

Doktori értekezés tézisei

Rekreatív testmozgás kardioprotektív és gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata patkánymodellben

Hegyköziné Veszélka Médea

Témavezető:

Dr. Pósa Anikó

egyetemi docens



Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék Szeged

2018

A tézisben szereplő rövidítések jegyzéke:

AVP: arginin-vazopresszin

CF: koronárián átáramló folyadékból

CO: szén-monoxid

CTRL: fitoösztrogén mentes táp

CVD: szív-és érrendszeri betegség

EKG: elektrokardiográf

HO-1, HO-2, HO-3: hem-oxigenáz-1, hem-oxigenáz-2, hem-oxigenáz-3

HT: magas triglicerid tartalmú étkezés

IL-6: interleukin-6

I/R: iszkémia/ reperfüzió

LAD: bal leszálló koronária artéria

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MMP-2: mátrix metalloproteináz-2

MPO: mieloperoxidáz

OVX: sebészi ovariectómia

R: futó

SO: áloperáció

TNF- α : tumor nekrozis faktor-alfa

1. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

Az elhízás és a szív-és érrendszeri betegségek (CVD) gyakorisága riasztóan növekszik. A CVD a világon vezető haláloknak számítanak. A krónikus gyulladás és az oxidatív stressz számos CVD kialakulásához vezet, beleértve a magas vérnyomást, a szívelégtelenséget. Ezeknek a betegségeknek a kockázata jelentősen csökkenthető lenne megfelelő életmódbeli változtatásokkal, például fokozott fizikai aktivitással. A CVD kialakulásának pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. Hölgyeknél az ösztrogén hiány az életkorral összefüggő betegségek egyik fő oka a kardiovaszkuláris rendszerben. Számos tanulmány szerint a kardiovaszkuláris morbiditás és a mortalitás jóval kisebb a premenopauzás nőknél, mint az azonos korú férfiaknál, melynek egyik feltehető oka az ösztrogén védő szerepe a CVD-ekkel szemben. Bár az ösztrogén hiány önmagában is megnöveli a túlsúlyt és elhízást a posztmenopauzás nőkben, számos genetikai, valamint környezeti hatás (például életmód, táplálkozás és dohányzás) befolyásolhatja a testzsír felhalmozódását. A posztmenopauza korba lépett nők életük harmadát ösztrogén hiányos állapotban töltik, ezért az elhízás és az elhízás okozta szövődmények kezelése fontos egészségügyi jelentőséggel bír a 21. században. Az ösztrogén alapvető szerepet játszik az antioxidáns és gyulladáscsökkentő mechanizmusokban, és pozitívan szabályozza a lipid és a glükóz metabolizmusát, ezért a posztmenopauzában lévő nők hajlamosabbak az elhízásra, a gyulladásos folyamatokra és érzékenyebbek az oxidatív stresszre. A mérsékelt intenzitású fizikai aktivitás kismértékű oxidatív stresszt okoz,

amire a szervezet az antioxidáns védő rendszerek fokozott aktivitásával válaszol. A hem-oxigenáz (HO) olyan enzim, amely katalizálja a hem degradációt így, szén-monoxid (CO), vas ion és biliverdin keletkezik., mely bilirubinná alakul át. A CO és a biliverdin / bilirubin fontos szerepet töltenek be a szív- és érrendszerben. A CO egy vasoaktív gáz, mely vasodilatációt okoz az érfal simaizomsejtjein. Emellett antiapoptotikus és gyulladásgátló hatása is jelentős.

A testzsír felhalmozódása gyulladással citokinek termelésének fokozásával elősegíti a pro-inflammatórikus citokinek termelődését, mint például a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α), interleukin-6 (IL-6). Ez az elhízás okozta gyulladással állapot az oxidáns / antioxidáns homeosztázis felborulásához vezet, mely az oxidatív stressz fokozódását eredményezi.

2.CÉLKITŰZÉSEK

2.1.Kísérleteink első szakaszában célul tűztük ki a szabadidős testmozgás hatásainak vizsgálatát hím patkány szív-és érrendszerében.

Tisztázni kívántam, hogy:

- A testmozgás hogyan befolyásolja a bazális vérnyomás értékeit, az infarktus méretét, az ST depresszió mértékét, az AVP-re adott vérnyomásválaszt és aortakontrakciót ?
- Milyen különbségek figyelhetők meg futó és nem futó csoportok között a MMP-2 aktivitását tekintve?

2.2.A második kísérletsorozatunkban célul tűztük ki, hogy a magas triglicerid tartalmú étrend (HT) és a szabadidős testmozgás (R) hatásait vizsgáljuk ösztrogénhiányos (OVX) nőstényekben.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ.

