

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Üld- ja molekulaarpatoloogia instituut

**ENERGEETILISE METABOLISMIGA SEOTUD GEENIDE
EKSPRESSIOONI KVANTITATIIVSED MUUTUSED
PERNITSIOOSSE ANEEMIA JA MAOVÄHI KORRAL**

Märt Rahu

Konkursitöö

Juhendaja: Lumme Kadaja, *DM*

TARTU 2009

Haridus- ja Teadusministeeriumi
Üliõpilaste teadustööde riiklik konkurss 2009

SISUKORD

Lühendid	4
1. Sissejuhatus	5
2. Kirjanduse ülevaade	8
2.1. Rakusisesed energiaülekanDESüsteemid	8
2.2. Mao antrumi ja korpuse energeetilise metabolismi iseloomustus	12
2.3. Maolimaskesta energeetilise metabolismi muutused patoloogilistes tingimustes	15
2.3.1. Pernitsioosne aneemia	15
2.3.2. Atroofiline gastriit	16
2.3.3. Helicobacter Pylori toime maolimaskestale	17
2.3.4. Maovähk ja selle tekkemehhanismid	20
2.4. Uuritavate geenide iseloomustus	22
3. Töö eesmärk	24
4. Tööülesanded	24
5. Materjal ja meetodid	25
5.1. Reaktiivid	25
5.2. Patsiendid ja koeproovid	26
5.3. Totaalse RNA eraldamine ja analüüs	27
5.4. RNA pöördtranskribeerimine	28
5.5. Konventsionaalne PCR	29
5.6. Reaalaja-PCR	29
5.7. Kalkulatsioonid ja andmete statistiline töötlus	30
6. Tulemused	31
6.1. RT-PCR lähtematerjali kvalitatiivne analüüs	31
6.2. AK, CK ja HK transkriptsiooniprofiil maolimaskestas	32
6.3. AK ja CK geenide ekspressiooni muutused atroofilise gastriidi korral	36
6.4. AK2 ja CK geenide ekspressiooni muutused maovähi korral	37
7. Arutelu	39
8. Järeldused	41
Kokkuvõte	42
Summary in English	43
Kasutatud kirjandus	45
Tänuavaldused	55

LÜHENDID

A	absorptsioon
ACTB	β -aktiini kodeeriv geen
ADP	adenosiindifosfaat
AK	adenülaatkinaas
AMP	adenosiinmonofosfaat
ANT	adeniinnukleotiidtranslokaas
ATP	adenosiintrifosfaat
ATPaas	adenosiintrifosfaataas
BB-CK	isoensüüm, aju-tüüpi kreatiinkinaas, CKB-geeni produkt
B2M	β -2-mikroglobuliini kodeeriv geen
CK	kreatiinkinaas
CKMT1	mitokondriaalse kreatiinkinaasi <i>ubiquitous</i> vormi kodeeriv geen
Cr	kreatiin
CT	lävetsükkel
DNA	desoksüribonukleiinhape
dNTP	deoksünukleotiidtrifosfaat
FDG	fluorodeoksüglükoos
HCl	vesinikkloriidhape
HK	heksokinaas
HPRT1	hüpoksantiin guaniin fosforüül transferaasi 1 koodeeriv geen
K_m	Michaelise konstant
NTC	<i>no template control</i>
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	fosfoenoolpüruvaat
PET	positronemissioontomograafia
PFK	fosfofruktokinaas
RCI	hingamiskontrolli indeks
RHK	rahvusvaheline haiguste klassifikatsioon
RNA	ribonukleiinhape
ROS	reaktiivne hapnik
RT	pöördtranskriptsioon (<i>reverse transcription</i>)
SOD	superoksiiddismutaas

1. Sissejuhatus

Vanim maovähi kirjeldus arvatakse leiduvat Vana-Egiptuse Ebersi papüüruses (umbes 1550 aastat e. Kr.). Omakorda tuleb tõdeda, et viimasel sajandivahetusel oli maovähk näiteks Inglismaal vähisurmade seas esikohal (Lochhead ja El-Omar, 2008). Vaatamata sellele, et suremus maovähki kogu Euroopa lõikes näitab langustendentsi, oli nimetatud vähiliigi (RHK järgi C16) esinemissagedus Eestis 2006. aastal, vastavalt meeste ja naiste seas, ligikaudu 33 ja 18 juhtu 100 000 elaniku kohta (Ferlay jt., 2007). Samas on selgunud, et maovähi haigestumuse langus toimub kõikjal vaid keskkonna kantserogeensete teguritega (toit, suitsetamine jms) seotud nn. intestinaalse vähitüübi arvel. Nii esinemissageduselt kui ka surma põhjusena on maovähk Eestis meestel 2. kohal, naistel aga esinemissageduselt 3. ja surma põhjusena 2. kohal. Korpus-dominantset atroofilist gastriiti loetakse maovähi riskifaktoriks (Sipponen jt., 1985; Ye ja Nyren, 2003). Pernitsioosset aneemiat põdejate seas on maovähi esinemissagedus 1%–3%, samas on 2%-l vähihaigetest pernitsioosne aneemia (Toh jt., 1997).

1982. a. leiti Barry J. Marshall ja J. Robin Warreni poolt maos seni tundmatu bakter – *Helicobacter pylori*, mis muutis maohaiguste patogeneesi ja ravi kontseptsiooni. Selgus, et kõik tuntud ja sagedasemad maohaigused – krooniline gastriit, peptiline haavand ja maovähk on seotud uue bakteriga. 2005. aastal pälvisid Marshall ja Warren selle avastuse eest Nobeli füsioloogia- ja meditsiinipreemia.

Atroofilist gastriiti loetakse maovähi prekantseroosiks (Haber, 2002). Molekulaarsed mehhanismid, mis vahendavad atroofilise gastriiti üleminekut vähiks ei ole täpselt teada, kuid rakutasandil tehtud uuringud viitavad energeetilise metabolismi häiretele. Otto Heinrich Warburg oli esimene, kes 1924. a. esitas hüpoteesi, mille kohaselt vähi teke on kausaalselt seotud OXPHOS protsessi supressiooni ja glükolüüsi aktivatsiooniga. Tänapäeval me teame, et vähi peamised põhjused on onkogeenide ja tuumor-supressor geenide mutatsioonid. Viimastel aastatel saadud andmete kohaselt võivad maovähi tekkes etendada tähtsat osa tüvirakud (Correia jt., 2009). Warburgi efekti peetakse pigem vähi tekitatud mitokondrite kahjustuse tulemuseks, kuid seda võivad esile kutsuda ka nn. vähigeenid, mis peatavad mitokondrite apoptoosiprogrammi. Seda probleemi võib käsitleda ka kui adaptatsiooni hapnikuvaegusele kasvaja sisemuses. Kuna raku energeetilisest seisundist sõltub haiguse prognoos ja ravi efektiivsus (Neubauer jt., 1997; Wiggers jt., 2001) pakuvad suurt huvi energeetilise metabolismi kliinilised uuringud ja mõjutusvõimalused. Kasvajarakkude glükolüüsile tuginedes on hakatud otsima võimalusi

kliiniliseks vähidiagnostikaks. Glükolüüsiga on otseselt seotud positronide emissioontomograafia (PET). Selles meetodis rakendatakse positrone emiteerivate isotoopide nagu ^{18}F võimet seostuda bioloogiliste substraatidega (n. glükoosiga). Glükolüütilise aktiivsuse markerina on asutusel glükoosi analoog fluorodeoksüglükoos (FDG), mis organismi viiduna võetakse üles glükoosikasutavate rakkude poolt ning fosforüülitakse ensüüm heksokinaasi vahendusel. Onkoloogiliste haiguste korral kasutatakse PET meetodit n. haiguse staadiumi (ulatuse) hindamisel või algkolde ja metastaaside lokaliseerimiseks. FDG on mitte-spetsiifiline tuumor-marker. Loomisel ja katsetamisjärgus on mitmed energeetilisele metabolismile suunatud ravimid. Nimetada võiks siin näiteks glükolüüsi inhibiitorite kasutamist. Võimalik, et tehnoloogiate edasi arenedes hakatakse rakendama transkriptoomi või metaboloomi iseärasustest juhitud kemoteraapiat.

Teatavasti on maovähirakkudes vähenenud BB-CK aktiivsus ning tsüklokreatiin ja kreatiin pidurdavad vähi arengut (He jt., 2004; Kristensen jt., 1999; Miller jt., 1993), mis viitab rakusisese energiaülekanne mehhanismide muutuste olulisele rollile maoepiteeli haiguslikes transformatsiooniprotsessides. Praeguseks on veel vähe andmeid selle kohta, kuidas muutub CK ja AK süsteemi komponentide ekspressioon erinevate maohaiguste korral ning kuidas need muutused moduleerivad energiaülekanne süsteemide funktsiooni. Energiaülekanne mehhanismide paremaks mõistmiseks haigestunud koes, oleks vajalik teada millisel määral muutub energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonitase atroofilise gastriidi kui vähieelse seisundi puhul. Inimesel on maovähi arengut raske uurida, kuna selleks oleks vaja pikaajaliselt jälgida suurt hulka katsealuseid. Seetõttu on käesolevas töös uuritud kolme erinevat patsientide gruppi, kellel on: 1) gastrii ilma atroofiata; 2) pernitsioosse aneemiaga kaasnev atrofiline gastriit (maovähi prekantseroos); 3) maovähk. Hiljuti selgus nimetatud patsientide grupi võrdlemisel, et pernitsioosse aneemiaga kaasnev maolimaskesta atroofia on seotud mitokondrite s. o. energiat genereerivate raku organellide väärtalitlusega (Gruno jt. 2008). Molekulaarsed mehhanismid, mis vahendavad atroofilise gastriidi üleminekut vähiks ei ole täpselt teada, kuid rakutasandil tehtud uuringud viitavad energeetilise metabolismi häiretele. Teadaolevalt ekspresseeritakse maolimaskestas CK, AK ja HK isovorme, mis osalevad rakusisestes energiaülekanne süsteemides ning maohaiguste korral esinevad nende süsteemide funktsiooni häired. Sellest tulenevalt on formuleeritud ka käesoleva **töö hüpotees**, mille kohaselt *pernitsioosse aneemiaga patsientidel esineva maolimaskesta atroofiaga kaasnevate OXPHOSi protsesside ning mitokondrite ja ATPaaside*

interaktsioonimehhanismide kahjustused on seotud energeetilises metabolismis osalevate geenide ekspressiooni muutustega, mis võivad olla veelgi enam väljendunud maovähiga patsientidel ning erineda mao antrumi ja korpuse vahel.

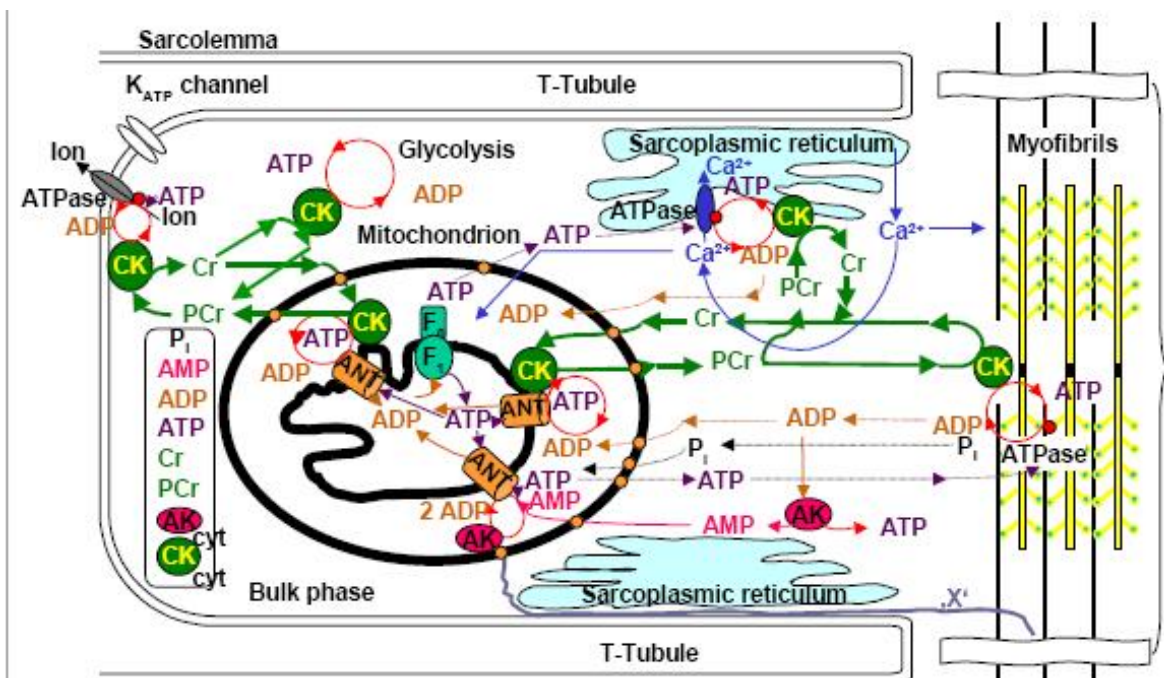
On andmeid, et maovähiga kaasnevad kreatiinkinaasse ja adenülaatkinaasse süsteemi muutused. Kroonilise maopõletiku üleminek atroofiliseks gastriidiks tähendab mao adenokartsinoomi kõrget riski. Seetõttu käsitletakse atroofilist gastriiti kui prekantserooset seisundit. Molekulaarsed mehhanismid, mis vahendavad atroofilise gastriidi üleminekut vähiks ei ole täpselt teada, kuid rakutasandil tehtud uuringud viitavad energeetilise metabolismi häiretele, sealhulgas mitokondrite väärtalitlusele. Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärgiks: *Selgitada välja, kas atroofilise gastriidiga ja maovähiga kaasnevad mitokondriaalse kreatiinkinaasi ja adenülaatkinaasi ning B-tüüpi kreatiinkinaasi mRNA taseme muutused.*

Töö tulemused peaksid aitama paremini mõista, kuidas raku energiaülekannet vahendavaid ensüümivalke kodeerivate geenide ekspressioon moduleerib vastavate isoensüümide rolli maolimaskestas haiguste korral. Paljude patoloogiliste protsessidega – põletikuga, apoptoosiga ja kantserogeneesiga kaasnevad mitokondrite funktsioonihäired. See on üheks põhjuseks, miks töös on uuritud just mitokondriaalsete protsessidega seotud CKMT1, AK2 ja HK2 gene. Nimetatud geenide produktid on valgud, mis osalevad rakusisesestes energiaülekandesüsteemides ning on seostunud OXPHOS protsessis ATPd produtseerivate raku organelide (mitokondrite) membraanidega.

2. Kirjanduse ülevaade

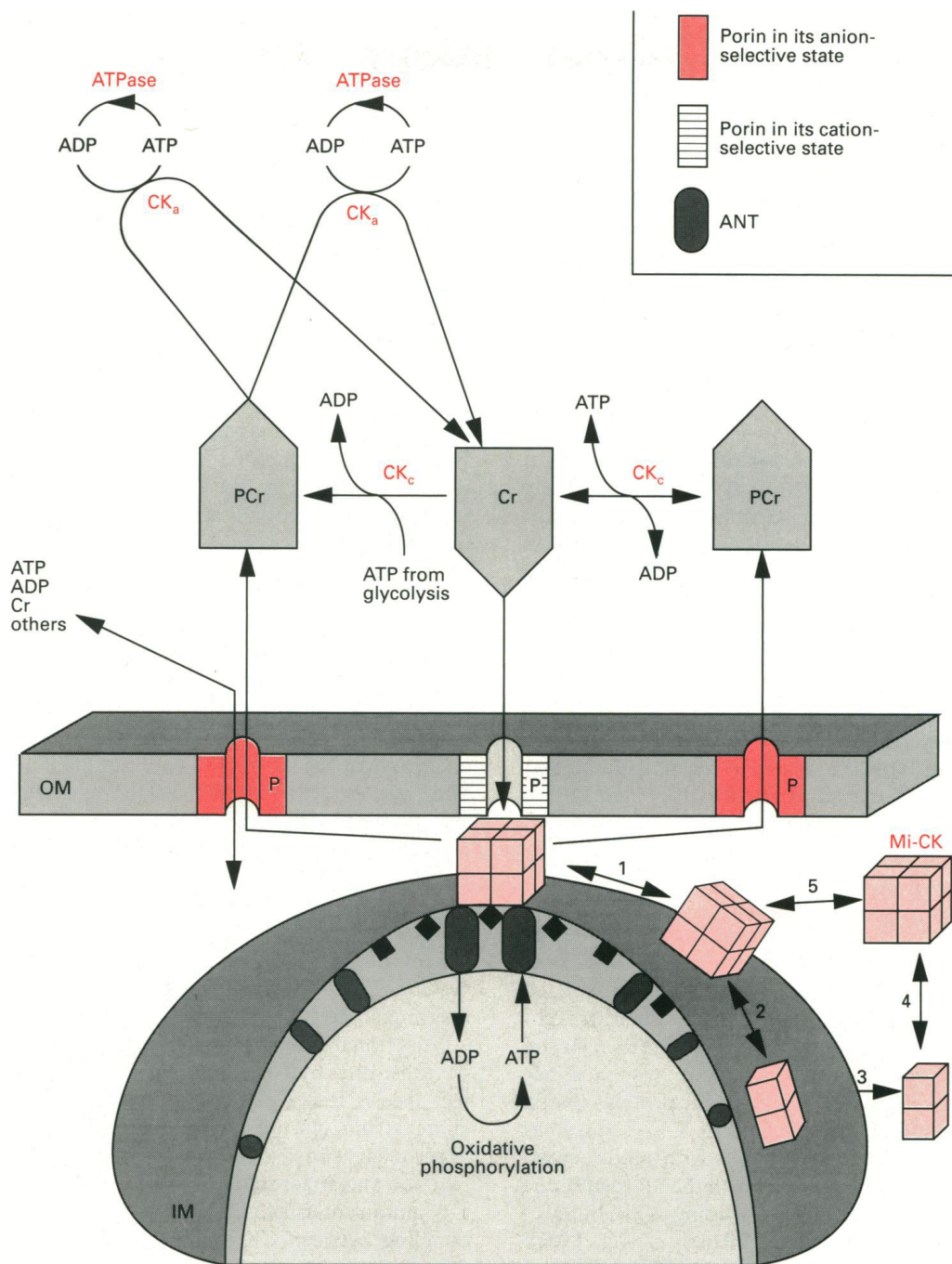
2.1. Rakusised energiaülekandesüsteemid

Energeetilise metabolismi protsesside uuringud raku tasemel *in vivo* näitavad, et südames ja oksüdatiivsetes skeletilihastes on mitokondrid, CaMgATPaasid, CK ja AK isoensüümid ning adeniinnukleotiidid kompartmenteeritud funktsionaalsetesse kompleksidesse, mida võib pidada raku energetilise metabolismi põhimooduliteks (Joonis 1)



Joonis 1. Raku energetiline üksus (Intracellular Energetic Unit) – kreatiin- (CK) ja adenülaatkiinasiidi (AK) võrgustik, mis tagab efektiivse energia ülekande mitokondritest raku energiat kasutavate kohtadeni (ioonpumbad, lihasraku kontraktsiooniaparaat jt.)

