

A rendszeres testmozgás hatása az agy öregedésére állatkísérletes modellekben

Doktori tézisek

Marosi Krisztina

Semmelweis Egyetem
Sporttudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyakas Csaba, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Székács Béla, egyetemi tanár, DSc
Dr. Szabolcs István, egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sipos Kornél, professor emeritus, CSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Osváth Péter, egyetemi docens, PhD

Dr. Pucskos József, egyetemi tanár, DSc

Dr. Sós Csaba, egyetemi docens, PhD

Budapest

2012

Bevezetés

Az agy öregedése során számos strukturális és fiziológiai változás megy végbe, melynek következtében különböző mértékű kognitív funkcióromlás tapasztalható időskorban. Ismert, hogy az öregedés során fellépő degeneratív változások progresszióját számos endogén és exogén faktor befolyásolja. Az exogén faktorok közül a rendszeres testmozgás, míg az endogén faktorok közül –hölgyek esetén- az ösztrogénpótló terápia játszhat kiemelkedő szerepet a prevencióban. Az ösztrogén számos pozitív neurobiológiai szereppel bír. Befolyásolja a neurotranszmissziót, trofikus hatással van a kolinerg rendszerre. Szerepet játszik a neurogenesisben, a sejt túlélésben valamint a szinaptogenezis indukálásában a hippocampusban. Emellett a hormon csökkenti az öregedő agyban az oxidatív stressz mértékét, így az ösztrogénpótlás több neurológiai betegségben preventív szereppel bírhat.

Azonban az ösztrogén terápia alkalmazása előnyös neurológiai hatásai ellenére a klinikumban nem rutinszerű, mivel az megnöveli a kardiovaszkuláris és egyes daganatos betegségek kockázatát.

A rendszeres testmozgás az irodalmi adatok alapján az ösztrogénhez hasonló neurológiai szereppel bír, ezért felmerülhet a kérdés, hogy a mozgásterápia kiegészítheti-e illetve helyettesítheti-e az ösztrogén terápiát menopauzában. A testmozgás az aktiválja az agyi eredetű növekedési faktort (BDNF), befolyásolja a neuro-, és szinaptogenezist. A hatásait feltehetőleg az ösztrogénnel azonos szignalizációs útvonalak (PKA/Akt/CREB és MAPK/CREB) aktivációján keresztül fejt ki. Azonban még egyetlen tanulmányban sem hasonlították össze az említett két faktor hatásait az agy öregedésére.

További kérdés lehet, hogy az öregedés során fellépő fokozott mértékű oxidatív stresszt a testmozgás hogyan befolyásolja a hippocampusban. Állatkísérletekben kimutatták, hogy a rendszeres aerob fizikai aktivitás az antioxidáns és repair mechanizmusok adaptációját, valamint a redox-szenzitív jelátvivő rendszerek aktivációját idézheti elő a neuronokban. Azonban a pontos hatásmechanizmus ismeretlen az agyban.

Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás állatmodellje fontos új információkkal szolgálhat a testmozgás idegrendszerre kifejtett hatásairól, mivel a szakirodalomban eddig nem alkalmaztak hasonló modellt. A krónikus, élethosszon át tartó mozgás idegrendszeri hatásai ismeretlenek.

Célkitűzések

A. Kísérlet: A hosszú-távú ösztadiol kezelés és a hosszú-távú, közepes intenzitású aerob testmozgás kognitív és neurobiológiai hatásai idősödő és idős nőstény patkányokban.

Célul tűztük ki tehát, hogy összehasonlítsuk a hosszú-távú ösztadiol és hosszú-távú fizikai aktivitás kognitív és neurobiológiai hatásait az életkor függvényében. A következő hipotéziseket fogalmaztam meg:

- a mozgástréning az ösztadiol kezeléshez hasonlóan javíthatja a memóriát, figyelmi képességet és a tanulást öregedő és időskorban egyaránt, mivel
- a testmozgás a neuronokban az ösztadiollal azonos olyan szignalizációs útvonalakat és fehérjéket aktiválhat, amelyek részt vesznek a tanulásban és a memóriaformálásban.
- az edzés az ösztadiolhoz hasonlóan segít fenntartani a neuronok redox és energiaegyensúlyát úgy, hogy mérsékli az oxidatív stresszt és támogatja az energiatermelő folyamatokat.

