hyvin korkean kuituosuuden sisältävät rehut mahdollisesti jopa vähentävät haihtuvien rasvahappojen muodostumista umpisuolella ja proksimaalisessa koolonissa, mutta tämä vaikutus saatetaan kompensoida lisääntyneellä haihtuvien rasvahappojen tuotannolla tästä distaalisemmassa koolonissa (Kenelly ym. 1981). Ravinnon kuitupitoisuuden lisäksi monet muut tekijät, kuten ravinnon probioottiset bakteerit lisäävät haihtuvien rasvahappojen muodostumista sian umpisuolella *in vitro* (Sakata ym. 2003).

2.2. Monokarboksylaattikuljettajat ravintoaineiden imeytymisessä

2.2.1. Yleistä monokarboksylaattikuljettajista

Monokarboksyylihapot, kuten pyruvaatti, laktaatti, asetoasetaatti ja β -hydroksibutyaatti, ovat fysiologisessa pH:ssa lähes täysin dissosioituneessa muodossa, jolloin niiden diffuusio solukalvojen läpi on erittäin vähäistä. Monokarboksylaattikuljettajat (MCT) ovat solukalvoilla sijaitsevia proteiineja, joiden avulla monokarboksyylihappojen anionit pääsevät solukalvon läpi myös dissosioituneessa tilassa.

Ensimmäiset viitteet monokarboksylaattikuljettajien olemassaolosta saatiin 1970-luvulla kineettisten tutkimusten avulla, mutta ensimmäinen isoformi sekvensoitiin vasta vuonna 1994 (Garcia ym. 1994). Monokarboksylaattikuljettajista tunnetaan nykyään 14 isoformia (MCT1-MCT14), joita yhdistää keskenään samankaltainen geenisekvenssi (Halestrap & Meredith 2004; Wilson ym. 2005).

Monokarboksylaattikuljettajat säätelevät solunsisäistä pH:ta sekä happoanionien konsentraatiota ja niillä on siten keskeinen merkitys lähes kaikkien solutyypin happo-emästasapainon ja aineenvaihdunnan säätelyssä (Halestrap & Meredith 2004). MCT kuljettaa dissosioituneen happomolekyylin lisäksi protonin samaan suuntaan. Kuljetuksen suunnan sekä nopeuden määrää pääasiassa protonigradietti (Poole & Halestrap 1993). Kuljetus ei vaadi ulkopuolista energiaa (Merezhinskaya & Fishbein 2009).

Eri kuljettajaproteiineilla on erilainen substraattispesifisyys sekä kinetiikka, minkä arvellaan olevan syy siihen, että monokarboksylaattikuljettajaisoformien esiintyminen on laji- ja kudosspesifistä (Jackson ym. 1997). Kuljettajia on löydetty kaikista muista kudoksista, paitsi haiman Langerhansin saarekkeiden soluista, mikä selittyy insuliini tuotannon ja seerumin glukoositasojen tärkeällä yhteydellä, joka häiriintyisi jos solukalvon läpi pääsisi merkittäviä määriä esimerkiksi laktaattia (Halestrap & Meredith 2004). Kuljettajien ilmenemiseen kudoksissa voivat vaikuttaa myös substraattien pitoisuudet (Cuff ym. 2002).

Glykolyttisissä soluissa – kuten punasoluissa – on usein tarvetta siirtää ylimääräinen laktaattianioni ja protoni solusta ulos (Dimmer ym. 2000; Koho ym. 2002), kun taas osa soluista käyttää laktaattia, ketoaineita tai haihtuvia rasvahappoja energiantuotantonsa (Müller ym. 2002; Sepponen ym. 2007; Halestrap & Meredith 2004; Bonen 2000).

Monokarboksylaattikuljettajien avulla kudokset, joissa on sekä glykolyyttisiä että oksidatiivisia soluja, voivat siirtää aineenvaihduntatuotteita solujen välillä myös suoraan ilman verisuoniyhteyttä (Merezhinskaya & Fishbein 2009). Tällä on merkitystä etenkin sydämen, poikkijuovaisen lihaksen, aivojen ja silmän verkkokalvon tehokkaalle toiminnalle (Merezhinskaya & Fishbein 2009). Esimerkiksi lihaskudoksessa glykolyttiset ja oksidatiiviset solut sijaitsevat vierekkäin, jolloin laktaatin siirto suoraan solusta toiseen lisää lihastoiminnan tehokkuutta.

MCT1 kuljettaa laajasti erilaisia monokarboksyylihappoja, kuten L-laktaattia ($K_m = 3-5$ mM), pyruvaattia ($K_m = 0,7$ mM), asetoasettaattia ($K_m = 4-6$ mM) ja β -hydroksibutyyraattia ($K_m = 10-12$ mM) (Halestrap & Meredith 2004). Laktaatin kuljetus on stereoselektiivistä siten, että K_m D-laktaatille on yli kymmenkertainen L-laktaattiin verrattuna (Poole & Halestrap 1993). MCT1 on ainoa ihmisen veren punasolusta löydetty monokarboksylaattikuljettaja (Fishbein ym. 2002) ja sitä pidetäänkin tärkeänä laktaatin kuljettajana elimistön glykolyttisissä soluissa (Koho ym. 2002; Merezhinskaya & Fishbein 2009). MCT1 osallistuu haihtuvien rasvahappojen sekä laktaatin kuljetukseen ainakin lampaan (Müller ym. 2002) ja poron (Koho ym. 2005) pötsistä verenkiertoon ja samankaltainen toiminta on ilmeistä myös sian suolistossa (Sepponen ym. 2007; Ritzhaupt ym. 1998b; Ritzhaupt ym. 1998a).

MCT2 on tehokas pyruvaatin ($K_m = 0,1$ mM) sekä L-laktaatin ($K_m = 0,7$ mM) kuljettaja (Merezhinskaya & Fishbein 2009). Sitä on havaittu ihmisellä oksidatiivisissa lihassoluissa (Garcia ym. 1995) ja toisaalta sialla glykolyttisissä lihassoluissa (Sepponen ym. 2003). Sen merkitys on todennäköisesti tärkeä myös esimerkiksi maksasoluissa, jotka ottavat monokarboksyylihappoja sisäänsä glukoneogeneesiä varten verenkierron pienistäkin pitoisuuksista (Halestrap & Meredith 2004).

MCT4 esiintyy varsinkin voimakkaasti glykolyttisissä soluissa ja se toimii vasta kun substraattien, kuten pyruvaatin ($K_m = 150$ mM) ja L-laktaatin ($K_m = 28$ mM), pitoisuudet ovat suuria (Halestrap & Meredith 2004).

