

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Rekreációs testmozgás cardioprotectiv hatásának
vizsgálata ösztrogén-hiányos állatmodelleken**

Dr. Karácsonyi Zoltán

Témavezetők: Dr. Pósa Anikó, Dr. Juhász Béla



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023

REKREÁCIÓS TESTMOZGÁS CARDIOPROTECTIV HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ÖSZTROGÉN-HIÁNYOS ÁLLATMODELLEKEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Karácsonyi Zoltán okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(kardiovaszkuláris megbetegedések programja) keretében

Témavezetők: Dr. Pósa Anikó, Dr. Juhász Béla

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, akadémikus
tagok: Dr. Dér Péter, PhD
Dr. Somodi Sándor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet, „A” épület
könyvtár
2024. április. 10., 10:00 óra.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szántó Sándor, az MTA doktora
Dr. Molnár Szabolcs Lajos, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Szántó Sándor, az MTA doktora
Dr. Molnár Szabolcs Lajos, PhD
Dr. Dér Péter, PhD
Dr. Somodi Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. április.10., 13:00 óra

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	3
A testmozgás szerepe a cardiovascularis megbetegedések megelőzésében és kezelésében	5
Célkitűzések	10
Anyagok és módszerek.....	11
Etikai engedélyek	11
A testmozgás szívműködésre gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen	11
Kísérleti állatok	11
Sebészeti beavatkozás	11
Vizsgálati protokoll	11
MMP-2 aktivitás.....	12
Össz-glutation (GSH+GSSG) szint.....	12
Cardiomyocyták 3-nitrotirozin (3-NT), szöveti (endogén) inhibitor 2 (TIMP-2) és I. típusú kollagén koncentrációjának meghatározása	12
Ischaemia/reperfusio vizsgálati protokollja.....	13
A myocardialis infarctus okozta necroticus terület kiterjedésének meghatározása	13
Statisztikai módszerek.....	13
A testmozgás utókezelésként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen.....	13
Kísérleti állatok	13
Vizsgálati protokoll	13
A myocardialis infarctus laboratóriumi paramétereinek meghatározása	14
A cardiomyocyták antioxidáns státuszának felmérése.....	15
Összfehérje szint meghatározása.....	16
Statisztikai módszerek.....	16
Eredmények.....	17
A testmozgás szívműködésre gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen	17
Az ösztrogén hiány, a diéta és a testmozgás hatása a cardiac MMP-2 aktivitásra.....	17
A 3-NT (3-nitrotirozin) szint változásai	17
A GSH szint változásai	17
A TIMP-2 szint változásai.....	17
Az I-es típusú kollagén szint változásai	17
A myocardialis infarctus okozta necroticus terület változásai	18
A testmozgás utókezelésként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen.....	18
A serum ösztadiol szint változása.....	18

Az ISO kezelés hatása a myocardialis infarctus markereire	18
A HO-1 koncentráció és aktivitás változása	18
A GSH+GSSG, illetve GSH koncentráció változásai	18
A cardialis TNF- α koncentráció változásai	19
A cardialis MPO aktivitás változásai	19
Megbeszélés	20
A testmozgás szívizomra gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen	20
A testmozgás postconditionálásként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen.....	22
Összefoglalás	25
Köszönetnyilvánítás	26

Bevezetés

A menopausa egy fiziológiás folyamat, amely során a női nemi hormonok, főként az endogén ösztrogén koncentrációja fokozatosan csökken, minek következtében számos szövet és szerv működése megváltozik. A cardiovascularis (CV) rendszer, a szénhidrát-, fehérje- és lipid anyagcsere, a csontok metabolizmusa jelentősen megváltozik az ösztrogén hiány hatására. Ezeken kívül sok esetben jelentkeznek vascularis tünetek is, melyeket összefüggésbe hoztak a menopausalis CV rizikó megnövekedésével.

Annak ellenére, hogy a CV betegségek halálozási aránya csökken, ezek a betegségek továbbra is vezető halálokok az idősebb nők körében. Összehasonlítva a férfiakkal, nőknél körülbelül 7-10 évvel később jelennek meg a CV betegségek, viszont a progressziójuk jelentősen felgyorsul menopausa után. Míg premenopausában előfordulásuk kisebb, mint a férfiak esetében, az arány kiegyenlítődik postmenopausában, előrehaladt korban pedig megfordul, és nők esetében sokkal magasabb lesz a CV morbiditás és mortalitás.

Az ösztrogén különösen fontos szerepet játszik a szív- és érrendszer egészségének megőrzésében azáltal, hogy védő hatást fejt ki az erekre, a szérum lipid profilokra és a gyulladásra (többek között, más kulcsfontosságú mechanizmusok mellett).

A petefészek hormonok szintjének csökkenése a menopausalis átmenet alatt és után jelentős szerepet játszik a nők CV betegségeinek kialakulásában. A betegségcsoport pathogenesisével összefüggésben a kutatások kimutatták, hogy az ösztrogénhiány és az elhízás egyaránt rizikótényezők, melyek hozzájárulnak a CV rendszer szerkezeti és szöveti átalakulásához, valamint a szív működés megváltozásához.

Ahogy a nők átlépnek a menopausába, és az ösztrogénszint csökken, ezek a védőhatások is csökkennek, és érzékenyebbé teszik őket a CV betegségekre. Ezzel egyidejűleg a hormonális változásokkal és az egészségtelen életmóddal összefüggő, gyakori elhízás tovább növeli a kockázatot azáltal, hogy proinflammatoricus hatású, valamint elősegíti inzulinrezisztencia és más kóros folyamatok kialakulását a CV rendszerben.

Az ösztrogén hiány következtében a CV betegségek, elsődlegesen az atherosclerosis, az ischaemiás betegségek és a hypertonia kockázata jelentősen megemelkedik postmenopausalis nőknél. A hormonális változások a metabolikus funkciókat ugyancsak befolyásolják, ezáltal tovább növelve a CV kockázatot.

Az ösztrogéntermelés hiánya endothel diszfunkcióhoz és a testtömeg-index növekedéséhez vezethet, mindkettő hozzájárulhat a hypertonia kialakulásához. Az artériás hypertonia (AHT) a CV mortalitás jelentős tényezőjeként ismert. A különféle kockázati tényezők – köztük a pszichés stressz, a környezeti szennyező anyagoknak való kitettség, az egészségtelen életmódbeli szokások és a fizikai inaktivitás – hatása jelentős kutatási érdeklődés tárgyát képezi. Ezeket a tényezőket számos állapot kialakulásával hozzák összefüggésbe, beleértve a vasculomotor diszfunkciót, a neuropszichológiai problémákat, az endokrin és metabolikus zavarokat, valamint a CV problémákat. Ezek nemcsak az életminőséget rontják, hanem a hosszú távú prognózist is befolyásolják.

A hypertonia a CV megbetegedések kialakulásához hozzájáruló elsődleges megelőzhető rizikófaktor, amely jelentős hatással van a globális morbiditásra és mortalitásra. Az életkor előrehaladtával azonban a menopausa utáni nőknél általában kedvezőtlen változások következnek be az artériák falának merevségében, az izomerőben és az egészségi állapotban, amelyek szorosan összefüggnek az endokrin változásokkal. Különösen az ösztrogénszint csökkenése gyengíti a CV védőhatást, ami növeli a hypertonia prevalenciáját. A menopausa utáni nők körében a hypertonia prevalenciája fokozatosan növekszik, ami növeli a CV betegségek morbiditását és mortalitását.

A fentiek miatt a postmenopausás nőknél lényegesen nagyobb lesz az ischaemiás szívbetegség kockázata, mint az azonos korú férfiaknál. A postmenopausában lévő nők ischaemiás szívbetegségének klinikai lefolyása is eltérő mintát követ: gyakoribbak a mikrokeringési rendellenességek, amelyek sokszor pozitív electrocardiographiás terhelési tesztben nyilvánulnak meg, az epicardialis artériák minimális hemodinamikai változásának ellenére. A megnövekedett kockázat - a mikrovaskuláris diszfunkció mellett - gyakran olyan problémákkal függ össze, mint a kóros koszorúér-reaktivitás és a HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction: megőrzött ejekciós frakciójú szívelégtelenség).

Az ösztrogén kimerülése a korai diasztolés relaxáció és a késői diasztolés compliance kedvezőtlen változásaival is összefügg, ami hozzájárul a bal kamrai diasztolés diszfunkcióhoz, a fibrózishoz és a koncentrikus bal kamrai hipertrofiához. Ez a szív-remodelling általában a menopausális átmenethez kapcsolódik. A bal kamra diasztolés diszfunkciója és a szív morfológiai változásai különböző tényezőkből fakadhatnak, beleértve a kollagén koncentráció növekedését, a fibrosist és a csökkent szívműködést. Ezeket az elváltozásokat az autonóm idegrendszer és a renin-angiotenzin rendszer befolyásolja. Ezen kívül a klimaxos fázis negatívan hat a hemodinamikai profilra is, amelyet a véráramlás dinamikájának kedvezőtlen megváltozása jellemez. Ezen túlmenően zavart szenved az autonóm idegrendszer egyensúlya is, ami a paraszimpatikus aktivitás csökkenéséhez és/vagy a szimpatikus aktivitás növekedéséhez vezethet. Az autonóm funkció ezen változásai hosszú távon rontják a szív teljesítményét és kedvezőtlenül befolyásolhatják a gyulladásos és oxidatív stressz markereket is.

Kimutatták, hogy az öregedési folyamat önmagában is autonóm, biokémiai és funkcionális változásokat idéz elő, amelyeket a menopausa súlyosbíthat. Ez aláhúzza a korai beavatkozások fontosságát a menopausa idején, hogy csökkentsék a nők öregedésének káros hatásait. Az öregedési folyamattal összefüggő autonóm diszfunkció megelőzése vagy javítása kedvezőbb gyulladásos illetve oxidatív stresszprofilhoz vezethet, segíthet megőrizni a megfelelő szívműködést, végső soron javítva a postmenopausás nők életminőségét és várható élettartamát (különösen azoknál, akik petefészek-eltávolításon estek át).

A testmozgás szerepe a cardiovascularis megbetegedések megelőzésében és kezelésében

A testmozgás széles körben elismert nem gyógyszeres beavatkozás a CV megbetegedések megelőzésére és kezelésére. Ez a terápiás eszköz jelentős CV adaptációhoz vezet, többek között csökkenti a vérnyomást, elősegíti a fiziológiás hipertrófiaként leírható jótékony szívizom remodellinget és enyhíti a myocardialis fibrosist. Ezen kívül az edzéssel kiváltott cardioprotectio szorosan összefügg az antioxidáns védekező mechanizmusok aktiválásával és a metabolikus kockázati tényezők mérséklésével.

Nőknél a menopause után felgyorsul az érrendszer öregedése, ami fokozott artériás rigiditást eredményez. Az artériás rigiditás életkorral összefüggő növekedését részben az artériák falában az extracelluláris mátrix (ECM) változásai okozzák. Ezek a változások magukban foglalják az elasztikus rostok rovására a kollagén felszaporodását (fibrosis) és a térhálósító molekulák megnövekedett szintjét, beleértve előrehaladott glikációs végtermékek (AGE - advanced glycation end products) képződését is.