További célom volt, hogy megvizsgáljam, milyen változások következnek be a felsorolt kognitív és neurofiziológiai funkciókban, ha a két kezelést (mozgás és ösztadiol kezelést) együttesen alkalmazzuk.

B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.

Célul tűztem ki a rendszeres, élethosszon át tartó testmozgás kognitív és neurobiológiai hatásainak vizsgálatát idős hím patkányok hippocampusában.

Hipotézisem szerint az élethosszon át tartó fizikai aktivitás preventív szereppel bírhat az agy öregedése során; javíthatja a kognitív képességeket, és befolyásolhatja a neurotrofikus és neurogenetikus szignalizációs útvonalakat, a neuronok működésének energetikai hátterét biztosító faktorokat, a kolinerg transzmissziót és a redox egyensúlyt.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

A. Kísérlet: A hosszú-távú ösztadiol kezelés és a hosszú-távú, közepes intenzitású aerob testmozgás kognitív és neurobiológiai hatásai idősödő és idős nőstény patkányokban.

A kísérlet során 32 db 12 hónapos középkorú, és 32 db 24 hónapos idős nőstény Wistar patkányokkal dolgoztam. A 32 db 12 hónapos állatot random módon 4 kísérleti csoportra osztottam. A 32 db idős állatot is random módon 4 kísérleti csoportra osztottam. A következő csoportokat hoztuk létre a két életkoron belül: 1. kontroll állatcsoport (C), melyek 0,1 ml/kg szezámolajat kaptak szubkután injektálva hetente kétszer. 2. edző állatcsoport (EX), melyek 0,1 ml/ kg szezámolajat kaptak szubkután injektálva hetente kétszer, valamint 18 m/min sebességgel napi 30 percet futottak futópádon 3. ösztadiol kezelésben részesült állat csoport (E2), mely hetente 30 µg/ kg 17- β ösztadiolt kapott szezámolajba feloldva, szubkután injektálva. Az ösztadiolt hetente 2 adagra elosztva kapták az állatok. 4. ösztadiol illetve edzés együttes alkalmazása (E2+EX). Az állatok a fent leírt módon ösztadiolt kaptak és futópádon futottak. A kognitív képességeket 15 hét kezelést követően teszteltem le.

B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.

A B. kísérlet során 16 db hím Wistar patkányokkal dolgoztam, melyeket random módon 8-8 fős csoportokra osztottam: 1. kontroll állat csoport (C): ketrecben tartott, inaktív állatok. 2. edző állat csoport (EX), melyek 3 hónapos koruktól 24 hónapos korukig 18 m/min sebességgel hetente háromszor 60 percet futottak futópádon.

Kognitív tesztek

A figyelmi funkcióra épülő tárgy-felismerést ismert környezetben, nyílt porondon vizsgáltam. Az állatok rövidtávú memóriájáról, az aktivitásáról a spontán alternáció teszt adott információt. A patkányok térbeli tanulási képességét Morris vízi útvesztő tesztben vizsgáltam.

Plazma hormonszint meghatározások

A patkányoktól egyenként 2 ml vért vettem a dekapitálás során. A vérmintákhoz 50 µl heparint adtam. A mintákat 2 percig 153000 g fordulatszámon centrifugáltam, az ösztradiol és kortikoszteron mennyiségét a vérplazmában ELISA kittel határoztam meg a gyártó utasításai szerint.