Selline struktuuriline organisatsioon, mis formeerub raku tsütoskeleti valkude abil, kindlustab CK ja AK isoensüümid vahendusel efektiivse energiaülekande ja tagasiseid mitokondrite ja ATPaaside vahel (Anmann jt., 2005; Saks jt., 2001, 2004, 2006; Seppet, 2001; 2006). Ülalnimetatud süsteemid vahendavad kolme protsessi: 1) funktsionaalse seose kindlustamise CK mitokondriaalse isovormi ja ANT vahel või AK2 ja ANT vahel; 2) energiarikaste fosforüülrühmade ülekande mitokondritest energiat tarivate kohtadeni 3) ATP regenerimine ATPaaside vahetus läheduses ja nendega funktsionaalses seoses olevate CK või AK1 abil (Dzeja ja Terzic, 2003; Saks jt., 2004). CK energiaülekande skeem on esitatud joonisel 2 (Wallimann jt., 1992).



Walliman *et al.*, Biochem. J. (1992) 281, p. 26

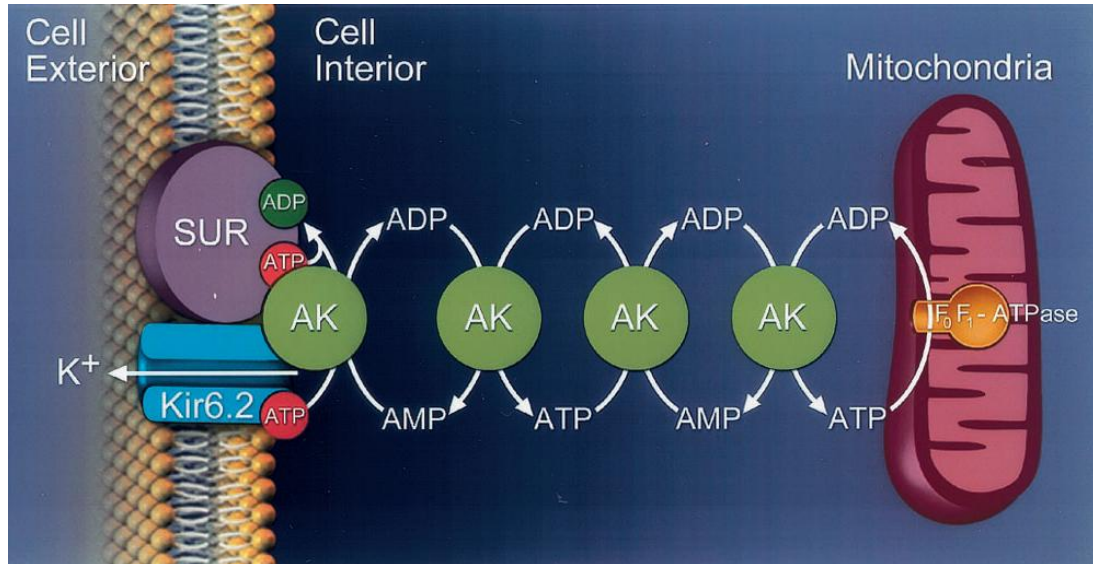
Joonis 2. Kreatiinkinaase energiaülekandesüsteemi skeem

IM – mitokondri sisemembraan; OM – mitokondri välismembraan; P – poriinikanal

Näidatud on 4 peamist kompartmenti, kus CK isoensüümid lokaliseeruvad: i) Tsütosoolne CK_c, mis on seostunud ATPd tootva glükolüütilise süsteemiga; ii) mitokondriaalne Mi-CK, mis on ANT kaudu funktsionaalselt seotud ATPd tootva OXPHOS protsessiga

mitokondrites; iii) tsütosoolne CK_a isovorm, mis on spetsiaalselt kompartmeteeritud energiainõudvate rakukomponentide läheduses, kus ta on funktsionaalselt seostatud ATPaasidega; iv) raku komponentidega seostumata lahustuv CK, mis tasakaalustab PCr/Cr ja ATP/ADP puulid tsütosoolis. Oktameerse Mi-CK interaktsioon ANTi molekulidega toimub ilmselt kardiolipiini kaudu. Sisemembraani valgud Mi-CK ja ANT on seostunud ka välismembraani voltaazh-tundliku ioon-selektiivse poriiniga, moodustades nii multiensüümse efektiivse membraanidevahelise energiakanali. Vastavalt sellele mudelile, OXPHOS käigus sünteesitud ATP kantakse tetrameerse ANT poolt (vahetuseks ADP molekulide vastu) läbi sisemembraani ning transfosforüülitakse oktameerse Mi-CK poolt fosfokreatiiniks, mis väljub mitokondrist läbi oligomeerse poriinikanali. Seega energia levib raku vektoriaalselt (ligandidena) PCr molekulide abil ATPaasideni, kus nendega seotud CK reaktsioonis genereeritakse ATP.

Tänapäevani on inimesel teada viis AK isoensüümi (Van Rompay jt., 1999), mis lokaliseeruvad mitokondrites, tsütosoolis või on seotud membraanidega (Tanabe jt., 1993; Carrasco jt., 2001). Adenülaatkinaasne energiaülekanalüsteemi skeem on esitatud joonisel 3.



Carrasco *et al.*,
PNAS (2001) 98, p.7627

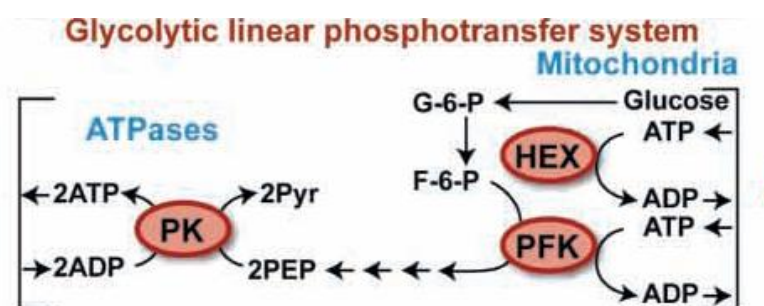
Joon. 3. Adenülaatkinaasne energiaülekanalüsteem raku

Maolimaskestas AK katalüüsib fosforüülrühma ülekannet: ADP, ATP ja AMP vahel. AK1 ja AK2 isoensüümid on ATP:AMP fosfotransferaasid. AK3 on GTP:AMP fosfotransferaas. Inimese AK4 cDNA on suure osas AK3 homolog ning inimese AK4

valk ei oma ATP:AMP ega ka ka GTP:AMP ensümaatilist aktiivsust (Noma *et al.*, 2001). AK5 on leitud ajukoe tsütosoolis ja selle isoensüümi kohta on teada, et tal on nii ATP:AMP kui ka GTP:AMP aktiivsus (Noma, 2001). AK isoensüümide peamiseks ülesanneteks on a) reguleerida adeniinnukleotiidide homeostaasi, et säilitada “raku energialaengut” (Atkinson, 1977; Tanabe, 1993) ja b) osaleda rakusiseses energia ülekandes mitokondritest energiat vajavate kohtadeni (Dzeja ja Terzic, 2003).

AK geenide ekspressioon on koespetsiifiline ja arenguliselt reguleeritud (Tanabe jt., 1993). Mitokondriaalse AK2 ja tsütosoolse isovormi AK1 koordineeritud tegevus võimaldab ühes ATP molekulis kahe energia-rikast kaksiksidet sisaldava fosforüülrühma ülekannet energiat tarbivate struktuurideni (Zeleznikar jt., 1995). AK energiaülekandesüsteem kommukeerib mitokondrites genereeritud signaalid K_{ATP} kanalitega. AK molekulid moodustavad fosforüülivahetusvõrgustikud, mis võivad ühendada mitokondreid ka rakumembraaniga (Carrasco jt., 2001).

Glükolüütilised ensüümid nagu näiteks HK annavad samuti oma panuse rakusiseses energiaülekande efektiivsuseks toimimiseks (Dzeja jt., 1998; de Groof jt., 2001). Mitokondriaalsete ATP molekulide energiat sisaldavate fosforüülrühmade abil fosforüülitakse heksokinaases reaktsioonis glükoos ja fosfofruktokinaasi PFK vahendusel fruktoos-6-fosfaat, ristumisel glükolüütilise rajaga fosforüülitakse püruvaatkinaasi (PK) abil ATPaaside lähedal ADP (Joonis 4).



Dzeja and Terzic,
J Exp Biol, (2003) 206, p. 2043

Joonis 4. Glükolüütilise ensüümide HK- (HEX), PFK- ja PK-vahendatud) energiaülekandesüsteemi skeem

G-6-P – glükoos-6-fosfaat; PFK – fosfofruktokinaas; PK – püruvaatkinaas; Pyr– püruvaat

Glükolüüsiprotsessis genereeritud energiarikkad fosforüülrühmad omavad tähtsust raku spetsiifiliste funktsioonide toetamisel nagu näiteks membraani ioongradiendi säilitamisel, raku motiilsuse tagamisel, lihaskontraktsioonil või rakutuumas kulgevate protsesside

toimumisel (Ottaway ja Mowbray, 1977; Masters jt., 1987). Samuti on leitud, et glükolüütilised ensüümid osalevad ATP/ADP tundlike rakukomponentide, näiteks K_{ATP} kanalid, regulatsioonis ((Weiss ja Lamp, 1987; Dzeja ja Terzic, 1998), moodustades nii rakusise signaalsiooni mitokondrite ja rakumembraani vahel.

Kõrgemates organismides on tuvastatud neli HK isoensüümi, mida kodeerivad erinevad geenid. HK1 ja HK2 valgud seostuvad mitokondritega (Wilson, 2003). HK2 ekspressioonitase on kõrge inimese HepG2 ja roti hepatoomi rakuliinis AH 130 (Shinohara jt., 1991, 1994) ja vähirakkudes võib HK2 seostuda poriini kaudu funktsionaalselt OXPHOS süsteemiga (Arora ja Pedersen, 1988).

2.2. Mao antrmi ja korpuse energeetilise metabolismi iseloomustus

Maoepiteel on kõrge energiatarbimisega kude. Nagu lk. 8 kirjeldatud, selliste kudede rakkudes (n. lihas, aju) on mitokondrid ja ATPaasid s. o. rakku energiaga varustavad ja energiat tarbivad kohad, omavahel seotud spetsiaalsete energiaülekandesüsteemide abil, milles osalevad CK ja AK, kuid ka HK isoensüümid. Selline energeetilise metabolismi organisatsioon rakus võimaldab hoida täpset vastavust mitokondriaalse ATP sünteesi ja ATP tarbimise vahel (Saks, 2001; Dzeja 2003). Mao limaskestarakkude kultuuris on detekteeritud nii CK kui ka AK aktiivsused (He jt., 2004; Rong jt., 1998; Sistermans jt., 1995; Takikawa jt., 2006). Samuti on näidatud mRNA ja valgu tasemel, et inimese mao antrumis kui ka korpuses ekspresseeruvad CKB, CKMT1, AK1 ja AK2 geenid (Gruno jt., 2006). Parietaalrakkudes on BB-CK funktsionaalselt seotud H^+/K^+ ATPaasiga, et efektiivselt toota prootonite pumpamiseks ATPd (Sistermans jt., 1995), mis on prootonpumba primaarne energiaallikas (Sachs jt., 1976). HCl sekreteerivad parietaalrakud vajavad palju energiat ning on selleks hästi kohandatud, sisaldades arvukalt mitokondreid (25–45%) ja vastavat ensüümsüsteemi, et hoida kõrget oksüdatiivset potentsiaali. Korpuse limaskesta oksüdatiivne kapatsiteet seostub seega massilise happe genereerimisega parietaalrakkude poolt. Protonpumpade (H^+/K^+ -ATPaaside) lühiajaline inhibeerimine omeprazooli ja ranitidiiniga pidurdab mao korpuses mitokondrite funktsiooni (Hui jt., 1989). Teisalt on teada, et mitokondriaalsete protsesside blokeerimisel kaob maonäärmete H^+ -pumba aktiivsus (Rong jt., 1998). Paralleelselt parietaalrakkude sekretoorse aktiivsuse muutustega leiavad aset morfoloogilised muutused mitokondrites (Jiang jt., 2002; Spicer jt., 2000). Ülalöeldut arvestades võib eeldada, et maolimaskestarakkudes toimivad mehhanismid, mis võimaldavad täpselt reguleerida ATP sünteesi mitokondrites nii, et see oleks kooskõlas ATP kasutamisega sekretoorsetes protsessides. Erinevused mao

anatomiliste piirkondade antrumi ja korpuse vahel ei piirdu ainult mitokondrite hulga erinevusega (Martin jt., 1987; Sato jt., 1978), vaid ka nende funktsionaalsete omaduste erinevusega. Energeetilist metabolismi on võrdlevalt uuritud mao antrumist ja korpusest võetud gastroendoskoopilistes biopsiates (Gruno jt., 2006). Mitokondrite hapniku tarbimise kiirused *in situ* saponiin-permeabiliseeritud rakumembraaniga koepreparaatides (nii mittefosforüülivates mitokondrites kui ka ADP-aktiveeritud kiirused) on antrumis madalamad kui korpuses, mis viitab sellele, et antrumis on vähem mitokondreid kui korpuses. Samuti erinevad mitokondrite hingamiskomplekside funktsionaalsed omadused. Korpuses on 1. kompleksi hingamiskiirus suurem kui 2. kompleksi oma, mis eeldab, et elektronide transport limiteeritakse teise kompleksi tasemel. Antrumi limaskesta elektronide transpordiahela uurimisel on leitud kompleks I suhteline alafunktsioon. Mao mitokondrite funktsiooni terviklikkuse arvuline näitaja on hingamiskontrolli indeks RCI (Martin jt., 1987). RCI väärtused sõltuvad hingamisel kasutatavast substraadist. Glutamaadi korral on korpuse jaoks kalkuleeritud indeksi väärtus kõrgem kui antrumi puhul, aga suktsinaadi korral jääb korpust iseloomustava RCI väärtus antrumiga madalamaks (Gruno jt., 2006).

Maolimaskestarakkude energiaülekandesüsteemide funktsiooni kohta on teada, et totaalsed CK ja ATPaasi aktiivsused on korpuses suuremad kui antrumis, kuid totaalsed AK aktiivsused oluliselt ei erine. Konventsionaalse PCR abil on kindlaks tehtud, et ilma atroofiata antrumi ja korpuse limaskestas ekspresseeruvad AK1, AK2, CKB ja CKMT1 (Liivo, 2008), kuid pole teada millisel määral need mRNA tasemed muutuvad erinevate maohaiguste, näiteks kroonilise atroofilise gastriidi ja adenokartsinoom korral. Westerni meetodil on näidatud ka ülalnimetatud energeetilise metabolismiga seotud geenide avaldumist valgu tasemel (Gruno jt., 2006) ning natiivse foreesi abil CK-BB ja mitokondriaalse kreatiinkinaasi funktsionaalse aktiivsuse olemasolu (Hirata jt., 1989). Proteoomi analüüsi andmetel ekspresseeritakse inimese ka mao MKN-45 rakuliinis adenülaatkinaas 2 valku (Takikawa jt., 2006). Toodud andmed viitavad sellele, et ka maolimaskestarakkudes võivad funktsioneerida energiaülekandesüsteemid, mille regulatsioonimehhanismid teiste kudede rakkudes n. kardiomüotsüütides on hästi teada. Mitokondrid ja ATPaasid kommunikeeruvad seal CK ja AK erinevate isovormide vahendusel, kusjuures mitokondriaalse CK ja AK ning ANT vahel on funktsionaalne seos. CK-MM ja AK1 lokaliseeruvad kardiomüotsüütides aga energiat tarbivate kohtade (n. müofibrillid, sarkoplasmaatiline retiikulum) vahetus läheduses ning on funktsionaalselt seostatud sealsete ATPaasidega (Dzeja ja Terzic, 2003; Saks jt., 2001, 2004). Siermans jt. (1995) on näidanud, et CK võib osaleda sarnastes mehhanismides maolimaskestarakkudes,

tuginedes funktsionaalsele seosele parietaalrakkude BB-CK ja H^+/K^+ -ATPaasi vahel. Hilisemad Gruno jt. (2006) andmed näitavad, et antrumis ja korpuses ekspresseerub lisaks CK-BB isovormile ka mitokondriaalne CK, mida kodeerib CKMT1 geen, mille valguline produkt on funktsionaalselt seotud OXPHOS protsessiga. Seda kinnitab fakt, et kreatiin aktiveerib 50 μ M ATP juuresolekul maoliaskestarakkudes hingamist, aktiveerides tsütosoolse ja endoplasmaatilise retiikulumiga ning mitokondritega seotud CK.

CK katalüüsib reaktsiooni:



mille tagajärjel suureneb tsütoplasmas ADP kontsentratsioon, sest mitokondrites on selle reaktsiooni tasakaal nihutatud PCr tekke suunas. Olles difundeerunud läbi välismembraani mitokondritesse, kantakse ADP sisemembraanis lokaliseeruva ANT vahendusel maatriksisse, kus ta aktiveerib oksüdatiivset fosforüülimist. Kirjeldatud mehhanism (Mudel 1), eeldab kiiret ADP kontsentratsioonide tasakaalustumist membraanidevahelises alas, tsütosoolis ja ümbritsevas keskkonnas samaaegselt toimivate ATPaasete, AK ja CK reaktsioonide tõttu. Alternatiivselt võib kreatiin aktiveerida ADP teket lokaalselt, mitokondriaalse CK abil vahetus ANT läheduses, mitokondrites OXPHOS reaktsioonis tekkinud ATP arvel. Seda mehhanismi (Mudel 2) tuntaksegi lihasraku bioenergeetikast ANT ja mitokondriaalse CK funktsionaalse seostatuse all ja selline mudel toimib ka maolimaskestarakkudes. Eksperimentaalsete andmete kohaselt on K_m väärtus ADP jaoks OXPHOS protsessis nii antrumi kui korpuse mitokondrites *in situ* ligikaudu 0.1 mM (Gruno jt., 2006), mis on peaaegu suurusjärg rohkem kui koest eraldatud mitokondrites (Kuznetsov jt., 1996). See fakt näitab eksogeense ADP piiratud kättesaadavust OXPHOS süsteemile, mis on ilmselt tingitud mao antrumi ja korpuse energeetilise metabolismi spetsiifilisest organisatsioonist.