A perimenopausában lévő nők esetében gyakran tapasztalják az artériás vérnyomás tartós emelkedését, ennek ellenére kevés információ áll rendelkezésre az életminőség változásáról, és eddig nem kaptak kellő figyelmet olyan, kimondottan a perimenopausában lévő nők igényeire szabott rekreációs fizikai aktivitási programok, amelyek kifejezetten az életminőség javítását szolgálnák menopausában. Ismert, hogy a mérsékelt, aerob típusú fizikai aktivitás jelentősen hozzájárulhat az artériás hypertonia megelőzéséhez. Prospektív tanulmányok kimutatták, hogy a fizikailag inaktív középkorú egyéneknél 30%-kal nagyobb a CV betegségek kockázata. A rendszeres, mérsékelt fizikai aktivitás elősegíti adaptív válaszok kialakulását, a környezeti stresszorokkal szembeni fokozott immunitást, a szöveti anyagcsere fokozódását, a hypoxiával való jobb megküzdést és a szívműködés nagyobb hatékonyságát.

A perimenopausában lévő nők életminőségének javítása érdekében elengedhetetlen átfogó wellness programok kidolgozása. Egy ilyen program legfontosabb összetevői a kinezioterápia (gyógytorna), a gondolkodás tréningje, a masszáz, de hasznos kiegészítést jelenthetnek a társadalmi kapcsolatok bővítését célzó kezdeményezések is. Az Észak-amerikai Menopausa Társaság (NAMS) azt ajánlja, hogy az enyhe vasculomotoros tüneteket tapasztaló nők kezelési tervük részeként először fontolják meg az életmódbeli változtatásokat és más gyógyszermentes beavatkozásokat.

A testmozgás a vérnyomás hatékony nem gyógyszeres kezelési lehetőségének bizonyult. Az aerob gyakorlatok széles körben ajánlottak a CV- és anyagcsere-paraméterekre kifejtett pozitív hatásai miatt.

Különböző vizsgálatok kimutatták, hogy egyes rizikófaktorok (hypertonia, menopause és fruktóz túlterhelés) társulása elősegíti a metabolikus, CV, vegetatív, gyulladásos és oxidatív stressz paraméterek további károsodását. Mind az aerob, mind a kombinált gyakorlatok, amelyek aerob és rezisztencia (vagyis ellenállással szembeni izomtevékenység) összetevőket tartalmaznak, képesek enyhíteni ezeket a működészavarokat. Bár az aerob és a rezisztencia gyakorlatok nem változtatják meg jelentősen a nyugalmi vérnyomást ebben a kockázati tényezők kombinációjával járó modellben, pozitív hatást gyakorolnak a keringés autonóm szabályozására, ami az érrendszeri szimpatikus moduláció és a baroreflex érzékenység javulásához vezet.

Az aerob testmozgás jelentősen csökkentheti a postmenopausás nők vérnyomását függetlenül attól, hogy hipertóniában szenvednek-e vagy sem, továbbá javítja az endothel funkciót, a NO szintjét és az artériás együttműködést, valamint csökkenti az inzulinrezisztenciát. Egyéb tanulmányok kimutatták, hogy a rezisztencia tréning jótékony hatással volt a vérnyomásra mind hipertóniás, mind nem hipertóniás postmenopausás nőknél. A rezisztencia tréning olyan testmozgás, ami külső ellenállással szembeni izomösszehúzódást igyekszik elérni az

izomerő, a tömeg és a csontsűrűség növelése érdekében. A postmenopausás nők általában csökkent izomerőtől és -tömegtől szenvednek, ami az artériás merevség növekedésével függ össze. Ezután a megnövekedett artériás merevség hozzájárul a hypertonia kialakulásához. A legtöbb tanulmány azt mutatja, hogy a rendszeres állóképességi edzést végző postmenopausás nők esetében csökkent artériás rigiditás mutatható ki, mint mozgásszegény életmódot folytató társaiknál. Ezen kívül egyes kutatások rávilágítottak a rugalmasság potenciális szerepére a nők és az idősök cardiometabolikus egészségének előmozdításában. Ezért tanácsos tehát a rezisztencia tréninget beépíteni a posztmenopausális nők rutinjába.

Míg egyes kutatások szerint a testedzés a szisztolés és a diasztolés vérnyomás jelentős csökkenéséhez vezetett menopausás és postmenopausás nőknél, más vizsgálatok azt mutatták ki, hogy az aerob edzés önmagában nem okozott jelentős vérnyomáscsökkenést, viszont az aerob és az rezisztencia edzés kombinációja nagyobb csökkenést eredményezett. Számos korábbi tanulmány kimutatta, hogy a heti háromszor végzett aerob testmozgás jelentősen csökkenti a vérnyomást a postmenopausás nőknél, azonban a heti háromnál kevesebbszer végzett kombinált aerob és rezisztencia gyakorlatok is hatékonyan csökkenthetik a vérnyomásukat. Az aerob és dinamikus rezisztencia gyakorlatok kiegészítik egymást a menopausa által kiváltott hypertonia minimalizálásában azáltal, hogy javítják a CV betegségek kialakulásában részt vevő kulcsfontosságú mechanizmusokat. Tekintettel arra, hogy az aerob és a rezisztencia gyakorlatok zömmel eltérő mechanizmusokon keresztül csökkentik a vérnyomást a postmenopausás nőknél, feltételezhető, hogy e két edzésforma kombinálása fokozott előnyökkel jár. Egyes kutatók ennek megfelelően javasolták, hogy az aerob testmozgást és a rezisztencia gyakorlatokat együtt alkalmazzák. A kombinált mozgás vérnyomáscsökkentő hatását az is növelheti, hogy a rezisztencia gyakorlatok növelik az izomerőt (és -tömeget), ez pedig fokozza az aerob mozgás hatékonyságát.

A nők öregedéssel kapcsolatos hormonális változásai összességében krónikus, alacsony fokú gyulladásos állapothoz vezetnek, ami kedvez a szisztémás artériás hypertonia (SAH) és a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásának. A női nemi hormonok, különösen a 17 β -ösztadiol szérumszintjének csökkenése több anyagcsere-utat és gyulladásos mechanizmust is befolyásol, ezen keresztül megváltoztathatja a zsírszövet eloszlását a testben.

A hasi elhízás a metabolikus zavarok és a CV halálozás jelentős kockázati tényezője, különösen a postmenopausában levő nőknél, ezért számukra különösen fontos az elhízás elleni hatékony védekezés lehetőségeinek feltárása. A testmozgás jó stratégiának bizonyult az elhízás elleni küzdelemben. A nagyobb energiafelhasználás fogyasztó hatása mellett úgy tűnik, hogy bizonyos proinflammatorikus citokinek szérumszintje is csökkenthető ily módon.

A testmozgásról leírták, hogy hatékonyan ellensúlyozza a CV betegségekben kialakuló strukturális és funkcionális szívelváltozásokat azáltal, hogy gátolja a fiziológiás szívhipertrofia patológiás irányba való eltolódását. A testmozgás csökkenti a testtömeg indexet, javítja az inzulinérzékenységet, a glükózfelvételt és a lipidprofilt is. A testmozgást végző idősebb nők, annak ellenére, hogy diabetes mellitusban és hypertóniában szenvednek, általános javulást mutatnak a különböző kockázati tényezőkre nézve, beleértve a kedvezőbb testarányokat (zsíreloszlást), vérnyomást, lipidprofilt és gyulladásos állapotot (figyelembe véve a pro- és antiinflammatorikus citokin szérumszintjeit). A lipidprofilt nagymértékben befolyásolja az öregedés, különösen a 2-es típusú diabetes mellitusban szenvedő nőknél. Jellemzően a triglicerid és az LDL szérumszintje nő, míg a HDL szintje csökken, ami emelkedett CV kockázattal jár (aterogén lipid-profil). A

fizikai aktivitás összefüggésbe hozható a cukorbeteg és hypertóniás, idősebb postmenopausás nők lipid-profiljának javulásával. Ez a javulás nemcsak az egyes paraméterekben volt megfigyelhető, hanem a HDL és bizonyos kockázati tényezők (például az LDL és a VLDL) közötti arányokban is.

Kimutatták, hogy a rezisztencia tréning (RT) nagy akut energiafelhasználással jár. Jól dokumentáltan javítja az inzulin hatását és így egyensúlyba hozhatja a glükóz anyagcserét. Ezek a kedvező hatások azonban csökkenhetnek mozgásszegény életmódot folytató nőknél olyan akut testmozgás után (például intenzív RT), ami izomkárosodást okoz. Nunes és mtsai szerint az alacsony volumenű (kevésbé intenzív) RT hatékonyabban csökkenti a HbA1c%-ot, mint a nagy volumenű RT. Ehhez hozzá kell tenni, hogy a nagy volumenű RT HbA1c%-ot csökkentő hatása a postmenopausában lévő nőknél valamelyest megbízhatóbban jelentkezik. Az eredmények azt sugallják, hogy míg az alacsony volumenű RT főleg a HbA1c-t, az izomerőt és a testzsírszázalékot javítja, addig a nagy volumenű RT a derékbőség, a derék-csípő arány, az összkoleszterin (TC) és az LDL-koleszterin (LDL-c) csökkentésében teljesít jobban, továbbá gátolja az interleukin 6 (IL-6) növekedését is a postmenopausás nőkben. Az életkorral összefüggő izomvesztést és gyengeséget tovább súlyosbítja az ösztrogén hormon csökkenése. A vizsgálatok azt sugallják, hogy az 50 életév feletti nőknél megfigyelt csökkent izomerő összefügg a menopausa miatti ösztrogénhiánnyal. Korábbi kutatások kimutatták, hogy az RT biztonságosan és hatékonyan beépíthető az idősebb nők terápiás programjába. Az RT-t sokan használják az izomerő növelésére és az állóképesség fokozására az egészséges életmód részeként. A hetente háromszor végzett RT csökkentheti a metabolikus szindróma ún. Z-pontszámát azáltal, hogy csökkenti az éhomi glükóz szintet, javítja a testzsírszázalékot és növeli az izomerőt. Egy rövid időtartamú hipertrofiás RT program a postmenopausás nők számára akár hetente kétszer is elvégezhető, beépíthető bármely testedzési programba, akár a progresszív RT program kezdeti szakaszába, akár más kezelésekkel kombinálva.

A legújabb szakirodalom hangsúlyozta a mozgásmennyiség és a fizikai edzettségi szint jelentőségét a CV megbetegedések prognózisában. Ezek közül azonban sok tanulmány elsősorban a cardiorespiratorikus alkalmasság, az izomerő és a CV betegségek kapcsolatára összpontosított. A fizikai erőnlét egyéb összetevőinek, például a rugalmasságnak és a gyorsaságnak (mozgékonyaságnak) a CV megbetegedések kockázatára gyakorolt hatása továbbra is vita tárgya. Az egyik ilyen tanulmány legfontosabb megállapításai arra utalnak, hogy a kevesebb ülőmunka, a cardiorespiratorikus fitness (CRF), a felsőtest nagyobb rugalmassága és az alsó test nagyobb izomereje kedvezőbb CV egészségi profillal jár együtt, különösen a menopausán átesett nőknél. Számos tanulmány hangsúlyozta a különböző fizikai erőnléti összetevők védő szerepét a nők CV egészségében. A CRF-ről például kimutatták, hogy pozitív hatással van a testzsírszázalékra, a vérnyomásra, az autonóm idegrendszer aktivitására, a glükóz- és a lipid-profilra, a gyulladásra való hajlamra, és az oxidatív stresszre. Ami a rugalmasságot illeti, egy közelmúltbeli átfogó tanulmány azt sugallta, hogy a vázizmok nyújtása csökkentheti a szimpatikus idegrendszer aktivitását és az artériás merevséget. Bár a kutatások nagy része a szív- és légzőrendszer alkalmasságára és az izomerőre összpontosított, egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy olyan tényezők, mint az ülőmunka mennyisége, a rugalmasság és a gyorsaság szintén jelentős szerepet játszanak a CV egészségben, különösen a menopausán átesett nők esetében. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a fizikai alkalmasság átfogó felmérésének fontosságát a CV betegségek kockázata szempontjából.