Western blot

A fagyasztott szövetet homogenizáltam enzim gátlókat tartalmazó lízis puffer oldatban. A szövet fehérjetartalmát Bradford protein teszttel határoztam meg. Minden mintából azonos (20 µg) protein mennyiséget választottam el 8-15% (v/v) poliakrilamid gélen SDS poliakrilamid gélelektroforézissel. A fehérje sávokat PVDF nitrocellulóz membránra transzferáltam. A membránokat 5% nem zsíros tejporthoz tartalmazó TBS-Tweenben blokkoltam szobahőmérsékleten 2 órán át, majd elsődleges ellenanyagban inkubáltam 4°C-on egy éjszakán keresztül. TBST- ben történő mosást követően blokkoló oldatban hígított másodlagos ellenanyagban inkubáltam a membránokat, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Kemilumineszcenciás szubsztrát segítségével X-ray filmen hívtam elő a fehérje bandeket, melyek intenzitását Image J szoftverrel kvantifikáltam. Kontrollként β-aktint használtam.

Reaktív oxigén gyökök meghatározása

A reaktív oxigén gyökök meghatározására fluorometriás módszert használtunk. 96 lyukú platen egyenként 8 µl frissen előállított hippokampusz homogenátumot, 152 µM töménységű kálium foszfát puffert (pH 7.4) és 40 µl H₂DCF-DA törzsoldatot adtam. Az oxidált H₂DCF-DA által kibocsátott fluoreszcens szignált fluoriméterrel mértem 0, 1 és 30 perc elteltével.

A karbonilált fehérjék meghatározása

A karbonilált fehérjék mennyiségét Oxyblot kittel határoztam meg. A fehérjéket 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-nal kezeltem 15 percig, majd szobahőmérsékleten inkubáltam az oldatot neutralizáló pufferben. Az átalakított fehérjéket 10% SDS-PAGE gélen futattam meg, majd PVDF membránra transzferáltam át az elektrtoforezis során molekulatömeg szerint elválasztott fehérjéket. A nem-specifikus kötőhelyeket 5%-os zsírmentes tejporthoz tartalmazó

Dulbecco's PBS-T-vel blokkoltam 4°C-on 3 órán keresztül. Ezt követően a membránt anti-DNP elsődleges ellenanyaggal inkubáltam. Ezt követve a membránt 3 alkalommal PBST-ben mostam, majd HRP-másodlagos ellenanyaggal inkubáltam szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Három mosást követően az immunokomplexeket ECL plus reagens felhasználásával röntgenfilmen vizualizáltam. Ezt követően X-ray filmen detektáltam a fehérje bandeket, melyet image J szoftverrel kvantifikáltam. Kontrollként β -aktint használtam.

Immunhisztokémia

A fél patkány hippokampuszokat 4 %-os, foszfát-pufferelt paraformaldehid-oldatban kerültek a fixáló oldatba. A fixált agyak dehidratációjára ezután 30%-os szacharóz oldatban került sor +4 °C-on. Folyékony nitrogénben történő fagyasztást követően a hippokampuszokból mikrotómmal 20 μ m vastag metszetek készültek. A metszetek mosása PBS-ben (pH 7.4) történt. Az endogén peroxidázok aktivitását 20 perces, 1 %-os H₂O₂-ben történő inkubálás blokkolta. 3X20 perc PBS mosás után a nem-specifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5 %-os normál szérum oldat blokkolta. Az inkubáció a primer ellenanyag oldatában 3-5 éjszakán keresztül történt, +4 °C-on. Ezután újból 5X20 perc PBS mosás következett, majd a szekunder ellenanyagban való 3-4 órási inkubálás szobahőmérsékleten. A 30 percen át tartó ABC reakciót PBS mosás követte, majd a DAB reakció.

Statisztikai analízis

Az A.kísérlet során a kezelések hatásait különböző életkorokban két-irányú ANOVA-val értékeltem. Ezután csoportok összehasonlítását Fisher-féle post hoc tesztet végeztem. A $p < 0,05$ értéket fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak. Az egész életen át tartó edzés (B) hatásainak vizsgálata esetében az eredmények kiértékeléséhez két mintás t-próbát használtam.

