

Az állóképességi edzés hatása a mitokondriális
biogenezisre edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett
patkányoknál

Doktori tézisek

Marton Orsolya

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Váczi Márk, egyetemi docens, PhD

Dr. Szabó Tamás, egyetemi magántanár, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor, professor emeritus, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: †Dr. Istvánfi Csaba, rector emeritus, Csc

Dr. Ihász Ferenc, egyetemi tanár, PhD

Budapest

2017

1. Bevezetés

A kardiovaszkuláris fittség, amelyet a maximális oxigén felvétel ($VO_2\text{max}$) segítségével mérünk, egy fontos markere az életminőségnek, mert a magas $VO_2\text{max}$ érték szoros összefüggésben áll az életmód függő betegségek alacsony előfordulási arányával. A magas $VO_2\text{max}$ már az ősebernél is fontos volt, mert a vadászat hatékonyságát tudta növelni vele, hisz az őseember üldözte a zsákmányállatot, és a nagyobb aerob kapacitás jelentős előnyt jelentett számára a több és minőségibb étel megszerzésében. Ezért feltételezzük, hogy az aerob testedzés, különösen a futás fontos lehet a homo sapiens fejlődésében.

Klinikailag az aerob kapacitás, amely vagy a $VO_2\text{max}$ vagy kifáradásig tartó futószalagos teszt segítségével mérhető, igen erős mutatója a halálozásnak és az egyes betegségek túlélésének. Számos tanulmány kimutatta, hogy a rendszeres állóképességi edzés növekvő $VO_2\text{max}$ -hoz vezet és növeli a kísérleti állatok és emberek átlag élettartamát. Azonban a $VO_2\text{max}$ nem az egyetlen jelzője a megnövekedett aerob teljesítménynek, a vázizomzat alkalmazkodása az állóképességi edzéshez szintén fontosnak tűnik. A vázizomzat mitokondriális hálózatának minősége és mennyisége, a mitokondriális biogenezis és az oxidatív enzimek aktivitása is limitáló faktora lehet az állóképességi teljesítménynek.

Ikrekkel és családokkal végzett kutatások alátámasztják, hogy az aerob edzhetőség nagymértékben függ a genetikától, örökölhető.

Szelektíven tenyésztett patkány modell segítségével tanulmányozták az „nem edzhető” (LRT) és az „edzhető” (HRT) állatokban az örökölhető tulajdonságokat. A szelekció az elért maximális futási távolságban bekövetkező változások értékelésén alapult, amelyet kimerülésig tartó futószalagos teszt segítségével mértek. Edzetlen állapotban az LRT és HRT állatoknak hasonló volt az állóképességi kapacitásuk. A vizsgálat alatt az állatok 8 héten keresztül heti 3 alkalommal edzettek, ahol a kezdeti futási intenzitás 10 m/min volt és a maximum 21 m/min. Elmondható, hogy a 8 hetes közepes intenzitású állóképességi edzés átlagban 84 ± 20 m fejlődést hozott a futási kapacitásban. Azonban az egyéni változások igen széles határok között mozogtak az edzésre adott alkalmazkodásban, + 754 m fejlődéstől a – 438 m csökkenésig (2,7-szeres eltérés) a futási távolságban.

A HRT állatok átlagosan 200 métert fejlődtek a futási távolságban, míg az LRT-nek nevezett állatok nem javultak, és átlagosan 65 méterrel csökkent a futási kapacitásuk az adott közepes intenzitású edzés során.

Lessard és munkatársai tanulmányukban kimutatták, hogy a vázizomzat mitokondriális kapacitása hasonló volt az LRT és HRT állatok között nem edzett állapotban és az LRT állatok közepes intenzitású állóképességi edzés hatására normális növekedést mutattak a mitokondriális denzitás és funkció tekintetében. Ennek ellenére edzés hatására a vázizomban szignifikáns különbséget mértek az angiogenezisben és a transforming growth factor β jelző molekulában. Továbbá vizsgálták a vázizom génexpresszióját, amely során ugyanaz a terhelés az LRT és HRT állatokban eltérő transzkripciós választ eredményezett. Az eltérően expresszált gének leginkább a génexpresszió biológiai funkciójához tartoztak, mint a fejlődés, sejtciklus szabályozás, sejtes növekedés, proliferáció és a mozgás.

A fent említett bizonyítékokra támaszkodva a vázizomzat részben felelős lehet a testedzéshez való eltérő alkalmazkodáshoz, amely a disszertációmban megfogalmazott feltételezések vizsgálatához vezettek.

2. Célkitűzések

A doktori disszertációmban tárgyalt vizsgálat célja az volt, hogy választ kapjunk az eltérő edzhetőséggel rendelkező patkányok esetében állóképességi edzés hatására a mitokondriális biogenezisben bekövetkező különbségekre vázizomban.

Az edzhetőség nemcsak az élsportban, hanem a rekreációs tevékenységek során is kiemelt jelentőséggel bír, melynek háttérében a genetika meghatározó szerepet tölt be, ezért fontos annak tanulmányozása, hogy az eltérő genetikával rendelkező egyének esetében melyek lehetnek azok a mitokondriális biogenezissel is összefüggő faktorok, amelyek az edzhetőséget befolyásolhatják.

