

A rendszeres fizikai aktivitás és a SIRT aktiválás hatása a különböző genetikai háttérrel rendelkező patkányok fiziológiai teljesítményére

Doktori tézisek

Hart Nikolett

Semmelweis Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, D.Sc

Hivatalos bírálók: Dr. Bácsi Attila, egyetemi docens, Ph.D
Dr. Ferdinándy Péter, egyetemi tanár, D.Sc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr.Sipos Kornél, professzor emeritus, C.Sc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr.Osváth Péter, egyetemi docens, Ph.D
Dr. Pucskos József, egyetemi tanár, D.Sc
Dr. Pavlik Gábor, professzor emeritus, D.Sc

Budapest
2012

Bevezetés:

Lauren Koch és Steven Britton 1996-ban egy heterogén NIH patkány csoportból (n=186) futási képességeik alapján vett szelekció alapján kitenyésztett két genetikailag különböző csoportot, ahol az egyik csoport magas aerob kapacitással rendelkezik és nagy futási teljesítménnyel bír (High Running Capacity = HRC/HCR), míg a másik csoport alacsony aerob kapacitású és gyenge futási képességekkel rendelkezik (Low Running Capacity = LRC/LCR). E két csoporton végzett vizsgálatok alapján Britton munkacsoportja 2001-ben a *Science* magazinban írta le azt a megfigyelésüket, hogy az LRC állatok már a 6.generációban sokkal nagyobb testsúllyal rendelkeztek, mint a HRC csoportba tartozó társaik. Ezen felül, futási képességeiket tekintve is jelentősen – mintegy 171%-kal – alul maradtak a magas aerob kapacitású állatokkal szemben. Szintén ezzel a módszerrel kitenyésztett állatok 11.generációjával végzett kutatások alapján írták le, hogy azon szülők leszármazottai, akik csak keveset voltak képesek futni (LRC) szív-keringési és mitokondriális problémákat halmoztak fel, megjelentek rajtuk a metabolikus szindróma jelei, míg a magas aerob kapacitással rendelkező állatok esetében (HRC) nem jelentkeztek ezek a tünetek. Továbbá kimutatták, hogy az LRC állatoknál nem megfelelő az inzulinérzékenység, centrális elhízás jellemezi őket, valamint kimutathatóak a dyslipidemia tünetei, hajlamuk van a metabolikus szindróma kialakulására.

Az aerob kapacitás fontos, meghatározó tényezője a vázizomzat felépítése, a bennük található - az oxidatív metabolizmusért felelős - enzimek mennyisége és aktivitása, illetve a mitokondriumok száma, és azok megfelelő működése, minőség-kontrollja. Így a maximális oxigénfelvevő képességnek, valamint a szervezet antioxidáns rendszerének az egyik limitáló tényezője lehet a hibásan működő mitokondriális biogenezis. Feltételeztük, hogy a rendszeres fizikai aktivitásra kialakuló adaptív válaszok hátterében egy részről az AMP-aktivált protein kináz (AMPK), peroxisome proliferator-aktivált receptor- γ koaktivátor 1 α (PGC-1 α), nukleáris légzési faktor 1 (NRF1), mitokondriális transzkripciós faktor A (TFAM), és a sirtuinok aktivitásváltozása áll.

/A SIRT1 fehérje fontos szabályozó szerepet játszik az anyagcsere folyamatokban, kontrolálva olyan transzkripciós faktorokat, mint a PGC-1 α , FOXO1 és a p53. Ezért a

SIRT1 aktivátorként is ismert rezveratrolnak is potenciális hatása lehet az aerob kapacitásra/.

Másrésről meghatározó tényező lehet a mitokondriális minőség-kontroll, – a mitokondriális fizió és fúzió megfelelő egyensúlya -, és a folyamatban szintén részt vevő HSP78, és Lon proteáz mennyisége és működése is.

Ezen feltételezések nyomán jelen kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogyan alakul a mitokondriális adaptív válasz rendszeres fizikai aktivitás, valamint rezveratrol adagolás hatására a különböző genetikai háttérrel bíró patkányok váz-, illetve szívizmában.

Célkitűzések:

A doktori értekezésemben tárgyalt vizsgálatok célja annak feltérképezése volt, hogy a rendszeres fizikai aktivitással, valamint rezveratrol adagolásával hogyan befolyásolható a mitokondriális biogenezis, valamint az aerob teljesítmény, különböző genetikai háttérrel rendelkező állatokon.

Vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy ezen életmódbeli változások, hogyan befolyásolják a mitokondriális biogenezist vázizom-, illetve szívizom szövet estén. Továbbá hogy ezen változások kapcsán hogyan befolyásolható az LCR állatok kedvezőtlen genetikai háttéréből adódó, különböző betegségek kialakulására való hajlama, és a HCR állatok aerob teljesítménye.

A. kísérlet: A rendszeres fizikai aktivitás és a rezveratrol adagolás hatása a különböző genetikai háttérrel rendelkező patkány csoportok mitokondriális biogenezisére vázizom esetén.

Ebben a témában a következő hipotéziseket fogalmaztam meg:

- A rendszeres fizikai aktivitás és a rezveratrol adagolás növeli az állatok futási teljesítményét és aerob kapacitását.
- A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására fokozódik a mitokondriális biogenezis izomszövetben (a PGC1 α - SIRT1 útvonal aktiválása révén).
- A kezelések kedvezően befolyásolják az izomszövet mitokondriális minőség-kontrollját biztosító enzimek működését.
- A testedzés és a rezveratrol kezelés képes kompenzálni/helyreállítani az LCR állatok genetikai deficitjéből adódó mitokondriális problémákat, ez által javítják életminőségüket, csökkenti betegségre-*való* hajlamukat.

B. kísérlet: A rendszeres fizikai aktivitás és a rezveratrol adagolás hatása a különböző genetikai háttérrel rendelkező patkány csoportok mitokondriális biogenezisére szívizom esetén.

Ez esetben a következő hipotéziseket fogalmaztam meg:

- A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására javuló mitokondriális funkciók várhatóak a “inaktív” genetikával bíró egyedek szívmájában.

- Edzéshatásra, és rezveratrol adagolásra fokozott AMPK és PGC1 α aktivitás várható szívmáj esetén is mely, egyéb transzkripciós faktorok átírását serkentve fokozza a szív mitokondriális biogenezisét.

- A kezelések javítják, illetve kompenzálják a genetikai hátrányokból adódó cardio-vasculáris betegségek kialakulásának kockázatát.

Anyagok és módszerek:

Állatok és edzés protokoll

186 fős homogén alap populációból származó, futási képességeik alapján genetikailag szelektált hím patkánycsoport 22. generációjával dolgoztunk (n=48). A mesterséges szelektálás protokollját Koch és Britton írta le és tőlük kaptuk az állatokat is (Koch és Britton 2001). Az így kitenyésztett inaktív (LCR) és aktív (HCR) genetikával rendelkező csoportokból a vizsgálat kezdetén további 4-4 csoportot különítettünk el, a kezelés sajátosságai alapján, következőképpen: 1. Kontroll alacsony futó kapacitású (CL), 2. Edzett alacsony futó kapacitású (TrL), 3. Kontroll rezveratrol táplált alacsony futó kapacitású (RsvL), 4. Edzett rezveratrol táplált alacsony futó kapacitású (TrRsvL), 5. Kontroll magas futó kapacitású (CH), 6. Edzett magas futó kapacitású (TrH), 7. Kontroll rezveratrol táplált magas futó kapacitású (RsvH), 8. Edzett rezveratrol táplált magas futó kapacitású (TrRsvH).

Az edzésben résztvevő állatok a második héttől kezdve egy két hetes szoktatási időszakban adaptálódtak az edzés emelkedő intenzitásához. A két hét leteltével megmértük az állatok aktuális maximális aerob kapacitását. A maximális oxigén felvétel (VO₂max.) mérése egy speciálisan patkányok részére kifejlesztett, zárt rendszerű spiroergométerrel történt. Az állat futószalagra való helyezését követően, 10 perces megnyugvási idő után mért VO₂ értéket tekintettük nyugalmi VO₂ minimumnak. A 10. perctől indítottuk a futószalagot 10m/perc-es sebességről, mely értéket 3 percenként 5m/perccel emeltük, egészen az állat kifulladásáig. Az állat relatív aerob kapacitását a kifulladás előtti idő pillanatban mért maximális VO₂ értékkel azonosítottuk. A negyedik héten mért maximális aerob kapacitás eredményük alapján határoztuk meg a további 12 hetes edzés program intenzitását. Az edző állatok 12 héten keresztül, heti 5 napot, napi 1 órát futottak a maximális aerob kapacitásuk 60%-án.