- A 12 hetes testmozgás hogyan befolyásolja a HO aktivitását aortában és szívben, ösztrogén hiányos állapotban és HT étrend hatására?
- A 12 hetes testmozgás milyen hatással van ösztrogén hiányában és HT étrenden a gyulladáshoz kapcsolódó paraméterekre (IL-6, TNF- α szint, MPO aktivitás)?

3.MÓDSZEREK

3.1.A testmozgás hatása a kardiovaszkuláris rendszerre hím patkányokban.

3.1.1.Vizsgált állatcsoportok

Első kísérlet sorozatunkhoz hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat véletlenszerűen két csoportra osztottunk. A fizikai aktivitást végző állatokat futókerékkel ellátott ketrecekben helyeztük el, mérőórával felszerelve, melyet szabadidős testmozgásként definiáltuk. A 6 hétig tartó tréning periódus alatt az állatok a nap 24 órájában szabadon hozzáférhettek a kerékhez. A futási periódus alatt az átlagos futási távolság $3,91 \pm 1,27$ km / nap / állat volt. A hím patkányok másik részét futókerék nélküli ketrecekben helyeztük el (nem futó). Az állatokat standard körülmények (hőmérséklet, világítás) között tartottuk. A patkányok csapvizet ad libitum kaptak és standard granulált patkánytápot fogyasztottak.

3.1.2.MMP-2 aktivitás mérése

Az 64kDa és 72kDa izoformájú MMP-2 aktivitását szérumból és koronárián átáramló folyadékból (CF) zselatin zimográfia segítségével határoztuk meg, melyet intenzitás \times mm²-ben fejeztünk ki.

3.1.3.Túlélő patkány aortagyűrű-kontrakció mérése

Az aortafeszülés /in vitro/ mérése ISOSYS számítógépes program segítségével történt. 2,0 μ g/ml dózisú arginin-vazopresszinre (AVP) adott aortakontrakciót vizsgáltuk, amit az aortagyűrű nyomásával fejeztünk ki (g/mg aortagyűrű).

3.1.4.A bazális vérnyomás mérése

Az állatokat 30 % uretánnal altattuk. A vérnyomás-emelkedést a jobb oldali arteria carotisban mértük. Az eredményeket a HAEMOSYS program segítségével értékeltük.

3.1.5.Szívperfúzió mérése Langendorff szerint

Az állatoknak a cervikális diszlokációt megelőzően 10-20 perccel heparin injekciót adtunk, majd a szívüket Langendorff perfúziós oszlopra helyeztük. Az AVP-re (1 µg) adott válaszként megjelenő szívperfúziót 15 perces stabilizációs periódus elteltével mértük, és % -ban fejeztük ki a bazális értékkel összehasonlítva.

3.1.6.Adrenalin és fentolamin által kiváltott experimentális angina modell

HEMOSYS számítógépes mérő és analizáló rendszer segítségével regisztráltuk az artériás középvérnyomást és a testfelszíni II. EKG-t. A szívizom iszkémia meghatározásához az ST változását használtuk fel. Az adrenalin-fentolamin modellben egyetlen dózisnyi epinefrin (10,0 µg/kg) majd 30 s elteltével alfa adrenoceptorantagonista fentolamint (15,0 mg/kg) adtunk az állatok farkivénájába. Az ECG és vérnyomás változásait párhuzamosan követtük.

3.1.7. Infarktusz terület meghatározása

Az infarktus méretét a bal leszálló koronária artéria (LAD) okklúzió által indukált regionális iszkémia után mértük. Az infarktusz terület nagyságát, a területekre (rizikózóna) vonatkozó %-os arányban fejeztük ki

3.1.8. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm S.E.M.-ként fejeztük ki. A statisztikai szignifikanciát ANOVA teszttel állapítottuk meg és az eltéréseket $p < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

3.2.A testmozgás és a magas triglicerid tartalmú étrend hatásai ösztrogénhiányos patkánymodellben

3.2.1. Vizsgált állatcsoportok

Munkánk során 10 hetes nőstény Wistar patkányokat használtunk. A kísérleti állatok egy részén sebészi ovariektómiát (OVX) hajtottunk végre, míg a másik csoporton áloperálást (SO) végeztünk. A negyedik hét végén meghatároztuk az ösztrogén szérumszintjét ELISA módszerrel (Quantikine patkány ösztrogén ELISA kit, R&D Systems Inc.). Négy hetes pihenési periódust követően az OVX és SO csoportokat az etetés típusa (CTRL: fitoösztrogén mentes étrend; HT: fitoösztrogén mentes étrend magas triglicerid tartalmú (40 %-os) zsírtartalommal) és a testmozgás alapján csoportosítottuk. A fizikai aktivitást végző állatokat (R) futókerékkel ellátott ketrecekben helyeztük el, melyet szabadidős testmozgásként definiáltuk. Azok az állatok, melyek nem futottak (NR) futókerék nélküli ketrece voltak elhelyezve. Az etetési és a tréning

periódus 12 hétig tartott. A patkányok testtömegét a 12 hetes futási és etetési periódus során nyomon követtük.