Jelen vizsgálatot a következő feltételezések tesztelésre terveztük:

1. Az általunk alkalmazott 12 hetes futószalagos terhelés után az LRT és HRT csoportokat vizsgálva jelentős eltérés lesz mérhető az állatok maximális oxigén felvétele és futási teljesítménye között a kontroll és az edző csoportokat illetően.
2. Az edzés által bekövetkezett változások a redox egyensúlyban szerepet játszanak az edzésre adott eltérő válaszokban.
3. Az adenosin-monofoszfát-aktiválta protein kináz (AMPK) jelentős hatással bír a vázizomzatban az edzésre.
4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó faktorok magyarázzák az LRT és HRT állatok eltérő edzhetőségét.

3. Módszerek

Állatok és edzés protokoll

Genetikailag heterogén patkány populációból (N/NIH törzs, n=152) származó, edzhetőségük alapján szelektíven tenyésztett hím patkányok 11. generációjával (n=27) végeztük vizsgálatainkat. Az „edzésnek ellenálló” (low response trainers – LRT, n=13) és „edzhető”/„edzésre reagáló” (high response trainers – HRT, n=14) vonalat Lauren Gerard Koch és Steven L Britton dolgozta ki.

Az LRT és HRT állatok 12 hónaposak voltak a kísérlet megkezdésekor, amikor is mindegyik csoporton belül véletlenszerű módon kontroll és edző alcsoportot alakítottunk ki: kontroll LRT (control LRT – LRTC, n=6), edző LRT (exercised LRT – LRTE, n=7), kontroll HRT (control HRT – HRTC, n=6) és edző HRT (exercised HRT – HRTE, n=8).

Az állatoknak 12 – 12 órás világos – sötét megvilágítási periódust biztosítottunk szobahőmérséklet mellett (22 ± 1 °C), amelynek során normál méretű ketrecben tartottuk őket, ketrecenként két állattal, ahol *ad libitum* fértek hozzá a táplálékhoz és vízhez. A kísérletet a helyi etikai bizottság jóváhagyásával végeztük, és betartottuk az állatkísérletekre vonatkozó előírásokat (The Guiding Principles for Care and Use of Animals, EU), melyek a Helsinkai Egyezményen (1964) alapulnak.

A 12 hétig tartó edzés első hetében a kontroll és edző csoport állatait megismertettük, hozzászoktattuk egy hat, különálló sávval rendelkező motor hajtotta futószalaghoz, amelyet a *Tektronik Kft.* egyedi megrendelés alapján készített a Sporttudományi Kutató Intézet számára. A futószalaghoz való adaptálódás első 5 napja során az állatok 10 percet futottak a futószalag 5°-os meredeksége mellett, miközben az egyes alkalmak során a sebességet fokozatosan növeltük 8 m/percről 23 m/percre.

A szoktatás, és a későbbiek során is, másokhoz hasonlóan jártunk el azokkal az állatokkal, amelyek nem voltak hajlandóak futni, ill. lecsúsztak a szalagról.

A teljes edzés 12 hétig tartott az edző állatok számára. Heti öt alkalommal 30 percet futottak 12 héten keresztül. A sebességet a csoport átlag maximális oxigénfelvételéhez ($VO_2\max$) tartozó 70%-nak megfelelően állítottuk be, és így fokozatosan emeltük 15 m/percről 25 m/percre. Mindkét csoport $VO_2\max$ -át kéthetente mértük egy speciálisan a patkányok számára kifejlesztett, zárt rendszerű spiroergometriás készülék segítségével (*Columbus Instruments, Columbus, OH*). A

maximális oxigénfelvétel mérésének napján az állatok egyéb futószalagos terhelésben már nem részesültek.

Célunk az állóképességi edzés hatásainak a vizsgálata volt, amihez a 70%-os maximális oxigénfelvételhez tartozó intenzitást irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján választottuk.

A VO_2 max mérése a korábbi kutatásaink során alkalmazott protokollt követte. Az első 10 perc során a futószalag nem ment, annak érdekében, hogy az állat megnyugodjon, és így meghatározhassuk a nyugalmi VO_2 értékét. A 10. perctől 10 m/perces sebességgel indítottuk a futószalagot, amit 3 percenként további 5 m/perccel emeltünk egészen az állat kifulladásáig. A mérés során három szempontot vettünk figyelembe a VO_2 max meghatározásánál: 1) nem történt változás a VO_2 -ben, amikor növeltük a sebességet, 2) az állat nem tudott fennmaradni a futószalagon, és 3) a respirációs kvóciens ($RQ=VC_2/VO_2$)>1. A VO_2 max mérést befejezettnek tekintettük, a vizsgálatot leállítottuk és nem ismételtük meg, ha a felsorolt szempontok közül legalább egy megvalósult. A teszt előtt mértük az állatok testsúlyát és a futási távolságot is.

Az állatokat az edzés protokoll befejezése után két nappal dekapitáltuk, hogy elkerüljük az utolsó edzésből eredő akut metabolikus hatásokat. A gastrocnemius izmot körültekintően eltávolítottuk az állatból, lemértük a tömegét, folyékony nitrogénbe helyeztük, majd további felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.