On havaittu, että monokarboksylaattikuljettajilla on kaitsijaproteiineja, joilla on ratkaiseva merkitys itse kuljettajaproteiinien esiintymiselle ja toiminnalle. Näitä ovat mm. MCT1, MCT3 ja MCT4 -kuljettajien yhteydessä esiintyvä CD147 (Kirk ym.

2000), sekä MCT2:n yhteydessä havaittu gp70 (Wilson ym. 2005). Esimerkiksi MCT1 ja CD147 muodostavat kompleksin keskenään ja vasta sitten kuljettajan toiminta on aktiivista (Kirk ym. 2000; Koho ym. 2002).

2.2.2. Monokarboksylaattikuljettajien merkitys maitohapon ja haihtuvien rasvahappojen imeytymisessä

Sian mahansisältö on suhteellisen hapanta ja muuttuu happamammaksi mitä lähemmäksi mahanporttia sisältö liikkuu ja mitä enemmän mahanesteitä sekoittuu siihen (Meulen & Bakker 1991; Argenzio & Southworth 1974). Mahanportista ohutsuoleen siirtyvän sisällön pH on 2,0-4,5 (Meulen & Bakker 1991; Argenzio & Southworth 1974). Mahassa suurin osa sisällön mikrobistosta kuolee ja rehun fermentaatio hidastuu. Orgaaniset hapot ovat edellä mainitussa happamuudessa pääosin dissosioitumattomassa muodossa ja lipofiilisinä liikkuvat helposti solukalvojen läpi passiivisen diffuusion avulla. Tällä tavoin rehun sisältämät ja siinä fermentaatiolla muodostuvat laktaatti sekä haihtuvat rasvahapot (asetaatti, propionaatti ja butyraatti) imeytyvät happovakion ja tasapainotilanteen määräämään verenkiertoon myös ilman erityistä solukalvon kuljettajaproteiinia.

Ohutsuoleen päätyy sialla kohtuullisia määriä maitohappoa, mutta vain vähäisiä määriä haihtuvia rasvahappoja (Clemens ym. 1975; Argenzio & Southworth 1974; Højberg ym. 2003; Canibe & Jensen 2003). Ohutsuolessa mahansisältöön sekoittuu haimanestettä, jonka ansiosta suolensisältö lähes neutraloituu pH-lukemaan 6,0-6,8 (Argenzio & Southworth 1974; Ritzhaupt ym. 1998a). Tämä mahdollistaa maitohappokäymisen myös ohutsuolessa. Tällöin tosin pääosa suolensisällön orgaanisista hapoista on dissosioituneessa muodossa ja niiden imeytyminen vaatii erillisen kuljettajasysteemin olemassaolon. Passiivista diffuusiota avittaa Na⁺/H⁺ -ioninvaihtojärjestelmä, jossa suolen seinämän välittömään läheisyyteen muodostuu hapan ympäristö (Lucas & Blair 1978; Binder & Mehta 1989).

Vaikka laktaatin muodostuminen sian ohutsuolessa kiihtyy suolen loppua kohden (Canibe & Jensen 2003), ei sen konsentraatio suolen eri osissa eroa merkittävästi (Clemens ym. 1975), (Canibe & Jensen 2003). Tätä voi pitää todisteena tehokkaan

laktaatinkuljetusmekanismin olemassaolosta. Sian ohutsuoesta on löydetty monokarboksylaattikuljettajia (MCT1, MCT2 ja MCT4) sekä kaitsijaproteiinia CD147, joiden merkitys orgaanisten happojen imeytymisessä on luultavasti keskeinen (Sepponen ym. 2007). Eräässä tutkimuksessa MCT1:n määrä oli sian ohutsuoessa huomattavasti alempi kuin paksusuoessa (Welter & Claus 2008). Eri tutkimuksista kerätyt tulokset maitohappopitoisuuksista sian ohutsuoessa vaihtelevat suuresti, kuten normaalistikin esimerkiksi syöntirytmien mukaan. Yleisesti laktaatin pitoisuudet ovat joitakin kymmeniä millimooleja litrassa (Clemens ym. 1975; Argenzio & Southworth 1974; Højberg ym. 2003; Canibe & Jensen 2003). Edellä mainitussa konsentraatiossa sekä MCT1 että MCT4 toimivat tehokkaasti edellyttäen, että myös CD147 ilmenee riittävässä määrin. Laktaattikonsentraation laskiessa riittävän alas MCT2 varmistaa tehokkaan imeytymisen (Sepponen ym. 2007).

Paksusuoessa pilkkoutuu pääosa rehun soluseinän hiilihydraateista mikrobidigestion avulla, jolloin syntyy huomattavia määriä haihtuvia rasvahappoja (Argenzio & Southworth 1974; Clemens ym. 1975; Canibe & Jensen 2003; Højberg ym. 2003). Paksusuolen pH on sialla noin 6,0 (Argenzio & Southworth 1974), joten haihtuvista rasvahapoista vain pieni osa kerrallaan on dissosioituneena ja siirtyy verenkiertoon passiivisen diffuusion avulla. Sian paksusuoesta on löydetty MCT1, MCT4 ja CD147, muttei MCT2:ta (Sepponen ym. 2007; Ritzhaupt ym. 1998b).

Ihmisen koolonin epiteelisolut tuottavat 60-70% energiastaan haihtuvien rasvahappojen, etenkin butyraatin, avulla (Ritzhaupt ym. 1998b). Butyraatilla on havaittu tärkeä tehtävä myös epiteelisolujen erikoistumisessa, kasvussa ja lisääntymisessä ihmisellä (Treem ym. 1994), joten tilanne voi olla samankaltainen myös sialla. Butyraatin kuljetus paksusuolen enterosyytteihin tapahtuu luultavasti anioninvaihtajaproteiinin ja/tai MCT1:n avustuksella (Ritzhaupt ym. 1998b; Ritzhaupt ym. 1998a). Anioninvaihtajaproteiini vaihtaa anionin, esimerkiksi bikarbonaatti-ionin, butyraatti-ioniin. Butyraatin kuljetus vähenee asetaatin tai propionaatin lisäyksen jälkeen, mikä viittaa siihen, että haihtuvien rasvahappojen kuljettajasysteemit ovat ainakin osittain yhteiset (Ritzhaupt ym. 1998a).