Eredmények

A. Kísérlet: A hosszú-távú ösztadiol kezelés és a hosszú-távú, közepes intenzitású aerob testmozgás kognitív és neurobiológiai hatásai idősödő és idős nőstény patkányokban.

Kognitív tesztek eredményei

Új tárgy felismerési tesztben, az edzés (EX), ösztadiol kezelés (E2) és a kombinált kezelések is (E2+EX) javították az új-tárgy felismerést 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az E2 és E2+EX csoportok teljesítettek jobban a tesztben az azonos korú kontrollokhoz képest. Spontán alternáció tesztben az ösztrogén (E2) és kombinált kezelések (E2+EX) növelték az alternációk számát 15 hónapos és 27 hónapos korban egyaránt. Az edzés 15 hónapos állatok esetén javította a munkamemóriát. Morris vízi útvesztőben az ösztrogént kapott csoport (E2) gyorsabban találta meg a víz alatt elrejtett platformot a negyedik, ötödik, hatodik és hetedik napokon a kontroll csoporthoz képest.

Plazma hormonszintek

Az ösztadiol kezelésben részesült (E2, E2+EX) 15 hónapos és 27 hónapos csoportok plazma ösztadiol szintje magasabb volt az azonos korú kontroll és edző csoportokhoz képest. A plazma kortikoszteron mennyisége nem változott szignifikánsan a kezelések hatására egyik életkorban sem.

Trofikus hatások a hippocampusban

A 15 hónapos állatoknál az edzés (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelések hatására növekedett volt az ösztrogén receptor alfa (ER α) mennyisége. 27 hónapos állatok esetén az E2 és E2+EX kezelések emelték meg a receptor mennyiségét. A BDNF fehérje tekintetében hasonló eredményeket tapasztaltam. 15 hónapos korban az EX, E2 és E2+EX csoportokban magasabb volt a BDNF szintje a kontrollokhoz képest. 27 hónapos korban az ösztrogén és kombinált kezelések a neurotrofin mennyiségének növekedését eredményezték.

Intracelluláris szignálútvonalak

A szignálmolekulák (MAPK, Akt, AMPK) és a CREB aktivációját foszforilált formájuk mérésével vizsgáltuk. 15 hónapos korban a MAPK, Akt és a CREB foszforilációja növekedett edzés, ösztrogén és kombinált kezelések hatására a kontroll csoporthoz képest. A p-AMPK mennyisége nőtt edzés (EX) hatására 15 hónapos korban. 27 hónapos korban a sem a p-Akt, sem

a p-AMPK mennyisége nem változott. A MAPK és CREB foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az E2 és E2+EX csoportokban az azonos korú kontrollokhoz képest 27 hónapos korban.

Szinaptikus markerek

A szinaptikus markerek expresszióját is befolyásolták a kezelések mindkét életkorban. A szinaptofizin mennyisége nőtt a 15 hónapos állatok hippocampusában az EX, E2 és E2+EX csoportokban. A szinapszin foszforilációja is magasabb volt az edző, ösztrogén és kombinált kezelésben részesült állatokban a kontroll csoporthoz képest. 27 hónapos korban az ösztrogén illetve a kombinált kezelés emelte meg a szinaptofizin mennyiségét. A p-szinapszin fehérje szintje az E2 csoportban volt nagyobb a kontroll csoporttal összehasonlítva.