3.2.2.HO enzim aktivitás mérése aortában és szívben

A HO aktivitásmérésnél a hem átalakulása során keletkező bilirubin szintet mértük spektrofotometriás módszerrel. Eredményeinket nM bilirubin/óra/mg fehérjére vonatkoztattuk.

3.2.3.A HO-1, TNF- α és IL-6 koncentráció meghatározása plazmában

A plazma TNF- α és IL-6 koncentrációját ELISA módszerrel vizsgáltuk a gyártó cég leírásai alapján. A IL-6 értékeket pg/mg plazma fejeztük ki. A TNF- α és HO-1 koncentráció értékét ng/mg fehérjében adtuk meg.

3.2.4.Mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitásának mérése szívből és aortából

A MPO enzim a neutrofil granulocitákban található, mennyisége jól jellemezi a gyulladás mértékét. A MPO aktivitását spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. Az eredményeket mU/mg.ban határoztuk meg.

3.2.5.Statisztikai analízis

Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel igazoltuk. A nyolc kísérleti csoport adatai (minden vizsgált biológiai változó esetében) egyutas ANOVA-val (Geisser-Greenhouse korrekcióval), majd Tukey vizsgálattal hasonlítottuk össze. A testtömeg változásait F teszttel hasonlítottuk össze. A 0,05-nél kisebb P értékeket szignifikánsnak tekintettük. Minden adatot átlag \pm SEM -ként fejeztünk ki.

4.EREDMÉNYEK

4.1.A testmozgás hatása a kardiovaszkuláris rendszerre hím patkányokban.

Zimográfiai méréssel kimutattuk, hogy hím állatoknál a 6 hetes rekreációs testmozgás csökkentette a 64- és 72 kDa MMP-2 izoformák szérumszintjét a futó állatokban a nem futó csoporthoz képest. Vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a 6 hetes szabadidős futókerekes testmozgás védelmet nyújt az I/R sérüléssel szemben a szívizominfarktus méretének csökkenésével arányosan. A testmozgás csökkentette továbbá az ST szegmens depresszióját, és ezáltal javította az iszkémiás érzékenységet a szívben. További vizsgálatainkban AVP-t alkalmaztunk, amely a hemodinamikai paramétereket szabályozza mérsékelt vazokonstriktió indukálásával. 1,0 µg AVP-re adott válasznál a futó állatokban a csökkenés szignifikánsan erőteljesebb volt. Futás hatására az aorta-kontrakcióban és bazális vérnyomásban nem volt különbség a nem futó és a futó állatok között. Vizsgálatunkban a futás csökkentette a 64 kDa MMP-2 aktivitását a CF-ben, a 30 perces LAD-elzáródás következtében. Az MMP-2 értékek csökkenéséhez hasonlóan az infarktus mérete is csökkent. A futás hatásos stimulusnak bizonyult a funkcionális javulást, a szívizom perfúziót és a szív ischaemiás érzékenységet tekintve.

4.2.A testmozgás és a magas triglicerid tartalmú étrend hatásai ösztrogénhiányos patkánymodellben

Az aortában és a szívben mért HO aktivitása és a HO-1 koncentrációja szignifikánsan csökkent mind a NR OVX és az SO HT csoportban. A 12 hetes testmozgás hatására azonban javulást tapasztaltunk a HO-1 értékek estében. A plazma IL-6 koncentrációk magasabbak voltak az NR OVX állatokban és a HT étrenden lévő patkányoknál az SO CTRL patkányokhoz képest. A TNF- α koncentráció szignifikánsan magasabb volt az NR OVX csoportokban. A 12 hetes edzés szignifikánsan csökkentette mind a TNF- α , mind az IL-6 koncentrációját az NR patkányokhoz képest. A MPO aktivitása az OVX és a HT étrend következtében szignifikánsan megnövekedett, azonban az testmozgás helyreállította az emelkedett értékeket.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva, eredményeink adaptív és kardioprotektív hatásokat mutatnak szabadidős testmozgás során. A szérumban MMP-2 csökkent aktivitása hozzájárulhat a 6 hetes testmozgás többféle adaptációs mechanizmusához. Az infarktus méretének csökkenése azt sugallja, hogy az MMP-2 felszabadulása a perfúzió során a kardioprotektív hatások egyik oka lehet. Továbbá, a testmozgás képes volt javítani a szív angina érzékenységet és az AVP-indukálta perfúziós változások által észlelt funkcionális javulást okozni.