Butyraatti – toisin kuin asetaatti tai propionaatti – indusoi MCT1:n esiintyvyyttä koolonin epiteelisoluissa (Cuff ym. 2002). Edellä mainitun perusteella juuri butyraatti on merkittävin haihtuva rasvahappo koolonin epiteelisoluille. Samaa osoittavat tutkimukset, joissa butyraatin vähäinen määrä koolonin epiteelisoluissa on yhdistetty paksusuolen syöpään sekä suoliston tulehdussairauksiin ihmisellä (Treem ym. 1994). On myös havaittu, että koolonin karsinooman yhteydessä solujen MCT1-määrä on alentunut normaalista (Lambert ym. 2002).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1. Aineisto

Tutkimukseen valittiin satunnaisesti 8 sikaa, joista 7 oli emakkoja, yksi leikko. Siat olivat Paimion koeaseman kantakoesikoja. Puolet sioista olivat suomalaista maatiaisrotua ja puolet Yorkshire-rotua. Sikojen teuraspaino vaihteli välillä 68,5-80,5 kg ja ohutsuolen pituus 17,0-22,5 m. Sikoja oli ruokittu viimeisen kerran vuorokausi ennen teurastusta.

3.2. Näytteenotto ja -käsittely

Siat tainnutettiin teurastamossa hiilidioksidilla. Suolet kerättiin kaltauksen jälkeen suolistuspaikalla muovilaatikoihin. Näytteenotto kesti kaikkiaan 6 tuntia, jonka aikana suolia säilytettiin muovilaatikoissa huoneenlämmössä. Sioista otettiin kudospätkät mahasta ja ohutsuolesta. Mahakudoksesta otettiin kaksi näytettä, joista ensimmäinen mahansuun jälkeen rauhasettoman kerrostuneen levyepiteelin alueelta ja toinen ennen mahanporttia rauhasellisen epiteelin alueelta. Mahan näytekudospalanen halkaistiin limakalvonalaiskerroksesta (*tela submucosa*) siten, että epiteelin puoleinen osuus käytettiin tutkimukseen. Ohutsuolinäytteet otettiin siten, että ensimmäinen näyte (nolla metriä) otettiin noin 8 cm päästä mahanportin sulkijasta ja seuraavat metrin välein 2 metrin päähän ensimmäisen näytteen ottopaikasta. Tästä edespäin näytteitä otettiin 2 metrin välein ja viimeinen näytepala noin 5 cm ennen ohutsuolen ja paksusuolen liittymiskohtaa. Kudosta leikattiin koko suolen paksuudelta. Kudospätkät pestiin ensin vedellä ja sitten 0,9 % NaCl-liuoksella, kunnes ne leikattiin noin gramman painoisiksi

paloiksi, kuivattiin talouspaperilla ja jäädytettiin nestemäisessä työssä. Kudospalat pakattiin folioon ja kuljetettiin nestetyössä pakastimeen (-80°C) säilytykseen.

3.3. Kudosten homogenisointi ja proteiinipitoisuuden mittaaminen

Monokarboxylaattikuljettajien tutkimista varten kudospaloista eristettiin solumembraanit Percoll-tekniikalla (Jackson ym. 1997). Näytekudosta punnittiin noin 1,5 g, joka pilkottiin useampaan osaan. Kudospaloista homogenisoitiin homogenisaattorilla (Potter S, B.Braun Melsnungen AG, Saksa) jäähauteessa. Homogenisointikammioon laitettiin kudospalojen lisäksi proteaasi-inhibiittorisekoitus (P8340, Sigma Genosys, Cambridge, Iso-Britannia) 50 µl, 50 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia (PMSF) 100 µl, sekä 10 ml homogenisointipuskuria (0,3 M sakkaroosi, 2 mM EGTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,2), johon on lisätty 0,5 % (w/v) naudan albumiinia (BSA). Homogenaatti siirrettiin 30 ml Sorvall-putkiin ja putket täytettiin homogenisointipuskurilla. Putkia sentrifugoitiin kylmäsentrifuugissa (Sorvall RC-5, DuPont Instruments, DE, USA) (+4°C) 10 min 2000 g. Supernatantti kaadettiin uuteen 30 ml Sorvall-putkeen ja tätä sentrifugoitiin (+4°C) 20 min 34800 g. Suurin osa supernatantista kaadettiin pois ja putken pohjalle muodostunut kudossakka sekoitettiin 10 ml homogenisointipuskurilla. Putkeen lisättiin 50 µl PMSF:ä ja 2,35 ml Percoll-liuosta (Sigma Genosys, Cambridge, Iso-Britannia). Sekoituksen jälkeen putkea sentrifugoitiin (+4°C) 20 min 15900 g ja tämän jälkeen otettiin muodostunut yläfaasi (noin 5 ml) talteen uuteen 30 ml Sorvall-putkeen ja putki täytettiin homogenisointipuskurilla. Putkea sentrifugoitiin (+4°C) 40 min 34800 g ja syntynyt sakka hajotettiin ja pestiin homogenisointipuskurilla toistamalla sentrifugointi vielä kaksi kertaa (40 min, 34800 g). Pesujen jälkeen neste poistettiin tarkoin muodostuneen sakan päältä ja putken pohjalle jäänyt solumembraanin homogenaatti sekoitettiin huolellisesti ja pakastettiin (-80°C).

Solumembraaninäytteet laimennettiin tislattulla vedellä proteiinipitoisuuden määrittämistä varten joko 1/5-, 1/10- tai 1/20-osaan. Jokaisen proteiininäärityksen aikana käsiteltiin myös standardinäytteet, joiden proteiinipitoisuus tiedettiin. Proteiinipitoisuus määritettiin käyttäen kaupallisen testipakkauksen reagensseja (Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, USA). Absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä

(Hitachi U-2000, Hitachi Ltd. Tokio, Japani) aallonpituudella 562 nm. Nollanäyte sisälsi proteiinilaimennoksen sijaan tislattua vettä ja se käsiteltiin alusta lähtien kuten muutkin näytteet.

Proteiinipitoisuuden avulla laskettiin elektroforeesia varten käytettävän homogenaatin määrä siten, että geelin kaivoon pipetoitava homogenaatin määrä (μl) vastaisi 10 μg proteiinia. Membraanihomogenaattiin lisättiin 1/1 näytepuskuria (4 % SDS, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 20 % glyseroli, 5 % bromofenolisininen), johon oli lisätty ennen pipetointia 1/10-osaa 2-merkaptotetanolia. Näyteputket sekoitettiin ja sentrifugoitiin nopeasti kylmäseentrifugissa (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG, Hamburg, Saksa) (+4°C) ja pakastettiin (-80°C).