Laboratóriumban használt módszerek

A fehérjék különböző hatásokra történő lehetséges mennyiségi változásait western blot technikával mértük. Az előzőleg – 80 °C-on tárolt, fagyott gastrocnemius izomszövet homogenizálása politronnal történt NP-40-et tartalmazó lízis pufferben.

A homogenát fehérjetartalmát a homogenizáló pufferben felhasznált detergenseknek megfelelően Bradford módszeren alapuló Bio-Rad Protein Assay Kittel (*Bio-Rad #600-005*) végeztük. A western blottok során az azonos fehérje koncentrációra hígított mintákból (5,4 mg/ml) 10 – 30 µl mennyiséget 8 – 12% töménységű (v/v) poliakrilamid gélen futtattunk és szeparáltunk. Ezután a fehérjéket szintén elektromos áram segítségével PVDF membránra transzferáltuk. A transzfer után a membránt 5%-os zsírmentes tejporos TBS-T vagy 1%-os BSA oldatban blokkoltuk 4 °C-on. Blokkolás

után egy egész éjszakán át 4 °C-on, a kimutatni kívánt fehérje ellen termeltetett speciális antitestet tartalmazó oldattal kezeltük a membránt. A mosás után másodlagos antitesttel blokkoltuk a membránt. A blokkás után ismét mostuk a membránt. Ezt követően a membránt HRP-vel reagáló szubsztrát oldatba helyeztük 5 percre. A kemilumineszcenciás reagens hatására keletkező fényreakciót röntgen filmen rögzítettük. A fehérje csíkok intenzitását imageJ szoftverrel végeztük és α -tubulinhoz normalizáltuk, ami belső kontrollként szolgál.

Az oxidált fehérjék mennyiségi változásának meghatározásához Oxyblot Kített (*Chemicon/Millipore, S7150*) használtunk a gyári leírásnak megfelelően. A mintákat DNPH-val kezeltük, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk neutralizáló pufferrel (*Chemicon/Millipore*). Az így módosított fehérjéket western blot technika segítségével, ill. a kit leírásának megfelelően mértük.

A citrát szintetáz (CS) a citromsav-ciklus első reakcióját katalizáló folyamatszabályozó enzim, amely mérést Shepherd és Garland leírása alapján végeztük el. Az azonos fehérje koncentrációjú mintákat triplikátumban vittük fel a 96 lyukú átlátszó mikrolemezre. A reagensek mintával való összemérése után, az optikai densitást ELISA leolvasóval (*Thermo Labsystems Multiskan EX*) 405 nm-en olvastuk le a 0., 1., 2. és 3. percben, majd az aktivitást $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ fehérje mennyiségben határoztuk meg.

Az izomszövet NAD^+/NADH arányának meghatározásakor a NAD^+/NADH Quantification Kit (*Bio Vision, K337-100*) gyári protokollját követtük, amihez 20 mg szövetet használtunk fel. Az útmutatónak megfelelően elsőként a minta NADH mennyiségét határoztuk meg, majd a mintában lévő NAD^+ -ot. A NAD^+ mennyiséget a NADt-NADH különbségéből becsültük, miután a NADt mennyiségét 450 nm-es hullámhosszon ELISA leolvasóval (*Thermo Labsystems Multiskan EX*) detektáltuk az 5 órás folyamat során 30 percenként.

A teljes ROS mennyiségének meghatározására H_2DCFDA -t (*Invitrogen-Molecular Probes #D399*) használtuk. A fluoreszcens intenzitás változást 30 percen keresztül 5 percenként mértük 485 nm-es excitációs és 538 nm-es emissziós hullámhossz használatával (*Fluoroskan Ascent FL*). A fluoreszcens intenzitást a fehérjetartalommal normalizáltuk és relatív unit / mg fehérjében fejeztük ki.

A PCR vizsgálat során az AMPK α (*PRKAA1*) mRNS szintjének mérését izomszövetből végeztük. Az RNS-t NucleoSpin[®] RNA/Protein kit segítségével (*Macherey-Nagel, Düren, Germany*) izoláltuk, a cDNS-t pedig *cDNA Synthesis Kittel* (*Bioline, #Biol-65026*). Az RT-PCR mérést Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research, Australia*) készüléssel végeztük. A mérés során SYBR Green (*EVA-Green, Biotium, #31000*) és ImmoMix (*#IMX-110C, Bioline*) reagenseket használtunk. A következő PCR körülményeket alkalmaztuk: 95 °C 10 perc; 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (40 cikluson keresztül). Az AMPK α mRNS gén expresszióját β -actinhez normalizáltuk.

Statisztika

Az adatok kiértékelését, a szignifikáns különbségek megállapítását STATISTICA 11.0 programban normalitás vizsgálatot követően vizsgáltuk. Mivel a változók jelentős része nem mutatott normál eloszlást, így az összes változó elemzésénél nem paraméteres, Kruskal-Wallis ANOVA-t használtunk. Ezt követően post-hoc analízist végeztünk, melynek alapja a 2 mintás t-próba nem paraméteres vizsgálata (Mann-Whitney próba). Egyes adatok esetében nem paraméteres kétmintás t-próbát is alkalmaztunk. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ és $p < 0,01$ -nél határoztuk meg.