Második kísérletünkben tisztáztuk, hogy az ösztrogén hiány és a túlzott HT tartalmú étrend hogyan befolyásolja a HO enzimszisztémát és a gyulladásos folyamatokat. A posztmenopauzában lévő nők várható élettartamára hatással van a HO-1 koncentrációjának és aktivitásának csökkenése, valamint a TNF- α , IL-6 szint és az MPO enzimaktivitás szintjének emelkedése. A HT étrend hatására hasonló változásokat tapasztaltunk. Összességében megállapítható, hogy a 12 hetes önkéntes testmozgás javítja a lecsökkent HO értékeket és csillapítja a gyulladásos paramétereket, így a futás úgynevezett nem farmakológiai terápiának tekinthető.

6.TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Veszélka Médea, MTMT azonosító: 10053090

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Médea Veszélka*, Csaba Varga*, Krisztina Kupai, Denise Börzsei, Zoltán Deim, Renáta Szabó, Szilvia Török, Dániel Priksz, Rudolf Gesztelyi, Béla Juhász, Zsolt Radák, and Anikó Pósa.

The effects of exercise training and high triglyceride diet in an estrogen depleted rat model: the role of the heme oxygenase system and inflammatory processes in cardiovascular risk, Journal of Sports Science and Medicine, 2018

**megosztott elsőszerezőség*

IF: 1,99

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka A, **Veszélka M**, Gyöngyösi M, Radák Z, Ménesi R, Pávó I, Magyariné Berkó A, Varga C:

Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2, Oxid Med Cell Longev, 2015;2015:876805., doi: 10.1155/2015/876805.

IF: 4,593

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények kumulatív impakt faktora: 6,58

Egyéb közlemények:

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Berkó AM, **Veszélka M**, Szűcs G, Börzsei D, Gyöngyösi M, Pávó I, Deim Z, Szilvássy Z, Juhász B, Varga C:

Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat,

Oxid Med Cell Longev, 2017;2017:2176749. doi: 10.1155/2017/2176749

IF: 4,593

Al-awar Amin, Kupai Krisztina, **Veszélka Médea**, Szűcs Gergő, Attieh Zouhair, Murlasits Zsolt, Török Szilvia, Pósa Anikó, Varga Csaba

Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models

JOURNAL OF DIABETES RESEARCH 2016: Paper 9051426. 12 p. (2016)

IF: 2.717

Pósa A, Szabó R, Csonka A, **Veszélka M**, Magyariné Berkó A, Baráth Z, Ménesi R, Pávó I, Gyöngyösi M, László F, Kupai K, Varga C:

Endogenous estrogen-mediated heme oxygenase regulation in experimental menopause, *Oxid Med Cell Longev*, 2015;2015:429713., doi:

10.1155/2015/429713.

IF: 4,593

Kupai K, Szabó R, **Veszélka M**, Awar AA, Török S, Csonka A, Baráth Z, Pósa A, Varga C: ***Consequences of exercising on ischemia-reperfusion injury in***

type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts: role of the HO/NOS system.,

Diabetol Metab Syndr. 2015 Oct 6;7:85. doi: 10.1186/s13098-015-0080-x.

IF: 2.347,

Pósa A, Szabó R, Kupai K, Csonka A, Szalai Z, **Veszélka M**, Török S, Daruka L, Varga C: ***Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats,*** *Oxid Med Cell Longev*, 2015;2015:787063., doi: 10.1155/2015/787063.

IF: 4,593

Zita Szalai, Krisztina Kupai, **Médea Veszélka**, Anikó Pósa, Szilvia Török, Anikó Magyariné Berkó, Zoltán Baráth, Ferenc A László, Csaba Varga

Novel features of the rat model of inflammatory bowel disease based on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid - induced acute colitis

ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS 58:(2) pp. 127-132. (2014)

IF: 0.66

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények kumulatív impakt faktora:

12,193

Összesített impakt faktor: 18,776

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. habil. Pósa Anikó nyilatkozom, hogy a Jelölt, mint társszerző hozzájárulása a disszertációjában taglalt eredményekhez jelentős volt. Kijelentem, hogy a Jelölt által végzett kísérletek eredményét saját magam és a további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2018. 10. 15.

Dr. Pósa Anikó

Megosztott első szerző nyilatkozat

Alulírott Dr. habil. Varga Csaba nyilatkozom, hogy a Jelölt, a megosztott első szerzős cikkét felhasználhatja a PhD munkájához, további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2018. 10. 15.

Dr. Varga Csaba