3.4. MCT-proteiinien mittaaminen

Näytteen proteiinifraktiot eroteltiin natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeeli-elektroforeesilla (SDS-PAGE). Tätä varten valmistettiin geelit (1,5 M Tris-HCl pH 8,6, 30 % bis-akryyliamidi, 10 % SDS, 10 % ammoniumpersulfaatti (APS), N,N,N',N'-tetraetylmetyleenidiamiini), joiden bis-akryyliamidipitoisuus oli 10 %. Geelin yläosaan valettiin tiivistysgeeli, johon tehtiin näytteitä varten kaivokuopakkeet kampojen avulla. Tiivistysgeelissä käytetyn Tris-HCl:n konsentraatio oli 0,5 M. Geelejä säilytettiin jääkaapissa korkeintaan viikon ajan. SDS-PAGE suoritettiin minigeeli-ajolaitteistolla (Mini-Protean® 3 cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Yläkammio täytettiin SDS-ajopuskurilla, joka laimennettiin 5*kantaliuoksesta (25 mM Tris-base, 250 mM glysiini, 0,1 % SDS, pH > 8,3) tislattulla vedellä. Geelien kaivot puhdistettiin ajopuskurilla puhtaaksi mahdollisista geelin irtopaloista. Elektroforeesia varten näytteet otettiin pakastimesta lämpöblokkiin (+95°C) 5 minuutiksi, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin nopeasti. Näytteiden lisäksi yhteen kaivoon pipetoitiin 1,5 μl molekyylipainostandardia (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ja yhteen kontrollinäyte, joka oli sama sian ohutsuolinäyte kaikissa geeleissä. Alakammio täytettiin merkkiin asti ja geelejä ajettiin ajolaitteessa (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 45 minuuttia 200 V:n jännitteellä.

Ajon jälkeen tiivistysgeeli poistettiin ja geelin kulma lovettiin merkiksi. Geelejä, kuitutyynyjä ja nitroselluloosamembraaneja (Protran®, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Saksa) tasapainotettiin 15 min huoneenlämpöisessä siirtopuskurissa (Tris-base 25 mM, glysiini 192 mM, metanoli 20%, pH 8,1-8,4). Seuraavaksi kasattiin ”voileivät” western blot –siirtoa varten järjestyksessä siten, että katodin puolelle tuli ensiksi kuitutyyny, sitten siirtopuskurissa kastettu suodatinpaperi (Bio-Rad Filter Paper, Mini Trans-Blot® cell, Hercules, CA, USA), geeli, membraani, kastettu suodatinpaperi ja kuitutyyny. ”Voileipä” laitettiin telineeseen ja teline asetettiin altaaseen, joka täytettiin kylmällä siirtopuskurilla. Geeleille suoritettiin Western Blot -ajo (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 90 min 100 V:n jännitteellä käyttäen jäähdytysblokkia ja magneettisekoittajaa lämpötilan pitämiseksi alhaisena.

Nitroselluloosamembraanit laitettiin blottauksen jälkeen vähintään tunniksi 10 % (liuottimena TBST (Tris-base 20 mmol, NaCl 137 mmol, Tween 0,1 %)) rasvattomaan maitojauheliuokseen (Valio Oy, Suomi) kallistelijaan. Seuraavaksi membraanit nostettiin Parafilm®-kalvolla vuorattuun lasikammioon ja päälle kaadettiin ensimmäinen vasta-aineliuos 4 µl (anti-MCT1)/4500 µl 10 % maitojauhetta tai 22 µl (anti-MCT4)/4500 µl 10 % maitojauhetta. MCT1:lle ja MCT4:lle käytetty ensimmäinen vasta-aine oli valmistettu kanissa ihmisen vastaavan MCT:n C-terminaalista polypeptidiketjua vastaan (Sigma Genosys, Cambridge, Iso-Britannia), (Sepponen ym. 2003). Vasta-aineen annettiin vaikuttaa yön yli jääkaapissa.

Käsittelyn jälkeen membraaneja huuhdottiin TBST-liuoksessa, pestiin TBST:llä 15 min kallistelijassa, jonka jälkeen liuos vaihdettiin ja pesu toistettiin vielä kahdesti 5 min ajan. Membraanit asetettiin Parafilm®-kalvolle toista vasta-ainekäsittelyä varten. Vasta-aineliuoksena käytettiin seosta, johon laitettiin 1125 µl 10 % maitojauhetta, 3375 µl TBST:tä ja 2,3 µl vasta-ainetta (piparjuuri-peroksidaasilla leimattu anti-kani). Vasta-aineen annettiin vaikuttaa yksi tunti huoneenlämmössä. Tämän jälkeen membraaneja huuhdottiin ja pestiin TBST:llä samoin kuin ensimmäisen vasta-ainekäsittelyn jälkeen. Membraanit asetettiin lasilevyille, jossa niiden päälle pipetoitiin 800 µl tuikeliuosseosta (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) ja suljettiin 0,5 l Minigrip®-pussiin. Kehitystä varten laitettiin röntgenfilmi valottumaan

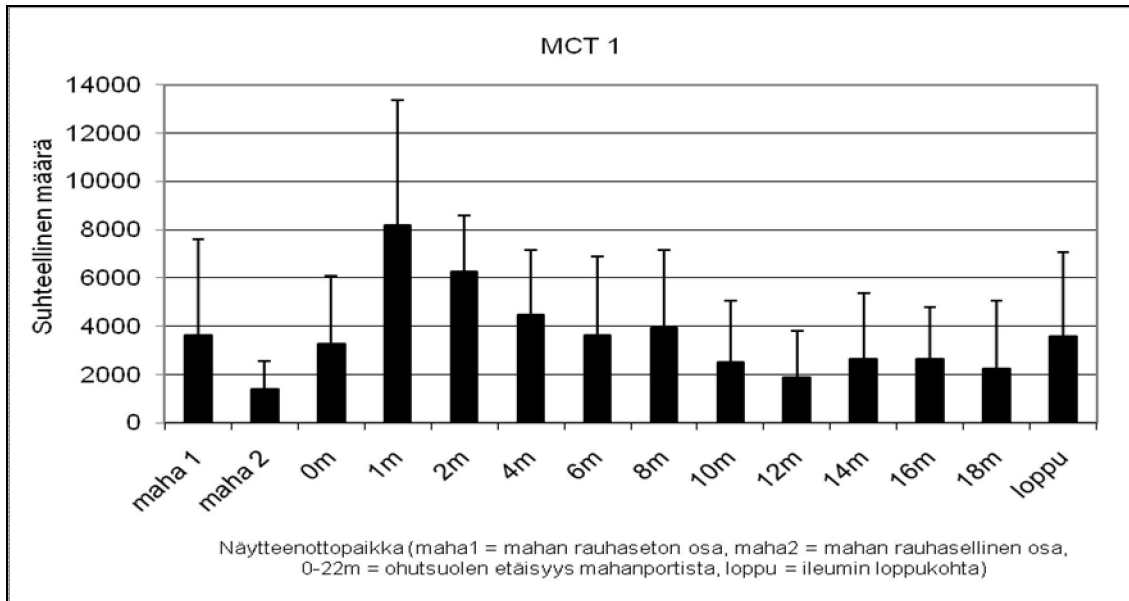
pussia vasten röntgenkasettiin tietyksi ajaksi (2, 5, ja 15 min), ja sen jälkeen filmi siirrettiin kehityskoneeseen (X-OMAT 270 RA Processor, Eastman Kodak Co, New York, USA). Filmit skannattiin (Fluor-S™ MultiImager, Bio-Rad, Hercules, CA) ja analysoitiin tietokoneohjelman (Multi-Analyst, Version 1.1, BioRad Laboratories) avulla.