4. Eredmények

Az állatok testsúlyát a 12 hetes edzés során hetente mértük. Az „edzésnek ellenálló” és az „edzhető” állatok kiindulási testsúlya azonos volt. A harmadik mérési alkalomtól kezdve az „edzésnek ellenálló” állatok és az „edzhető” állatok edző csoportjának testsúlya folyamatosan csökkent. A(z) LRTE állatok testsúlya a kiindulási értékekhez képest szignifikánsan csökkent az edzés periódus végére ($p < 0,05$) a(z) LRTE csoporthoz képest ($422,14 \pm 15,19$ vs. $474,00 \pm 14,10$ g), valamint hasonló változást figyeltünk meg a HRTE és HRTC csoportoknál is ($410,63 \pm 9,52$ vs. $471,00 \pm 12,88$ g).

Az edzés program elkezdése előtt a maximális oxigénfelvétel ($VO_2\max$) hasonló volt a négy kísérleti csoport között – LRTE, LRTE, HRTC és HRTE –, átlagban $\sim 65 \pm 7,5$ ml/kg/min. Az állóképességi edzés szignifikánsan növelte a $VO_2\max$ szintjét a(z) LRTE és HRTE csoportokban ($p < 0,05$) a kontroll állatokhoz képest. Ez a különbség a harmadik mérési alkalomtól kezdve élesen elkülönül az edző és a kontroll csoportok között, amely a növekedés az edzés protokoll utolsó hetében sokkal erőteljesebb volt a HRTE állatok esetében ($p < 0,01$), mint a(z) LRTE állatok esetében ($p < 0,05$), amit nem paraméteres kétmintás t-próbával elemeztünk.

A $VO_2\max$ teszt során az állatok futási képességét is mértük úgy, hogy rögzítettük az állatok által megtett távolságot. Hasonlóan az aerob kapacitás eredményeihez, az állóképességi edzés megkezdése előtt itt sem volt különbség a csoportok között, és a futási távolság folyamatosan és szignifikánsan nőtt az edző állatok körében a kontroll csoport tagjaihoz képest. Ezen felül szignifikáns különbséget figyelhettünk meg a(z) LRTE és HRTE csoportok között. A HRTE állatok több mint 20 %-kal nagyobb futási távolságot tettek meg az utolsó mérési alkalom során, mint a(z) LRTE csoport állatai.

A vázizomzat mitokondrium számát a COX-4 fehérje szintjével mértük, amely során szignifikáns különbséget mértünk a(z) LRTE és a(z) LRTE, valamint a HRTC és HRTE csoportok között.

A citrát szintetáz (CS) enzim aktivitását, ahogy azt már korábban említettük, a sértetlen mitokondrium szám megméréséhez használtuk. A CS aktivitáshoz hasonlóan a COX-4 esetében is szignifikáns különbséget mértünk az „edzésnek ellenálló” és az „edzhető” állatok kontroll és edző csoportja között. Annyi különbséget itt

felfedezhetünk, hogy az „edzésnek ellenálló” kontroll és edző csoport között itt ellentétes irányú a folyamat, hiszen szignifikáns csökkenés történt. Ezenkívül a(z) LRTE és HRTE csoportok között is szignifikáns különbséget mértünk, az edző „edzhető” állatok nagyobb mértékben reagáltak az edzésre, mint az „edzésnek ellenálló” edző állatok. Ellentétben a COX-4-gyel, a CS esetében csak a HRTE állatoknál mértünk szignifikáns különbséget a HRTE vs. LRTE és LRTE vs. HRTE ($p < 0,05$) összehasonlításban. Érdekesség, hogy a CS aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt az edző LRT, mint a kontroll LRT állatokban.

A reaktív oxigén gyökök legnagyobb része a mitokondriális légzési folyamat mellékterméke, amelynek szintjét a H_2DCFDA eljárás segítségével mértük. Szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk a HRT állatok kontroll csoportjában a(z) LRT állatok kontroll csoportjához képest (14 % volt a különbség a HRTE és LRTE csoportok között). Az edzés hatására növekvő tendenciát figyelhetünk meg a ROS szintjében a(z) LRT és HRT csoportoknál.

A ROS szint változásával ellentétes kapcsolatot találtunk a $NAD^+/NADH$ aránynál, – amely a redox egyensúly meghatározására szolgál – mert itt csak a HRTE és LRTE csoportok között tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. A HRTE csoportban a $NAD^+/NADH$ arány magasabb volt, mint a(z) LRTE csoportban.

A sejtekben és szövetekben lévő fehérjéket ért oxidatív stresszt, amelyet edzés is kiválthat, általában a reaktív karbonil származékok mennyiségével becsülhetjük. Adataink alapján szignifikáns különbséget mértünk a HRTE és a HRTE állatok között, míg a(z) LRTE csoportban nem tapasztaltunk semmiféle változást az „edzésnek ellenálló” kontroll csoporthoz képest.