Vizsgálatok igazolják a különböző edzés protokollok specifikus étrendi bevitellel vagy vitamin kiegészítőkkel együtt történő hatását egészséges postmenopausás nők különböző egészségügyi paramétereire, beleértve a testösszetételt, a lipid- és a glükóz-profilt, az antioxidáns állapotot, a protrombotikus terhelést és CV

paramétereket. Ez a kutatás különösen fontos mivel epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy menopausa után nagyobb a CV megbetegedések kockázata, mint a premenopausában lévő nőknél. Mind az öregedés, mind a menopausa a katekolaminok, különösen az adrenalin és a noradrenalin szintjének emelkedéséhez vezethet a keringésben. Ez vélhetően az autonóm idegrendszer aktivitásának csökkenését eredményezi, mivel az idősök és a postmenopausás populációk nyugalmi állapotában fokozott szimpatikus idegrendszeri aktivitást mutattak ki, ami edzés hatására csökkent. A károsodott autonóm idegrendszeri aktivitás hozzájárulhat a CV betegségek kialakulásához, mivel magasabb katekolamin szinteket figyeltek meg ezen betegségcsoportban, beleértve az idősebb, hypertóniában szenvedő egyéneket, a postmenopausás és hypertóniás nőket. A megnövekedett pulzushullám-sebesség, az artériás merevség mutatója, az atherosclerosis, a magas vérnyomás és a szívbetegségek egyik fő kockázati tényezője, és gyakran megfigyelhető postmenopausás nőknél. Az izomerőről úgy gondolják, hogy védő hatást fejt ki az artériás merevség és a hypertonia ellen, ami arra utal, hogy az izomerő javulása CV előnyökhöz és az általános egészségi állapot javításához vezethet. Ezért kezelni kell a magas vér katekolamin szinteket, az artériás merevséget, a csökkent izomerőt és az izomtömeget, amelyet a postmenopausás hypertóniában szenvedő nők tapasztalnak. Ennek a populációnak egy előnyös edzésforma a Taekwondo lehet, mert különböző intenzitással végezhető, aerob és rezisztencia edzési komponenseket egyaránt tartalmaz, valamint javíthatja az izomerőt, a motoros koordinációt és a szív- és érrendszer egészségét. Irodalmi adatok azt mutatják, hogy a Taekwondo edzés hatékony terápiás megközelítés lehet a vér katekolamin szintjének, az artériás merevségnek, a vérnyomásnak és az izomerőnek a javítására a 2. stádiumú hypertóniában szenvedő postmenopausás nőknél. Ezért ezek az eredmények alátámasztják ezen edzéstípus használatát és ajánlását a CV betegségek kockázati tényezőinek megelőzésére és kezelésére ebben a populációban.

Bár a fizikai aktivitás és a strukturált testmozgás pozitív hatásai jól dokumentáltak, még mindig nem tartják be megfelelően az Egészségügyi Világszervezet (WHO) fizikai aktivitásra vonatkozó ajánlásait, különösen a nők körében. A fizikai inaktivitás a globális mortalitás és a CV betegségek fő kockázati tényezője. Ez szorosan összefügg a súlyos menopausális tünetekkel és a postmenopausabeli nők elhízásával. Az ülő életmódot szintén összefüggésbe hozták anyagcsere-rendellenességekkel, CV betegségekkel, malignus betegségekkel, pszichológiai szorongással és nagyobb mortalitással. Így az ülő tevékenység csökkentése alternatív stratégiát kínál a CV megbetegedések, valamint a CV betegségek okozta halálozás kockázatának csökkentésére idősebb felnőtteknél.

A fizikai aktivitás és a testmozgási programok betartása egy másik kritikus tényező, amely befolyásolhatja az egészségügyi eredményeket, különösen az idősebb felnőtt populációban. A gyakorlatok betartása általában akkor tekinthető sikeresnek, ha a résztvevők az idő legalább kétharmadában teljesítenek egy előírt gyakorlati rutint. A strukturált testmozgás, amely a fizikai aktivitás egy strukturált és tervezett formája, számos pozitív hatással van a cardiometabolikus profilra az élettartam során, és jelentős szerepet játszik a menopausális átmenettel járó kedvezőtlen változások ellensúlyozásában. A fizikai aktivitás a hagyományos farmakológiai terápiák elengedhetetlen kiegészítőjévé vált és a közegészségügyi programok is egyre gyakrabban integrálják a rendszeres fizikai aktivitást, mint a krónikus betegségek kezelésének értékes eszközét.

Jelenleg az American College of Sports Medicine és az American Heart Association hetente 150 perces fizikai aktivitást javasol felnőttek és idősök számára. Ezen túlmenően, ha figyelembe vesszük a heti edzésidőt, a heti 150 percet vagy többet fizikai tevékenységet folytató postmenopausás nők mind a szisztolés, mind a diasztolés

vérnyomás jelentős csökkenését tapasztalták azokhoz képest, akik heti 150 percnél kevesebbet sportoltak. Ez megfelel az Egészségügyi Világszervezet által javasolt minimális heti fizikai aktivitási időnek.

Úgy tűnik azonban, hogy a testmozgás mennyisége ugyancsak kritikus szerepet játszik a zsírvessztés mértékében. Feltételezhető, hogy a postmenopausás nők testzsírtartalmának csökkenése közvetlenül összefügg az izom aerob funkciójának fokozásával, a mitokondriális tartalommal és/vagy a megnövekedett energiafelhasználással.

Általánosságban elmondható, hogy a rendszeres testmozgás, legyen az aerob vagy ellenálló edzés, segíthet a nők érrendszeri öregedésének mérséklésében. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek a hatások nem feltétlenül jelentkeznek az érrendszeri öregedés minden biomarkerén.

Mindezek rávilágítanak a testmozgásban rejlő mélyreható terápiás potenciálra, amely a CV betegségek megelőzésének és kezelésének sarokköve, sokrétű előnyökkel jár, magukban foglalják a CV rendszer szerkezeti, funkcionális és anyagcsere-javulását, még olyan helyzetekben is, ahol a hormonális egyensúlyhiány is szerepet játszik.

Célkitűzések

Vizsgálatunk elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk az önkéntes testmozgás utókondicionáláshoz hasonló hatását a postmenopausalis CV kimenetekre myocardialis infarctus (MI) után, valamint a myocardialis ECM/kollagén homeosztázisra gyakorolt hatásait.

Korábbi vizsgálatainkra építve a jelenlegi tanulmány egyik célja, hogy megvizsgáljuk az isoproterenol (ISO) által kiváltott szívkárosodásnak az antioxidáns és gyulladásos profilra gyakorolt hosszú távú hatását fertilis és különböző módon ösztrogénhiányos patkánymodellekben egyaránt. Hipotézisünk az volt, hogy az önkéntes fizikai testmozgás hatékony terápiás megközelítésként szolgálhat az ISO által kiváltott szívkárosodás enyhítésére.

Továbbá azt is feltételeztük, hogy a hosszabb távú önkéntes testmozgás hatékony stratégia lehet az ösztrogénhiányos állapotban kiváltott szív-remodelling hatás módosításában. A myocardialis ECM kulcsszerepet játszik a szív fejlődésében, a homeosztázis fenntartásában és remodelling folyamatokban. Mindezeket figyelembe véve, a jelen tanulmány második célkitűzése az volt, hogy feltárja a MMP-2 és a kollagén tartalom deregulációs és káros hatásaival szembeni lehetséges védőhatásokat, amelyek összefüggésben állnak az ischaemia/reperfúziós sérülés utáni necroticus arány kimutatásával.

Az érrendszeri öregedés felgyorsulása és a petefészek hormonszintjének csökkenése a menopausa során, jelentős következményekkel jár a CV prevenciós stratégiáinak proaktív végrehajtásában, amelyek a perimenopausalis szakaszban levő nőket célozzák meg. Ahogy a várható élettartam folyamatosan növekszik, a nők életük jelentős részét a postmenopausás szakaszban töltik. Ezért klinikailag elengedhetetlen a bizonyítékokon alapuló terápiás megközelítések alkalmazása a nők CV betegségeinek megelőzésére.

Mindazonáltal a jövőbeli kutatások egyik fontos területe az edzés optimális típusának, mennyiségének és intenzitásának meghatározása, amely hatékonyan javíthatja a nők érrendszeri egészségét. A jelenlegi ajánlások módosítást igényelhetnek, hogy figyelembe vegyék a nők hormonális állapotát, biztosítva, hogy a testmozgás minden előnye megvalósuljon.

A hatékony kezelési és beavatkozási stratégiák kidolgozásához elengedhetetlen, hogy átfogó képet kapjunk az érrendszeri öregedéssel kapcsolatos mechanikai hibákról és az érrendszer csökkent érzékenységről az idősebb nőknél. Ez a tudás a jövőbeli kutatások alappilléreként szolgál majd, lehetővé téve olyan nem-specifikus terápiás megközelítések kidolgozását, amelyek megőrzik a vascularis funkciót a nők életkorának előrehaladtával.

Anyagok és módszerek

Etikai engedélyek

Vizsgálataink során minden állatkísérletet a laboratóriumi állatok védelméről és használatáról szóló nemzetközi rendelkezések és az azokkal összhangban lévő, a Szegedi Tudományegyetem helyi etikai irányelveinek a betartásával végeztünk (I.74-40/2017. MÁB és 16/2007 DE MÁB).

A testmozgás szívizomra gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen

Kísérleti állatok

A kísérletekhez 180-200 g súlyú, 9 hetes nőstény Wistar (Toxi-Coop Zrt., Hungary) patkányokat használtunk. Az állatokat standard méretű ketrecekben – 3 állat/ketrec – helyeztük el a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék kísérleti állatházában, illetve a Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének a kísérleti állatházában. Az egy hét akklimatizációs idő alatt, illetve a kísérleti periódus teljes ideje alatt a kísérleti állatházakban az állandó 20-23°C hőmérséklet és a 12-12 órás periódusokból álló sötét/világos megvilágítás biztosított volt.

Sebészeti beavatkozás

Az akklimatizációs időszak után, a 10 hetes patkányokon thiopentallal indukált altatásban (5 mg/100 g i.p.) ovariectomiát (OVX), illetve álműtétet (SO – sham operation) végeztünk. Az ovariectomia során kétoldali dorsolateralis bemetszést végeztünk, és a petefészkeket eltávolítottuk. Az álműtéten átesett állatok petefészkeit nem távolítottuk el, csak exteriorizáltuk, az azonos stresszhatás kiváltása érdekében.

Négy hetes felépülési idő után az OVX-indukált menopausa kialakulásának ellenőrzése céljából a szérum ösztrogénszintet ELISA (Quantikine patkány ösztrogén ELISA készlet, R&D Systems Inc.) módszerrel ellenőriztük.