Tulokset käsiteltiin tilastollisesti Prism 4.01- ja Microsoft Exel 07 –tietokoneohjelmilla. MCT –pitoisuuksien ja ohutsuolen pituuden korrelaatiota arvioitiin lineaarisen regression avulla. Mahan ja suolen eri osien väliseen vertailuun käytettiin parillista t-testiä. Tulokset on esitetty keskiarvoina \pm keskihajonta.

4 TULOKSET

4.1. MCT1

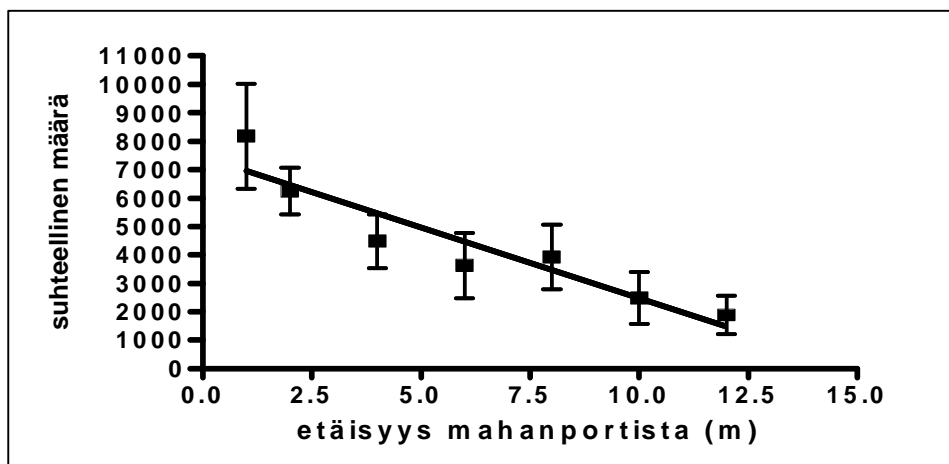
MCT1:n suhteellinen määrä mahassa ja ohutsuolen eri osissa on esitetty kuvassa 1. Kaikista kahdeksasta tutkitusta siasta saatiin tutkittua näytteet mahasta, suolen matkalta 1-12 metriä sekä suolen lopusta (n = 8). Kohdissa 14, 16 ja 18 metriä on saatu tulokset seitsemästä siasta (n = 7). Koska vain yhdeltä sialta oli mahdollista mitata MCT1:n suhteellinen määrä 20 sekä 22 metrin kohdalta, jätettiin ne tulokset huomiotta. Yhdellä sioista ei löytynyt ollenkaan MCT1 –kuljettajaa mahasta.



Kuva 1.

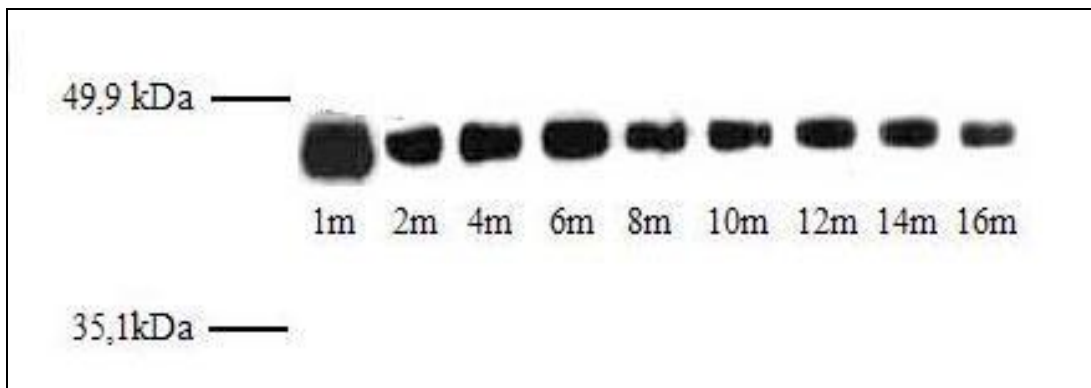
Kuvassa 1 on havaittavissa MCT1:n suhteellisen määrän väheneminen ohutsuolessa 1 metrin kohdasta kohti ileumia mentäessä. Asia varmennettiin lineaarisen regression avulla (kuva 2). Koska ohutsuolen alkupäässä ennen haimatiehyyen laskukohtaa suolensisällön kemiallis-fysiologiset olosuhteet muistuttavat mahaa, näytteenottoaika 0 metriä jätettiin pois analyysistä. Mukaan otettiin ne näytteenottoaikat, joista on saatavilla arvot kaikista tutkituista eläimistä (1-12m, n = 8).

Kuvassa 2 esitetään MCT1:n suhteellinen määrä ohutsuolessa etäisyyden (1-12m) funktiona. Korrelaatio on tilastollisesti merkitsevä ($P < 0,0001$), eli MCT1:n suhteellinen määrä laskee mentäessä ohutsuolen alkuosasta kohti loppuosaa.



Kuva 2.