A sérült fehérjék lebontásában közreműködő enzimek közül a proteaszóma az egyik fő fehérje bontó enzim. Edzés hatására a proteaszóma (PSMA6) általunk mért R2-es alegységének mennyisége edzés hatására mind a(z) LRT, mind a HRT csoportokban is szignifikánsan nőtt.

Míg a citoszólban a proteaszóma felelős a sérült fehérjék lebontásáért, addig a Lon proteáz a mitokondriumban végzi ugyanezt a feladatot. Edzés hatására csak a HRT csoportban mértünk szignifikáns különbséget, az LRT csoportban nem történt változás. Továbbá szignifikáns a különbség a(z) LRTE és HRTE csoportok között.

A HSP78 egy mitokondriális chaperone, amely a mitokondriumban a sérült fehérjéket jelöli meg a lebontó enzimek számára. A HSP78 szintjében nem történt változás a négy kísérleti csoporton belül.

Az AMPK α aktivitás fontos visszajelzője a vázizom edzéshez való adaptációjának, amit mi a pAMPK α /AMPK α arányával becsültük. Szignifikáns növekedést figyelhetünk meg a HRTC csoportban a(z) LRTC, ill. a HRTE csoporthoz képest. A vázizomban található AMPK α fehérje mennyisége mellett megmértük az AMPK α mRNS szintjét is, de itt nem találtunk különbséget az egyes csoportok között.

A SIRT1 fehérje érzékeny markere a metabolikus változásoknak. Kontroll csoportok között nem mértünk különbséget (LRTC vs. HRTC), de edzés hatására mindkét kísérleti csoportban (LRTE és HRTE) szignifikáns különbséget, növekedést mértünk a szintjében.

A mitokondriális biogenezis egyik fontos eleme a PGC1- α , amelyről tudott, hogy edzés hatására nő a szintje. Ennek ellenére növekedést csak a HRTE csoportban mértünk, a(z) LRTC és a(z) LRTE csoport között nem változott a PGC1- α szintje.

A PGC1- α szabályozza a mitokondriális biogenezisben résztvevő TFAM és NRF-1 fehérjéket. A(z) NRF-1 fehérje szintjének változása a PGC1-1 α szintjéhez hasonló mintázatot mutatott. A(z) NRF-1 edzés hatására csak a HRTE csoportban mutatott szignifikáns különbséget, növekedést, míg a(z) LRTC és a(z) LRTE csoportok között nem találtunk különbséget.

A TFAM fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) LRTE csoportban, mint a(z) LRTC csoportban. A HRT állatok esetében a testedzés pedig növelte ezen fehérje mennyiségét.

A mitokondriumok minőségi kontrolljának szabályozásáért részben fiziós és fúziós folyamatok felelnek. A mitokondriumban a fiziós folyamatokért részben a Fis1 felelős, melynek szintje a HRTC állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) LRTC állatokhoz képest. Edzés hatására mindkét csoportban (LRT és HRT) növekvő tendenciát figyelhetünk meg a kontroll csoporthoz képest, bár szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatnunk.

A mitokondrium fúziós folyamatáért felelős fehérje, az Mfn1 szintje ellentétesen változott a Fis1-hez képest. Kontroll körülmények között nem volt különbség, míg

edzés hatására szignifikánsan csökkent a tartalma mindkét edző (LRTE és HRTE) csoportban.

5. Következtetések

Az edzhetőség a profi sport szintjén óriási jelentőséggel bír, de a mindennapi egészség érdekében végzett rendszeres testedzés során is kiemelt szerepe van, hisz egy amatőr sportoló is mindig fejlődni akar. Az edzhetőség egy igen összetett dolog, amely széles határok között mozog, többek között a genetika is befolyásolja. Ezért nagy kihívás egy olyan figyelemre méltó mechanizmust meghatározni, amely hozzájárulhat az ugyanarra az edzés ingerre adott eltérő reakciók alaposabb megismeréséhez, ill. ahhoz, hogy megértsük az edzhetőség háttérében zajló folyamatokat. Jelen disszertációban lehetőségünk volt edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkányokon elfogulatlanul vizsgálni az edzhetőséget, az állóképességi edzés hatását a mitokondriális biogenezisre vázizomzatban.

A 12 hetes futószalagos edzés megkezdése előtt a(z) LRT és HRT állatok VO_2max értékei és futási távolsága között nem találtunk szignifikáns különbséget, amely azt sugallja, hogy az edzhetőség nem függ teljes mértékben a kiindulási VO_2max értékektől. Állóképességi edzésre adott sokkal nagyobb mértékű válasz figyelhető meg a futási távolságban a(z) LRT és HRT állatok között, mint a VO_2max -nál, amely a VO_2max értékekben bekövetkező változások korlátolt edzhetőségét jelzik. Ezt a megállapítást számos humán tanulmány is alátámasztja, miszerint a magas-intenzitású aerob teljesítmény nincs kapcsolatban a maximális oxigénszállító kapacitással, valamint a kiindulási aerob kapacitás sem pozitívan sem negatívan nincs összefüggésben a testedzés által kiváltott maximális aerob teljesítménnyel. Természetesen az aerob kapacitáson kívül sok más tényező is hozzájárulhat a jobb futóteljesítményhez, amelyek magyarázatul szolgálhatnak a HRT állatok jelentősebb eredményeihez a futási távolságot illetően a 12 hetes terhelés végére.