Vizsgálati protokoll

Az OVX és SO csoportok állatait véletlenszerűen további 8 csoportba osztottuk, az elfogyasztott táp (szokásos rágsálótáp – kontroll (KTRL) csoport és a magas triglicerid tartalmú táp – HT csoport), valamint a testmozgás (futó és nem futó csoportok) függvényében. A 12 hetes kísérleti periódus alatt a KTRL állatok standard rágsálótápot, míg a HT csoport állatai magas triglicerid tartalmú rágsálótápot (40% triglicerid és 60% standard táp keveréke) kaptak. Az ily módon kialakított csoportokat további 2-2 futó és nem futó alcsoportra osztottuk. A futó csoport állatait egyenként futókerékkel felszerelt ketrecekbe helyeztük napi 24 órás, 12 hétig tartó szabad hozzáférést biztosítva a futókerékhez, ezáltal csökkentve a kényszeres testmozgás okozta stresszhatást. A nem-futó (3 állat/ketrec) állatok továbbra is standard méretű ketrecben lettek elhelyezve. A kísérleti időszak végén az állatokat a menstruációs ciklus pre-ösztrogén fázisában 100/5 mg/ttkg ketamin/xylazin túllaltatással extermináltuk. Az álműtött állatok ösztrogén fázisának ellenőrzéséhez Giemsa festést használtunk. A Giemsa festéshez az állatoktól fültisztítóval hüvelyváladékot vettünk és ezt tárgylemezre kentük. A kenetet 96%-os alkohol és éter 1:9 arányú keverékével fixáltuk és Giemsa oldattal (metilénazúr eozin) megfestettük. A megszürt

Giemsa-oldatot 3-5 percig a keneten hagytuk, majd forró vízzel lemostuk, desztillált vízzel öblítettük, és a keneteket mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Az állatok kíméletes euthanasiája után a szíveket vagy Langendorff perfúziós rendszerbe helyeztük az ischaemia/reperfúziós károsodás ex vivo kimutatásának céljából (10 állat/csoport), vagy pedig azonnal lefagyasztottuk és -80°C-on tároltuk (10 állat/csoport) a későbbi biokémiai és molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig.

MMP-2 aktivitás

A szívizomszövetekből az MMP-2 aktivitását zselatin-zimográfiával határoztuk meg. A fehérjemintákat (50 µg) zselatinnal (20mg/ml, Sigma) kopolimerizált 8%-os poliakrilamid gélen elektroforézissel szeparáltuk. A futtatás után a géleket 2,5%-os Triton X-100 oldatban mostuk, ezt követően pedig aktivitáspufferben 20 órán át, 37°C-on inkubáltuk, majd 0,05% Coomassie Brilliant Blue festéssel vizualizáltuk az MMP-2 aktivitását. Az enzim 2 izoformájának identifikálásához fehérje létrát (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific) használtunk. A zimogrammok digitális szkennelése után a sávok optikai aktivitását Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével mértük.

Össz-glutation (GSH+GSSG) szint

A myocardialis szövetmintákat (70 mg) 280 ml „A” homogenizáló pufferben (0,25 M szacharóz, 20 mM Tris, és 1 mM dithiothreitol (DTT)) centrifugálással (30 perc 15000 g, 4°C) homogenizáltuk. Az eltávolított felülúszó alikvotjait (150 µl) 600 µl „B” pufferrel (0,1 M CaCl₂, 0,25 M szacharóz, 20 mM Tris, és 1 mM DTT) elegyítettük, 0°C-on 30 percig inkubáltuk, és ezt követően ismét lecentrifugáltuk (60 perc, 21,450g 4°C). Az enzim vizsgálatokhoz a citoszolikus frakciót használtuk. A glutation (GSH), glutation reduktáz, DTNB (5,5'-ditio-bisz-2-nitro-benzoészav), β-NADPH (β-nikotinamid-adenin-dinukleotid-2'-foszfát) törzsoldatokhoz 125 mM nátrium-foszfát és 6,0 mM EDTA oldatát használtuk hígító pufferként. Azonos mennyiségű (40 µl) háttér/standard/izolátumot, 20 µl DTNB törzsoldatot és 140 µl β-NADPH-t öt percig 25°C-on inkubáltunk. Ezt követően a reakció elindításához 10 µl glutation reduktázt használtunk és 10 perces várakozás után 405 nm hullámhosszon microplate reader-rel meghatároztuk az abszorbancia mértékét. Az össz-glutation szintet nmol/mg fehérje értékben fejeztük ki.

Cardiomyocyták 3-nitritirozin (3-NT), szöveti (endogén) inhibitor 2 (TIMP-2) és I. típusú kollagén koncentrációjának meghatározása

A kísérlet végpontján (12 hét) az állatok szívét kimetszettük és lefagyasztottuk. Az enzim vizsgálatokhoz a mintákat foszfát pufferben (pH=7,4) szövet-homogenizátorral (Ultra-Turrax T8; 2 x 30 mp), ezt követően pedig centrifugálással (20 perc, 2000 rpm, 4°C) készítettük elő a vizsgálatokhoz, melyekhez kereskedelmi forgalomban kapható kiteket (GenAsia, Shanghai, Kína) használtunk. Az abszorbancia mérést 450 nm hullámhosszon (Benchmark Microplate reader; Bio-Rad) végeztük. A fehérje koncentráció meghatározásához 20 µl hígított homogenizátumot 980 µl dH₂O-val (desztillált víz) és 200 µl Bradford reagenssel (Bio-Rad Labs) összekevertünk, 10 percig szobahőn inkubáltuk és végül 595 nm hullámhosszon detektáltuk a minta optikai denzitását. Az eredményeket 3-NT esetében pmol/fehérje mg, I. típusú kollagén esetében pg/fehérje mg és TIMP-2 esetében ng/fehérje mg értékben fejeztük ki.

Ischaemia/reprfusios vizsgálat protokollja

Általános érzéstelenítésben (30 mg/ttkg thiopental) az állatok szívét kipreparáltuk és azonnal jéghideg Krebs-Henseleit (11,2 mM glükóz, 1,24 mM KH_2PO_4 , 20,1 mM NaHCO_3 , 119 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl_2 , és 1,24 mM MgSO_4) oldatba helyeztük. Ezt követően a szívet egy Langendorff perfúziós rendszerbe illesztettük, melyben a szív retrográd perfúzióját 75 mmHg állandó nyomás alatt, az aortán keresztül végeztük, 37°C-os 5% CO_2 -al és 95% O_2 -el buborékolatott Krebs-Henseleit pufferrel. Az ischaemiát a bal koszorúér elülső leszálló ágának (LAD – Left anterior descendens) 30 percig tartó ligatúrájával váltottuk ki, majd következett a reperfúzió 120 percig. A kísérlet végén a LAD-ot újból elzártuk és a perfúziót leállítottuk. Az ischaemiás terület meghatározásának céljából a szívet az aortán keresztül beinjektált 1%-os Evans kék oldattal megfestettük, majd egy éjszakára -20°C-on lefagyasztottuk.

A myocardialis infarctus okozta necroticus terület kiterjedésének meghatározása

A fagyasztott szív szöveti mintákat keresztirányban 2 mm vastag szeletekre vágtuk és 10 percig 37°C-on 1%-os 2,3,5-trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) oldatba áztattuk. A TTC festés után a szeleteket először 10 percre 10 %-os formalinba, majd foszfát pufferbe (pH=7,4) helyeztük át. Az inkubációt követően a szeletek mindkét oldaláról digitális kamera segítségével felvételeket készítettünk és kiszámítottuk az infarktusos terület méretét, melyet a veszélyeztetett terület százalékában fejeztünk ki.

Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag $\pm$ S.E.M-ben (standard error of mean: az átlag standard hibája) fejezzük ki. A csoportok közötti különbségeket varianciaanalízis (ANOVA) teszttel kiszámítottuk, és $p \leq 0,05$ értéket határoztuk meg szignifikancia határként.

A testmozgás utókezelésként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen

Kísérleti állatok

A kísérletekhez 180-200 g súlyú nőstény Wistar (Toxi-Coop Zrt., Hungary) patkányokat használtunk. Az állatokat a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék kísérleti állatházában, illetve a Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének a kísérleti állatházában tartottuk. Mindkét helyen biztosítottuk az állandó 20-23°C hőmérsékletet és a 12-12 órás periódusokból álló sötét/világos megvilágítást. Az állatokat standard méretű ketrecekben – 3 állat/ketrec – tartottuk, fito-ösztrogén-mentes táppal etettük, illetve csapvizet kaptak ad libitum.

Vizsgálati protokoll

Egy hét akklimatizációs időszak után az állatokat (n=100) kontroll (KTRL) és farmakológiailag indukált ovariectomia (POVX) csoportokra osztottuk (5. Ábra). Az ösztrogénhiányos állapotot a POVX csoport állatainál 750 $\mu\text{g/kg}$ triptorelin (Decapeptyl depot, Ferring Germany) 4 hetente történő intramuscularis (i.m.) beadásával idéztük elő. A kontroll csoport állatai ugyancsak 4 hetente az ekvivalens mennyiségű fiziológiás sóoldatot kapták

i.m. A kezelés 56. napján megvizsgáltuk a POVX csoport állatainak ösztrogén szintjét kvantitatív enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal (Rat E2 ELISA kit, SunRed Biological Technology Co., Shanghai, China).

Mind a kontroll, mind pedig a POVX csoportot további 2 csoportra – KTRL, ISO-KTRL, POVX és ISO-POVX – osztottuk. Az ISO-KTRL és a POVX-KTRL csoport állatainál myocardialis infarctust idéztük elő egyszeri 0,1 mg/ttkg (1 ml fiziológias sóoldatban feloldva) isoproterenol/isoprenalin (ISO) (Sigma Chemicals Co.) subcutan beadásával. A többi állat (KTRL és POVX csoportok) hatóanyag nélküli 1 ml fiziológias sóoldatot kapott subcutan. A myocardialis infarctus igazolásának céljából, az isoproterenol injekció beadása után 20 órával meghatároztuk a serum LDH (laktát dehidrogenáz) és myoglobin koncentrációkat, továbbá a szívizom károsodást 1%-os TTC festéssel támasztottuk alá, melyhez a fagyasztott szív szöveti mintákat keresztirányban 2 mm vastag szeletekre vágtuk és 10 percig 37°C-on 1%-os TTC oldatban tartottuk.

Az isoproterenol/fiziológias NaCl kezelést követő 4. héten az állatokat további 2 – futó és nem-futó (szedentáris) – alcsoportra osztottuk. A futó csoport állatait speciális, futókerékkel felszerelt ketrecbe helyeztük át. Minden ketrecbe 2 állatot helyeztünk, a stresszhatás elkerülése, illetve a szocializálás fenntartása érdekében. Edzés protokollként az önkéntes futókerék használat modellt választottuk, amely által a kötelező (kényszerű) edzés okozta stresszt ki tudtuk küszöbölni. Az önkéntes futókerék használat modell esetében az állatok a futókereket a nap 24 órájában szabadon használhatták. Az átlagosan lefutott távolság állatonként napi 4,0 km $\pm$ 10% volt. Az edzés protokollt 6 héten keresztül folytattuk. A nem-futó állatokat standard ketrecekben tartottuk (3 állat/ketrec) az edzési protokoll teljes ideje alatt.

A kísérlet végpontján, a kísérleti állatok 100/5mg/ttkg ketamin/xylazin elegyvel történő exterminálása után a szívizom szövetből két mintát izoláltunk: az egyik mintát TTC-vel megfestettük, a másik mintát pedig szövet homogenizátorral megőröltük, majd -80°C-on tároltuk a további biokémiai vizsgálatok elvégzéséig.

A myocardialis infarctus laboratóriumi paramétereinek meghatározása

LDH és myoglobin koncentráció meghatározása

Az LDH koncentráció meghatározásához, 20 órával az isoproterenol kezelést követően az állatoktól a v. safena-ból vért vettünk. A vérmintákat lecentrifugáltuk (20 perc, 2000 rpm, 4°C). Az így nyert szérumból, forgalomban kapható kiteket (GenAsia Biotech Co., Ltd, Shanghai, China) használva, 450 nm-en meghatároztuk az LDH, illetve a myoglobin koncentrációkat Benchmark Microplate (Bio-Rad) készülékkel. Az LDH koncentrációt U/l, míg a myoglobin koncentrációt ng/ml-ben fejeztük ki.