Kapaszkodási teszt

Az állatok mellső lábainak erőfejlődését mérő tesztet hetente végeztük mindig azonos napon, az edzést megelőző reggeli órákban. A teszthez egy megközelítőleg 40cm magasságú „kapaszkodó-állványt” használtunk, ami alá szivacsos felületű platformot helyeztünk, az állatok biztonságosabb leérkezése érdekében. A mérés során úgy helyeztük a patkányokat az állványra, hogy csak két mellső lábukkal tarthatták magukat az állvány középső, vízszintes rúdján. Kapaszkodási idejüket stopperórával mértük, majd rögzítettük.

Rezveratrol adagolás

A rezveratrol kezelésre sorolt állatoknak megérkezésüktől kezdve minden másnap szájon át adagoltuk az 100 mg/testtömeg kg-ra számolt rezveratrol mennyiséget egészen a 4 hónapos kísérlet végéig.

Hetente ellenőriztük az állatok testsúlyváltozását, valamint vizsgáltuk motoros-képességeiket kapaszkodási-, illetve egyensúlyozási tesztekkel.

Az edzés protokoll befejezését követően az állatokat dekapitáltuk, majd a gastrocnemius izmot és a szívet eltávolítottuk az állatokból. A kivett mintákat azonnal folyékony nitrogénbe tettük, majd a feldolgozás megkezdéséig -80 °C-on tároltuk.

Western blot analízis

A fehérjék mennyiségének meghatározására Western Blot analízist használtam. A méréshez szükséges mintákat NP40-es lízis-pufferben homogenizáltam, majd az összfehérje koncentráció meghatározására a Bradford-módszert alkalmaztam, a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad #600-005) használatáva.

8-12% v/v polyacrylamide SDS-PAGE gélen elektroforézissel futattam megközelítőleg 50ug proteint, amit a továbbiakban PVDF membránra elektrotranszferáltam. Ezt követően blokkoltam a membránt 5%-os tejporos 1xTBST-ben, vagy 1%-os BSA-s 1xTBST-ben, majd „over night” inkubáltam 4°C-on az elsődleges antitesttel. Ezt követően 3x10 percet mostam a membránt 1xTBST-vel, majd HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel (nyúl/kecske) inkubáltam, egy órán keresztül, 4°C-on. Az újabb 3x10 perces mosást követően a membránt 5 percig reagens szubsztráttal kezeltem. A fehérje koncentrációt

szemléltető denzitási jeleket röntgen filmen hívtam elő. A band-eket ImageJ szoftver használatával quantifikáltam, és tubulin housekeeping fehérjéhez normalizáltam.

Szabadgyök koncentráció meghatározása

A teljes szabadgyök mennyiség meghatározására egy módosított festési módszert használtam, ahol festékanyagként dichloridihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) -ot használtam. (Radák és mtsa.2004). A mérésben használt H2DCFDA festékanyagot (Invitrogen-Molecular Probes #D399) ethanolban feloldva 12,5 mM-os koncentrációra hígítva -80°C-on, sötétben tároltam a használatig. A mérés kezdetén kálium-foszfát pufferrel hígítottam 125uM-os koncentrációra a tárolt törzsoldatot. A fluoreszcens reakcióban 96 lyukú, fekete plate-re vittem fel 152ul/lyuk kálium foszfát puffert (pH 7.4), melyhez 8ul hígított izomszövet homogenátot, és 40ul 125uM-os H2DCFDA festéket adtam. Így a 200ul ösztérfogat végső koncentrációja 25uM-os lett.

A fluoreszcens intenzitásváltozást 30 percen keresztül 5 percenként regisztráltam 485 nm-es excitációs-, valamint 538 nm-es emissziós hullámhossz használatával (Fluoroskan Ascent FL).

SIRT1 aktivitás mérés

A nukleáris extraktum SIRT1 deacetyláz aktivitásának mérésére Cyclex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kitet (Cyclex,CY-1151) használtam a mellékelt protokoll alapján. 10ul gastrocnemius izom extraktumot 40ul reakció mix /50mM Tris-HCl (pH 8.8), 4mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 0,25mAU/ml Lysyl endpeptidase, 1uM Trichostatin A, 20uM Fluoro- Substrate peptid, 200uM NAD⁺/ hozzáadásával, mikroplaten összepipettáztam. Ezt követően a mintákat 10 percig, szobahőn inkubáltam. A fluoreszcens intenzitás-változást 10 percenként mértem két órán keresztül 355nm excitációs-, illetve 460nm emissziós hullámhosszon. Az így kapott eredményt a minták fehérje tartalmához normalizáltam.