A mitokondriális hálózat kiemelkedő jelentőséggel bír a testedzés által kiváltott metabolikus változásokkal szembeni megküzdés folyamatában. Holloszy állatkísérleten alapuló úttörő munkája kimutatta, hogy a rendszeres testedzés növeli a mitokondriális enzimek aktivitását és a mitokondrium tartalmát is. Holloszy felfedezését humán vizsgálatok is alátámasztják.

Ahogy azt az eredményeknél láthatjuk a ROS kiindulási szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) HRT állatokban, mint a(z) LRT állatokban. A ROS nemcsak

izomsejten belüli, hanem izomsejten kívüli forrásokból is termelődhet. Megerőltető terhelés izomsérülést eredményezhet, amely a neutrofilok és makrofágok aktiválódásához vezethet az interferon- γ , interleukin-1 és tumor nekrozis faktorokon keresztül. Ezek az immunsejtek nagymértékben termelnek ROS-t, amelyek a neutrofil védelmi vonal központi elemei. Vizsgálatunkban a két kontroll csoport állatainál találtuk a ROS kiindulási szintjében a különbséget, amely állatok a kéthetente esedékes futószalagos VO₂max mérésen kívül semmilyen terhelésnek nem voltak kitéve. Ezenfelül az állatok dekapitálása is 2 nappal az utolsó edzés befejezése után történt, hogy elkerüljük az akut metabolikus hatásokat. Ennek ellenére lehetséges, hogy a(z) LRT állatok kontroll csoportjában ezért detektáltunk magasabb ROS szintet. Mivel vizsgálatunk során az interferon- γ , interleukin és tumor nekrozis faktorokat nem mértük, így nem tudjuk eredményekkel alátámasztani ezt a lehetőséget, így pontos választ sem tudunk adni a két kontroll csoport között tapasztalható eltérésre. A ROS szintet H₂DCFDA segítségével mértük, amely nem mutatott különbséget a HRTE és LRTE csoport között.

Emellett a ROS számos jelző folyamatban vesz részt, a redox homeosztázis fenntartásában is, ami szorosan kapcsolódik a sejtszintű anyagcseréhez. Jelen vizsgálatunkban ellentétes irányú a ROS szintje és a NAD⁺/NADH arány az „edzésre reagáló” állatok kontroll és edző csoportja között (HRTE és LRTE csoport), amely kontrollált redox homeosztázist feltételez. Azonban ezt a kapcsolatot nem találtuk az „edzésnek ellenálló” (LRT) csoportok között. Másrészt, a COX-4 szintjében sem mutattunk ki szignifikáns eltérést a két kontroll csoport között, ami azt sugallja, hogy a redox egyensúlyban bekövetkező lehetséges eltérések nem befolyásolják szignifikánsan a mitokondriális biogenezist. COX-4 esetében szignifikáns növekedést csak a(z) LRTE és LRTE, valamint a HRTE és LRTE csoportok között mértünk, amely eredményünk összecseng Short és munkatársai megfigyelésével, akik 16 hetes aerob edzés hatására az általunk is vizsgált markerek hasonló változását írták le. A citrát szintetáz és a citokróm c oxidáz aktivitás nőtt, de a COX-4 mRNS szintje, valamint a PGC-1 α , NRF-1 és TFAM szintje is.

Disszertációmban szignifikánsan magasabb szintet figyeltünk meg a karbonilált fehérjék szintjében a LRTE patkányok csoportjában az HRTE csoporthoz képest, míg a(z) LRT állatok esetében ilyen változást nem tapasztaltunk. A fehérje karboniláció a

fehérje oxidáció egyik típusa, amelyet a ROS elősegít, ha nő a ROS szintje, akkor nő a karbonilált fehérje szintje is. A karbonilált fehérjéket a fehérjék oxidatív károsodásának markereként használjuk, azonban a mérsékelt fokú karboniláció összefüggésben lehet a fehérje turnover folyamatával. Így a fehérje karboniláció jelzi, hogy a sérült fehérjék lebontásra kerüljenek javításra, mert a karboniláció egy visszafordíthatatlan/javíthatatlan módosulás. A fehérje degradáció szintjét a proteaszoma R2-es alegységének és a LonP fehérjének a segítségével mértük, amely housekeeping fehérjéről tudjuk, hogy a rendszeres testedzés növelni tudja a szintjüket. Ez egy fontos folyamat, mert a fehérjék oxidatív módosulásai a fehérjék funkcióvesztését eredményezik. A(z) LRT és HRT csoportok közötti különbség hiánya a proteaszoma indukcióban azt jelezheti, hogy ez a citoszólban található fehérje független lehet az edzhetőségtől. Azonban nem ez történt a mitokondriumban lebomló oxidált fehérjékkel, mivel a LonP csak a HRTE csoportban nőtt a(z) LRTE és HRTC csoportokhoz képest. A Lon proteáz enzim szintje a HRTC csoportban alacsonyabb szinthez közelít, mint a(z) LRTE csoportban ($p=0.22$). Azonban, egy korábbi vizsgálatunk eredményeit figyelembe véve tudjuk, hogy az öregedés gátolja a Lon proteázt a vázizomban, és ennek hatását a testedzés mérsékelni képes, az állóképességi teljesítmény növelni. Ezért nem jelenthetjük ki, hogy a Lon proteáz fehérje szerepet játszik az edzhetőségben.