GOT (glutamát-oxálacetát aszpartát aminotranszferáz), GPT (glutamát-piruvát alanin-aminotranszferáz) és az ALP (alkalikus foszfatáz) koncentráció meghatározása

A GOT, GPT és ALP szintek meghatározása Biolis 24i Premium system (Siemens) analizátorral történt az isoproterenol kezelés után 20 órával levett vérmintából. A GOT és a GPT abszorbanciákat 340 nm-en, az ALP abszorbanciáját pedig 405 nm-en detektálta a készülék, az alkalmazott mértékegység a koncentráció kifejezésére az U/l volt.

A cardiomyociták antioxidáns státusának felmérése

HO-1 aktivitás

A HO-1 aktivitás meghatározásához 70 mg, a patkányokból izolált, myocardialis szövetet 280 ml jéghideg pufferben (10,0 mM HEPES, 32,0 mM szacharóz, 1,0 mM DTT, 0,10 mM EDTA, 10,0 µg/ml tripszin inhibitor, 10,0 µg/ml leupeptin és 2,0 µg/ml aprotinin), (pH=7,4) centrifugálással (20 perc, 15,000 g, 4°C) homogenizáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük és elkészítettük a reagens elegyet. A reagens elegy 1,5 ml össztérfogatban a következőket tartalmazta: 2,0 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 15,0 µM hemin, biliverdin redukáz forrásként 120,0 µg/ml patkány máj cytosol, 2,0 mM MgCl₂·6H₂O, 100,0 mM KH₂PO₄ és 150 µl felülúszó. A kémiai reakciót 100,0 µl redukált β-NADPH hozzáadásával indítottuk el, és jégen való hűtéssel állítottuk le 60 perces 37°C-on történő inkubálás után. A bilirubin koncentrációt 465 és 530 nm-en meghatároztuk, majd kiszámoltuk a két hullámhosszon mért eredmények különbségét. A HO aktivitást az óránként és fehérje mg-ként termelt bilirubin koncentrációban határoztuk meg, nmol-os nagyságrendben.

HO-1 koncentráció

A HO-1 koncentráció szemi-quantitatív meghatározása Western blot vizsgálattal történt. A patkányok szívizomszövetét RIPA pufferben, 10 perces szonikálással (UP-100H, Hielscher, Teltow, Germany) homogenizáltuk. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (10 perc, 12000 rpm, 4°C), majd 5 percig forraltuk. Azonos mennyiségű fehérjét (80 µg) gél-elektroforézissel szeparáltunk 10%-os poliakrilamid gélen (90 V/2 gél), majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk (35 V/2 gél, 2,5 óra). A végső HO-1 jelérzékenységi növelése érdekében a membránokat Pierce Western Blot Signal Enhancer-rel (ThermoFisher Scientific) inkubáltuk, majd egy éjszakán át blokkoltuk 5%-os Tris-pufferolt Tween 20 sóoldatban. Anti HO-1 nyúl poliklonális primer antitesttel (1:500, ab82219, Abcam) 4 órán át szobahőn inkubáltuk a membránokat. A membránokat 3x10 percig TBST oldattal átmostuk, és 1 órán át szekunder antitesttel (bovine anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase, 1:5000, sc-2370, Santa-Cruz Biotechnology) inkubáltuk. Kontroll fehérjének β-aktint használtunk. A detektáláshoz a membránokat éjszakára 5% BSA oldattal blokkoltuk. A mosást követően a membránokat először egér anti-β-aktin antitesttel inkubáltuk (1:4000, 2 óra, ab20272, Abcam), majd poliklonális nyúl egér ellenes HRP ellenanyaggal (1:2000, 1 óra, Dako). A megfelelő fehérje meghatározáshoz MagicMark XP Western protein standardot (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) használtunk. A standard kilenc rekombináns fehérjét (20 és 220 kDa) tartalmaz, és elősegíti mind a HO-1, mind a β-aktin fehérjék azonosítását. Az előhíváshoz Uvi Chemi Pro szkennert, az eredmények kiértékeléséhez és ábrázolásához Quantity One szoftvert (Bio-Rad) használtunk.

Össz-glutation koncentráció

Az izolált patkány szívizom szövetet (70 mg) 4x-es mennyiségű „A” pufferben (0,25 M szacharóz, 1 mM DTT és 20 mM Tris oldat) homogenizáltuk, és 30 percig (15000 g, 4°C) centrifugáltuk, majd 150 µl felülúszóhoz 600 µl B puffert (0,1 M CaCl₂, 0,25 M szacharóz, 20 mM Tris és 1 mM DTT) pipettáztunk. Ezt követően 0°C-on, 30 percig inkubáltuk az elegyet, majd ismét lecentrifugáltuk a mintát (60 perc, 21,450 g, 4°C). Hígító pufferként 125 mM Na-foszfát és 6,0 mM EDTA tartalmú oldatot használtunk a GSH, GSH redukáz, DTNB és β-NADPH törzsoldatokhoz. A plate minden well-jébe a következőket pipettáztuk: 40 µl háttér/standard/minta, 20 µl DTNB törzsoldat és 140 µl β-NADPH, majd 5 percig 25°C-on inkubáltuk a plate-et. A reakció elindítása 10 µl GSH

reduktáz adagolásával történt, és 10 perccel ezután az abszorbanciát 405 nm-en mértük le. A spektrofotometriás vizsgálat során a GSH szakaszosan oxidálódott a DTNB által, illetve a NADPH redukálta, GSH reduktáz jelenlétében. Az össz-GSH koncentrációt nmol/mg fehérje értékben határoztuk meg.

Myocardialis GSH és TNF- α szint

A szívizomszövetet 7,4 pH-jú foszfát pufferben homogenizáltuk (Ultra-Turrax T8, 2×30 s), majd 20 percig (2000 rpm, 4°C) centrifugáltuk. A GSH és TNF- α koncentrációkat kereskedelmi forgalomban kapható kit-kel (GenAsia) 450 nm-en határoztuk meg (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad). A GSH szinteket mg/l, a TNF- α szinteket pedig pg/mg értékben fejeztük ki.

Mieloperoxidáz (MPO) aktivitás

Az MPO aktivitás meghatározásához a szívizom szövetet jéghideg PBS és 0,5%-os hexadecil-trimetil-ammónium-bromid oldattal (pH= 6,0) homogenizáltuk. Háromszori fagyasztás és kiolvasztás után a mintákat lecentrifugáltuk (15 perc, 15000 g, 4°C). A felülúszóból 12- μ l-t hozzáadtunk egy 280 μ l PBS (pH=6,0) és 0,167 mg/ml O-dianisidin-dihidroklorid tartalmú oldathoz és 10 μ l 0,03%-os hidrogén peroxiddal beállítottuk a reakciót. 90 mp-es rázatás után a cardialis MPO aktivitást 490 nm hullámhosszon μ U/fehérje mg értékben határoztuk meg.

Összfehérje szint meghatározása

Az összfehérje koncentráció meghatározásához a Bradford módszert alkalmaztuk. A hígított fehérjemintákból 20 μ l alikvottokat összekevertünk 200 μ l Bradford reagenssel (Bio-Rad Laboratories) és 10 perces keveréses inkubáció után spektrofotometriás módszerrel, 595 nm-en meghatároztuk a fehérje koncentrációkat, melyeket mg/ml értékben fejeztünk ki.

Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlag $\pm$ SE (standard hiba) formátumban ábráztuk. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük, a csoportok közötti különbségek determinálásához pedig egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk, melyet Tukey posttesztel egészítettünk ki. Ha $p \leq 0,05$ volt, az eredményeket szignifikánsnak tekintettük. Ezen kívül megvizsgáltuk a három paraméter (ISO kezelés, ösztrogén státusz és testmozgás) párosított kombinációinak kölcsönhatását kétutas ANOVA-val és Tukey posttesztel.

Eredmények

A testmozgás szívizomra gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen

Az ösztrogén hiány, a diéta és a testmozgás hatása a cardialis MMP-2 aktivitásra

Annak érdekében, hogy felderítsük, milyen szerepet játszanak a cardialis fibrosis pathomechanizmusában az ösztrogén hiány, a diéta és a testmozgás, meghatároztuk az MMP-2 fehérjék 64kDa és 72kDa izotípusainak aktivitását a kísérlet végpontján. Az SO-HT-F, az OVX-KTRL-NF és az OVX-HT-NF csoportoknál a 64kDa MMP-2 aktivitása szignifikánsan kisebb volt ($p < 0,05$) az SO-KTRL-NF csoporthoz viszonyítva. A testmozgás jelentősen megemelte ($p < 0,05$) a fehérje aktivitását mind az SO-HT-F, mind pedig az OVX-CTR-F és OVX-HT-F csoportok állatainál, a nem futó társaikkal szemben. A futó állatoknál azt tapasztaltuk, hogy a zsírdús táplálék szignifikánsan csökkentette ($p < 0,05$) az értékeket mind az álműtött, mind pedig az ovariectomizált csoportokban.

A 72kDa izoforma aktivitása jelentősen alacsonyabb volt a zsírdús táppal etetett ovariectomizált nem-futó állatoknál. A testmozgás jelentősen javította az értékeket, mind az álműtött, mind pedig az OVX állatoknál, a kontroll csoporthoz viszonyítva, illetve a nem-futó társaikhoz viszonyítva ($p < 0,05$). A legmagasabb értékeket viszont az SO-KTRL-F állatoknál kaptuk.

A 3-NT (3-nitrotirozin) szint változásai

A 3-nitrotirozin szintje a myocardiumban jelentősen kisebb ($p < 0,05$) volt az ovariectomizált csoportokban a kontroll csoporthoz viszonyítva. A zsírdús diéta hatására az álműtött állatoknál is tapasztaltunk 3-NT szint csökkenést, viszont ez nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét. A testmozgás jelentős mértékben növelte ($p < 0,05$) a zsírdús táppal etetett állatok (SO és OVX) 3-NT szintjét a nem futó társaikkal szemben, ezzel ellentétben az OVX-KTRL-F csoportban szignifikáns csökkenést ($p < 0,05$) észleltünk.

A GSH szint változásai

A kísérlet végpontján, spektrofotometriás módszerrel mért GSH szintek a testmozgást nem végző csoportokban (SO-HT-NF, OVX-KTRL-NF és OVX-HT-NF) jelentősen lecsökkentek ($p < 0,05$) a kontrol csoporttal szemben. A testmozgás szignifikánsan megemelte ($p < 0,05$) a GSH szinteket a nem-futó állatokhoz viszonyítva.

A TIMP-2 szint változásai

A cardialis TIMP-2 koncentráció meghatározása alapvető az MMP-TIMP rendszer myocardialis extracelluláris mátrix egyensúlyának megőrzésében játszott szerepének a meghatározásában. Eredményeink azt mutatják, hogy a zsírdús diéta és az ösztrogén hiány csökkenti ($p < 0,05$) a TIMP-2 koncentrációt a myocardiumban, viszont a testmozgás szignifikáns növekedést ($p < 0,05$) indukált mindegyik csoportban a szedentáris állatokhoz viszonyítva.