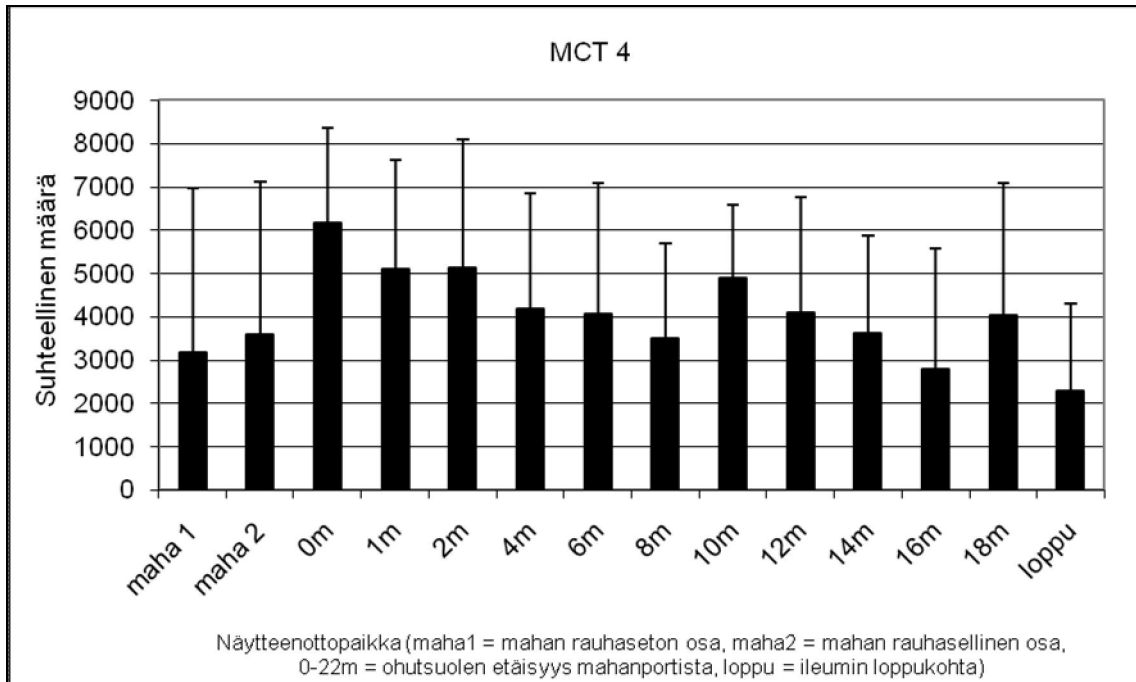
Kuvassa 3 on nähtävissä yhden tutkitun sikayksilön MCT1-proteiinijuovat Western Blot –analyysin jälkeen. Kuvassa on nähtävillä proteiinimäärän väheneminen mennessä kohti suolen loppukohtaa. MCT1:n molekyylipainoksi arvioitiin 45 kDa, joka on hieman suurempi kuin aiemmin sian koolonista raportoitu 40 kDa (Ritzhaupt ym. 1998b) tai 43 kDa (Welter & Claus 2008), mutta pienempi kuin aikaisemmassa tutkimuksessa sian lihaksesta mitattu 55 kDa (Sepponen ym. 2003).



Kuva 3

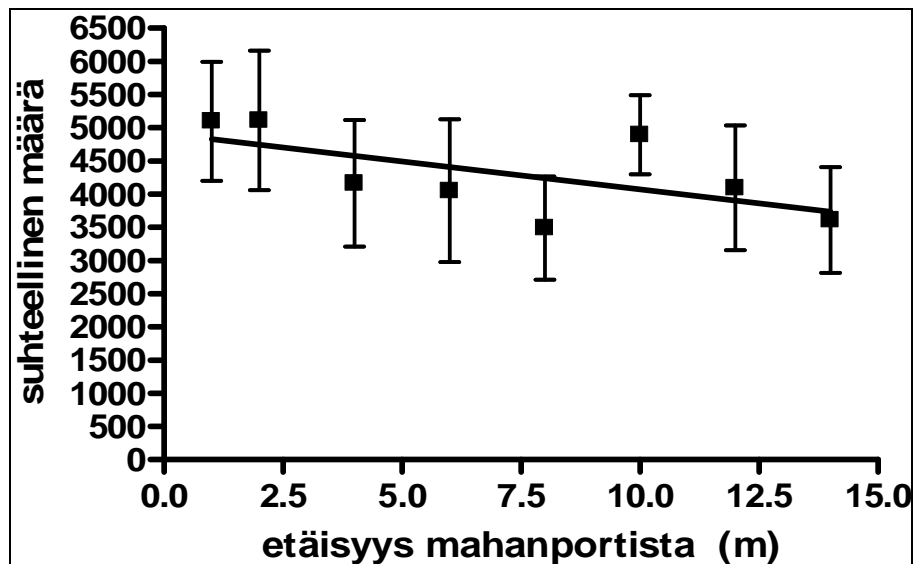
4.2. MCT4

MCT4:n suhteellinen määrä mahassa ja ohutsuolen eri osissa on esitetty kuvassa 4. Kaikista kahdeksasta tutkitusta siasta saatiin tutkittua näytteet mahasta, suolen matkalta 1-14 metriä sekä suolen lopusta ($n = 8$). Kohdissa 16 ja 18 metriä on saatu tulokset seitsemästä siasta ($n = 7$). Koska vain yhdeltä sialta oli mahdollista mitata MCT4:n suhteellinen määrä 20 sekä 22 metrin kohdalta, jätettiin ne tulokset huomiotta. Tutkimuksen kahdeksasta siasta kahdella ei havaittu MCT4 –kuljettajaa mahan rauhasettomassa osassa ja toisella näistä sioista ei myöskään rauhasellisessa osassa.



Kuva 4.

Kuvassa 5 esitetään MCT4:n suhteellinen määrä ohutsuolessa etäisyyden (1-12m) funktiona, vastaavasti kuin aiemmin MCT1:n kohdalla (kuva 2). Korrelaatio ei ole tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 5.

Määritimme myös, eroaako mahan, ohutsuolen alkuosan (1-4m) sekä ohutsuolen loppuosan (14-18m) keskimääräinen suhteellinen MCT-määrä toisistaan. Taulukossa 1

on esitetty edellä mainittujen ryhmien keskimääräiset suhteelliset MCT1- ja MCT4-määrät.

Taulukko 1.

	Maha	Ohutsuolen alkuosa	Ohutsuolen loppuosa
MCT1	2513±2503	6300±2527	2327±1951
MCT4	3361±3535	4790±2230	3392±2301

MCT1:n suhteellinen määrä mahassa oli pienempi kuin ohutsuolen alkuosassa ($P < 0,01$), kun taas eroa mahan ja ohutsuolen loppuosan välillä ei ollut. Sen sijaan ohutsuolen alkuosassa MCT1:n suhteellinen määrä oli suurempi kuin ohutsuolen loppuosassa ($P < 0,001$). MCT4:n suhteellisissa määrissä mahassa ja ohutsuolen eri osissa ei löydetty tilastollisesti merkitsevää eroa. MCT4:n havaittu molekyylipaino 45 kDa on aiemman tutkimuksen kanssa yhteneväinen (Kirk ym. 2000).

5 POHDINTA

Sian mahasta ei ole aiemmin tutkittu monokarboksylaattikuljettajia. Tämä on myös ensimmäinen kerta, kun ohutsuolesta on löydetty MCT1- ja MCT4 –proteiineja. Aiemmin sian paksusuolesta on löydetty MCT1 –proteiini (Ritzhaupt ym. 1998b).