Az AMPK-ról érdemes tudni, hogy a terhelés intenzitásának megfelelően aktiválódik, amely aktiválódást már a maximális aerob kapacitás ≈ 60 %-ánál is megfigyeltek, míg mások alacsony intenzitásnál az AMPK aktivitás hosszantartó, elnyújtott hatását találták. Az AMPK egy fontos jelző molekulája az állóképességi edzésnek, és az AMPK AICAR-ral való stimulálásával növekvő aerob teljesítményről lehet beszámolni. A nem edző kontroll állatok csoportjai közül a HRT csoportban szignifikánsan nagyobb AMPK aktivitást mértünk, mint a(z) LRT csoportban, amely így a HRT állatok számára nagyobb érzékenységet mutat a metabolikus változások érzékelése felé. Ebből adódóan nem jelenthetjük ki egyértelműen, hogy az AMPK α aktivitással járó magasabb szint kedvezőbb metabolikus állapot jelent a jobb aerob edzhetőség számára. Az AMPK α mRNS szintjében nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között, de a(z) mRNS és a fehérje szint közötti eltérés nem igazán meglepő, a(z) mRNS lebomlása, a nem megfelelő transzkripció, a(z) miRNS szabályozása vagy a megváltozott fehérje lebontás következtében. Lessard és

munkatársai egy tanulmányukban arról számolnak be, hogy akut edzés hatására az AMPK megfelelően aktiválódott a(z) LRT és HRT állatokban, és nem valószínű, hogy kapcsolatban áll az edzés ingerre adott eltérő alkalmazkodással. Az edzésre csökkenő AMPK aktivitás a(z) LRT csoportban a citrát szintetáz csökkenéssel együtt azt sugallja, hogy a mitokondriummal összefüggő faktorok fontosak lehetnek az edzhetőség során. Valóban, az AMPK béta alegységének csökkenése a vázizomzatban csökkent edzés toleranciát eredményez anélkül, hogy jelentős változás következne be a mitokondrium tartalmában vagy a cukor anyagcserében.

Edzés hatására növekvő SIRT1 szintet mértünk az „edzésnek ellenálló” és az „edzésre reagáló” csoportokban, amely alapján feltételezhetjük, hogy a(z) LRT és HRT állatok edzhetősége közötti különbség független a SIRT1 szinttől. Érdekes, hogy a PGC1- α tartalom csak a HRTE csoportban nőtt. Jelenleg megoszlanak a vélemények arról, hogy a SIRT1 szerepet játszik-e a PGC1- α aktivációjában. Néhány tanulmány, beleértve Holloszy kutatócsoportját is, azt feltételezik, hogy a PGC1- α deacetilációja gátolja a SIRT1 aktivitást és a mitokondriális biogenezist, míg más cikkek a SIRT1 által deacetilált PGC1- α aktivitásról számolnak be.

A mitokondriális biogenezist a PGC1- α , NRF-1 és TFAM fehérjék szabályozzák. Ahogy azt korábban említettük, a PGC1- α edzés hatására nőtt a HRTE csoportban a HRTE-hez képest, de nem nőtt a(z) LRTE csoportban a(z) LRTE-hez képest. A TFAM szintje edzésre csökkent az „edzésnek ellenálló” LRT állatoknál, és nőtt az „edzésre reagáló” HRT csoportban. A TFAM kapcsolatban van a magasabb aerob állóképességgel, amit mi is nagyobb mértékben mértünk a HRTE csoportban. A TFAM ellentétesen változik edzés hatására a(z) LRT csoportban a HRT csoportéhoz képest, amely alapján ez a fehérje limitáló faktor lehet az edzhetőségben. Ezen kívül a Lon proteáz szintje párhuzamosan változott a TFAM szintjével. A Lon proteáz közreműködik a fehérjék stabilitásában, replikációjában, transzkripciójában és translációjában is, valamint szerepet játszik a TFAM, steroidogenic acute regulatory protein és az akonitáz fehérjék lebontásában. Továbbá az NRF-1 a PGC1- α -hoz hasonlóan változott; az NRF-1 edzés hatására indukálódott a HRT csoportban, de a(z) LRT csoportban nem. Így a PGC1- α által szabályozott elemek csak az edzésre fogékony állatok csoportjában nőttek.