Az I-es típusú kollagén szint változásai

Feltételezésünk szerint a rendszeres testmozgás módosítja a fibrotikus szövet felhalmozódását a szívizomban, ezért az I-es típusú kollagén koncentrációt is megmértük, ELISA módszer alkalmazásával. Mint az várható volt,

az ösztrogén hiány és a zsírdús táplálék kollagén felhalmozódást idézett elő, melyet a testmozgás képes volt szignifikánsan lecsökkenteni az OVX-HT-F csoport állatainál.

A myocardialis infarctus okozta necroticus terület változásai

A zsírdús diéta önmagában is, viszont ösztrogén deplécióval társítva jelentősen megemelte a myocardialis infarctus okozta necrotikus terület mértékét ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz viszonyítva, mely hatásokat a rendszeres testmozgás szignifikánsan ($p < 0,05$) redukált mindegyik futó csoportban.

A testmozgás utókezelésként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen

A serum östradiol szint változása

A szérum östradiol szint, melyet két triptorelin injekció beadása után határoztunk meg, jelentősen lecsökkent a POVX állatoknál: KTRL: $290,92 \pm 3,10$ ng/l vs. POVX: $160,90 \pm 2,98$ ng/l. ($p < 0,0001$)

Az ISO kezelés hatása a myocardialis infarctus markereire

A serum laktát dehidrogenáz aktivitás 20 órával az ISO kezelést követően szignifikánsan megemelkedett mind a kontroll, mind pedig a POVX csoportban. A myoglobin koncentráció az ISO kezelést követően a mindkét ISO kezelt csoportban megemelkedett, ugyanakkor az ISO-POVX csoportban az ISO-KTRL csoporthoz viszonyítva is markáns emelkedést mutatott.

Míg a 0,1 mg/kg ISO-kezelés szignifikáns mértékben növeli a GOT koncentrációkat a KTRL és a POVX csoportokban egyaránt, sem a POVX, sem az ISO nem változtatta meg a szérum GPT szinteket. A szérum ALP szignifikánsan emelkedett a POVX csoportokban, összehasonlítva a KTRL csoportokkal, az ISO kezelés pedig tovább növelte az ALP koncentrációkat a POVX csoportokban, ellentétben a KTRL-ISO csoporttal.

A HO-1 koncentráció és aktivitás változása

A testedzés antioxidáns homeosztázisra gyakorolt hatásait a cardiomyocyták HO-1 aktivitásának és koncentrációjának meghatározásával mértük fel a 6 hetes kezelési periódus végén. A HO-1 aktivitás az ISO-KTRL csoportban csökkent a negatív kontrollhoz képest. Az ISO-POVX csoportban a csökkenés viszont már szignifikáns volt a KTRL csoporthoz viszonyítva. A 6 hetes testmozgás eredményeképpen megfigyelhető a HO-1 aktivitás emelkedése minden csoportban, a nem futó csoportokkal szemben, viszont szignifikánsan magasabb értékeket a KTRL, ISO-KTRL, illetve ISO-POVX csoportokban találtunk.

A HO-1 expressziója jelentősen lecsökkent a farmakológiailag indukált ovariectomia következtében a nem futó állatoknál a saját kontroll csoportjukhoz viszonyítva, a testmozgás azonban jelentős mértékben javította az expressziót ugyanazon csoportban a nem futó állatokkal összehasonlítva.

A GSH+GSSG, illetve GSH koncentráció változásai

A kontroll állatokhoz viszonyítva a POVX és a POVX-ISO csoportok állatainál a GSH és a glutation diszulfid aktivitás (GSH + GSSG) a szívizomban szignifikánsan lecsökkent. A testmozgás eredményeként szignifikánsan javulást tapasztaltunk mind a CTRL, mind a POVX patkányok GSH szintjében, amelyeket azonban az ösztrogénhiány és az ISO kezelés csökkentett. Mindazonáltal szignifikáns összefüggést ($p = 0,0176$) találtunk az edzés és az ösztrogén státusz között.

A továbbiakban meghatároztuk a GSH koncentrációját a szívizom sejtekben. Egyszeri ISO dózis hatására a GSH koncentráció lecsökkent minden ISO-kezelt csoportban, szignifikáns csökkenést viszont csak az ISO-KTRL és futó-ISO-POVX csoportokban észleltünk, összehasonlítva a nem ISO kezelt csoportokkal. További eredmény, hogy az ösztrogénhiányos állatokban az abszolút KTRL csoportba tartozó állatokhoz viszonyítva a GSH-koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt. A 6 hetes edzés javította az ösztrogénhiány okozta GSH szintváltozásokat, mind a POVX, mind pedig az ISO-POVX csoportokban. Eredményeink tehát egy szignifikáns interakciót mutatnak a testmozgás, az ösztrogén koncentráció és a GSH szintek között ($p = 0,0164$).

A cardialis TNF- α koncentráció változásai

Amint az várható volt, a TNF- α koncentrációja jelentősen megemelkedett az ösztrogénhiányos állatoknál, melyeket a 6 hetes edzés szignifikánsan lecsökkentett ($p = 0,011$).

A cardialis MPO aktivitás változásai

A kísérlet végpontján a myocardium MPO aktivitását is meghatároztuk, mely a feltételezéseinkkel megegyezően szignifikánsan magas értékeket mutatott a POVX és ISO-POVX csoportoknál a kontroll állatokkal összehasonlítva. A 6 hetes edzés azonban az MPO kóros aktivitást képes volt helyreállítani az ösztrogénhiányos állatoknál, a nem-futó társaikkal szemben. Eredményeink tehát bizonyítják egyrészt, hogy a testmozgás és az ösztrogén státusz is szignifikánsan befolyásolja a cardialis MPO aktivitását ($p = 0,0077$), másrészt pedig a testmozgás hatékonyságát a gyulladásos folyamatok helyreállításában (MPO aktivitás csökkenése).

Megbeszélés

A testmozgás szívizomra gyakorolt hatásainak vizsgálata ovariectomia indukálta patkány modellen

A CV betegségek világszerte a halálozási okok első helyét foglalják el. A WHO 2016. évi adatai alapján évente 17,9 millió ember halálát okozzák a különböző CV kórképek. Számos kockázati tényező játszik szerepet a betegségek – akár korai – kialakulásában, melyek közül a gyulladás, a dyslipidaemiák, az ösztrogén hiány, az antioxidáns státusz egyensúlyának változásai, a szedentáris életmód leggyakoribb következményei a szívhypertrophia és a szívelégtelenség. Jellemző elváltozások a szívizom remodelling-je, a fibrosis, a kollagén beszűrődés, és az oxigénhiány miatti apoptosis és cardiomyocytolysis, melyek tovább súlyosbítják az említett kórképek prognózist.

A fizikai aktivitás egy biztonságos nem gyógyszeres terápiás eszköz lehet a CV megbetegedések megelőzésében és kezelésében az egészségmegőrző hatásai miatt, mint például öregedés indukálta cardiomyocytolysis és a szívelégtelenség kockázatának a csökkentése, illetve a szív pumpa funkciójának javítása.

Egyre több kutatás irányul annak bizonyítására, hogy a szigorúan szabályozott ECM homeosztázis jelentős mértékben befolyásolhatja a szív működését. Cardialis fibrosisban jelentős ECM fehérje, elsődlegesen kollagén felhalmozódás figyelhető meg, mely nagymértékben elősegíti a cardiomyociták remodelling-jét, és ennek következtében az extrém izom merevséget, hypertrophit és akár akut MI-t. Az interstitialis kollagén depozitumok felhalmozódása az öregedési folyamatok, a myocardialis ischaemia, gyulladásos folyamatok, diabetes vagy hormonok hatására egyaránt kialakulhat. A nemi hormonok és receptoraik jelentős szerepet játszanak az ECM fehérjék szabályozásában. Továbbá, az MMP-2, a peroxinitrit (ONOO⁻) és a glutation között megfigyelt kölcsönhatások új irány nyitnak a szív pathophysiológiájának tanulmányozásában ösztrogén deficiens állapotokban.

Következésképpen megvizsgáltuk az ösztrogén depléción indukálta kollagén felhalmozódás és a fibrosis pathomechanizmusát, mely az MMP-2 downreguláció és a szívhypertrophia révén jelentkezhetnek. Eredményeink is azt mutatják, hogy az ösztrogén hiány és a magas triglicerid tartalmú diéta szignifikánsan megemeli a cardialis kollagén és csökkenti a 3-NT, valamint a GSH koncentrációkat. Mindazonáltal bizonyítottuk, hogy a 12 hetes mérsékelt testmozgás csökkenti a szívizom fibrosist az ovariectomizált állatoknál, feltételezhetően a GSH/3-NT és MMP-2 reguláción keresztül. Korábbi eredményeink azt is bizonyították, hogy az ovariectomia előidézte vérnyomás emelkedés ugyancsak részt vesz az említett elváltozások mechanizmusában. Az endogén és exogén ösztrogén antioxidáns hatása döntő szerepet játszik a vazoprotektív hatások kiváltásában, amit az is alátámaszt, hogy postmenopausás nőkben és állatokban az oxidatív stressz folyamatok fokozódnak. Pedram és mtsai. bizonyították, hogy az ösztrogén megakadályozza a szív remodellinget a myofibroblast, valamint a kollagén és fibronectin termelés szabályozása által, míg az ösztrogén csökkenti az ECM turnover-t és védelmet biztosít a cardiomyociták apoptosisa és az ösztrogén megvonás ellen, mely bal kamra hypertrophit, kollagén lerakódást és a vasoconstrictor anyagokkal - mint angiotenzin II - szembeni érzékenységet fokozódot idéz elő. Eredményeink, az irodalommal összhangban, azt mutatják, hogy az ovariectomia az I. típusú kollagén felhalmozódás következtében szívizom károsodást vált ki. A fibrosis ugyancsak multifaktoriális, továbbá az ECM metabolizmus szabályozásához köthető molekuláris mechanizmusok számos jelátviteli útvonalat érintenek. Széles körben elfogadott tények, hogy a mozgáshiány, a szedentáris életmód, a keringő ösztrogén szint csökkenése, az oxidatív stressz és öregedési folyamatok

közrejátszanak a kollagén mátrix túlzott felhalmozódásában és a cardialis dysfunctio progressziójában, azonban a testmozgás által kiváltott szívizom fibrosis csökkenés pathomechanizmusa még nem teljes mértékben tisztázott. Jelen kutatásunk az önkéntes testmozgás és a diéta MMP-2 regulációra kifejtett hatásainak vizsgálatára összpontosított. A MMP-ok és szöveti inhibitoraik mind normál, mind pedig patológiás körülmények között szabályozzák az ECM profilt, ennek értelmében a MMP-ok és a metalloproteinázok szöveti inhibitorai (TIMPs – The tissue inhibitors of metalloproteinases) közötti egyensúly határozza meg a szív remodellinget. Egy korábbi tanulmányban Felix és mtsai. bizonyították, hogy a petefészek hormonok hiánya jelentős mértékben károsítja a szív morphológiáját, miközben az alacsony intenzitású aerob jellegű mozgás megakadályozza a fibrosis proliferációját. Viszont a kutatócsoport nem vizsgálta az MMP-2 regulációs mechanizmusait. Kwak és mtsai. a kollagén profil változásait vizsgálták a testmozgás hatására és bizonyították a testmozgás védő hatását az életkorral összefüggő aktív MMP-k downregulációjával szemben.