Kokkuvõttes võib terviklikku CK-vahendatud energiaülekandeüsteemi maolimaskestarakkudes ette kujutada järgmiselt: 1) PCr süntees mitokondrites; 2) energarikaste fosforüülrühmade ülekande PCr molekulides energiat tarbivate ioonpumpadeni; 3) ATP regenereerimine ATPaaside vahetus läheduses tänu nende funktsionaalsele seostatusele BB-CK valguga. Mitokondriaalse AK2 ja tsütosoolse AK1 isovormi ekspressioon ning AK2 seos OXPHOS süsteemiga viitab otseselt ka AK-vahendatud energiaülekandeüsteemi toimimisele nii antrumis kui ka korpuses.

2.3. Maolimaskesta energeetilise metabolismi muutused patoloogilistes tingimustes

2.3.1. Pernitsiosne aneemia

Pernitsiosne aneemia on haigus, mille puhul organism ei omasta B-12 vitamiini loomulikult teel s. o. seedetrakti kaudu. Vitamiin B12-defitsiitne aneemia on megaloblastilise aneemia vorm (Kumar, 2007). Seda liiki aneemia korral on punavererakud suured, mistõttu nimetatakse neid megalotsüütideks, suurpunaliblesust nimetatakse makrotsütoosiks. Ka luuüdi ebaküpsed tuumaga punavererakud on suured, neid nimetatakse megaloblastideks (Kr. *megas*, *megale*, *mega* – suur). Megaloblastilise aneemia hematoloogilised iseärasused ongi eelkõige veres makrotsütoos ja luuüdis hüpertsellulaarsus, erütroidne hüperplaasia, megaloblastide esinemine ja hiid-metamüelotsüüdid. Megaloblastilise aneemia kliinilised manifestatsioonid on aneemia ning epiteelkoe kahjustused. Pernitsiosse aneemia diagnoosi kriteeriumid on: makrolüütiline aneemia, parietaalrakkudevastased antikehad ning madal B₁₂ vitamiini ja foolhappe tase vereseerumis (Gruno jt., 2008).

Põhjused, esinemissagedus, riskifaktorid: Vitamiin B12 on vajalik aine närvisüsteemi normaalseks tegevuseks ja erütrotsüütide, granulotsüütide ja trombotsüütide produktsiooniks ning normaalseks küpsemiseks luuüdis. Vitamiin B12 allikaks on loomse päritoluga produktid. Vitamiin B12 imendub organismis vaid seotud kujul. Seega peab vitamiin B12 seonduma nn. sisemise faktoriga (*intrinsic factor, IF*), mis on valguline aine ning mida toodetakse maolimaskesta parietaalrakkude poolt. Seotud kujul vitamiin B12 (IF-B12 kompleksina) imendub valdavalt peensoole lõpposas. Pernitsiosset aneemiat põdevate inimeste organism on kaotanud võime sünteesida sisemist faktorit, mistõttu vitamiin B12 ei imendu soolest ja areneb vitamiin B12 defitsiitne aneemia (Kumar, 2007). Vanemas eas võib põhjuseks olla ka soolhappe puudus maomahlas, mille puhul B12 ei vabane juba süljes R-valguga tekkinud kompleksist. Haigus võib olla pärilik, kuid võib kaasneda ka mitmesugustele autoimmuunsetele endokriinhaigustele nagu suhkurtõbi (I tüüp), hüpoparatreoidism, Addisoni tõbi, hüpopituitarism, testikulaarne düsfunktsioon, Graves'i tõbi, krooniline türeoidiit, *myastenia gravis*, sekundaarne amenorröa, vitiligo. Aegamööda tekib vitamiin B12 defitsiidi tulemusena sensorsete ja mootorsete närvide kahjustus neuroloogilise sümptomatoloogiaga. Aneemia mõjutab ka mao-sooletrakti ja südame-veresoonekonda. Maos võib areneda atroofiline gastriit.

2.3.2. Atroofiline gastriit

Atroofiline gastriit (K29.4) on põletikuline maohaigus. Põletiku foonil võib tekkida mitmesuguseid haigusi: kaksteistsõrmiku haavand, maohaavand, nende tüsistused – verejooks, haavandi mulgustumine, maovähk (Maaroos, 2006).

Etioloogiliste faktorite järgi jaotatakse kroonilised gastriidid järgnevalt: 1) autoimmuunne gastriit (tüüp A); 2) *Helicobacter*-gastriit (tüüp B); 3) keemilis-toksiline gastriit (tüüp C). A-tüüpi e. autoimmuunse gastriidi korral on etioloogiliseks faktoriks antikehad parietaalrakkude ja vitamiin B12-resorptsioonifaktori vastu.

Maopõletike formaal-patogeneetiline jaotus on järgmine: 1) krooniline (pindmine, lihtne) gastriit; 2) krooniline aktiivne gastriit; 3) krooniline atroofiline gastriit; 4) krooniline gastriit metaplaasiaga e. koe kvalitatiivse teisenemisega.

Atroofilise gastriidi korral on maolimaskest õhenenud ja silenenud, maonäärmete hulk vähenenud. Väheneb ka mao happesus, mis võimaldab nitriteid ja nitroosamiine tootvate bakterite arenemist. Kroonilist atroofilist gastriiti seostatakse maovähi tekkega.

Patofüsioloogia. Autoimmuunne metaplastiline atroofiline gastriit on atroofilise gastriidi pärilik vorm, autoimmuunne haigus, mis ründab parietaalrakke ja põhjustab hüpokloorhüüdriat ning sisemise faktori defitsiiti, mille tagajärjel tekib vitamiin B12 imendumishäire ja sageli areneb pernitsioosne aneemia. Autoimmuunne metaplastiline atroofiline gastriit lokaliseerub enamasti korpuses ja ka funduses e. maopõhimikus. Hüpokloorhüüdriast kutsub esile gastriini produtseerivate G rakkude hüperplaasia, mis viib hüpergastrineemia tekkele. Gastriin avaldab troofilist efekti ECL-rakkudele, mis vastutavad histamiini sekretsiooni eest ning see arvatakse olevat üks mehhanism, mis võiks selgitada ECL rakkude malignantset transformatsiooni kartsinoidseteks tuumoriteks autoimmuunse metaplastilise atroofilise gastriidi puhul. Atroofilise gastriidiga patsientidel on suur risk adenokartsinoomi tekkeks (Giannakis jt., 2008).

Atroofilises korpuses on OXPHOS kapatsiteet oluliselt langenud (Gruno jt., 2008), mis on kooskõlas varasemate andmetega. Nende kohaselt, võrreldes normaalse maoga, langeb atroofia korral epiteelirakkudes mitokondrite sisaldus ja ka cristade (sisemembraani sopistuste) arv mitokondris ning rohkem on defragmenteerunud cristasid ja paisunud mitokondreid (Yin jt., 2003).

Atroofilise gastriidi patogeneesis on oluliseks faktoriks *H pylori* infektsioon (Katelaris jt., 1993).

2.3.3. *Helicobacter pylori* toime maolimaskestale

Kui 2005. aastal Nobeli füsioloogia- ja meditsiinipreemia pälvinud Barry J. Marshall ja J. Robin Warren 1982. aastal Austraalias Perthis *Helicobacter pylori*, tollase nimega *Campylobacter pylorum* avastasid, avas see maohaiguste käsitluses uue ajastu. *Helicobacter pylori* on mikroaerofiilne bakter, kes elab vähese hapnikuga keskkonnas – kaitstult mao limaskesta limakihis. Ta toodab oma elutegevuses ureaasi, mis on tema kaitseaine happe vastu, kuid mille toimele tekib maos kudesid kahjustav ammoniaak. Bakteril on ka kudesid kahjustavad spetsiifilised nakkuslikud valgud (CagA), toksiinid (VacA) ja ensüümid, mis lõhustavad rakukesta. Nii tekib helikobakteri toimele mitmesuguste põletikuvahendajate osavõtul maolimaskestapõletik, mis loob soodsa pinna teiste sagedaste maohaiguste kujunemiseks. *Helicobacter pylori* põhjustatud limaskestapõletik areneb osal inimestel selle kõige raskemakujuks vormiks, atroofiliseks gastriidiks. Atroofiline gastriit omakorda on tunnustatud vähieelseks seisundiks. Inimesel on maovähi arengut raske uurida, selleks oleks vaja aastakümneid jälgida suurt hulka katsealuseid. See, milline on maolimaskestapõletiku kulgu ning kas areneb atroofia, sõltub suurel määral peremeesorganismist ja tema immuunvastusest (Maaroos 2006).

Krooniline aktiivne gastriit, näärmete atroofia, maohaavad, limaskestaseoseline lümfoidse koe lümfoom ja adenokartsinoom on kõige sagedasemad maohaigused. Kuigi need haigused on kliiniliselt erinevad, seob neid ühine etioloogiline faktor, *Helicobacter pylori* (Konturek jt., 2001; Meining jt., 2001; Zhang, 2005). See bakter kutsus põletiku esile mitme teguri kaudu (nagu vakuoliseeriv tsütotoksiline valk VacA või siis lipopolüsahhariidi LPS toimele). LPS toimib viies suunas: 1) stimuleerib pepsinogeeni sekretsiooni; 2) muudab lima omadusi, muutes lima kõrgmolekulaarsest madalmolekulaarseks; 3) segab limabarjääri kaitsefunktsiooni 4) Lipaas A vähendab LPS-i immunoloogilist aktiivsust ja tänu madaldate immunoloogilisele aktiivsusele võib *H. Pylori* peremeesrakus kindlalt alal hoida; 5) indutseerib otseselt põletiku teket, neutrofiilide ja lümfotsüütide migratsiooni sublimaskestast (Naito ja Yoshikawa, 2002). Maoepiteelihaiguste puhul on teada, et *H. pylori* vacA tsütotoksiin permeabiliseerib mitokondrite membraane, mis vähendab mitokondrite võimet sünteesida ATP-d ja indutseerib apoptoosi. *H. pylori* põletikku soodustav toime on seotud hapniku vabade radikaalide liiaga ning avaldub tugevamini ja sagedamini antrumi epiteelis võrreldes korpusega (Broide jt., 1996; Gruno jt., 2006). Liigne ROS teke, mis avaldab mao

epiteelirakkudele tsütotoksilist toimet lipiidide peroksidatsiooni, membraanikahjustuste ja raku glutatiooni (tugev kehasisene antioksidant) varude vähendamise kaudu (Davies jt., 1994; Jung jt., 2001; Santra jt., 2000; Xia ja Talley, 2001), on koe peamine põletikuline vastus. Mitokondrid mängivad maopõletike tekkes tähtsat osa mitte ainult ROS allikana vaid ka märklauana (Raha ja Robinson, 2000). Kultureeritud maoepiteelirakkudes AZ-521 inaktiveerib tsütotoksiin VacA mitokondrite kahjustuste tõttu energeetilist metabolismi (Kimura jt., 1999; Ashktorab jt., 2004) ja aktiveerib apoptoosi (Galmiche jt., 2000; Maeda jt., 2005). Antrum ja korpus võivad olla mõjutatud erineval määral, kuna mõningatel andmetel on korpuses rohkem mitokondreid (Martin jt., 1987; Sato jt., 1978).

Viimastel andmetel iseloomustab inimese antrumi epiteelirakkude mitokondrite hingamisahelat kompleks I suhteline defitsiit võrreldes korpuse mitokondritega, mis võib stimuleerida HVR-de rohkemat teket antrumis. Samuti häirub mitokondriaalsete kinaaside funktsionaalne seos OXPHOS süsteemiga (Gruno jt., 2006), mis võib olla seotud CKMT1 geeni alaekspressiooniga. Mitmete uurimisgruppide andmed näitavad, et *H. Pylori*-seoseline põletik on seotud SOD mitokondriaalse isovormi aktivatsiooniga antrumis, kuid mitte korpuses (Broide jt., 1996; Farkas jt., 2003; Gotz jt., 1996, 1997). Viimased andmed näitavad, et mitokondrite vastus kroonilisele aktiivsele põletikule antrumi ja korpuse limaskestas on mõneti üllatav, sest OXPHOS supresseeritakse just korpuses, kuid on ülesreguleeritud antrumis (Gruno jt., 2006). Antud juhul pakub huvi, kas nimetatud muutused kajastuvad ka OXPHOS protsessiga seotud mitokondriaalsete kinaaside ekspressioonis. Seda enam, et tulemused on mõnevõrra üllatavad, kuna aktiivne krooniline gastriit ja sellega kaasnev oksüdatiivne stress on tavaliselt enam väljendunud antrumi, mitte korpuse limaskestas (Bayerdorffer jt., 1992; Fu jt., 1999; Ozawa jt., 2005) ning võiks eeldada, et mitokondrite funktsiooni kahjustused on ulatuslikumad antrumis. See näiv vastuolu on siiski seletatav raku bioenergeetiliste protsesside koetüübi-spetsiifilise kontrolliga selle bakteri poolt. Esiteks, *H. Pylory* indutseerib MnSOD ekspressiooni eksklusiivselt antrumi limaskestarakkudes (Broide jt., 1996; Farkas jt., 2003; Gotz jt., 1996, 1997), mis võib suurendada tema võimet elimineerida ROS, lisaks võimalusele, mida pakub tavapärase GSH. Mitokondrite hapniku tarbimise allaregulatsioon korpuses saab tuleneda ka happe produktsiooni inhibeerimisest. See oletus põhineb leiul, et IL-1 β ja TNF- α , kaks peamist *H. Pylory* toimet vahendavat tsütokiini, vähendavad oluliselt parietaalrakkude happe sekretsiooni (Beales ja Calam, 1998) ning et patsientide ravi H⁺-K⁺-ATPaasi e. prootonpumba inhibiitori omeprasooliga toob kaasa mitokondrite aktiivsuse languse (Hui jt., 1989). Mitokondrite hingamiskiiruste vähenemine *H-pylori*-seoselise

põletiku korral ilma RCI muutusteta, viitab mitte niivõrd mitokondrite funktsiooni regulatsiooni muutustele *H-pylori* toimel, vaid eelkõige koe mitokondrite sisalduse muutumisele, mis tõenäoliselt vähenes korpuses, kuid suurenes antrumis (Gruno jt., 2006). Põhimõtteliselt, ülalkirjeldatud vastupidised muutused võivad olla tingitud antrumi ja korpuse limaskesta apoptootiliste ja antiapoptoiliste mehhanismide ebaproportsionaalselt muutunud vahekorra. *H. pylori* soodustab apoptoosi peamiselt mitokondrite liini pidi, käivitades tsütokroom c vabanemise (Galmiche jt., 2000; Maeda jt., 2005) Bax valgu (Ashktorab, jt., 2004; Maeda jt., 2005) ja/või *H. pylori* vacA tsütotoksiini NH₂-terminuse 34-kDa fragmendi translokeerimisega mitokondrisse (Galmiche jt., 2000) sesoses mitokondrite membraanide depolarisatsiooniga, ATP sisalduse vähenemisega ning mitokondrite fragmentatsiooniga (Ashktorab, jt., 2004; Kimura jt., 1999). Üheks patogeenseks faktoriks nimetatud muutuste puhul on on ammonium, kõrge ureaasi aktiivsusega *H. pylori* produkt (Kubota, jt., 2004; Smoot, jt., 1990; Suzuki jt., 2002; Tsujii jt., 1992). Seega, mitokondrite hapniku tarbimise vähenemine ja OXPHOS aeglustumine võib olla seotud mitokondrite apoptootiliste muutustega. Teisalt aga, avaldab *Helicobacter pylori* mitmel viisil tugevat antiapoptootilist toimet aktiveerides rakus apoptoosi inhibiitor 2 geeni (Yanai jt., 2003), mõjutades epiteeli rakutsükli (Shirin jt., 1999) ning reguleerides üles tsüklooksügenaas-2 geeni epiteeli- ja parietaalrakkudes (Fu jt., 1999; McCarthy jt., 1999; Sung jt., 2000). Cox-2 geeni produktid (15-d-PGJ₂ ja PGA₁) inhibeerivad NF-κB-vahendatud apoptoosi mehhanismi aktiveerides peroksiomi proliferaator-aktiveeritava retseptor γ (PPARγ) (Gupta jt., 2001; Peek ja Blaser, 2002), aga PPARγ kiirendab mitokondrite biosünteesi, suurendades seeläbi koe oksüdatiivset võimsust (Czybrit jt., 2003; Lehman jt., 2000). On teada, et *H. pylori* reguleerib Cox-2 üles antrumis suuremal määral kui korpuses (Fu jt., 1999). Seega peaks PPARγ aktivatsioon olema antraalses limaskestas enam väljendunud, mis põhjendab ka selles koes registreeritud suuremat hingamiskiirust (Gruno jt., 2006). Lisaks ülalmainitud mehhanismidele, peremeesrakkude vastus bakterile hõlmab suurenenud gastriini produktsiooni maolimaskesta G-rakkudes, mis omakorda stimuleerib maoepiteelirakkude proliferatsiooni (Peek ja Blaser, 2002). Limaskestamuutuste süvenemine nakkuse püsimisel on seotud uute rakkude tekke vähenemisega ning rakkude loomuliku kontrollitud suremisprotsessi (apoptoosi) intensiivistumisega. Apoptoosimehhanismide häirete korral jäävad kahjustatud rakud organismi alles, nende rakutsükkel ei allu enam tervikliku organismi kontrollile ning tulemuseks võib olla kontrollimatu rakkude vohamine – vähkkasvaja (Maimets, 2006).

2.3.4. Maovähk ja selle tekkemehhanismid

Epidemioloogia. Ülemaailmselt levikult on maovähk kopsu-, rinna- ja soolevähi järel neljandal kohal; 2002. a. diagnoositi ligikaudu 930 000 uut juhtu, mis moodustas antud aastal 8.6% kõikidest uutest vähijuhtudest. Arvesse võttes, et maovähki haigestumine on siiski näidanud langustendentsi, prognoositakse 2010 aasta jooksul 1.1 miljonit uut juhtu, kusjuures juurdekasv võrreldes 2002. aastaga moodustab 19%, mis tuleneb elanikkonna juurdekasvust ja vananemisest. Haigestumine on suurem meeste seas ja arengumaades (Parkin jt., 2005). *Merck & Co., Inc* andmetel moodustab adenokartsinoom 95% mao malignantsetest tuumoritest, harvem esineb lümfoomi ja silelihase sarkoomi.

Etioloogia. Maovähi etioloogiat on multifaktoriaalne, aga enamasti saab haigus alguse *Helicobacter pylori* infektsioonist. Autoimmuunne atroofiline gastriit ja geneetilised faktorid tulevad samuti arvesse, kuid toitumusharjumusi ei peeta kausaalseks.