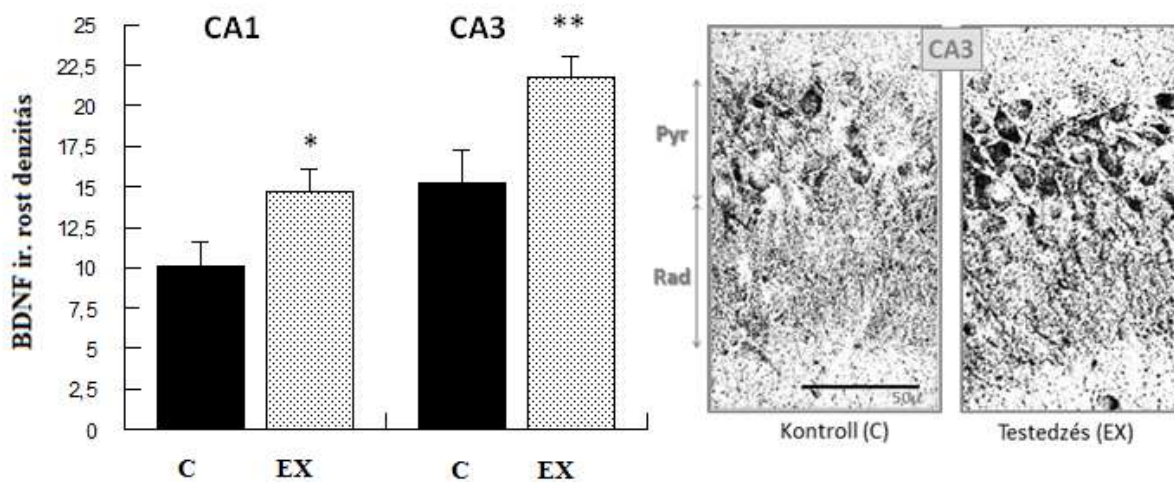
Redox egyensúly szabályozása

A reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyisége alacsonyabb volt mind 15 mind 27 hónapos korban az ösztrogén (E2) és kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban. 15 hónapos edző állatokban a szabadgyök mennyiség szignifikánsan alacsonyabb volt az azonos korú kontroll csoporthoz képest. 15 hónapos korban alacsonyabb volt a fehérje karbonilok mennyisége az edző (EX), ösztrogént kapott (E2) és kombinált kezelésben (E2+EX) részesült csoportokban, mint az azonos korú kontroll állatcsoportban. 27 hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A PGC1- α mennyisége nőtt a 15 hónapos állatok hippocampusában az EX, E2 és csoportokban. 27 hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A szuperoxid diszmutáz-1 (SOD-1) mennyisége 15 hónapos életkorban nőtt a futó és az E2 kezelésben részesült csoportokban. Az ösztrogénkezelés megnövelte a SOD-2 mennyiségét a kontroll csoporthoz képest. A glutation peroxidáz (GPx) fehérje expressziója 15 hónapos korban változott meg a kezelések hatására. Az EX kezelés megnövelte a GPx mennyiségét a kontroll csoporthoz képest.

B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.

Az élethosszig tartó testmozgás javította a memóriát új tárgy felismerési tesztben. Morris vízi útvesztőben az edző csoport jobban teljesített a kísérlet 3 napján, mint a kontroll csoport.

A BDNF ir. rostok denzitása szignifikánsan nőtt a testmozgás hatására a hippocampusz CA1-es és CA3-as régióiban. A doublecortin mennyisége nőtt a hippocampusz molekuláris rétegében. A Glut-1 ir. rostok denzitása szignifikánsan magasabb volt az edzett állatok hippocampuszának GyrusDentatus (DG) régiójában. Továbbá, a mozgás növelte a CA-1-es és a DG régiókban a ChATir. rostok mennyiségét. Szignifikáns növekedést mértem az AMPK és az Akt fehérjék foszforilációjában a futó csoportban a kontroll csoporthoz képest. Szignifikáns növekedést mutattam ki az edző állatoknál szinaptofizin fehérje mennyiségében a kontroll csoporthoz képest.



A BDNF immunoreaktiv rostok denzitása a hippocampusz CA1 és CA3-as régiójában

Az élethosszig tartó testmozgás megnövelte a BDNF ir. rostok mennyiségét mind a CA1, mind a CA3 régiókban a hippocampuszban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. azonos korú kontroll csoport.