Kutatásaink bizonyították, hogy 12 hét önkéntes testmozgás jelentősen növelte az MMP-2 aktivitást, és ezáltal védelmet biztosít a kollagén akkumulációval és a fibrosissal szemben. Az MMP-2 lebontja az ECM fehérjét, melyek szerepet játszanak a szív remodellingben. Ezen kívül megállapítottuk, hogy a testmozgás csökkenti az I. típusú kollagén szintet és javítja az MMMP/TIMP arányt, kialakítva ezáltal a védőhatást a szívkárosodásokkal szemben.

Jelen tanulmányunkban kimutattuk, hogy a 12 hetes testmozgás hatására az infarctusos terület szignifikánsan lecsökkent, továbbá enyhítette az ösztrogén hiány, a zsírdús diéta és az elhízással összefüggő necroticus terület mértékét ischaemia/reperfusio modellben. Számos tanulmány alátámasztja azt a tényt, hogy a klimaxos és postmenopausás időszakokban a nőknél megnövekszik a CV kockázat, beleértve a MI-t, mely elsődlegesen a fokozott oxidatív károsodáshoz és a NO biológiai hasznosulásának csökkenéséhez köthető. A rendszeres testmozgás egy nem farmakológiai terápiás lehetőségnek számít a CV megbetegedések prevenciójában nők és férfiak esetében egyaránt. Az infarctus mértékét minimalizálhatja a fizikai aktivitás előidézte myocardialis capillaris functio, intracellularis redox egyensúly, és NO termelés okozta endothel dysfunctio javulása. Almeida és mtsai. arról számoltak be, hogy a testmozgás csökkentette az egyik legjelentősebb oxidatív stressz útvonal fehérje expresszióját, ugyanakkor fokozta az antioxidáns kataláz enzim aktivitását, melyek egyaránt javították a szív funkcióit és a remodellinget ovariectomizált postinfarctusos patkányoknál. Klinikai vizsgálatok is igazolták, hogy a szív fibrosis szorosan összefügg az elhízással és hozzájárul a cardialis dysfunctio kialakulásához obez nők esetében. Kosmala és mtsai. szerint pedig a bal kamra működés zavarai az MMP/TIMP rendszer változásaihoz kapcsolódnak, mely változások elősegíthetik az ECM fehérjék degradációjának csökkenését az MMP-2 downreguláció következtében elhízott nőknél.

Kísérleti protokollunkban a testmozgás szignifikánsan növelte az MMP-2 aktivitást és csökkentette a kollagén felhalmozódást a szívizomban az álműtött és az ovariectomizált állatoknál egyaránt. Ezáltal a testmozgás fontos profilaktikus stratégiát jelenthet a szívbetegségek megelőzésében és kezelésében. A testmozgás indukálta kollagén turnover és cardioprotekció mechanizmusa az MMP/TIMP profilhoz kapcsolódik és az MMP útvonal aktivációjának az eredménye. Az MMP-2 aktiválása kétféleképpen történhet, proteolitikus és nem proteolitikus módon. A 72 kDa zymogen proteolitikus aktiválása az autoinhibitor propeptid eltávolításával az aktív 64 kDa MMP-2 termelését idézi elő, vagy a peroxinitrit celluláris glutation jelenlétében előidézett poszttranszlációs módosítást követően alakul át. A peroxinitrit – a szuperoxid anion és a NO terméke – MMP-2 aktiváló vagy deprimáló kapacitása még vitatott. Rajagopalan és mtsai. megállapították, hogy a peroxinitrit fokozza a

tisztítatlan MMP-2 aktivitását a simaizom sejtekben. Az oxidatív stressz okozta poszttranszlációs változások az MMP-2 aktiválását idézhetik elő. Az intracelluláris glutation és peroxinitrit okozhat S-glutation termelést, konformációs változásokat, melyek az MMP aktív formájának a termelődését segítik elő. A GSH egy nem enzimikus antioxidáns a sejtekben, és a koncentrációjának csökkenése az oxidatív károsodás egyik legfontosabb markere. Kísérleteinkben az ösztrogén hiány és a zsírdús táplálkozás jelentősen csökkentette a GSH koncentrációját. Más tanulmányokkal összhangban azt tapasztaltuk, hogy a 12 hetes testmozgás képes visszaállítani a GSH koncentrációját. A GSH, a redox homeosztázis fenntartása révén kulcsfontosságú szerepet játszik a cardialis funkciók megtartásában. Frasier és mtsai. bebizonyították, hogy a fizikai aktivitás fenntartja a szív GSH raktárait és csökkenti az ischaemia indukálta szívkárosodás mértékét. Azonban az MMP-k funkcionális tulajdonságainak összetettsége bizonyos korlátokat is feltételez, az MMP-2 aktiválása pedig különösen a CV patológiában nem egységes. Mindemellett más tanulmányok nem vizsgálták az életmód változtatás (ösztrogén hiány, testmozgás, diéta) szerepét az MMP-2 aktiválásában és szabályozásában.

Következtetésképpen elmondható, hogy a 12 hetes testmozgás növeli a cardialis 3-NT és GSH koncentrációkat, mely a 72 kDa MMP-2 aktiválással együttesen jelentős szerepet játszik a szív fibrosis kivédésében. Ezek az adatok összhangban vannak a korábbi eredményeinkkel, miszerint a testmozgás előidézte az MMP-2 aktivációt és az MMP/TIMP egyensúly fenntartása hozzájárul a cardioprotekcióhoz és terápiás lehetőségként is szolgálhat szív remodelling esetében.

A testmozgás postconditionálásként való alkalmazásának hatása farmakológiailag indukált menopausában patkány modellen

A CV megbetegedések vezető morbiditási és halálozási oknak tekinthetők postmenopausás nők esetében, mivel az ösztrogén hiány negatív hatásokat okoz mind az anyagcserében, mind pedig a CV funkciókban. A menopausa test zsíreloszlási zavarokkal, lipid és glükóz anyagcsere betegségekkel, hypertóniával, gyulladással társul, ami a CV rendellenességek, elsődlegesen a MI kockázatát jelentősen növeli. Több kutatás bizonyította, hogy az ösztrogén hiánya káros hatást fejt ki a szív- és érrendszerre, illetve a gyulladásos státusra: csökkenti a NO biológiai hasznosulását, növeli az aorta reaktivitását, fokozza a gyulladásos reakciókat és az oxidatív stresszt, melyek összességében negatívan befolyásolják a várható élettartamot postmenopausás postinfarctusos nők esetében.

A legtöbb preklinikai és klinikai tanulmány bizonyította, hogy a testmozgás hatásos megelőző stratégia a MI profilaxisában, azonban kevés vizsgálat irányult a testmozgás hatásainak vizsgálatára infarctus utáni állapotokban.

Tanulmányunk célja az önkéntes testmozgás oxidáns/antioxidáns homeosztázis, valamint a gyulladásos státus változásaira kifejtett hatásainak vizsgálata postinfarctusos állapotban. Vizsgálatainkhoz egy noninvasív állatmodellt választottunk, melyben az ösztrogén hiányt triptorelin adásával, a MI-t pedig egy dózis ISO adásával idéztük elő. A „coronaria lekötés” beavatkozással ellentétben, mely esetében a morbiditás és a mortalitás lényegesen nagyobb, az ISO indukálta MI patkánymodell esetében a CV hatások megbízhatóbbak, továbbá a mortalitás is sokkal alacsonyabb. A leghatásosabb dózis meghatározásának érdekében 5 különböző dózisban – 100; 10; 1; 0,1 és 0,01 mg/kg – alkalmaztuk az ISO-t. A mortalitási adataink alapján a 0,1 mg/kg dózis bizonyult optimálisnak MI laesiók kialakítására ösztrogén deficiens nőstény állatoknál. A munkacsoportunk által alkalmazott túlélő patkány modellben a subcutan ISO kezelés jelentősen megemelte a

myocardialis necrosis serum markereit, mint az LDH, myoglobin, GOT és ALP, mely eredmény számos korábbi tanulmánnyal van összhangban. Ezen felül a myocardialis laesio kiterjedését is meghatároztuk TTC festéssel ISO-kezelt és POVX állatok szívizom mintáiban egyaránt.

Egyszeri 0,1 mg/kg ISO kezelés az ISO-KTRL csoport állatainál 15,83%-os, míg az ISO-POVX csoportnál 23,54%-os necrosist idézett elő. Napjainkban egyre több kutatás irányul egyrészt az akut ISO kezelés következményeinek tanulmányozására, és egyidejűleg különböző, potenciálisan profilaktikus hatóanyagok vizsgálatára ISO-kezelés indukálta MI-ban. Legjobb tudomásunk szerint tanulmányunk, mely az ISO-kezelés hosszú távú hatásainak tanulmányozására, illetve a testmozgás szerepének vizsgálatára irányult noninvazív MI patkánymodellben, egyedülálló. Köztudott tény, hogy az ISO-kezelés fokozza a gyulladásos folyamatokat és aktiválja a szabadgyökök képződést, következésképpen felmerül a kérdés, hogy mikor ajánlott elkezdni a fizikai aktivitást és milyen intenzitással javasolt a testmozgás végzése a MI okozta szívizom károsodás szignifikáns javulásának érdekében. Garza és mtsai. összefoglalták azokat az irodalmi adatokat, melyek igazolják a tényt, hogy a MI után azonnal elkezdett testmozgás kiterjeszti a myocardialis necrosist, a korai edzés (kevesebb, mint 1 héttel a MI után) súlyosbíthatja a bal kamra remodellinget, viszont a később elkezdett edzés (3 héttel a MI után) nem rontja a betegség prognózisát.

Jelen kutatási protokollunkban a patkányok 3 héttel az ISO-kezelést követően kezdték el az önkéntes futókerék edzést. Az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a testmozgás cardioprotektív hatása a HO enzim fokozott aktivitásának és expressziójának következménye KTRL és a POVX csoportokban egyaránt. A HO és termékei rendelkeznek mind rövid, mind pedig hosszú távú cardioprotektív hatásokkal. A HO a hemet biológiailag aktív metabolitokká konvertálja, mint például a szénmonoxid (CO), vas, biliverdin, mely utóbbit a citoszolikus biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja át. Az említett citoprotektív végtermékek csökkentik az apoptosist és a gyulladást, szabályozzák a vasomotoros tónust, továbbá antioxidáns és immunmoduláns tulajdonságokkal is rendelkeznek. Miközben az ösztrogén hiány és/vagy a korai ISO-kezelés a HO enzim aktivitását és expresszióját is jelentősen lecsökkenti, a 6 hetes önkéntes edzés visszaállította az oxidáns/antioxidáns egyensúlyt. Ren és mtsai. spontán hypertoniás patkányokon végzett kísérleteikben azt tapasztalták, hogy a mérsékelt aerob szerű edzés szignifikánsan növelte a HO aktivitást és expressziót az aorta és myocardium szövetmintákban. Következésképpen az edzés indukálta HO upreguláció fokozza az endogén CO termelést és részt vesz a cGMP (ciklikus guanozin-monofoszfát) szintek szabályozásában az érfaltónus megtartásának érdekében. A HO enzim farmakológiailag aktív hatóanyagok vagy edzés általi aktivációja javítja a postinfarctusos cardialis funkciókat, csökkenti az apoptosist, a gyulladásos sejtes infiltrációt és az oxidatív károsodásokat. Wang és mtsai egér modellen bizonyították a HO overexpresszió postinfarctusos túlélést javító, továbbá bal kamra dilatációt, apoptosist, fibrosist és oxidatív károsodást csökkentő hatásait. Az oxidatív stressz károsodás fokozódása a reaktív oxigéngyökök és az antioxidáns rendszer aktivitása közötti egyensúly felbomlásának tulajdonítható. Lobo Filho és mtsai. az antioxidáns enzimek, mint kataláz és GSH koncentrációjának progresszív csökkenését figyelték meg a MI korai stádiumában. MI-ban a szuperoxid gyökök megváltoztatják az antioxidáns rendszer működését és szívizom károsodást idéznek elő. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az ISO beadása a szív GSH koncentrációját hosszú távon befolyásolja, csökkentve a GSH szintet a kontroll, de főként a POVX csoportokban. A HO enzimhez hasonlóan a GSH értékek is javultak a testmozgás hatására. A GSH a fehérjék redox státusának szabályozása révén védi a szívizmot az oxidatív stressz okozta károsító hatásokkal szemben. Mind a GSH, mind pedig a HO útvonal jelentős antioxidáns hatásokkal