Helicobacter pylori poolt põhjustatud limaskestapõletik areneb osal inimestel selle kõige raskemakujuliseks vormiks, atroofiliseks gastriidiks, vähem kui 20 aastaga. Atroofiline gastriit omakorda on tunnistatud vähieelseks seisundiks. *H. pylori* ja maovähi seost on täpsemalt uuritud katseloomadel, kellel on tekitatud bakteri toimel maovähk.

Mao kartsinogeneesi bioloogiline mudel hõlmab mitut järjestikust faasi: põletik – atroofia – metaplaasia – düsplaasia – kartsinoom (Correa, 2004). Esmalt *H. pylori* põhjustatud krooniline aktiivne põletik loob pinnase maolimaskesta infiltratsiooniks ja epiteelirakkude kahjustuste tekkeks. Teist faasi iseloomustavad rakutsükli muutused, eriti aga kiirenenud apoptoos ja rakkude proliferatsioon. Tekib ebanormaalne koemass, mille kasvuvõime ja kasvu koordinatsioon ei ole omased normaalsele koele. Need muutused põhjustavad limaskesta atroofiat, mis on iseloomulik kõrge vähiriskiga gastriiditüübile. Kolmandas faasis rakkude diferentseerituse aste väheneb, maolimaskesta rakud transformeeruvad glandulaarseks koeks (intestinaalne metaplaasia). Diferentseerumise all mõistetakse seda, millisel määral kasvujarakud meenutavad lähtekoe rakke (nii morfoloogiliselt kui funktsionaalselt). Düsploasia faasis, mis eelneb vahetult vähile, on rakud ebatüüpilised, nende orientatsioon kadunud, tuumad on suurenenud. Puudub invasioon, kahjustus lokaliseerub ümbritseva normaalse koe piirides (*carcinoma in situ*).

Kõik düsploasiad ei lähe üle vähiks, ning võivad isegi kahjustava teguri kadumisel taandareneda. Seisukoht, et kroonilise maopõletiku üleminek atroofiliseks gastriidiks tähendab mao adenokartsinoomi kõrget riski on üldiselt omaksvõetud (Correa, 1992, 2004; Sipponen jt., 1985; Valle jt., 1996). Vastavatesse mehhanismidesse võib olla kaasatud ka

mitokondrite väärtalitus ja sellest tulenev, kuna elektronmikroskoopilised uuringud on näidanud kroonilise põletiku puhul maolimaskestasmitokondrite sisalduse vähenemist ja kahjustatud mitokondrite fraktsiooni suurenemist (Yin jt., 2003).

Histopatoloogia. Mao adenokartsinoom on pahaloomuline näärmekoest alguse saanud tuumor. Lauren'i klassifikatsiooni kohaselt on kaks maovähi tüüpi: intestinaalne ja difuusne. Lümfoom on parema prognoosiga kui kartsinoom (*Merck Manual Professional*). Juba ammu teatakse, et vähirakkude kõige iseloomulik biokeemiline karakteristik on intensiivne glükolüüs (Burk jt., 1967; Warburg jt., 1924; Warburg, 1930;). Rho jt. (2007) hinnangul on glükolüütilise süsteemi võimsus ja aktiivne mitokondrite talitus olulised prolifereruvate vähirakkude energiavajaduste katteks ning seetõttu võib glükolüüsi ja mitokondrite hingamisega seotud geenidel olla tähtis roll mao kartsinogeneesis. Rho jt. (2007) andmed, mis on saadud 257 patsiendi uurimisel, kinnitavad, et ligikaudu 17% mao kartsinoomi juhtudest esineb HK2 üleekspressioon. Nendel juhtudel oli haiguse prognoos halvem ja kartsinoom agressiivse iseloomuga (Rho jt., 2007). Teiste energeetilises metabolismis osalevate geenide (n. AK ja CK perekonna geenid) transkriptsiooniliste muutuste kohta inimese mao kartsinogeneesis andmed puuduvad, kuid on teada et CK ensümaatiline aktiivsus adenokartsinoomi korral väheneb (Hirata jt., 1989). Tõendeid on ka selle kohta, et suktsinaadi metaboolsed muutused mao atroofilises limaskestas võivad soodustada rakkude siiret vähiks HIF-1 α -vahendatud raja aktiveerimise kaudu. Selle tulemusena indutseeritakse glükolüütiliste ensüümide ekspressioon, mis aitab vältida kasvajarakkude hüpoksilisi kahjustusi (Agani jt., 2000; Briere jt., 2005; Seppet jt., 2007).

Tüvirakkude osatähtsus kartsinogeneesis. Uuemad andmed viitavad ka tüvirakkude osalusele vähi tekkes. Houghton (2004) on näidanud, et *H. pylori* indutseeritud põletiku korral võivad luuüdi tüvirakud migreeruda mao limaskesta. Väga hiljutiste katsete käigus on õnnestunud maovähist isoleerida mesenhümaalsed tüvirakud (Cao, 2009). Mao limaskestas muteerub tüvirakkude pärilikkusmaterjal. Klonaalse proliferatsiooni tagajärjel antakse vigane DNA edasi igale uuele rakule, mille tagajärjel tekivad ebanormaalsete rakkude kogumikud (McDonald 2008). Patogeense faktori kroonilisel toimel ja koe terviklikkuse taastamiseks käivituvad kahjustuse-regeneratsiooni tsüklid. Need signaalrajad aktiveerivad ka tüvirakke paljunema. Krooniline stimulatsioon viib lõpuks tagasipöördumatu aktivatsioonini ning kontrollimatu rakkude paljunemiseni, seega maovähini.

2.4. Uuritud geenide bioinformaatiline lühiiseloostus

Sümbol ja nimetus: AK2 adenülatkinaas 2 Homo Sapiens

Alias: ADK2

Tüüp: valku-kodeeriv

Produkt: adenülatkinaasi tüüp II isoensüüm

Asukoht genoomis: kromosoom 1, 1p34

Valgu lokalisatsioon rakus: mitokondrite membraan

Funktsioon: energeetiline metabolism, rakusisene energiaülekanne

Bibliograafia: Mitokondriaalne AK2 vahendab apoptoosi moodustades AK2-FADD-kaspaas-10 (AFAC10) kompleksi moodustumise kaudu. Apoptoosiprotsessis, AK2 tranlokeerub tsütoplasmasse, mida pidurdab Bcl-2. Puhastatud AK2 valgu lisamine rakuekstraktile esmalt aktiveerib FADD kaudu kaspaas-10 ja seejärel toimub kaspaas-3 aktivatsioon, kusjuures kaspaas-8 ei ole mõjutatud. AFAC10 kompleksid esinevad apoptoosi minevates rakkudes. AK2 soodustab kaspaas-10 ja FADD seostumist. Need tulemused annavad alust arvata, et koosmõjus ühenditega FADD ja kaspaas-10, AK2 vahendab uut apoptoosirada, millel võib olla oma osa tumorigeneesis (*Lee jt., 2007*).

Sümbol ja nimetus: CKB kreatiinkinaas B Homo Sapiens

Alias: B-CK; CKBB

Tüüp: valku-kodeeriv

Produkt: ensüüm, aju-tüüpi kreatiinkinaas B

Asukoht genoomis: kromosoom 14, 14q32

Valgu lokalisatsioon rakus: tsütoplasma, tuum

Funktsioon: energeetiline metabolism, rakusisene energiaülekanne (aju, maolimaskest)

Bibliograafia: Western analüüsi tulemustest on selgunud, et soolevähi puhul CKB subtsellulaarne tase langeb oluliselt, võrreldes külgneva normaalse koega või tervete doonoritega. Tuuma maatriksi ekstraktis täheldatud CKB kõrge tase võrreldes tsütoplasmaatiliselega võib olla põhjustatud sellest, et tumorigeneesi käigus valgu lokalisatsioon tuuma suureneb. Rakutuuma energeetilised rajad ei ole praeguseks veel täielikult välja selgitatud, mistõttu on raske ennustada CKB tuuma maatriksisse lokaliseerumise bioloogilist tähendust (*Balasubramani jt., 2006*). Kuigi inimese mao CKB mRNA taset pole analüüsitud, näitavad senised andmed, et seedetrakti vähi arenguga kaasnevad energeetise metabolismi kompartmentatsiooni muutused.

Sümbol ja nimetus: CKMT1 A ja B kreatiinkinaas B Homo Sapiens

Alias: CKMT, UMTCK

Tüüp: valku-kodeeriv, 2 erinevat geeni, mis lokaliseeruvad kõrvuti kodeerivad kahte identset ensüümivalku.

Produkt: ensüüm, mitokondriaalne kreatiinkinaas „kõikjalolev” (*ubiquitous*), eksisteerib kahe oligomeerse vormina, dimeerina ja oktameerina

Asukoht genoomis: kromosoom 15, 15q15

Valgu lokalisatsioon rakus: mitokondrite sisemembraani väliskülge

Funktsioon: Rakusisene energiaülekanne

Bibliograafia: CK isoensüümid on väga tundlikud vabade radikaalide kahjustuste suhtes ning on inaktiveeritavad superoksiidi ja peroksünitriti radikaalide poolt. Peroksünitriti ONOO⁻ toime uurimisel *in vitro* inimese mitokondriaalse CK aktiivsusele ja oktameerse struktuuri stabiilsusele selgus, et ensüümi aktiivsus langeb 60 % juba küllaltki madala peroksünitriti kontsentratsiooni (10 µM) juures ning toime sõltus doosist. Nii „kõikjaloleva” kui ka sarkomeerse isovormi aktiivsus kaob täielikult 50 µM ONOO⁻ sisalduse puhul, kusjuures graafiliselt määratud IC₅₀ võrdub 8 µM. Peroksünitriti radikaalid soodustavad ka oktameerse CK valgu dimeriseerumist, kuid uMtCK on selles suhtes püsivam kui sMtCKM (Wendt jt., 2002).

Sümbol ja nimetus: HK2 Heksokinaas 2 Homo Sapiens

Alias: HKII, HXK2, DKFZp686M1669

Tüüp: valku-kodeeriv

Produkt: HK isoensüüm heksokinaas 2

Asukoht genoomis: kromosoom 2, 2p13

Valgu lokalisatsioon rakus: mitokondrite välismembraan, seostub poriiniga

Funktsioon: osaleb energeetilises metabolismis, katalüüsides glükolüüsiraja esimest reaktsiooni, milles glükoos fosforülitakse glükoos-6-fosfaadiks. Loomkatsetega on näidatud, et see valk seotud glükolüüsi intensiivistumisega kiiresti arenevas vähis.

Bibliograafia: HK2 mRNA taset on maksavähi korral määratud ka uudse reaalaaja-PCR meetodiga hepatotsellulaarses kartsinoomis ja metastaatilises maksavähis. HK2 ekspressioonitase oli oluliselt kõrgem metastaase andva vähi puhul. HK2 valk lokaliseerub vähirakkudes nekroosi lähedal. Maksavähi hüpoksilises keskkonnas HIF-1α indutseerib glükolüüsi, mis on antud situatsioonis primaarne energiallikas (Yasuda jt., 2004).

3. Töö eesmärk

Selgitada välja, kas atroofilise gastriidi ja maovähiga kaasnevad mitokondriaalse kreatiinkinaasi ja adenülaatkinaasi ning B-tüüpi kreatiinkinaasi mRNA taseme muutused.

4. Tööülesanded

1. Eraldada gastroendoskoopilistest biopsiatest summaarne RNA;
2. Analüüsida saadud RNA kvaliteeti ning määrata preparaatides selle nukleiinhappe kontsentratsioon;
3. Pöördtranskribeerida RNA, et saada üheaahelaline komplementaarne DNA;
4. Valmistada geenispetsiifiliste praimerite lahjendused, optimeerida PCR reaktsioonis kasutatavate praimerite kontsentratsioonid ning analüüsida praimerite cDNA-spetsiifilisust;
5. Kontrollida pöördtranskribeerimise tulemust ja primereid konventsionaalse e. tava-PCR abil;
6. Leida reaala-PCR optimaalne tsükleerimise režiim;
7. Uuritavate geenide ja nn. *housekeeping* e. referentsgeenide kaheaahelaliste fragmentide amplifitseerimine polümeraasiahelreaktsioonis (reaala-PCR)
8. Analüüsida reaala-PCR tulemusi DNA dissotsiatsioonikõverate abil ja elektroforeetilisel;
9. Kalkuleerida geenide suhteline ekspressioonitase vähemalt kahe erineva *housekeeping* geenide suhtes, kasutades lävetsükli erinevuse võrdlemise meetodit;
10. Katseandmete statistiline töötlus.

5. Materjal ja meetodid

5.1. Reaktiivid

β -merkaptopetanol (Sigma-Aldrich), Titan 10x PCR reaktsioonipuhver (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.0), Titan nukleotiidide segud, Titan Taq DNA Polümeraas, Titan Agaros, TitanSight DNA värv ja 5xTBE (Tris-Boraat-EtüleenDiamiinTetraAtsetaat) puhverlahus (*BioAtlas*). 5xTBE 5-kordsel lahjendamisel saadud 1xTBE (pH =8.2) sisaldas 89 mM Tris, 89 mM boraati, 2 mM EDTA, pH 8.2; nukleiinhapete suurusmarkerid ja laadimispuhvid (*Fermentas*), *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*), *QuantiTect[®] Reverse transcription kit* (*Qiagen*), *QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR kit* (*Qiagen*); Praimerite (*Sigma-Proligo* ja *Oligomer OY*) järjestused saadi elektroonilisest reaallaja-PCR praimerite andmebaasist RTPrimerDB (Pattyn *jt.*, 2003) või disainiti Primer Express™ programmiga (*Applied Biosystems*). Kasutatud praimeripaaride järjestused ja ettenähtud ampliconide pikkused on esitatud alljärgnevalt (Tabel 1).

Tabel 1. Geenide sümbolid, praimerite järjestused (päripidine ülalpool, äraspidine allpool) ja ampliconide pikkused aluspaarides (ap)

GEENI SÜMBOL	PRAIMERITE NUKLEOTIIDNE JÄRJESTUS 5' > 3'	AMPLIKONI PIKKUS (aluspaarides)
AK2	CCCAGATTGGCTGAAAACCTTCT	130
	CACTCACCAGTTTCCCAGCAT	
CKB	CGGTATCTGGCACAATGACAA	88
	TTCATGTTGCCCCCTTCT	
CKMT1	TGACCTGTTTGACCCTGTGATC	99
	CCAGAACGATTTACTGGCAT	
HK2	CAAAGTGACAGTGGGTGTGG	87
	GCCAGGTCCTTCACTGTCTC	
ACTB	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	150
	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	
B2M	TGTCTTTCAGCAAGGACTGG	147
	GATGCTGCTTACATGTCTCG	
HPRT1	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG	101
	AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	

5.2. Patsiendid ja koeproovid

Tehtud uuringud on kooskõlas Euroopa Nõukogu inimõiguste ja biomeditsiini konventsioon ja WMA (*World Medical Association*) Helsingi deklaratsiooniga ning projekt, mille raames töö toimus on saanud Tartu Ülikooli inimuuringu eetika komitee loa.

Võrreldi järgmisi erinevate maohaigustega patsientide gruppe maohaigusi:

1) *Kontrollgrupi* moodustasid 9 järjestikust patsienti Lõuna-Eestist (5 meest ja 4 naist, keskmine vanus 66 ± 3), kes läbisid gastrointestinaalse enoskoopia, kuna neil esinesid vaevused kroonilise põletiku tõttu antrumis ja korpuses, mille raskust 12-pallises skaalas hinnati järgmiselt: 4 patsienti – 0; 5 patsienti – 1; Mitte ühelgi nendest kontrollgrupi patsientidest ei esinenud maolimaskesta atroofiat, kuid 6 patsienti olid korpuse limaskesta histoloogiliste leidude põhjal *H. pylori* –positiivsed.

2) *Pernitsioosset aneemiat põdevad atroofilise gastriidiga haiged*: 12 patsienti (5 meest ja 7 naist, keskmine vanus 67 ± 4 aastat). Pernitsioosse aneemia diagnoosimisel olid kriteeriumiteks makrolüütiline aneemia, parietaalrakkude antikehad ning madal B₁₂ vitamiini ja foolhappe sisaldus vereseerumis. Korpus-dominantse atroofilise gastriidi diagnoos põhines madalal seerumi pepsinogeen I tasemel ja korpuse limaskesta atroofia histoloogilistel näitudel. Kroonilise põletiku raskusastmed selle grupi puhul jagunesid järgmiselt: 1 patsient – 1; 6 patsienti – 2; 5 patsienti – 3. Kõik perniitsioosse aneemiaga patsiendid olid *H. pylori* -negatiivsed, arvatavasti progresseeruva atroofia tõttu (Oksanen jt., 2000; Valle jt., 1996).

3) *Patsiendid, kellel oli maovähk* (6 meest ja 4 naist, keskmine vanus 68 ± 5 aastat). Kõikidel patsientidel oli mao kartsinoom. Mitmel patsiendil esines nekroosikoldeid. Maliigsuse astme alusel jagunesid vähihaiged järgnevalt: a) keskmiselt diferentseerunud (G2) oli 4; b) madalalt diferentseerunud (G3) oli 2; mittediferentseerunud ehk anaplastseid oli 4.

Koeproovid uuringuteks (ligikaudu 30 mg) võeti gastroendoskoopiliste uuringute käigus kontrollgrupi (TÜ kirurgiakliinik) ja atroofilise gastriidiga patsientidel (TÜ sisekliinik) mao antrumist ja korpusest ning vähihaigetel (TÜ onkoloogiakliinik) mao antrumist, korpusest ja vähikoldest.