Következtetések

Munkám során kimutattam, hogy a hosszú távú testmozgás potenciális nem-farmakológias prevenciós módszer lehet idősödő korban, mivel a menopauza kezdeti szakaszában képes javítani a kognitív képességeket és olyan molekuláris változásokat indukálni a hippocampusban, melyek hozzájárulnak az agy egészséges öregedéséhez. Idősödő korban a testmozgás az ösztrogénnel azonos szignálút vonalakat aktivált a neuronokban és növelte a szinaptikus molekulák mennyiségét is. Emellett a rendszeres, közepes intenzitáson végzett testmozgás csökkentette a szabadgyökök és az oxidatív károsodás mértékét is az agyban, mivel olyan szignálút vonalakat aktivált, melyek részt vesznek az antioxidáns enzimek expressziójának szabályozásában. Idős korban az általam alkalmazott mozgás tréning hatása nem volt hasonló az ösztrogén terápia hatásához. Azonban nem zárható ki, hogy optimális tréning kondíciók mellett idős korban is pozitív változások érhetőek el mozgás terápiával.

Hím állatok esetén az élethosszig tartó rendszeres testmozgásnak jelentős hatásai voltak az idegrendszerre. A mozgás neurotrofikus hatású volt, befolyásolta a neuronok anyagcseréjét szabályozó szignálmolekulákat is a hippocampusban. Az idős hím állatok kognitív funkciói javultak a testmozgás hatására. Azonban sem a nőstény állatoknál sem a hím állatokban nem sikerült idős korban kimutatni a redox változásokat mozgás hatására. A redox egyensúlyt szabályozó faktorok expressziója feltehetőleg olyan mértékben megváltozik öregedéskor, hogy az mozgással nem kompenzálható az adataink alapján.

Összefoglalva a rendszeres fizikai aktivitás pozitív hatással van az agy öregedésére, de a különböző életkorokban és a nemeket tekintve is más és más edzésmódszer szükséges a kívánt eredmények eléréséhez.

Publikációk

A tézis témájához kapcsolódó közlemények

Marosi K, Felszeghy K, Mehra RD, Radák Z, Nyakas C. Are then europrotective effects of estradiol and physical exercisecomparable during ageing in female rats? Biogerontology. 2012 Jun 22. PMID: 22722983

IF:3.339

Marosi K., Bori Z., Hart N., Sárga L., Koltai E., Radák Z., Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of ageing rats. Neuroscience. 2012 Sep 12. pii: S0306-4522(12)00902-5.PMID:22982624

IF:3.380

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények

Marosi K, Horváth E, Nagy P, Köles B, Nagy ZB. Review of geneticresearch and testing in sport. Orv Hetil. 2012 Aug 12;153(32):1247-55. Hungarian.

Marosi K, AgotaA, Végh V, Joó JG, Langmár Z, Kriszbacher I, Nagy ZB. The role of homocysteine and methylenetetrahydrofolatereductase, methioninesynthase, methioninesynthasereductase polymorphisms in the development of cardiovascular diseases and hypertension. Orv Hetil. 2012 Mar 25;153(12):445-53.Review. Hungarian. PMID:22411217

Börzsönyi B, Demendi C, Pajor A, Rigó J Jr, **Marosi K**, Agota A, Nagy ZB, Joó JG. Geneexpression patterns of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzyme in human placenta from intrauterine growth restriction: the role of impaired feto- maternal glucocorticoid metabolism.Eur J Obstet Gynecol ReprodBiol. 2012 Mar;161(1):12-7. Epub 2012 Jan 11. PMID:22239940

IF:1,974

Hornyák I, **Marosi K**, Kiss L, Gróf P, Lacza Z. Increased stability of S-nitrosothiolsolutions via pH modulations. Free Radic Res. 2012 Feb;46(2):214-25. Epub2012 Jan 12.

PMID:22149535

IF:2,878