rendelkezik és biztosítja a fiziológias citoprotekciót. A hem metabolizmus végtermékeként a bilirubin széles körű védelmet nyújt a lipid peroxidációval szemben, miközben a GSH elsődlegesen a vízdékony fehérjék oxidációját gátolja. A fizikai aktivitás által megnövekedett antioxidáns kapacitás összefüggésbe hozható a GSH szívizomban kifejtett szabadgyök eltávolító képességével. Számos tanulmány támasztja alá a HO-1 enzim szerepét az oxidáns/antioxidáns homeosztázis fenntartásában. A HO-1 enzim működésének transzkripció szabályozásában az antioxidáns válasz kulcsfontosságú regulátora az Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) fehérje. Az Nrf2 meghatározó szerepet játszik a cisztein felvétel szabályozásában, mely az oxidatív stressz elleni védelemhez vezet az intracelluláris GSH és cisztein szintek megtartása révén. Yu és mtsai. is beszámoltak az Nrf2/HO-1 útvonal CV patológiában betöltött szerepéről. Bizonyították, hogy az Nrf2/HO-1 jelátvitel aktiválása csökkenti a necrosist, a gyulladásos és az oxidatív folyamatokat. Jelen szabályozási mechanizmus tanulmányozása átfogóbb bizonyítékokat szolgáltat a testmozgás és annak antioxidáns hatásainak vizsgálatára irányuló jövőbeni kutatásainkhoz. Az antioxidáns hatásokon kívül a testmozgás indukálta HO-1 aktivitásfokozódás a gyulladásos folyamatokkal szemben is védelmet nyújt, továbbá a biliverdin és az endogén CO termelés növelésével indukálja a HO-1 aktivitás upregulációját. A CO gátolja a lipopoliszacharid által közvetített proinflammatorikus mediátorok – TNF- α és IL-1 β – felszabadulását, ugyanakkor az antiinflammatorikus mediátorok – IL-10 - expresszióját fokozza. Több tanulmány is bizonyította a fizikai inaktivitás és egy alacsonyabb fokú gyulladásos állapot közötti összefüggést, ami tovább fokozza az öregedéssel összefüggő betegségek kialakulásának kockázatát. Kutatásainkban a POVX által kiváltott ösztrogén deficiencia idézte elő a legnagyobb mértékű válaszreakciót a TNF- α és MPO aktivitás fokozásával. A MPO a lipoproteinek oxidatív elváltozásait katalizálja és endothelialis NO-t használ el, ezáltal károsítva a CV rendszert, elsődlegesen az értágító funkciót. A MPO a gyulladás egyik korai biomarkere és jelentős szerepet játszik a CV betegségek előidézésében és progressziójában. Korábbi vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy az ön-protoporfirin IX (SnPP) – amely a HO egyik legerősebb kompetitív gátlója – 30 $\mu\text{g/kg}$ dózisú kezelés szignifikánsan megemelte a cardialis MPO aktivitást az egészséges és ösztrogénhiányos patkányoknál egyaránt. Továbbá, a HO knock-out egér modell szintén bizonyította a HO-1 gyulladásban betöltött szerepét. Kapturczak és mtsai. észrevették, hogy a HO-1 hiányos állatoknál fokozódik a proinflammatorikus citokinek termelése és progresszív gyulladásos folyamat alakul ki. Hat hetes futókerék edzés, feltételezhetően az antiinflammatorikus hatása révén csökkentette a szívben az MPO aktivitást és a TNF- α szintet, ezáltal mérsékelve a szívizom gyulladásos állapotát.

Következtetésképpen elmondhatjuk, hogy a hat héten át tartó önkéntes futókerék edzés javította a cardialis antioxidáns és gyulladásos státuszt az alkalmazott nem invazív MI állatmodellben. A testmozgás cardioprotektív hatásának feltételezett mechanizmusai összefüggenek a HO enzim aktivitásának és expressziójának a fokozódásával, illetve a GSH szint növekedésével, melyek a gyulladásos válaszreakciót csökkentik a szívizomban. Ebből adódóan az önkéntes testmozgás potenciális terápiás célpontot jelenthet menopausás MI-on átesett nőknél a CV szövődmények kivédésében és kezelésében.

Összefoglalás

Az első vizsgálatban a testmozgásnak a myocardiumra gyakorolt hatását vizsgáltuk petefészek-eltávolítás által kiváltott ösztrogénhiányos patkánymodellben. A tanulmány az ECM szívműködésben betöltött szerepére összpontosított. A myocardialis fibrosis, amelyet a szívben a kollagén túlzott felhalmozódása jellemez, káros szívizom-átalakításhoz és diszfunkcióhoz vezethet, és az ösztrogénhiány az állapot kialakulásához hozzájáruló tényezőként azonosítható. Az eredmények azt mutatták, hogy 12 hét mérsékelt testmozgás hatékonyan csökkentette a myocardialis fibrosist petefészek-eltávolított patkányokban. Úgy tűnt, hogy az edzés szabályozza a GSH-t, a peroxinitritet és a MMP-2-t, ami megnövekedett MMP-2 aktivitáshoz vezetett, ami elősegítette az ECM fehérjék lebontását és megakadályozta a kollagén felhalmozódását. A testmozgás az infarktusos területet is csökkentette, különösen ösztrogénhiány, zsíros étrend és elhízás esetén. Ez a csökkenés a capillarisok funkciójának, az intracelluláris redox egyensúlynak és az endothel funkciónak a javulását eredményezi. Következésképpen az edzés előnyei közé tartozott az MMP-2 útvonal modulálása, az ECM fehérje egyensúly fenntartása és a szívvel kapcsolatos szövődmények elleni védelem.

A második vizsgálatban utókezelési megközelítésként az önkéntes testmozgás hatásait vizsgáltuk egy olyan patkánymodellben, amelyben triptorelin beadása által ösztrogénhiányt és ISO adásával MI-t váltottunk ki. Míg a korábbi kutatások rávilágítottak a testmozgásnak a MI-ra gyakorolt megelőző hatásaira, ez a tanulmány a post-infarctusos állapotot javító hatásokra összpontosított. Az ISO kezelés gyulladást és szabadgyökképződést váltott ki, ami kérdéseket vet fel a post-infarctusos edzés időzítésével és intenzitásával kapcsolatban. A vizsgálat megállapította, hogy a testmozgás korai megkezdése ronthatja a bal kamra remodellinget, viszont a későbbi megkezdés nem rontotta az állapotot. A testmozgás gyulladáscsökkentő hatást is kifejtett a myocardialis MPO és a TNF- α szintjének csökkentése révén. Összefoglalva, az akaratlagos testmozgásnak cardioprotektív hatásai voltak egy farmakológiailag indukált menopausalis és post-infarctusos patkánymodellben. A lehetséges pathomechanizmusok között a megnövekedett HO enzimaktivitás, az emelkedett GSH-szint és a myocardialis gyulladás csökkentése kiemelt jelentőségű.

Összefoglalásként elmondható, hogy a testmozgás alapvető tényező a CV megbetegedések kockázatának csökkentésében a postmenopausás nők körében. Előnyök széles skáláját kínálja, beleértve a CV rendszer szerkezeti és funkcionális fejlesztését, a hormonális szabályozást, a gyulladáskezelést és az anyagcsere javulását. Azonban meg kell jegyezni, hogy létfontosságú a testmozgást a hormonális változásokhoz igazítani a postmenopausás nők szív- és érrendszeri funkcióinak, valamint általános egészségének megőrzése érdekében.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Szilvássy Zoltán Intézetvezető egyetemi tanárnak és egyetemünk rektorának, hogy biztosította számomra a kutatás feltételeit a DE Laki Kálmán Doktori Iskola keretein belül.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Dr. Pósa Anikó egyetemi docensnek és Prof. Dr. Juhász Béla egyetemi tanárnak, hogy PhD hallgatójuknak fogadtak és a közös munkánk során biztosított magas szintű szakmai útmutatásért, akiknek bölcs tanácsaira, gondolatébresztő meglátásaira és folytonos támogatására mindig számíthattam kutatómunkám során.

Köszönettel tartozom 2023. október 8-án elhunyt Prof. Dr. Csernátorny Zoltán Lajos egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Ortopédiai és Traumatológiai Klinika volt Igazgatójának, hogy az általa vezetett intézményben gyakorolhattam a hivatásom, továbbá biztosította számomra a lehetőséget tudományos munkám elvégzéséhez. Hálás köszönet egykori és jelenlegi munkatársaimnak, hogy biztosították a kiváló munkahelyi légkört, ami nagymértékben járult hozzá a disszertáció létrejöttéhez.

Nem fejezhetem ki eléggé hálámat Drága Családomnak és Barátaimnak a határtalan támogatásukért, türelmükért és szeretetükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm az SZTE, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi munkatársának, valamint a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet munkatársainak a segítséget.



Nyilvántartási szám: DEENK/473/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Karácsonyi Zoltán

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabó, R., Börzsei, D., **Karácsonyi, Z.**, Gesztelyi, R., Nemes, K., Magyariné Berkó, A., Veszélka, M., Török, S., Kupai, K., Varga, C., Juhász, B., Pósa, A.: Postconditioning like effect of exercise- New paradigm in experimental menopause.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 316 (2), H400-H407, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00485.2018>
IF: 3.864
2. Szabó, R.*, **Karácsonyi, Z.***, Börzsei, D., Juhász, B., Al, a. A., Török, S., Magyariné Berkó, A., Takács, I., Kupai, K., Varga, C., Pósa, A.: Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats.
Ox. Med. Cell. Longevity. 2018, 1-9, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6709742>
* These authors contributed equally to this work.
IF: 4.868

További közlemények

3. **Karácsonyi, Z.**, Erdei, T. D.: A gyógyszereszi gondozás lehetőségei az ortopédiai gyakorlatban.
Eü. Innov. Szle. 2 (1), 35-47, 2023.
4. Börzsei, D., Priksz, D., Szabó, R., Bombicz, M., **Karácsonyi, Z.**, Puskás, L. G., Fehér, L. Z., Radák, Z., Kupai, K., Magyariné Berkó, A., Varga, C., Juhász, B., Pósa, A.: Exercise mitigated sex-based differences in aging: from genetic alterations to heart performance.
Am. J. Physiol.-Heart Circul. Physiol. 320 (2), 854-866, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00643.2020>
IF: 5.125





5. Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, É., Takács, R. Á., Soha, R. F., Szabó, I. A., Cserhádi, C., Sződy, R., **Karácsonyi, Z.**, Bakó, É., Gergely, P., Zákány, R.: Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures.
Cell. Signal. 26 (3), 468-482, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001>
IF: 4.315
6. **Karácsonyi, Z.**, Gáspár, L., Csernátó, Z.: Protézisnyak törésének különleges megoldása.
Magyar Traum. Ort. Kézs. Plaszt. Seb. 53 (4), 343-346, 2010.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,172

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,732**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.10.24.