Mahassa MCT1:n määrä oli vähäinen. Käytännössä imeytymisen kannalta monokarboksylaattikuljettajien ilmentyminen mahassa saattaa olla merkityksetöntä, koska happamassa ympäristössä monokarboksyylilihapot dissosioitumattomina läpäisevät solukalvot helposti myös ilman kuljettajaa. On myös mahdollista, että monokarboksylaattikuljettajien osuus mahan toiminnassa on ennemminkin osallistuminen esimerkiksi happo-emäs –tasapainon säätelyyn protonin siirron kautta kuin monokarboksyylilihapojen imeytyminen. Tutkimuksen kahdeksasta siasta kahdella ei havaittu MCT4 –kuljettajaa mahan rauhasettomassa osassa ja toisella näistä sioista ei myöskään rauhasellisessa osassa. Ensiksi mainitulla sialla ei havaittu myöskään MCT1 –kuljettajaa kummassakaan mahan osassa. Monokarboksylaattikuljettajien totaalinen

puuttuminen joidenkin sikayksilöiden mahasta voi olla viittaus niiden merkityksettömyyteen mahan ruoansulatusfysiologiassa.

Ohutsuolessa pääasiallinen monokarboksyylihapo on laktaatti, jonka pitoisuus suolensisällössä vaihtelee välillä 7-120 mmol/l (Argenzio & Southworth 1974; Canibe & Jensen 2003; Højberg ym. 2003). Ohutsuolessa maitohappokäyminen on mahdollista ja maitohapon muodostuminen kiihtyykin mentäessä kohti ohutsuolen loppua (Canibe & Jensen 2003). Kuitenkaan tietynä ajanhetkenä maitohapon pitoisuus suolen sisällössä ei näytä eroavan merkitsevästi eri osissa ohutsuolta (Clemens ym. 1975), (Canibe & Jensen 2003). Sian ohutsuoesta on löydetty sekä MCT1, MCT2, MCT4 sekä kaitsijaproteiini CD147 (Sepponen ym. 2007). MCT2:n K_m L-laktaatille on 0,7mM (Merezhinskaya & Fishbein 2009), MCT1:n 3-5mM, kun taas MCT4:n 28mM (Halestrap & Meredith 2004). Voidaankin ajatella, että tehokkaan laktaatin imeytymisen eri ajanhetkinä mahdollistaa se, että suolen seinämässä toimii useita monokarboksylaattikuljettajia, joilla kaikilla on erilainen herkkyys laktaatin kuljettamiseen. MCT4 toimii tehokkaimmin suurissa laktaattipitoisuuksissa ja MCT2 varmistaa laktaatin tehokkaan imeytymisen pienistäkin pitoisuuksista.

Tämän tutkimuksen mukaan MCT1 –määrä vähenee siirryttäessä ohutsuolessa 1 metrin kohdalta kohti ileumia. MCT1 –määrä oli ohutsuolen alkuosassa myös suurempi kuin mahassa tai ohutsuolen loppuosassa. Voidaankin ajatella, että MCT1:n toiminta on merkityksellisintä juuri ohutsuolen alkuosassa. MCT4:n kohdalla vastaavaa eroa ei löydetty, joten sen toiminnan voi ajatella olevan samanveroista mahan ja ohutsuolen kaikissa osissa. Tämän tutkimuksen näytteille on tehty jatkotutkimuksena määritykset MCT2:n ja CD147:n osalta (Sepponen ym. 2007), joista havaittiin, että MCT2- ja CD147 –määrä ei eronnut merkitsevästi ohutsuolen kohdissa 1 metriä ja 12 metriä. Sepposen ym. (2007) mukaan MCT2 varmistaa laktaatin tehokkaan imeytymisen ohutsuoesta ja siksi sen määrä pysyy muuttumattomana kun verrataan ohutsuolen alku- ja loppuosaa. Koska MCT1 tarvitsee toimiakseen kaitsijaproteiinia CD147, saattaa MCT1 –määrän laskeminen ohutsuolen loppua kohden olla kuitenkin merkityksetöntä fysiologian kannalta. CD147:n ratkaiseva merkitys MCT1:n toiminnalle laktaatin kuljetuksessa on havaittu esimerkiksi hevosen punasoluissa, joissa ei esiinny MCT4:ää (Koho ym. 2002). On myös mahdollista, että CD147 –määrän korrelointi MCT4:n määrään kertoo MCT4:n tärkeydestä sian ohutsuolessa (Sepponen ym. 2007).

Tämän tutkimuksen ohutsuolinäytteet otettiin koko suolen seinämän paksuudelta, eli kudoksessa on imeytymisepiteelin lisäksi myös esimerkiksi verisuonia ja lihaskudosta. Tästä syystä pelkän monokarboksylaattikuljettajien kokonaismäärän perusteella ei voida niiden sijaintia tietämättä päätellä luotettavasti niiden merkitystä monokarboksyylihappojen siirtymisessä suolen lumenista parenteraalitalaan. Aiemmin märehitöillä tehtyjen tutkimusten mukaan (Müller ym. 2002; Kirat ym. 2006; Kirat ym. 2007) voidaan kuitenkin olettaa, että myös sialla monokarboksyylihapot imeytyvät MCT –välitteisesti ja kuljettajat sijaitsevat pääasiassa epiteelisolujen basolateraalipuolella. Apikaalipuolella diffuusiota edistää Na^+/H^+ - ioninvaihtojärjestelmä, joka muodostaa suolen seinämän välittömään läheisyyteen happaman mikroympäristön (Lucas & Blair 1978; Binder & Mehta 1989).

Koska useat lääkeainemolekyylit sisältävät karboksyyliryhmän, voi monokarboksylaattikuljettajilla olla tärkeä osuus myös joidenkin lääkeaineiden imeytymisessä (Enerson & Drewes 2003). Koska tutkimuksessa on löydetty myös runsaasti eri monokarboksylaattikuljettajia yleisesti tai isoformispesifisti inhiboivia yhdisteitä, saatetaan tulevaisuudessa MCT-proteiinien toimintaa ohjailemalla joko edistää tai estää tiettyjen lääkeaineiden imeytymistä. Syöpäkudoksen MCT –määrä voi erota normaalista (Lambert ym. 2002) ja näin tulevaisuudessa voi olla mahdollista ohjata myös syöpäsolujen kasvua kun tieto monokarboksylaattikuljettajista ja niiden toiminnasta lisääntyy.