Tabel 2. Patsientide andmed

	KONTROLLGRUPP	ATROOFILINE GASTRIIT	MAOVÄHK
Vanus	66 ± 3	67 ± 4	68 ± 5
Arv (M/N)	9 (5/4)	12 (5/7)	10 (6/4)
Põletiku raskusaste, 12-pallilises skaalas	0 (4 haiget)	1 (1 haiget)	
	1 (5 haiget)	2 (6 haiget)	
		3 (5 haiget)	
Atroofia	0 haiget	12 haiget	
H. pylori	+ (6 haiget)	+ (0 haiget)	
	- (3 haiget)	- (12 haiget)	
Diferentseerumise (maliigsuse) aste			G2 (4 haiget)
			G3 (2 haiget)
			G4 (4 haiget)

5. 3. Totaalse RNA eraldamine ja analüüs

RNA eraldamine. Geenide ekspressiooni uurimisel reaalkaja-PCR meetodil on esimeseks etapiks mRNA või rakkude kogu RNA (ribosomaalne RNA, transport-RNA, mRNA) eraldamine, sest raku mRNA-d kujutavad endast selles rakus ekspresseeritud geenide kogumit, mis kodeerivad erinevaid valke. Käesolevas töös kasutati koeproovidest totaalse RNA saamiseks kommertsiaalset reaktiivide komplekti *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*. Koeproovid (gastroendoskoopilised biopsiad) asetati koheselt RNA stabilisaatorisse *RNAlater® (Qiagen)*, kus neid hoiti kuni RNA erldamise protseduurini vastavalt tootja protokollile (*Qiagen RNeasy® Mini Handbook*, 2006, lk. 39–44). Koetükike (ligikaudu 30 mg) homogeniseeriti toatemperatuuril Ultra Thurrax (*Janke & Kunkel*) homogenisaatori abil, kiirusel 9500 rootori pööret/min kuni 20 kuni 30 s lüüsiva toimega lahuses (*Qiagen*), millele oli lisatud (tõmbekapi all) 10 µl 14.3 M β-merkaptotoetanooli 1 ml lüüsimispuhvri kohta. Lüüsilahus (*RNeasy Mini Kit, Qiagen*) sisaldas ka guanidiin-tiotsüanaati, mis on efektiivne valkude denatureerija ning inhibeerib endogeensed RNAasid ja aitab eraldatava RNA valkudest vabastada. Rakukestadest jms. tsentrifuugimise teel puhastatud lüsaadis sisalduv RNA seostati etanooli juuresolekul *Qiagen RNeasy* eralduskolonne membraaniga ning pesti. Pesulahused eemaldati tsentrifuugimise teel. Puhastatud RNA elueeriti kolonnist 30 µl RNAasivaba veega ning säilitati kuni kasutamiseni –80° C juures. Selline meetod (*Qiagen RNeasy® Mini Handbook*, 2006, lk. 39–44) võimaldab kätte saada RNA molekulid, mis on pikemad kui 200 nukleotiidi. Sellest tulenevalt RNA preparaat rikastub

just mRNA fraktsiooniga, sest mitmed ribosomaalse RNA (5.8S rRNA, 5S rRNA) ja transportRNA välistatakse selektiivselt.

RNA puhtuse hindamine ja kontsentratsiooni mõõtmine. RNA (vesilahuses) neeldumisspekter registreeriti skaneeriva spektrofotomeetriga UV/VIS/ NIR Lambda 900 (*Perkin Elmer*) lainepikkuste vahemikus 260 nm kuni 280 nm kuna RNA puhtuse hindamisel valguliste ja fenoolsete kontaminantide suhtes on olulised lainepikkuste 260 nm/230nm suhted. Reaalaja-PCRi eksperimentides kasutati RNAd, mille A260/A280 oli ligikaudu 2.0. Nukleiinhappe neeldumist mõõdeti 260 nm juures ning saadud näidu alusel arvutati RNA kontsentratsioon preparaadis, kasutades seost, mille kohaselt näidule $A=1$ vastab RNA kontsentratsioon (1 cm) küvetis 40 ng/μl.

RNA kvaliteedi elektroforeetiline analüüs. Selleks, et veenduda kas eraldatud RNA pole kahjustatud ja on terviklik teostati RNA elektroforees 1-kordse TBE puhvri baasil valmistatud 0.8% agarosgeelis (*Mukhtar et al.*, 1998), millele oli nukleiinhappe visualiseerimiseks lisatud enne foreesi *TitanSight* DNA värvi 0.5 μg/ml. RNA fragmentide lahutamine toimus 45 minutit pinge juures 5 V/cm. Geeli pildistati ultravioletvalguses firma *SynGene* aparatuuri ja *Genesnap* programmi abil. Tulemust analüüsiti kasutades *Genetools 3.07* tarkvara. Traditsiooniliselt kontrollitakse RNA intaktsust rRNA bändide intensiivsuse suhte järgi, mis ideaalsel juhul peaks olema 1.9–2. Kui ribosomaalsed 28S RNA ja 18S RNA olid selgesti nähtavad, kusjuures 28S oli intensiivsem kui 18S (28S/18S ligikaudu 2) ja laguprodukte polnud, loeti RNA kasutuskõlblikuks järgmisel reaalaja-PCR etapil. Kuna mRNAd on ebastabiilsed ja lühikese elueaga, siis on otstarbekas kasutada geenide ekspressiooni uurimisel komplementaarse DNA (cDNA) järjestusi.

5.4. RNA pöördtranskribeerimine

RNA pöördtranskribeeriti üheaheelaliseks cDNA-ks kasutades kommertsiaalset reaktiivide komplekti *Quantitect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen)* vastavalt tootja protokollile (*Quantitect[®] Reverse Transcription Handbook*, 2005), mille kohaselt üheaheelalise cDNA süntees on integreeritud genoomse DNA elimineerimisega totaalse RNA preparaadist. Totaalse RNA kogus reaktsioonis oli 1 μg. Ensüüm *Quantiscrypt* pöördtranskriptaas omab RNA-sõltuvat DNA polümeraasi aktiivsust, mis võimaldas transkribeerida RNA pealt cDNA. Nimetatud ensüüm omab ka Rnase H ensümaatilist aktiivsust, mis degradeerib ribonukleiinhappe RNA:DNA hübriidist. Protseduur teostati 15 minuti jooksul 42°C juures. Seejärel inaktiveeriti ensüüm pöördtranskriptaas e. revertaas kuumutades reaktsioonisegu 3

min 95°C juures ning proovid pandi kiiresti jääle, et seda kasutada RT-PCR läbiviimisel. Genoomse DNA elimineerimise kontrolliks menetleti ka NRT proovid (ilma ensüümita).

5.5. Konventsionaalne PCR

Tava- ehk konventsionaalne PCR meetod oli kasutusel selleks, et kontrollida pöördtranskribeerimise efektiivsust ning praimerite töökindlust, spetsiifilisust ja kontrollida kas nende efektiivsused on ligikaudu samad. PCR viidi läbi 0,2 ml tuubides (*Applied Biosystems*) termotsükleris GeneAmp PCR System 2400 (*Applied Biosystems*) kasutades Titan 10x PCR reaktsioonipuhverit (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, pH 8.0), Titan nukleotiidide (dATP, dCTP, dGTP ja dTTP) segu, Titan Taq DNA Polümeraasi vastavalt näidisprotokollile (*BioAtlas*). Matriits-DNA kasutatav kogus ühes reaktsioonis oli 100 ng, mis kalkuleeriti teoreetilisest arvestusest, et kogu RNA pöördtranskribeeritisel kasutatud RNA (1 µg) muundati üheaheelaliseks DNaks. Praimerite seostumise temperatuur (56°C) ja aeg (30 s) optimeeriti.

5.6. Reaalaja-PCR

a) *Reaalaja PCR teostamise tingimused.* Reaalaja PCR viidi läbi optilistes tuubides (Perkin Elmer/*Applied Biosystems*) ABI Prism 7000 SDS instrumendi abil (*Perkin Elmer/Applied Biosystems*), kasutades kommertsiaalse PCR reagentide komplekti *Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen)* komponente, vastavalt tootjaprotokollile (*Quantitect™ SYBR® Green PCR Handbook, 2008*). Proovide lõppmaht oli 33 µl ning praimerite kontsentratsioon 0.3 µM. Kõik praimerid ei olnud cDNA-spetsiifilised, mistõttu segati ja mõõdeti ka NRT kontrollproovid. Kontaminatsiooni ja praimerite kontrolliks aga segati ja mõõdeti NTC proovid (negatiivne kontroll) kõikide praimeripaaride jaoks.

PCR režiim: 1) Polümeraasi aktivatsiooni staadium 15 min. 95°C; 2) Tsükleerimine (kokku 35 tsükli): denaturatsioon 15 s 94 °C, praimer seostumine 30 s 56 °C, DNA süntees 30 s 72°C; 3) Dissotsatsiooniprotokoll.

b) *Dissotsiatsiooniprotokoll.* Vahetult pärast viimast PCR tsükli võimaldab ABI Prism 7000 SDS (*Applied Biosystems Instrument 7000 Sequence Detection System*) koos vastava tarkvaraga määrata reaktsiooniproductide dissotsiatsiooni- e. sulamistemperatuuri (T_m). Selleks tõstab instrument pidevalt temperatuuri etteantud vahemikus, samaaegselt registreerides fluorestsentsi. Fluorestsentsi tugevus sõltub SYBR Green I seostumisest kaheaheelise produktiga. Madalamatel temperatuuridel, kui DNA ahelad ei ole

dissotsieerunud, fluorestsents veel oluliselt ei vähene. Ahelate lahkne misel sulamistemperatuuri e. dissotsiatsioonitemperatuuri (T_m) piirkonnas fluorestsents nõrgeneb kiiresti, sest kaheaheelalise DNA denatureerumise tõttu SYBR Green I enam ei seostu. Registreeritud fluorestsentsist kalkuleerib tarkvara negatiivse tuletise temperatuuri järgi. T_m sõltub põhiliselt konkreetsete praimerite abil saadud amplikonide omadustest ja reaktsioonikeskkonnast. Nii on võimalik T_m järgi kontrollida PCR käigus amplifitseeritud (paljundatud) produktide spetsiifilisust. Kirjeldatud protokoll võimaldab ka välja selgitada ebasoovitavat praimerite dimeriseerumist. Praimerite dimeerid ilmnevad piikidena madalamatel temperatuuridel kui amplikonide dissotsiatsioonitemperatuurid. Dissotsiatsioonikõverate analüüs viidi läbi igas eksperimendis 60 °C juures.

c) *Amplifikatsioonikõverate analüüs.* Varasemates tsüklites püsib kaheaheelalise PCR produkti vähese hulga tõttu fluorestsents madal. Produkti hulga suurenemisel hakkab fluorestsents kasvama kuni ületatakse lävi e. käsitsi või tarkvara poolt etteantud fluorestsentsi tugevus. Tsüklit, mille ajal toimub läve ületamine nimetatakse lävetsükliks ja tähistatakse CT (*threshold cycle*). Mida rohkem on paljundatavat algmaterjali, seda kiiremini akumulereerub kaheaheelaline produkt ja seda varasemas tsükliks ületatakse lävi. Seega mRNA pealt saadud cDNAde erinevate tasemete tõttu toimub läve ületamine erinevates tsüklites, millest tuleneb lävetsükli erinevuse mõiste (DeltaCT e. ΔCT). Tavaliselt arvutatakse ΔCT nn. *housekeeping* geeni(de) suhtes, mis võetakse kasutusele kui endogeenne referents. Käesolevas töös kasutati sel eesmärgil ACTB ja HPRT1 geeni ning osades katsetes ka B2M geeni. Selline normaliseerimine võimaldab elimineerida kontsentratsioonist tulenevaid erinevusi proovide vahel ning võrrelda ühe ja sama geeni ekspressiooni mRNA tasemel, näiteks terve koest ja põletikulisest koest eraldatud RNAs lähtudes, millest pöördtranskriptsiooniga saadakse cDNA, mida edasi kasutatakse reaaliaja PCR meetodit rakendades kaheaheelalise DNA järjestuse amplifitseerimiseks. Suhtelise ekspressiooni erinevus kordades võrreldavate gruppide vahel arvutati seose $2^{-\Delta\Delta CT}$ abil (Livak ja Schmittgen, 2001; Schmittgen ja Livak, 2008)

5.7. Kalkulatsioonid ja andmete statistiline töötlus

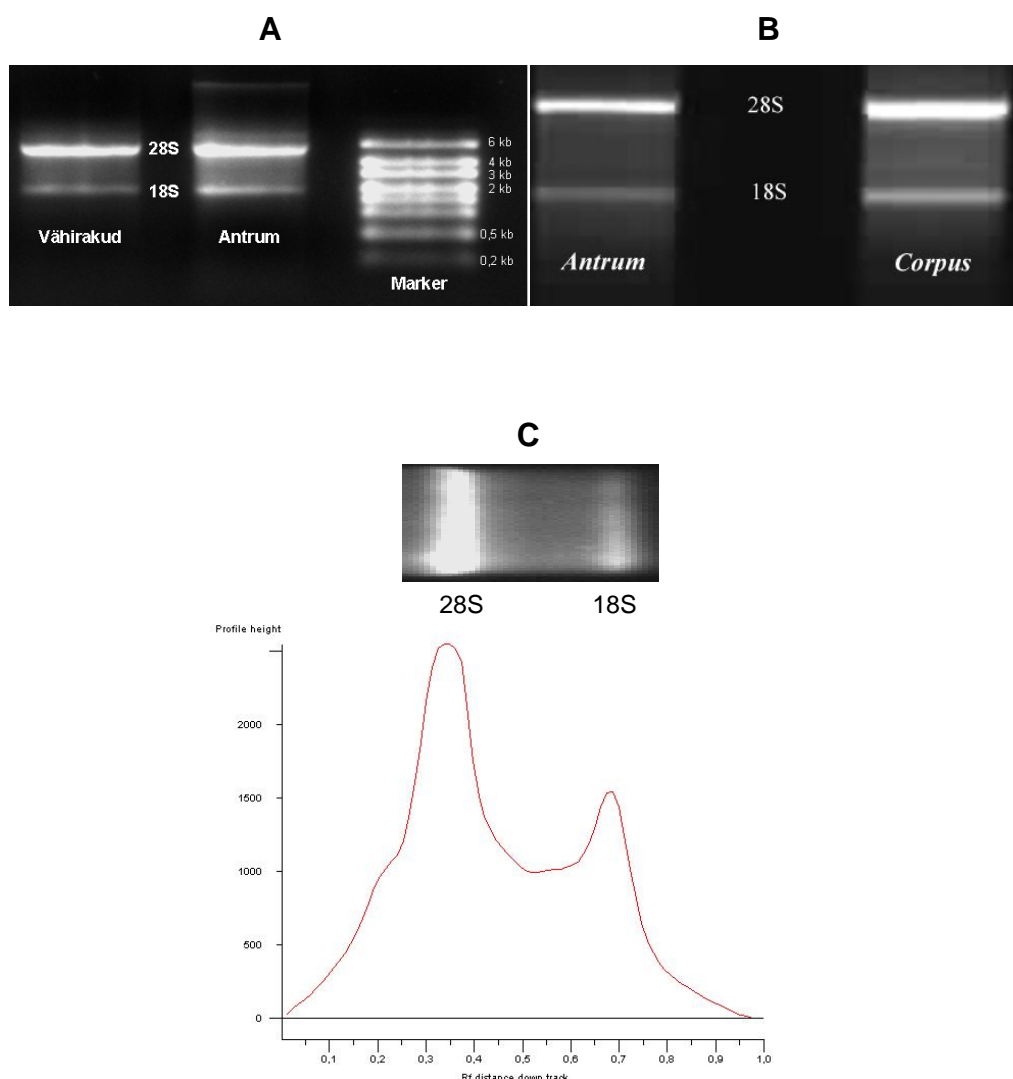
Andmete organiseerimine ja ekspressioonitasemete arvutamine teostati *Microsoft Office Excel 2003* abil. Arvesse võttes, et PCR on eksponentsiaalne protsess, arvutati suhteline ekspressioon uuritava geeni ja housekeeping geeni lävetsükli vahe (deltaCT) alusel seose

$2^{-\text{deltaCT}}$ järgi ning erinevus kordades indutseeriti $2^{-\text{deltadeltaCT}}$ alusel nagu on näidanud Livak ja Schmittgen (2001). Andmete statistiline töötlus toimus *Graph Pad Prism 3* ja *Microsoft Office Excel 2003* vahendusel. Arvutati aritmeetiline ja geomeetiline keskmine ning mediaan. Rakendati paaritud t-testi (sõltumatute valimite jaoks), Mann-Whitney testi ja ühesuunalise ANOVA Dunnett' testi). Statistiliselt olulise erinevuse piiriks loeti $p=0.05$.

6. Tulemused

6.1. Reaalaja-PCR lähtematerjali kvalitatiivne analüüs

Käesoleva töö katseseeriates esimeses etapis eraldati totaalne e. summaarne RNA maolimaskesta biopsiatest, mis olid võetud ilma atroofiata gastriidiga ja atroofilise gastriidiga patsientide mao antrumist ja korpusest ning maovähiga patsientide antrumist, korpusest ja vähikoldest. Näited tulemustest on esitatud joonisel 5.



Joonis 5. Vähirakkudest ja seda ümbritsevast koest (A) ning kontrollgrupi antrumist ja korpusest eraldatud summaarse RNA elektroforees 0,8%-lises agarosgeelis. Nukleiinhape on visualiseeritud UV-s fluorestseeruva TitanSight DNA värviga. Mõlemal juhul on geeli laaditud ligikaudu RNA kogus 0,5 µg ning pinne elektrodide vahel 5V/cm. Foreesi kestvus 45 min (A) ja 1 tund (B)

Ülalesitatud joonis 5 näitab, et nii vähikoldes ja seda ümbritsevas koes (A) kui ka antrumi ja korpuse normaalses limaskestas (B) domineerivad ribosomaalse RNA fragmendid 28s ja 18S. Joonis 5A võimaldab DNA suurusmarkeri (parempoolne äärmine rada) määrata nende pikkust aluspaarides (kb, *kilobase*), 28S ja 18S vastavalt 5.0 ja 1.9. Need väärtused vastavad nimetatud RNA fragmentide pikkusele inimese puhul. Võrdluseks, hiire ribosomaalse RNA 28S ja 18S pikkused on vastavalt 4.7 ja 1.9 aluspaari. *Genetools* (*Syngene, UK*) tarkvara abil on võimalik määrata 28S/18S (intensiivsuste suhe), mis kõnealustes katsetes oli ligikaudu 2. Näide analüüsi tulemusest on toodud joonisel 5C millest järeldub, et eksperimentides kasutatud RNA oli intaktne ja ei olnud lagunenu. Sellise RNA pöördtranskribeerimisel saadi komplementaarne üheaahelaline DNA (cDNA), millest amplifitseeriti reaallaja-PCR käigus geenispetsiifiliste praimerite abil vastava produkti kaheaahelised järjestused (amplikonid). Tänu sellele, et moodustuva kaheaahelise DNA ja PCR-segus sisalduva ühendi SYBR Green seostumisel emitteeritakse fluorestsents, oli produkti akumulatsioon jälgitav reaallajas.