Karbonilált fehérjék mennyiségi mérése

Az oxidált fehérjék mennyiségi változásának meghatározásához Oxyblot Kittet (Chemicon/Millipore) használtam, a gyári leírásnak megfelelően. A szövetmintákat 4-dinitrophenylhydrazine-nal (DNPH) történő 15 perces kezelést követően, szobahőmérsékleten inkubáltam neutralizáló puffer hozzáadásával. Az ily módon átalakított fehérjéket 10%-os SDS-PAGE-gélen futtattam, majd PVDF membránra transzferáltam. A membránt 5% zsírtmentes tejport tartalmazó Dulbecco-PBS-T-ben (PBS+0,5% Tween 20) blokkoltam 3,5 órán át, majd DNP-ellenes antitesttel inkubáltam egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezt követően háromszor 10 perces időtartamokat mostam a membránt 1x PBST-ben, majd 1 órán át szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitesttel kezeltem. Az immun komplexet kemilumineszcens szubsztrát hozzáadásával röntgenfilmen való előhívással jelenítettem meg.

mtDNS szeparálása és mennyiségi mérése

A mitokondriális DNS szeparálását Q-BIO gene Fast DNA kittel /# 6540-400/ végeztem, a kitben szereplő 3-as „Lysis Matrix Comb.” felhasználásával, a leírások alapján. 100 mg kiindulási izomszövet mennyiséghez adtam 1ml „Sample – Specific Cell Lysis Solution”-t és a „Lysing Matrix”-ot, majd FAST PREP géppel homogenizáltam a mintát. Ezt követően centrifugáltam a homogenátumot (14000g, 5perc), és a felülúszóval dolgoztam tovább. Az elkülönített felülúszót „Bindig Matrix” hozzáadásával szobahőmérsékleten inkubáltam, majd egy fugálást követően csak a pelletet használtam. Szuszpendáltam „SEWS-M” folyadékban, és többszöri szűrési lépést követően az utolsó szűrésnél DEPC-es vizet használva nyertem ki a mtDNS-t.

A továbbiakban a mintákat egységesre hígítottam, majd kvantitatív PCR használatával mértem meg a mtDNS relatív expresszióját, amit a genomiális DNS-hez normalizálva értékeltem ki.

Statisztikai analízis

A statisztikailag szignifikáns különbségeket normalitás vizsgálatot követően Statisztika 8.0 programmal vizsgáltam. Mivel a változók jelentős része nem mutatott normál eloszlást, így az összes változóm elemzésénél nem paraméteres, Kruskal-Wallis ANOVA-t használtam. Ezt követően post-hoc analízist végeztem, melynek alapja a 2 mintás t-próba nem paraméteres vizsgálata (Mann-Whitney próba). Ahol a p-érték kisebb volt, mint 0.05, szignifikáns különbségként tüntettem fel az ábrákon.

Eredmények:

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja egy 12 hetes futószalagos edzésprogram, és/vagy a rezveratrol adagolás az eltérő genetikával bíró patkányok fiziológias paramétereit. Az edzés hatás mindkét csoport esetében jelentősen növelte a futási teljesítményt, ezzel szemben a rezveratrol önmagában nem volt egyértelműen hatásos az aerob teljesítmény befolyásolásában. A kapaszkodási teljesítmény esetében a rezveratrol a HCR állatoknál pozitív hatást gyakorolt, míg az LCR állatoknál nem volt megfigyelhető változás. Az állatok gastrocnemius izmát feldolgozva 15, a mitokondriális biogenezis szempontjából meghatározó faktort, illetve azok kezelésre történő változásait vizsgáltuk. Rezveratrol adagolás hatására az AMPK, SIRT1, és a TFAM nőtt a HCR-, ellenben csökkent az LCR állatok esetében. A mitokondriális fizíós-, illetve fúziós fehérjék szintje alapvetően jóval alacsonyabb volt az LCR állatok esetében, de az edzés és a rezveratrol együttes hatására szintjük megemelkedett, és elérte a HCR állatok esetében mért szintet. Hasonló eredményt tapasztaltunk a mtDNS mennyiségi összehasonlítása során is.