Monokarboksyylihapoilla on vaikutusta myös sian ruoansulatuskanavan terveydelle. On havaittu että runsas maitohapon määrä mahalaukussa estää muun muassa salmonellan (Winsen ym.2001) ja koliformien (Højberg ym. 2003) jakautumista. Orgaaniset hapot voivat siis olla mukana ripulien estämisessä toimimalla bakteriostaatteina mahalaukussa. Vaikuttamalla monokarboksyylihappojen pitoisuuteen monokarboksylaattikuljettajat voivat siis tätä kautta vaikuttaa yksilön terveyteen.

6 KIRJALLISUUSLUETTELO

Argenzio RA, Southworth M. Sites of organic acid production and absorption in gastrointestinal tract of the pig. *Am J Physiol* 1974, 228: 454-460.

Binder HJ, Mehta P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology* 1989, 96: 989-996.

Bonen A. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Med Sci Sports Exerc* 2000, 32: 778-789.

Breves G, Gädeken D, Schulze E, Sallmann HP, Oslage HJ. Measurements on VFA-production in the large intestines of pigs. *Digestive physiology in the pig. Proceedings of the 4th International Seminar, Jablonna, Poland, 1998: 136-139.*

Canibe N, Jensen BB. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J Anim Sci* 2003, 81: 2019–2031.

Clemens ET, Stevens CE, Southworth M. Sites of Organic Acid Production and Pattern of Digesta Movement in the Gastrointestinal Tract of Swine. *J Nutr* 1975, 105: 759-768.

Cuff MA, Lambert DW, Shirazi-Beechey SP. Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 2002, 539: 361-371.

Dimmer K-S, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 2000, 350: 219-227.

Enerson BE, Drewes LR. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: Implications for drug delivery. *J Pharmaceutic Sci* 2003, 92:1531-1544.

Fishbein WN, Merezhinskaya N, Foellmer JW. Relative distribution of three major lactate transporters in frozen human tissues and their localization in unfixed skeletal muscle. *Mus Ner* 2002, 26: 101-112.

Garcia CK, Brown MS, Pathak RK, Goldstein JL. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem* 1995, 270: 1843-1849.

Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson GW, Brown MS. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 1994, 76: 865-873.

Gregory PC, McFayden M, Rayner DV. Control of gastric emptying in the pig: influence of cholecystokinin, somatostatin and prokinetic agents. *Experim Physiol* 1995, 80: 159-165.

Gregory PC, McFayden M, Rayner DV. Pattern of gastric emptying in the pig: relation to feeding. *Brit J Nutr* 1990, 64: 45-58.

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

Holtug K, Rasmussen HS, Mortensen PB. An *in vitro* study of short chain fatty acid concentrations, production and absorption in pig (*sus scrofa*) colon. *Comp Biochem Physiol* 1992, 103A: 189-197.

Højberg O, Canibe N, Knudsen B, Jensen BB. Potential rates of fermentation in digesta from the gastrointestinal tract of pigs: effect of feeding fermented liquid feed. *Appl Env Microbiol* 2003: 408-418.

Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP. Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J* 1997, 324: 447-453.

Kenelly JJ, Aherne FX, Sauer WC. Volatile fatty acid production in the hindgut of swine. *Can J Anim Sci* 1981, 61: 349-361.

Kirat D, Masuoka J, Hayashi H, Iwano H, Yokota H, Taniyama H, Kato S. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen. *J Physiol* 2006, 576: 635-647.

Kirat D, Matsuda Y, Yamashiki N, Hayashi H, Kato S. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene* 2007, 391:140-149.

Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* 2000, 19: 3896-3904.

Koho N, Majjala V, Norberg H, Nieminen M, Pösö AR. Expression of MCT1, MCT2 and MCT4 in the rumen, small intestine and liver of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.). *Comp Biochem Physiol* 2005, A 141: 29-34.

Koho NM, Väihkönen LK, Pösö AR. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. *Equine Vet J, Suppl.* 34, 2002: 555-559.

Lambert DW, Wood IS, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *Brit J Cancer* 2002, 86: 1262-1269.

Lucas ML, Blair JA. The magnitude and distribution of the acid microclimate in proximal jejunum and in relation to luminal acidification. *Proceedings of the Royal Society of London* 1978, 200: 27-41.

Merezhinskaya N, Fishbein WN. Monocarboxylate transporters: Past, present, and future. *Histol Histopatol* 2009, 24:243-264.

Meulen J van der, Bakker JGM. Effect of various sources of dietary fibre on chemico-physical characteristics of digesta in the stomach and the small intestine of the pig. Proceedings of the 5th international symposium on digestive physiology in pigs, Wageningen (Doorwerth), Netherlands, 1991: 440-445.

Müller F, Huber K, Pfannkuche H, Ashenbach JR, Breves G, Gäbel G. Transport of ketone bodies and lactate in the sheep ruminal epithelium by monocarboxylate transporter 1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 238: G1139-G1146.

Plourde V. Stress-induced changes in the gastrointestinal motor system. *Can J Gastroenterol*, 13 Suppl A 1999: 26A-31A.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993, 264: C761-C782.

Rainbird AL, Low AG. Effect of various types of dietary fibre on gastric emptying in growing pigs. *Brit J Nutr* 1986, 55: 111-121.

Ritzhaupt A, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. The characterisation of butyrate transport across pig and human colonic luminal membrane. *J Physiol* 1998, 507: 819-830.

Ritzhaupt A, Wood IS, Ellis A, Hosie KB, Shirazi-Beechey SP. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *J Physiol* 1998, 513: 719-732.

Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Takahashi M, Michibata T. Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria *in vitro*. Proceedings of the nutrition society 2003, 62: 73-80.

Sepponen K, Koho N, Puolanne E, Ruusunen M, Pösö AR. Distribution of monocarboxylate transporter isoforms MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine muscles. *Acta Physiol Scand* 2003, 177: 79-86.

Sepponen K, Ruusunen M, Pakkanen JA, Pösö AR. Expression of CD147 and monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine small intestine and colon. *Vet J* 2007, 174: 122-128.

Treem WR, Ahsan N, Shoup M, Hyams JS. Fecal short-chain fatty acids in children with inflammatory bowel disease. *J Ped Gast Nut* 1994, 18: 159-164.

Welter H, Claus R. Expression of the monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in cells of the porcine intestine. *Cell Biol Int* 2008, 32: 638-645.

Wilson MC, Meredith D, Manning Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the intensive MCT2 is embigin (gp70). *J Biol Chem* 2005, 280: 27213-27221.

Winsen van RL, Urlings BAP, Lipman LJA, Snijders JMA, Keuzenkamp D, Verheijden JHM, van Knapen F. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl Env Microbiol* 2001: 3071-3076.