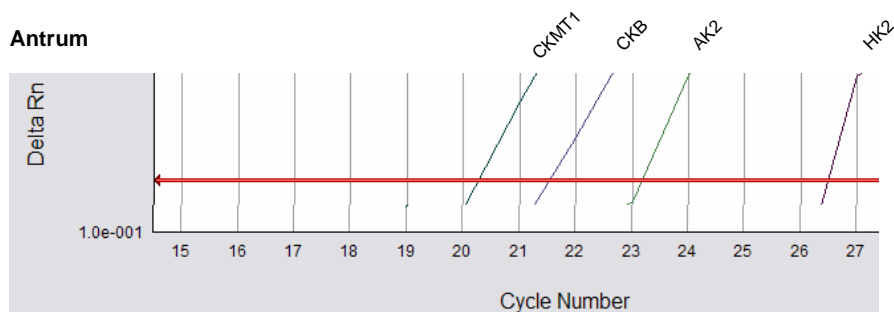
6.2. Mao antrumi ja korpuse transkriptsiooniprofiili iseloomustus

Reaallaja-PCR meetodi abil registreeriti esmalt rakusiseses energiaülekandes osalevate geenide mRNA profiil, mao erinevates anatoomilistes piirkondades. Selleks amplifitseeriti mao antrumi ja korpuse cDNAst lähtuvalt AK2, CKB, CKMT1 ja HK2 geenidele vastavad järjestused. Amplifikatsiooniprotsess oli jälgitav reaallajas. Seejärel analüüsiti vastavat mRNA endogeenset profiili lävetsükli numbriga järgi, arvestades asjaolu, et mida kõrgem on uuritavas proovis cDNA algase, seda varasemas PCR tsüklis akumulereb sel määral produkti, et etteantud lävi ületatakse. Tulemusi illustreerib joonis 6. Sellelt jooniselt on näha, et ilma atroofiata (kontrollgrupp) patsientide maolimaskestas avalduvad kreatiinkinaasi geenid tugevamini kui mitokondriaalne AK2 geen. On leitud, et ka AK2 aktiivsus on nii antrumis kui ka korpuses madalam totaalse CK aktiivsusest vastavates maopiirkondades (Gruno et al., 2006). Kontrollgrupi antrumis ja korpuses avaldus uuritud geenidest kõige nõrgemini glükolüüsis osalev HK2 geen. Erinevalt antrumist, domineerib korpuse limaskestarakkude energeetilise metabolismiga seotud geenide ekspressioonimustris CKB geen, mis ilmselt seostub tema osatähtsusega parietaalrakkude prootonpumba funktsioonis (Sistermans et al., 1995). Kuigi mõnede andmete kohaselt (Martin et al., 1987; Sato et al., 1978) on antrumis vähem mitokondreid kui korpuses, näitab kirjeldatav eksperiment, et mitokondriaalse CK isoensüümi mRNA

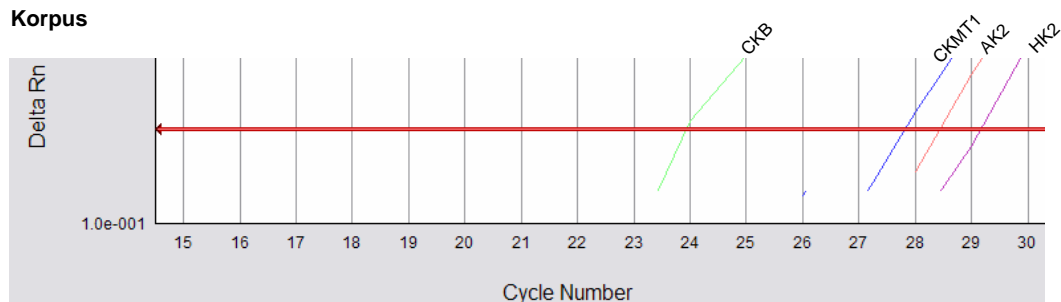
tase ei ole seal madalam kui näiteks tsütoplasmaatilist CK isovormi kodeeriva CKB geeni transkripti tase. Samas on mitokondriaalsed adenülaatkinaasi kodeeriva AK2 ekspresioonitase siiski mõnevõrra madalam või ligikaudu sama kui tsütoplasmaatilist kreatiinkinaasi kodeeriva CKB tase. Joonis 6 põhjal saab küll võrrelda sisemist profiili (ekspresioonimustrit), kuid ei saa võrrelda geenide ekspresioonitaset antrumis ja korpuses, kuna erinevatesse proovidesse ei ole võimalik võtta absoluutselt ühepalju amplifitseeritavat algmaterjali. Ülalnimetatud geenide ekspresiooni uurimiseks võrdlevalt antrumis ja korpuses olid käesolevas töös kasutusel 3 *housekeeping* e. referentsgeeni: ACTB, HPRT1 ja B2M (endogeensed referentsid).

Kontroll 1

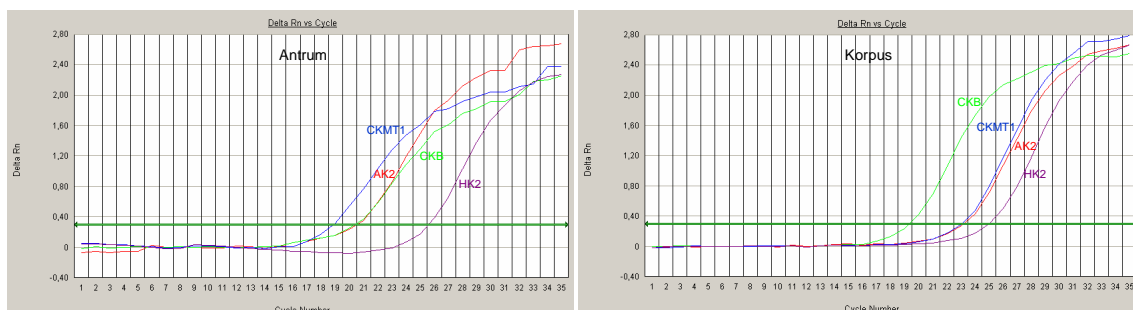
Antrum



Korpus

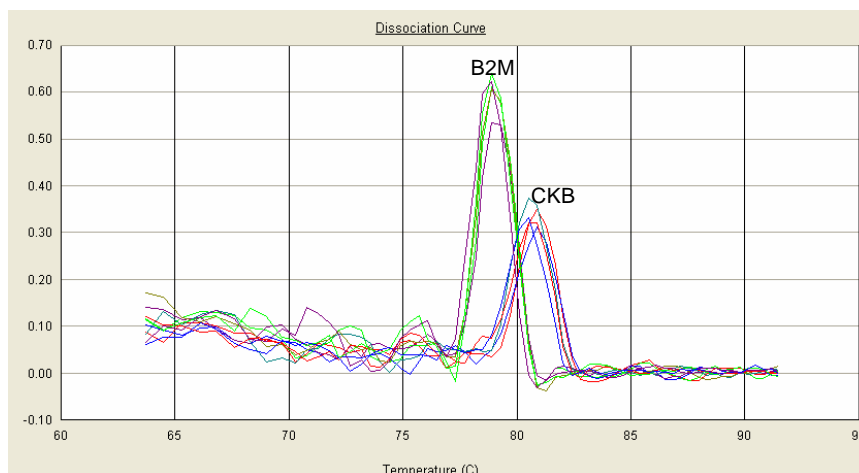


Kontroll 2



Joonis 6. Reaalaja PCR amplifikatsioonikõverad (PCR tsükli number *versus* produkti *juurdekasv*), mis iseloomustab uuritavate energeetilises metabolismis osalevate geenide endogeenset profiili. Esitatud on originaalväljavõtte (kontrollgrupi patsiendi antrum ja korpus) kahe eksperimendi paralleelselt kulgevatest reaktsioonidest logaritmilises (Kontroll 1) ja lineaarses skaalas (Kontroll 2).

Reaalaja-PCRi tulemuste verifitseerimiseks analüüsiti amplikone esmalt DNA dissotsiatsioonikõverate alusel. Ühe ja sama geenijärjestuse amplifitseerimisel (ka erinevatest proovidest ja erinevates eksperimentides) langesid dissotsiatsioonipiigid kokku (Joonis 7), mis näitas, et reaalaja PCR tulemusena saadi spetsiifilised reaktsiooniproduktid, millel on üks ja sama dissotsiatsioonitemperatuur (T_m). Joonisel 7 on toodud näitena B2M ja CKB amplikonidele vastavad dissotsiatsioonikõverad, mille T_m väärtused on vastavalt 78°C ja 81°C. Dissotsiatsioonikõveratest selgub, et analüüsitava proovis sisaldub geenispetsiifiliste (B2M ja CKB) praimerite abil saadud vaid üks spetsiifiline produkt ning madalamatel temperatuuridel ei esine ebasoovitavaid praimerite dimeere. Viimane asjaolu on väga oluline SYBR GREEN I abil detekteerimise puhul, kuna praimerite dimeerid annavad lisafloorestsentsi ja selletõttu kujuneksid tulemused ebatäpseteks.



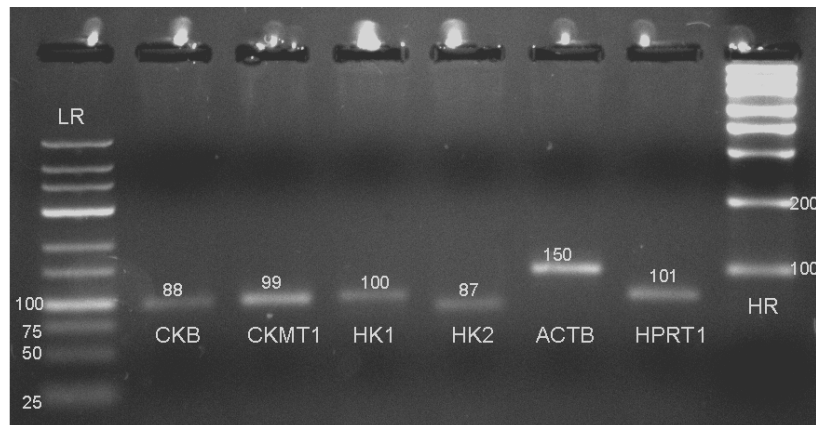
Joonis 7. Näide mao korpuse limaskestast amplifitseeritud DNA (referentsgeeni B2M ja uuritava CKB geeni) dissotsiatsioonikõveratest.

Dissotsiatsioonikõveratest selgub, et analüüsitava proovis sisaldub geenispetsiifiliste (B2M ja CKB) praimerite abil saadud vaid üks spetsiifiline produkt ning madalamatel temperatuuridel ei esine ebasoovitavaid praimerite dimeere.

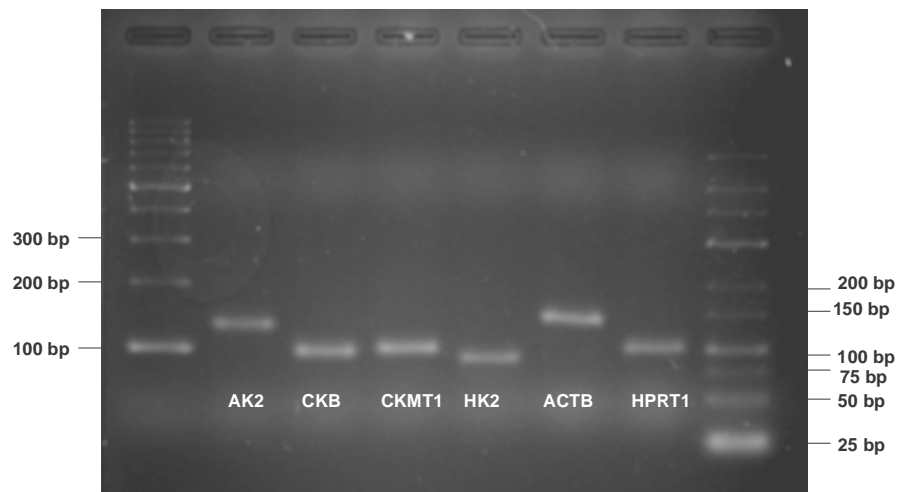
PCR-järgselt analüüsiti amplikone ka elektroforeetiliselt, et kontrollida kas need on ettenähtud pikkusega (Joonis 8). See joonis kinnitab mRNA tasemel, et normaalse maolimaska antrumis ja korpuses ekspresseeruvad energeetilise metabolismiga seotud geenid, mille produktideks olevad valgud paljudes teistes rakutüüpides osalevad efektiivselt rakusisestes energiaülekanandesüsteemides. Joonis 8 näitab veel, et

geenispetsiifiliste praimerite (Tabel 1) abil on reaalaaja-PCR käigus saadud ka *housekeeping* geenide ACTB ja HPRT1 spetsiifilised ampliconid.

A



B

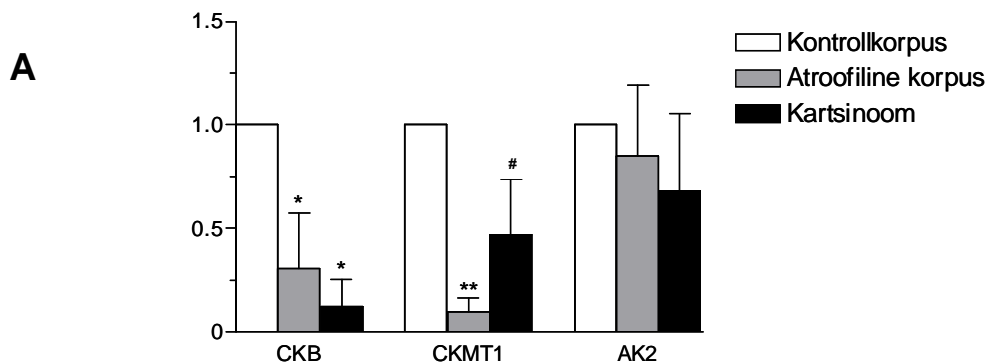


Joonis 8. Antrumi (A) ja korpuse (B) normaalsest maolimaskestast (ilma atroofiata, *H. Pylori* negatiivne) reaalaaja-PCR tulemusena saadud ampliconide elektroforeetiline analüüs 2,4% agarosgeelis.

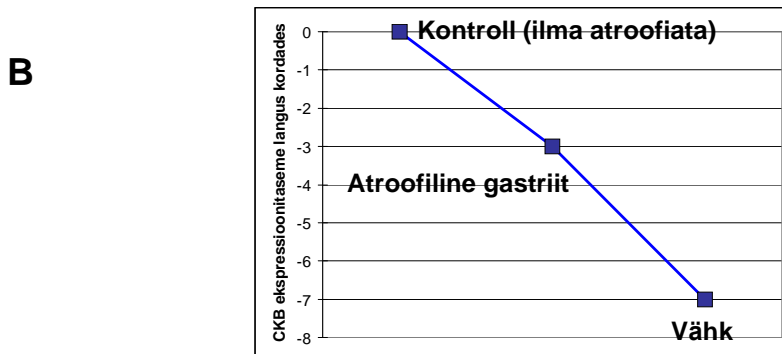
Äärmistele radadele on laaditud DNA suurusmarkerid. Uuritavate PCR produktide migratsioon elektriväljas näitab, et kasutatud geenispetsiifiliste praimeripaaride abil (Tabel 1) amplifitseeriti ettenähtud pikkusega DNA järjestused. DNA on visualiseeritud UV-s *TitanSight* DNA abil.

6.3. AK2 ja CK-geenide ekspressioonitase atroofilise gastriidi ja maovähi korral

Selgus, et atroofilise gastriidi ja maovähi puhul esinevad vaid kreatiinkinaasi isovorme kodeerivate geenide ekspressioonitaseme olulised muutused. Pernitsioosse aneemiaga kaasneva korpuse atroofia korral langes CKB geeni ekspressioonitase ligikaudu 3 korda ja mitokondriaalset isovormi kodeeriva CKMT1 tase peaaegu 9 korda. Mao kartsinoomis oli CKB ekspressioonitase kontrollgrupiga võrreldes 7 korda madalam, kuid CKMT1 kontrollgrupist oluliselt ei erinenud. Prekantseroosiga võrreldes avaldus see geen aga väljakujunenud vähis tugevamini. Registreeriti küll AK2 ekspressiooni minimaalne tõusutendents atroofia korral, kuid statistiliselt olulist erinevust ei olnud (Joonis 9A). Erinevused kordades atroofilise gastriidi ja kontrollgrupi vahel on näidatud Tabelis 3. Joonis 9B demonstreerib küllaltki ilmekalt et kui toimub normaalse mukoosa siire prekantseroosini ja sealt edasi väljakujunenud vähini siis CKB ekspressioonitase langeb progresseeruvalt.



Joonis 9A. Esitatud on 7–9 eksperimendi geomeetrilised keskmised koos standardveaga. Erinevused kordades võrreldes kontrollgrupiga on arvatatud valemi $2^{-\Delta\Delta CT}$ järgi, kus ΔCT on PCR-i lävetsükli erinevus endogeense referentsgeeni ACTB või HPRT1 suhtes (Livak and Schmittgen, 2001). *, ** ($p < 0.05$, $p < 0.01$) – oluliselt erinev mRNA tasemest ($2^{-\Delta CT}$) kontrollkorpuses; # – oluliselt erinev mRNA tasemest ($2^{-\Delta CT}$) atroofilises korpuses.



Joonis 9B. CKB ekspressiooni langus kordades kontrollgrupi, atroofilise gastriidi ja vähi võrdluses. Ekspressioonitasemete languse kujutamisel on lähtutud valemi $2^{-\Delta\Delta CT}$ järgi arvatud erinevustest kontrollgrupi suhtes.

6.4. AK2 ja CK-geenide ekspresioonitaseme muutused atroofilise gastriidi ja maovähi korral võrreldes kontrollgrupi antrumiga

Pernitsioosse aneemiaga kaasneva atroofilise gastriidi korral langes mao antrumis CKMT1 mRNA tase kontrollgrupiga võrreldes 10 korda ($p < 0,01$). CKB ja AK2 ekspresioonitase atroofilise gastriidi puhul kontrollgrupist oluliselt ei erinenud.

Kartsinoomis avaldus CKMT1 4-korda ($P < 0,05$) nõrgemini võrreldes kontrollgrupi antrumiga, kuid CKB ja AK2 ekspresioonitase kartsinoomis ja kontrollgrupi antrumis oluliselt ei erinenud.

Kümnel mao kartsinoomiga patsiendil võrreldi AK2, CKB ja CKMT1 ekspresiooni vähi kolde ja seda ümbritsevate kudede vahel. Statistiliselt olulisi erinevusi ei leitud, kuid sarnaselt mao kartsinoomiga patsientide võrdlemisel kontrollgrupiga esinesid samasuunalised tendentsid kreatiinkinaasi isoensüümide ekspresiooni puhul vähikoldes, AK2 ekspresioonitase oli vähikoldes ja seda ümbritsevates kudedes ligikaudu sama. (Tabel 3). Seevastu, ühel patsiendil kahest, keda spetsiaalselt selles suhtes uuriti, ilmnes HK2 geeni tähelepanuväärne üleekspressioon vähikoldes võrreldes ümbritsevate kudedega (Joonis 11; Tabel 4).