Szívizom esetében vizsgálva a mitokondriális biogenezis faktorait hasonló megfigyeléseket tehattunk, bár kevesebb faktor esetében jött létre szignifikáns változás a 12 hetes kezelés hatására. Edzéshatásra a Fis1, Mfn1 fehérjék mennyisége emelkedett mindkét állat csoport esetében, míg HCR állatoknál az SDHA szintje is jelentősen nőtt. Ezzel szemben az AMPK aktivitás csökkent az LCR állatoknál edzéshatásra. A rezveratrol adagolásnak jótékony hatása nem volt kifejezett, bár HCR állatoknál növelte az SDHA mennyiségét, ellenben az LCR csoport esetén csökkentette a TFAM mennyiségét. A két kezelés együttes hatása a HCR állatok esetében volt megfigyelhető a PGC1 α , valamint az AMPK aktivitás növelésében.

Összességében úgy tűnik, hogy míg az edzéshatás mindkét genetika esetében jótékony változásokat eredményez, addig a rezveratrol hatása erőteljesen különbözik az eltérő genetikával bíró csoportoknál.

Következtetések:

Vázizom esetében az edzéshatás jótékonyan befolyásolja mindkét genetikával bíró állatcsoport aerob teljesítményét, és futási képességeit, míg a rezveratrol hatás csak a HCR állatok esetében bizonyult hatékonynak ebből a szempontból. Az edzéshatás az AMPK aktivitást növelte a HCR állatoknál, ellenben csökkentette az LCR állatoknál, ez a rendellenes válasz jelezheti az LCR állatokra jellemző metabolikus rendellenességek kialakulásának egyik metabolikus deficitjét. A SIRT1 aktivitás változása, és a PGC1 α fehérje tartalom változásának mintázata követi az AMPK aktivitását. Azon csoportoknál, ahol emelkedett az AMPK aktivitás, ott nőtt a SIRT1 deacetyláz aktivitás is, melyet jól reprezentál az adott csoportnál létrejövő acetilált lizin, illetve carbonilált fehérje mennyiségének ellentétes irányú változása. A mitokondriális biogenezis fő koordinátora - a PGC1 α -, és az NRF1 bár nem mutatott különösebb változást a kezelések hatására, mégis a mitokondriális transzkripciós faktor A (mtTFA) mindkét genetikával bíró csoportnál szignifikáns emelkedést mutatott a két kezelés együttes hatására. Az mtTFA mintázatát követi a mitokondriális biogenezis mértékét reprezentáló mtDNS, valamint az SDHA mennyisége is, mi szerint a leghatékonyabbnak a két kezelés együttes hatása bizonyult mindkét csoportnál. A mitokondriális minőség kontroll szempontjából fontos fizios és fúziós fehérjék, valamint HSP78 nagy mértékű növekedése a kezelések hatására LCR állatoknál a javuló mitokondriális funkciókat jelzi, míg a HCR állatoknál alapvetően jól működő szabályozáson már nem változtatott egyik kezelés sem. A zsír metabolizmus és az izomrost differenciálódás szempontjából meghatározó SIRT4 és FOXO1 változása is a „low” állatoknál mutatott kedvező változást mindkét kezelés hatására, míg a „high” állatok jó értékeit már kevésbé befolyásolták a kezelések. Szívizom esetében a mért faktorok kevésbé mutattak látványos változásokat a kezelések hatására, jellemzően a mitokondriális minőség-kontrollért felelős Fis1-Mfn1 fehérjék mennyiségében volt növekedés megfigyelhető mindkét állatcsoportnál. Valamint az AMPK aktivitás esetében itt is hasonlóan negatív változás volt tapasztalható az LCR állatok esetében, mint a vázizom eredményeinél. Edzéshatásra általánosságban pozitív változások voltak tapasztalhatóak, míg rezveratrol hatásra a változások genetika függő különbséget mutatott.

Publikációk:

A tézis témájához kapcsolódó közlemények:

Hart N, Sarga L, Csende Z, Koltai E, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Kouretas D, Wessner B, Radak Z. (2013) Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. *Food Chem Toxicol*. [Epub ahead of print]

IF: 2.999

Koltai E, **Hart N**, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ, Radak Z. (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 303: R127-34.

IF: 3.336

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények:

Radak Z, **Hart N**, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. (2010) Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 20(3):777-83.

IF: 4.261

Marosi K, Bori Z, **Hart N**, Sarga L, Koltai E, Radak Z, Nyakas C. (2012) Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of ageing rats. *Neuroscience*. 226:21-8.

IF: 3.380

Radak Z, Koltai E, **Hart N**, Szabo Z

The role of reactive oxygen and nitrogen species in skeletal muscle

In: Magalhaes J, Ascensao A (szerk.)

Muscle Plasticity: Advances in Biochemical and Physiological Research

Karela: Research Signpost Karela, 2009. pp. 37-46.