Eredményeink alapján a vázizom vizsgálatához megfogalmazott hipotézisekre a következő válaszokat adhatjuk:

1. Az általunk alkalmazott 12 hetes futószalagos terhelés után az LRT és HRT csoportokat vizsgálva jelentős eltérés lesz mérhető az állatok maximális oxigén felvétele és futási teljesítménye között a kontroll és az edző csoportokat illetően. **A kontroll csoportokhoz képest mind a(z) LRTE, mind a HRTE csoportokban szignifikáns növekedést mértünk a maximális oxigén felvétel és a futási teljesítmény esetében. Éppen ezért jelentős eltérést nem figyeltünk meg a maximális oxigén felvételnél, így ez a rész NEM IGAZolódott be, míg a futási távolságnál IGAZ a hipotézisünk, hiszen a két edző csoport között jelentős volt a különbség.**
2. Az edzés által bekövetkezett változások a redox egyensúlyban szerepet játszanak az edzésre adott eltérő válaszokban. **NEM IGAZ, mert nem találtunk egyértelmű oxidatív marker(ek)e)t, amely(ek) megmagyarázná(k) az eltérő edzhetőséget. Bár a ROS szintjében szignifikáns volt a különbség a(z) LRT és HRT állatok kontroll csoportja között.**
3. Az adenosin-monofoszfát-aktiválta protein kináz (AMPK) jelentős hatással bír a vázizomzatban az edzésre. **IGAZ, mert a HRTC és. LRTC állatok között szignifikánsan nagyobb volt az AMPK aktivitás szintje, amely nagyobb potenciált jelent a metabolikus változások érzékelése felé. Ezenkívül a csökkenő tendenciát mutató AMPK és szignifikánsan csökkent citrát szintetáz aktivitás a(z) LRTE állatokban szintén ezt a megfigyelést erősíti.**
4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó faktorok magyarázzák az LRT és HRT állatok eltérő edzhetőségét. **IGAZ, mert a vizsgált mitokondriális biogenezisben szerepet játszó PGC-1 α , NRF-1 és TFAM fehérjék edzés hatására szignifikánsan nőttek a HRT csoportban, míg a(z) LRT csoportban nem.**

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az edzhetőségnek nagy jelentősége van a mindennapi, rekreációs sporttevékenységet végzőknél és az elit sportolóknál egyaránt. Edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkányokkal („edzésnek ellenálló – low response trainers (LRT) és „edzhető”/„edzésre reagáló” – high response trainers (HRT)) végeztük kutatásunkat annak érdekében, hogy az állóképességi edzés hatását vizsgáljuk a mitokondriális biogenezisre. Az állatok 3 hónapon keresztül, a hét 5 napján 30 perces futószalagos terhelésen vettek részt, ahol a sebességet a $VO_2\text{max}$ -uk 70%-nak megfelelően állítottunk be. Ahogy azt vártuk, edzés hatására szignifikáns különbséget mértünk a futási távolságban a(z) LRT és HRT állatok között. Azonban a $VO_2\text{max}$, a COX-4, a redox homeosztázist biztosító markerek (reaktív oxigén gyökök (ROS)), silent-informator-regulator 1 (SIRT1), NAD^+ /NADH arány, proteaszóma (R2 alegység), és a mitokondriális hálózat fenntartásáért felelős mitochondrial fission protein (Fis1) és mitochondrial fusion protein (Mfn1) vizsgálata után kijelenthetjük, hogy ezek a markerek nem befolyásolják egyértelműen az eltérő edzhetőséget a(z) LRT és HRT csoportban. Másrészt, eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az AMP-aktivált protein kinase alpha ($AMPK\alpha$) alap aktivitásában található különbség, és az állóképességi edzés kiváltotta változás a citrát szintetáz, karbonilált fehérje, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1- α), nuclear respiratory factor (NRF1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) és Lon proteáz szintjében limitáló tényező lehet az általunk vizsgált edzhetőség alapján szelektált patkány populációban. Eredményeinkre támaszkodva megállapíthatjuk, hogy a mitokondriális biogenezissel összefüggő faktorok eltérő módon alkalmazkodnak állóképességi edzés során az „edzésnek ellenálló” és az „edzésre reagáló” patkányokban.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- **Marton O**, Koltai E, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S, Radak Z. (2010) Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology* 11: 679-686.
- **Marton O**, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Boldogh I, Radak Z. (2015) "Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflügers Arch* 467: 779-788.
- **Marton O**, Koltai E, Takeda M, Mimura T, Pajk M, Abraham D, Koch LG, Britton SL, Higuchi M, Boldogh I, Radak Z. (2016) The rate of training response to aerobic exercise affects brain function of rats. *Neurochem Int* 99: 16-23.

6.2. Független közlemények

- Radák Z, Silye G, Bartha C, Jakus J, Stefanovits-Bányai E, Atalay M, **Marton O**, Koltai E. (2013) The effects of cocoa supplementation, caloric restriction, and regular exercise, on oxidative stress markers of brain and memory in the rat model. *Food Chem Toxicol* 61:36-41.
- Ihász F, Karsai I, Kaj M, **Marton O**, Finn KJ, Csányi T. (2015). Characteristics of cardiorespiratory output determining factors among 11-19-year-old boys at rest and during maximal load: Its impact on systolic hypertension. *Acta Physiol Hung* 102:263-73.
- Laurson KR, Welk GJ, **Marton O**, Kaj M, Csányi T. (2015) Agreement and Diagnostic Performance of FITNESSGRAM®, International Obesity Task Force, and Hungarian National BMI Standards. *Res Q Exerc Sport* 86 Suppl 1:S21-8.