Tabel 3. Uuritud geenide suhtelised ekspresioonitasemed vähigrupi siseselt referentsgeeni ACTB suhtes. Suhteline ekspressioon on arvatud valemi $2^{-\text{deltaCT}}$ abil. Statistiliselt võrreldi nii grupi keskmisi kui mediaane. Skaleerimisfaktor: $\times 1000$

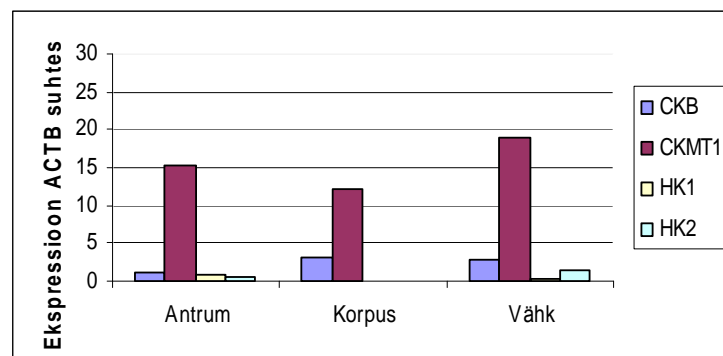
	Vähigrupi antrum	Vähikolle	Vähigrupi korpus
AK2	65	52	52
CKB	21	19	25
CKMT1	34	13	21

6.5 HK2 mRNA taseme testimine

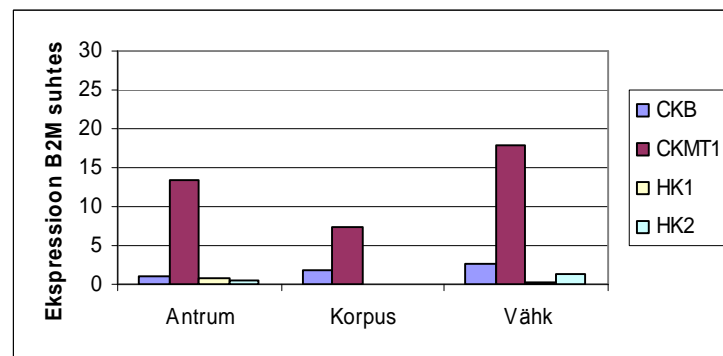
Kuna on näidatud, et maovähi puhul omab HK2 ekspresioonitase prognostilist tähendust. Nimelt on näidatud (Rho et al, 2007) et kui maovähi puhul esineb oluline HK2 üleekspressioon on haiguse kulg halvema prognoosiga. Seetõttu testiti kahe mao kartsinoomiga patsiendi puhul ka HK2 mRNA taset. Ühel nendest oli tähelepanuväärselt tõusnud HK2 geeni ekspressioon mõlema kasutatud referentsgeeni ACTB ja B2M suhtes

(Joonis 9) ja erinevused kordades (Tabel 4). Jooniselt 11 on näha, et ekspressioonitasemete kalkuleerimine kahe referentsgeeni suhtes annab samasunalised ja samade proportsioonidega tulemused. See asjaolu võimaldab olla kindel, et ACTB ja B2M ise vähi patoloogia puhul ei muutu ja on antud juhul sobivad kasutamiseks võrdlusgeenidena. Ka HPRT1 on üldtunnustatud *housekeeping* geen. Tabelis 4 esitatud erinevustest kordades nähtub, et HK2 mRNA tase tõusis selles kartsinoomis 16 korda võrreldes ümbritseva korpusega (antud patsiendil lokaliseerus vähk korpuses). See näitaja viitab halvemale haiguse prognoosile.

A



B



Joonis 11. HK2 geeni selektiivne üleekspressioon maovähi korral ühel konkreetsel patsiendil referentsgeenide ACTB (A) ja B2M (B) suhtes. Võrdlevalt on määratud ka CK-geenide ekspressioonitase.

Tabel 4. Ekspressiooni erinevused kordades

Geen	vähk/antrum	vähk/korpus
CKB	2,5	1,1
CKMT1	1,2	1,9
HK1	0,4	3,5
HK2	2,5	16,4

Arutelu

Käesoleva töö tulemused näitavad, et maohaigustega kaasnevad rakuenergeetika süsteemide häired on seotud energeetilises metabolismis osalevate geenide ekspressiooni muutustega. Selles töös saadud andmed geenide ekspressiooni kohta on vajalikud raku funktsioneerimismehhanismide paremaks mõistmiseks normi ja patoloogia tingimustes. Raku energeetilisest seisundist sõltub haiguse kulg, tulemus ning ravi efektiivsus (Neubauer jt., 1997; Wiggers jt., 2001). Selle hindamine aitab täpsustada diagnoosi ning hinnata terapeutilist efekti ning prognoosi. Näiteks on leitud, et maovähi arengut soodustab anaeroobne energeetiline fenotüüp, mille iseloomulikuks näitajaks on ka HK2 üleekspressioon.

Tunnustatud seisukoht on, et atroofiline gastriit on prekantseroosne seisund. Eriti kõrge maovähi tekke riskiga on A tüüpi maopõletikuga patsiendid. Selle tõttu on antud uuringusse kaasatud vähieelse seisundi näitena pernitsioosse aneemia diagnoosiga haiged. Molekulaarsed mehhanismid, mis vahendavad atroofilise gastriidi üleminekut vähiks ei ole täpselt teada, kuid rakutasandil tehtud uuringud viitavad energeetilise metabolismi, täpsemalt energiaülekandesüsteemide häiretele, mis on vahendatud mitokondrite funktsioonihäirete poolt. Et teha kindlaks, kas ja kui palju moduleerivad neid muutusi rakusisestes energiaülekandesüsteemides osalevaid valke kodeerivad geenid, võrreldi antud töös mitokondriaalse lokalisatsiooniga ensüümide AK2 ning CKMT1 ekspressioonitasemeid atroofilise gastriidiga ning adenokartsinoomiga patsientidelt võetud biopsiates. Lisaks mõõdeti ka ATP-d regenereeriva ensüümi CKB taset, kuna on teada, et mitokondrite häirete korral muutub ka H⁺-pumba funktsioon (Rong jt., 1998). Biomeditsiinilistes uuringutes kasutatakse tänapäeval järjest enam uudset reaallaja-PCRi geenide ekspressioonitaseme määramiseks. Meetodi kiirus ja tundlikkus lubavad detekteerida uuritava materjali väga väikest kogust (tüüpiliselt võetakse 500 ng kuni 1

mikrogramm summaarset RNAd cDNA sünteesiks). Pernitsioosse aneemiaga kaasneva atroofilise gastriidi korral ilmnenu CKMT1 ekspressioonitaseme langus nii mao antrumis kui korpuses on tõenäoliselt põhjustatud rakkude arvu vähenemisest ning põletiku poolt tekitatud ning reaktiivsete radikaalide poolt vahendatud mitokondrite kahjustusest. Mitokondreid võib kahjustada ka põletikku algselt indutseeriv faktor, näiteks *Helicobacter pylori*, mis oma elutegevuse käigus sekreteerib vacA tsütotoksiini ja toodab ammoniaaki. CKB suhteline alaekspressioon atroofilises mao korpuses viitab parietaalrakkude arvu langusele. See võib olla tingitud ka tagasisidest mitokondrite funktsiooni häiretele, kuna on teada, et mitokondrite funktsiooni langus inhibeerib ka prootonpumba tööd, mis on funktsionaalselt seotud B tüüpi kreatiinkinaasiga. Prekantseroosi võrdlemisel väljakujunenud vähiga ilmnes CKMT1 geeni suhteline üleekspressioon vähirakkudes, mis võib olla tingitud vähirakkude kõrgest energiatarbest aga ka kõrgenenud transkriptsioonifaktorite tasemest, mis indutseerivad mitokondrite biogeneesi.

CKB madal ekspressioonitase atroofilises limaskestas ning veelgi suurem langus vähirakkudes näitab, et CKB langeb progresseeruvalt vähi arenedes. Võib oletada, et CKB langus vähirakkudes on dediferentseerumise tunnuseks, kuna vähirakud ei oma hapet sekreteerivat H^+K^+ -ATPaasi. Varasemad uuringud on näidanud, et maovähi korral langeb CK ensüümide totaalne aktiivsus (Hirata jt., 1989). Ilmselt on see seotud madala CKB ekspressioonitasemega. Käesolevas töös saadud tulemused on uudsed, kuna seni puudusid andmed energeetilises metabolismis osalevate AK2 CKB ja CKMT1 mRNA taseme muutuste kohta kartsinogeneesis.

HK2 ekspressioonitaseme muutust peetakse oluliseks kuna on näidatud, et selle geeni üleekspressiooniga on vähi progresseerumine ägedam ning prognoos halvem (Rho jt., 2007). Seega, mida tugevamini on avaldunud Warburgi efekt, seda rohkem mõjutab kasvaja makroorganismi. On alust arvata, et vähi korral muutub ka vähirakke ümbritsevate koerakkude energeetiline seisund, mistõttu käesolevas töös uuritud energeetilises metabolismis osalevate geenide ekspressiooni erinevused vähikolde ja ümbritsevate kudede vahel, ei osutunud sedavõrd ilmekaks kui maovähiga patsientide ja kontrollgrupi võrdlemisel saadud tulemused. Selle asjaolu täpsustamine jääb antud töö eesmärkide piiridest väljapoole ja annab ainet järgnevaiks katseseeriaks.

Järeldused

Saadud tulemused võimaldavad teha järgmised järeldused:

1. Maovähi tekkega kaasnevad kreatiinkinaasi transkriptsiooniprofiili kvantitatiivsed muutused, mis väljenduvad selles, et:
 - CKMT1, mille ekspressioonitase atroofilise gastriidi korral oli kontrollgrupiga võrreldes oluliselt madalam, hakkab vähi arenedes, ilmselt suureneva energiavajaduse tõttu, tugevamini avalduma;
 - CKB mRNA tase vähi arenedes langeb progresseeruvalt, mis viitab mao limaskesta fenotüübi muutusele ja mukoosarakkude energeetilise metabolismi organisatsiooni seisukohalt väga olulise valgu defitsiidi kujunemisele. Selle tõttu võib häiruda mitokondrite ja ATPaasidevaheline interaktsioon.
2. Saadud tulemused viitavad rakusisese energiaülekanne mehhanismide muutuste olulisele rollile maolimaskesta haiguslikes transformatsiooniprotsessides.

Kokkuvõte

Käesolevas töös hinnati võrdlevalt rakusiseses energiaülekandes osalevate geenide ekspressioonitaset 1) pernitsioosse aneemiaga kaasneva atroofilise gastriidiga (maovähi prekantseroos), 2) väljakujunenud vähiga ja 3) ilma atroofiata kergekujulise gastriidiga (kontrollgrupp) patsientide maolimaskestast võetud koeproovides. Molekulaarsed mehhanismid, mis vahendavad atroofilise gastriidi siiret vähiks, ei ole täpselt teada. Rakutasandil tehtud uuringud viitavad jätkuvalt energeetilise metabolismi häiretele nii korpus-dominantse atroofilise gastriidi kui maovähi puhul. Teadaolevalt ekspresseeritakse maolimaskestas AK, CK ja HK isovorme, mis on paljudes rakutüüpides energiatranspordisüsteemide komponentideks. Teatud maohaigustega kaasnevad nende süsteemide funktsioonihäired. Sellest tulenevalt oli käesoleva töö eesmärgiks uurida kas atroofilise gastriidi ning maovähiga kaasnevad ka CK- ja AK- geenide ekspressioonitaseme muutused.

Uuriti 1) ilma atroofiata gastriidiga (kontrollgrupp; n=9) ja 2) atroofilise gastriidiga (vähieelne seisund; n=12) patsientide antrumi ja korpuse ning 3) mao kartsinoomiga (n=10) patsientide antrumi, korpuse ja vähikolde gastroendoskoopilisi biopsiaid. Geenide ekspressioonitase määrati reaal-aja PCR meetodi abil võrdlusgeenide suhtes lähtudes biopsiatest eraldatud summaarsest RNAst.

Saadud tulemused näitavad, et pernitsioosse aneemiaga kaasneva atroofilise gastriidi puhul (prekantseroos) oli CK tsütoplasmaatilist BB-CK isovormi kodeeriva CKB ekspressioonitase mao korpuses kontrollgrupi patsientidega võrreldes 3 korda madalam ($p < 0.05$). Veelgi nõrgemini avaldus CK mitokondriaalset isovormi kodeeriv CKMT1 geen, mille mRNA tase osutus atroofilises korpuses kontrollgrupiga võrreldes 9 korda madalamaks ($p < 0,01$). Prekantseroosi võrdlemisel väljakujunenud vähiga ilmnes seevastu CKMT1 geeni 3.5-kordne ($P < 0,05$) üleekspressioon, kuid CKB mRNA taseme 2.5-kordne langustendents maovähi arenedes. Kartsinoomis oli CKMT1 tase 4 korda madalam kui kontrollgrupi antrumis ($P < 0.05$) ning CKB tase 7 korda madalam kui kontrollgrupi korpuses ($P < 0.05$). Uuritud geenide avaldumine vähikoldes võrrelduna ümbritseva antrumi ja korpusega oluliselt ei muutunud, ilmnesid vaid samad tendentsid, mis saadi kontrollgrupi ja vähihaigete võrdlemisel. See annab alust arvata, et geenide ekspressiooni vähiseoselised nihked mRNA tasemel võisid olla toimunud ka ümbritsevas koes. Tulemustest järeldub, et maovähi tekkega kaasnevad CK geenide transkriptsiooniprofiili muutused, kusjuures CKB mRNA tase vähi arenedes progresseeruvalt langeb.

Summary in English

Atrophic gastritis and gastric cancer are accompanied with the changes in expression of the genes related to intracellular energy transfer network

The present study was undertaken to comparatively assess expression level of the genes related to intracellular energy transfer, in biopsy specimens from the mucosa of the patients with 1) gastric corpus dominant atrophic gastritis, a consistent finding in pernicious anemia and definable as precancerosis; 2) gastric cancer and 3) non-atrophic moderate gastritis as control group. Molecular mechanisms mediating the progression of atrophic gastritis and its transition to carcinoma are unclear. At the cellular level, increasing evidence points to the crucial role of disturbances of energy metabolism in case of corpus-dominant atrophic gastritis and gastric cancer. Factually, in gastric mucosa, there are expressed the isoforms of AK, CK and HK – known to participate in intracellular energy transfer systems in many of about 210 known distinct human cell types. Some gastric disorders are accompanied with appearance of energy transport system disturbances. Considering this, the purpose of present study was to find out whether or no the changes of expression of genes encoding the components of energy transport system that are associated with gastric cancer development.

1) As the control group, nine patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy for epigastric complaints were included. None of these subjects exhibited corpus mucosal atrophy. At the same time, they exhibited chronic inflammation in the corpus 2) Twelve gastroendoscopic biopsies of patients with atrophic corpus gastritis were included to study precancerous state. 3) In parallel use, ten patients with gastric carcinoma were studied. Detection of gene expression levels was performed by real-time PCR using total RNA isolated from the antrum and from the corpus of patients of each group studied and in addition to them, one from the canceric lesion of patients with gastric carcinoma.

The results show that in case of atrophic gastritis (precancerosis), the expression level of the CKB gene, encoding cytoplasmic BB-CK isoform that is strongly expressed in parietal cells, was 3-fold lower compared to the control group ($p < 0.05$). Even worse, mitochondrial CK isoform-encoding CKMT1 gene exhibited 9-fold underexpression in the atrophic corpus compared to the corresponding mRNA level of control group. At the same time, the underexpression of CKMT1 and CKB in gastric carcinoma cells was 4-folds and 7-folds, respectively. When the data of atrophic corpus were compared with those of gastric

carcinoma samples, it became evident that CKMT1 was expressed at levels even higher in cancer cells than in case of precancerous state but however, the level of CKB mRNA was lowered. The comparison of mRNA levels of interest in canceric cells in relation to surrounding tissue showed that above-mentioned changes were expressed in much lesser extent, giving rise the suggestion that cancer-associated changes had occurred also in surrounding mucosa.

It can be concluded that development of gastric cancer is accompanied with changes in transcription profile of CK genes and CKB expression level descended proportionally with cancer development.

Kasutatud kirjandus

- Anmann, T., Eimre, M., Kuznetsov, A. V., Andrienko, T., Käämbre, T., Sikk, P., Seppet, E., Tiivel, T., Vendelin, M., Seppet, E., Saks, V.A. (2005) Calcium-induced contraction of sarcomeres changes the regulation of mitochondrial respiration in permeabilized cardiac cells. *FEBS J*, **272**, 3145–3161.
- Arora, K.K., Pedersen, P.L. (1988) Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP. *J Biol Chem*, **263**, 17422–17428.
- Ashktorab, H., Frank, S., Khaled, A.R., Durum, S.K., Kifle, B., Smoot, D.T. (2004) Bax translocation and mitochondrial fragmentation induced by *Helicobacter pylori*. *Gut*, **53**, 805–813.
- Balasubramani, M., Day, B. W., Schoen, R.E., Getzenberg, R. H. (2006) Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer. *Cancer Res*, **66**, 763–769.
- Bayerdorffer, E., Lehn, N., Hatz, R., Mannes, G.A., Oertel, H., Sauerbruch, T., Stolte, M. (1992) Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology*, **102**, 1575–1582.
- Beal, M. F. (2000). Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, **23**, 298–304.
- Beales, I.L., Calam, J., Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. (1998) *Gut*, **42**, 227–234.
- Broide, E., Klinowski, E., Varsano, R., Eschar, J., Herbert, M., Scapa, E. (1996) Superoxide dismutase activity in *Helicobacter pylori*-positive antral gastritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **23**, 609–613.
- Burk, D., Woods, M., Hunter, J. (1967) On the significance of glycolysis for cancer growth, with special reference to Morris rat hepatomas. *J Natl Cancer Inst*, **38**, 839–863.
- Carrasco, A.J., Dzeja, P.P., Alekseev, A.E., Pucar, D., Zingman, L.V., Abraham, M.R., Hodgson, D., Bienengraeber, M., Puceat, M., Janssen, E., Wieringa, B., Terzic, A. (2001) Adenylate kinase phosphotransfer communicates cellular energetic signals to ATP-sensitive potassium channels. *PNAS*, **98**, 7623–7628.

- Correa, P. (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process – First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*, **52**, 6735–6740.
- Correa, P. (2004) The biological model of gastric carcinogenesis. *IARC Sci Publ*, **157**, 301–310.
- Correia, M., Machado, J. C., Ristimäki, A. (2009) Basic Aspects of Gastric Cancer. *Helicobacter*, **14**, 36–40.
- Czybryt, M.P., McAnally, J., Fishman, G.I., Olson, E.N. (2003) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 1711–1716.
- Davies, G.R., Simmonds, N.J., Stevens, T.R., Sheaff, M.T., Banatvala, N., Laurenson, I.F., Blake, D.R., Rampton, D.S. (1994) *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production in vivo. *Gut*, **35**, 179–185.
- de Groof, A.J., Oerlemans, F.T., Jost, C.R., Wieringa, B. (2001) Changes in glycolytic network and mitochondrial design in creatine kinasedeficient muscles. *Muscle Nerve*, **24**, 1188–1196.
- Dzeja, P.P., Terzic, A. (1998) Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K⁺ channels. *FASEB J*, **12**, 523–529.
- Dzeja, P.P., Terzic, A. (2003) Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol*, **206**: 2039–2047.
- Dzeja, P.P., Zeleznikar, R.J., Goldberg, N.D. (1998) Adenylate kinase: Kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem*, **184**, 169–182.
- Farkas, R., Selmeçi, L., Tulassay, Z., Pronai, L. (2003) Superoxide-dismutase activity of the gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Anticancer Res*, **23**, 4309–4312.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P. (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, **18**, 18581–18592.
- Forte, J.G., Black, J.A., Forte, J.G.. Jr. (1980) Substrate dependency for HCl secretion by isolated piglet gastric mucosa. *Am J Physiol*, **238** (*Gastrointest Liver Physiol*), G353–G357.
- Fu, S., Ramanujam, K.S., Wong, A., Fantry, G.T., Drachenberg, C.B., James S.P., Meltzer, S.J., Wilson, K.T. (1999) Increased expression and cellular localization of inducible

- nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology*, **116**, 1319–1329.
- Galmiche, A., Rasso, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, J.C., Contamin, S., de Tillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* **19**, 361–6370.
- Gao, L.B, Rao, L., Wang, Y.Y., et al. (2009) The association of interleukin-16 polymorphisms with IL16 serum levels and risk of colorectal and gastric cancer. *Carcinogenesis* **30**,295–299.
- Giannakis, M., Chen, S.L., Karam, S.M., Engstrand, L., Gordon, J.I. (2008) *Helicobacter pylori* evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,**105**, 4358–4363.
- Gotz, J.M., Thio, J.L., Verspaget, H.W., Offerhaus, G.J., Biemond, I., Lamers, C.B., Veenendaal, R.A. (1997) Treatment of *Helicobacter pylori* infection favourably affects gastric mucosal superoxide dismutases. *Gut*, **40**, 591–596.
- Gotz, J.M., van Kan, C.I., Verspaget, H.W., Biemond, I., Lamers, C.B. Veenendaal, R.A. (1996) Gastric mucosal superoxide dismutases in *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, **38**, 502–506.
- Gruno, M., Peet, N., Seppet, E., Kadaja, L., Paju, K., Eimre, M., Orlova, E., Peetsalu, M., Tein, A., Soplepmann, J., Schlattner, U., Peetsalu, A., Seppet, E.K. (2006) Oxidative phosphorylation and its coupling to mitochondrial creatine and adenylate kinases in human gastric mucosa. *Am J Physiol; Regul Integr Comp Physiol*, **291**, R936–R946.
- Gruno, M., Peet, N., Tein, A., Salupere, M., Sirotkina, M., Valle, J., Peetsalu, A., Seppet, E.K. (2008) Atrophic gastritis: deficient complex I of the respiratory chain in the mitochondria of corpus mucosal cells. *J Gastroenterol*, **43**, 780–788.
- Gupta, R.A., Polks, D.B., Krishna, U., Israel, D.A., Yan, F., Dubois, R.N., Peek, R.M. (2001) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ suppresses nuclear factor κ B-mediated apoptosis induced by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 31059–31066.
- Haber, M.M. (2002) Histologic precursors of gastrointestinal tract malignancy. *Gastroenterol Clin N Am*, **31**, 395–419.
- He, Q.Y., Cheung, Y.H., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Chu, K.M., Chiu, J.F. (2004) Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics* **4**, 3276–3287.

- Hirata, R.D.C., Hirata, M.H., Strufaldi, B., Possik, R.A., Asai, M. (1989) Creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes in serum and tissues of patients with stomach adenocarcinoma. *Clin Chem*, **35**, 1385–1389.
- Houghton, J.M., Stoicov, C., Nomura, S. et al. (2004) Gastric cancer originating from bone marrow derived cells. *Science*, **306**, 1568–1571.
- Hui, W.M., Liu, H.C., Lam, S.K. (1989) Parietal cells in duodenal ulcer disease: a histochemical study of the effects of omeprazole and ranitidine on mitochondrial activities. *J Gastroenterol Hepatol* **4**, 143–149.
- Isidoro, A., Martinez, M., Fernandez, P.L., Ortega, A.D., Santamaria, G., Chamorro, M., Reed, J.C., Cuezva, J.M. (2004) Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J*, **378**, 17–20.
- Jiang, X., Suzaki, E., Kataoka, K. (2002) Immunofluorescence detection of gastric H₂/K₊-ATPase and its alterations as related to acid secretion. *Histochem Cell Biol*, **117**, 21–27.
- Jung, H.K, Lee, K.E., Chu, S.H., Yi, S.Y. (2001) Reactive oxygen species activity, mucosal lipoperoxidation and glutathione in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*, **16**, 1336–1340.
- Katellaris, P.H., Seow, F., Lin, B.P.C., Napoli, J., Ngu, M.C., Jones, D.B. (1993) Effect of age, *Helicobacter pylori* infection, and gastritis with atrophy on serum gastrin and gastric acid secretion in healthy men. *Gut*, **34**, 1032–1037.
- Kimura, M., Goto, S., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Hirayama, T., Kondo, T. (1999) Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microb Pathog*, **26**, 45–52.
- Konturek, P.C., Konturek, S.J., Pierzchalski, P., Bielański, W., Duda, A., Marlicz, K., Starzyńska, T., Hahn, E.G. (2001) Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach—role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit*, **7**, 1092–1107.
- Kristensen, C. A., Askenasy, N., Jain, R. K., Koretsky, A.P. (1999) Creatine and cyclocreatine treatment of human colon adenocarcinoma xenografts: ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies *British J Cancer*, **79**, 278–285.

- Kubota, Y., Kato, K., Dairaku, N., Koike, T., Iijima, K., Imatani, A., Sekine, H., Ohara, S., Matsui, H., Shimosegawa, T. (2004) Contribution of glutamine synthetase to ammonia-induced apoptosis in gastric mucosal cells. *Digestion*, **69**, 140–148.
- Kumar, V. (2007) Pernicious anemia. *MLO Med Lab Obs*, **28**, 30–31.
- Kuznetsov, A.V., Tiivel, T., Sikk, P., Käämbre, T., Kay, L., Daneshrad, Z., Rossi, A., Kadaja, L., Peet, N., Seppet, E.K, Saks, V.A. (1996) Striking differences between the kinetics of regulation of respiration by ADP in slow-twitch and fast-twitch muscles in vivo. *Eur J Biochem* **241**, 909–915.
- Lee, H.J., Pyo, J.O., Oh, Y., Kim, H.J., Hong, S.H., Jeon, Y.J., Kim, H., Cho, D.H., Woo, H.N., Song, S., Nam, J.H., Kim, H.J., Kim, K.S., Jung, Y.K. (2007) AK2 activates a novel apoptotic pathway through formation of a complex with FADD and caspase-10. *Nat Cell Biol*, **11**, 1303–1310.
- Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E, Medeiros, D.M., Kelly, D.P. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, **106**, 847–856.
- Liivo, K. (2008) Rakusisese energiaülekanedega seotud geenide ekspressioon maolimaskestas: antrumi ja korpuse võrdlus. *Eesti Arst*, **9**, 698.
- 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**, 402–408.
- Lochhead, P., El-Omar, E. M. (2008) Gastric cancer. *Br Med Bull*, **85**, 87–100.
- Maaroos, H.-I. (2006) *Helicobacter pylori* – Nobeli preemiaga pärjatud meditsiiniavastus. *Horisont* **2**, 10–11.
- Maeda, S., Yoshida, H., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Shiratory, Y., Omata, M. (2005) Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* **50**, 771–778.
- Maimets, T. (2006) Juhuslikkusest rakkude elus. *Horisont* **2**, 7–9.
- Martin, L.F., Asher, E.F., Passmore, J.C., Hartupee, D.A., Fry D.E. (1987) Effect of hemorrhagic shock on oxidative phosphorylation and blood flow in rabbit gastrointestinal mucosa. *Circ Shock*, **21**, 39–50.
- Masters, C.J., Reid, S., Don, M. (1987) Glycolysis – new concepts in an old pathway. *Mol Cell Biochem*, **76**, 3–14.
- McCarthy, C.J., Crofford, L.J., Greenson, J., Scheiman, J.M. (1999) Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, **94**, 1218–1223.

- McDonald, S., Greaves, L., Gutierrez-Gonzalez, L., et al. (2008) Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology*, **134**, 500–510.
- Meining, A., Morgner, A., Miehlke, S., Bayerdörffer, E., Stolte, M. (2001) Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **15**, 983–998.
- Miller, E. E., Evans, A. E., Cohn, M. (1993) Inhibition of rate of tumor growth by creatine and cyclocreatine. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, **90**, 3304–3308.
- Mukhtar, M., Parveen, Z., Logan, D.A. (1998) RNA from the filamentous fungus *Mucor circinelloides*. *J Microbiol Methods*, **33**, 115–118.
- 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**, 2190–2196.
- Oksanen, A., Sipponen, P., Karttunen, R., Miettinen, A., Veijola, L., Sarna, S. (2000) Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in outpatients referred for gastroscopy. *Gut*, **46**, 460–4633.
- Ottaway, J.H., Mowbray, J. (1977) The role of compartmentation in the control of glycolysis. *Curr Top Cell Reg*, **12**, 107–208.
- Ozawa, K., Kato, S., Sekine, H., Koike, T., Minoura, T., Iinuma, K., Nagura, H. (2005) Gastric epithelial cell turnover and mucosal protection in Japanese children with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol*, **40**, 236–246.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74–108.
- Pattyn F., Seleman, F., De Paepe, A., Vandensompele, J. (2003) RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Research*, **31**, 122–123.
- Peek, R.M. ja Blaser, M.J. (2002) *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Rev*, **2**, 28–39.
- Raha, S., Robinson, B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biol Sci*, **25**, 502–508.
- Rho, M., Kim, J., Jee, C.D., Lee, Y.M., Lee, H.E., Kim, M.A., Lee, H.S., Kim, W.H. (2007) Expression of type 2 hexokinase and mitochondria-related genes in gastric carcinoma tissues and cell lines. *Anticancer Res*, **27**, 251–258.

- Rong, Q., Utevskaia, O., Ramilo, M., Chow, D.C., Forte, J.G. (1998) Nucleotide metabolism by gastric glands and H⁺-K⁺-ATPase-enriched membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **274**, G103–G110.
- Rosenberg, P. (2004). Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion*, **4**, 621–628.
- Sachs, G., Chang, H.H. Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M., Saccomani, G. (1976) A non-electrogenic H1 pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* **251**, 7690–7698.
- Saks, V., Dzeja, P., Schlattner, U., Vendelin, M., Terzic, A., Wallimann, T. (2006). Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*, **571**, 253–723.
- Saks, V.A., Käämbre, T., Sikk, P., Eimre, M., Orlova, E., Paju, K., Piirsoo, A., Appaix, F., Kay, L., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E., Seppet, E.K. (2001) Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J*, **356**, 643–657.
- Saks, V.A., Kuznetsov, A.V., Vendelin, M., Guerrero, K., Kay, L., Seppet, E.K. (2004) Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem*, **256–257**, 185–199.
- Santra, A., Chowdhury, A., Chaudhuri, S., Das, G.J., Banerjee, P.K., Mazumder, D.N. (2000) Oxidative stress in gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Indian J Gastroenterol*, **19**, 21–23.
- Sato, N., Kamada, T., Kawano, S., Abe H., Hagihara, B. (1978) Oxidative and phosphorylative activities of the gastric mucosa of animals and humans in relation to the mechanism of stress ulcer. *Biochim Biophys Acta* **538**, 236–243.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*, **3**, 1101–1108.
- Seppet, E.K., Eimre, M., Anmann, T., Seppet, E., Piirsoo, A., Peet, N., Paju, K., Guzun, R., Beraud, N., Pelloux, S., Tourneur, Y., Kuznetsov, A.V., Käämbre, T., Sikk, P., Saks, V.A. (2006) Structure-function relationships in the regulation of energy transfer between mitochondria and ATPases in cardiac cells. *Exp Clin Cardiol*, **11**, 189–194.
- 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**, 2252–2303.

- Seppet, E. K., Käämbre, T., Sikk, P., Tiivel, T., Vija, H., Tonkonogi, M., Sahlin, K., Kay, L., Appaix, F., Braun, U., Eimre, M., Saks, V.A. (2001). Functional complexes of mitochondria with Ca,MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 379–395.
- Shinohara, Y., Ichihara, J., Terada, H. (1991) Remarkably enhanced expression of the type II hexokinase in rat hepatoma cell line AH130. *FEBS Lett*, **291**, 55–57.
- Shinohara, Y., Yamamoto, K., Kogure, K., Ichihara, J., Terada, H. (1994). Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cells. *Cancer Lett*, **82**, 27–32.
- Shirin, H., Sordillo, E.M., Oh, S.H., Yamamoto, H., Delohery, T., Weinstein, I.B., Moss, S.F. (1999) *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res*, **59**, 2277–2281.
- Sipponen, P., Kekki, M., Haapakoski, J., Ihamaki, T., Siurala, M. (1985) Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int J Cancer*, **35**, 173–177.
- Sistmans, E.A., Klaassen, C.H.W., Peters, W., Swarts, H.G.P., Jap, P.H.K., DePont, J.J.H.H., Wieringa, B. (1995) Co-localization and functional coupling of creatine kinase B and gastric H⁺/K⁺-ATPase on the apical membrane and the tubulovesicular system of parietal cells. *Biochem J*, **311**, 445–451.
- Smoot, D.T., Mobley, H.L.T., Chippendale, G.R., Lewison, J.F., Resau, J.H. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **58**, 1992–1994.
- Spicer, Z., Miller, M.L., Andringas, A., Riddle, T.M., Duffy, J.J., Doetschman, T., Shull G.E. (2000) Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha-subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. *J Biol Chem* **275**, 21555–21565.
- Sung, J.J., Leung, W.K., Go, M.Y., To, K.F., Cheng, A.S., Ng, E.K., Chan, F.K. (2000) Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol*, **157**, 729–735.
- Suzuki, H., Yanaka, A., Shibahara, T., Matsui, H., Nakahara, A., Tanaka, N., Muto, H., Takashi, M., Uchiyama, Y. (2002) Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **283**, G986–G995.

- Takikawa, M., Akiyama, Y., Maruyama, K., Suzuki, A., Liu, F., Tai, S., Ohshita, C., Kawaguchi, Y., Bandou, E., Yonemura, Y., Yamaguchi, K. (2006) Proteomic analysis of a highly metastatic gastric cancer cell line using two-dimensional differential gel electrophoresis. *Oncology Reports*, **16**, 705–711.
- Tanabe, T., Yamada, M., Noma, T., Kajii, T., Nakazawa, A. (1993) Tissue-specific and developmentally regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes. *J Biochem*, **113**, 200–207.
- Toh, B.H., van Driel, I.R., Gleeson, P.A. (1997) Pernicious anemia. *N Engl J Med* **337**,1441–1448.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Fusamoto, H., Kamada, T., Sato, N. (1992) Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia. *Gastroenterology*, **102**, 1881–1888.
- Valle, J., Kekki, M., Sipponen, P., Ihamäki, T., Siurala, M. (1996) Long-term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. Results of a 32-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*, **31**, 546–550.
- Van Rompay, A.R., Johansson, M., Karlsson, A. (1999) Identification of a novel human adenylate kinase cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of therecombinant protein. *Eur. J. Biochem*, **261**, 509–516.
- Vyssokikh, M.Y., Brdiczka, D. (2003) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol*, **50**, 389–404.
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H.M. (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "PCr-circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J*, **281**, 21–40.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309–314.
- Weiss, J.N., Lamp, S.T. (1989) Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol*, **94**, 911–935.
- Wendt, S., Schlattner, U., Wallimann, T. (2003) Differential effects of peroxynitrite on human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem*, **278**, 1125–1130.
- 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**, 100–108.
- Wilson, J.E. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*, **206**, 2049–2057.

- Xia, H.H.X., Talley N.J. (2001) Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*, **96**, 16–26.
- Yanai, A., Hirata, Y., Mitsuno, Y., Maeda, S., Shibata, W., Akanuma, M., Yoshida, H., Kawabe, T., Omata, M. (2003) *Helicobacter pylori* induces antiapoptosis through nuclear factor-kB activation. *J Infect Dis*, **188**, 1741–1751.
- Yasuda, S., Arii, S., Mori, A., Isobe, N., Yang, W., Oe, H., Fujimoto, A., Yonenaga, Y., Sakashita, H., Imamura, M. (2004) Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1 alpha and its significance. *J Hepatol*, **40**, 117–1123.
- Ye, W., Nyren, O. (2003) Risk of cancers of the oesophagus and stomach by histology or subsite in patients hospitalised for pernicious anaemia. *Gut*, **52**, 938–941.
- Yin, G.Y., Zhang, W.N., He, X.F., Chen, Y., Shen, X.J. (2003) Study on the classification of chronic gastritis at molecular biological level. *World J Gastroenterol*, **9**, 836–842.
- Yin, G.Y., Zhang, W.N., Shen, X.J., Chen, Y., He, X.F. (2003) Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol*, **9**, 851–857.
- Zeleznikar, R.J., Dzeja, P.P., Goldberg, N.D. (1995) Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem*, **270**, 7311–7319.
- Zhang, C., Yamada, N., Wu, Y.L., Wen, M., Matsuhisa, T., Matsukura, N. (2005) *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol*, **11**, 791–796.

Tänuavaldused

Antud töö on osa suuremast projektist “Energeetilise metabolismi kompartmentaliseeritud süsteemid ja nende häired südame-, maoepiteeli- ja ajurakkudes”, mis on saanud Eesti Teadusfondi uurimistoetust (projekt ETF7117). Ma tänan teadusteema juhti prof. Enn Seppetit võimaluse eest selles projekti raames eksperimente teha. Kõik katsed on tehtud TÜ arstiteaduskonna üld- ja molekulaarpatoloogia instituudis.

Käesolev uurimus on valminud tänu koostööle kolme TÜ kliinikuga. Nendeks on kirurgiikliinik, hematoloogia-onkoloogiikliinik ja sisekliinik. Ma soovin koostöö eest tänada:

prof. Ants Peetsalu,	kirurgiikliiniku juhataja
dr. Margot Peetsalu	(kirurgiikliinik)
dr. Andres Tein	(kirurgiikliinik)
dr. Jaan Soplepmann	(hematoloogia-onkoloogiikliinik)
dr. Riina Salupere	(sisekliinik)