

**Úszás közvetítette kardiovaszkuláris protektív mechanizmusok
infarktusos patkánymodellben**

Szerző:

Tóth Kristóf

Témavezetők:

Dr. habil Pósa Anikó egyetemi docens

Szász András főiskolai docens

2024. 12. 10.

Absztrakt

Bevezetés

Dolgozatom a mérsékelt intenzitású úszás kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt pre- és poszt kondicionáló hatásait vizsgálja patkány modellben. A kutatás során különös figyelmet fordítok a szívizomszövet állapotának fiziológiai és molekuláris vizsgálatára, különösen a szívinfarktust követő gyulladásos folyamatok és az oxidatív stressz következményeként kialakuló károsodások tekintetében.

Kutatási cél

A kutatás vizsgálja a rendszeres, mérsékelt intenzitású fizikai aktivitás (úszás) hatását az izoproterenol (ISO) által indukált szívizomszöveti károsodás regenerációjára, figyelembe véve az anyagcsere fokozódását, az oxidatív stressz és gyulladásos folyamatok szerepét a sejtregenerációt és a vazkularizációt.

Anyag és módszer

Vizsgálataimban állatkísérletes modellt alkalmaztam, amelyben az izoprotenerollal kezelt patkányok különböző csoportra osztva részesültek rendszeres fizikai aktivitásban. A kontroll csoporton kívül csak egy csoport egyedei nem végeztek fizikai aktivitást, ezek kizárólag ISO kezelést kaptak. Az első csoport, amelyek a kezelést megelőzően úsztak, a második csoport, akik a kezelést követően úsztak, és a harmadik csoport, akik a kezelést megelőzően és azt követően is végeztek fizikai aktivitást. Vizsgálataimat 8 hónapos hím Wistar patkányokon végeztem. Ezen csoportok egyedeinek szívében meghatároztam az ejekciós frakciót illetve az infarktusos terület nagyságát. Terminálást követően megnéztem a szív hemoxigenáz-1 (HO-1) koncentrációját, annak aktivitását; a mieloperoxidáz (MPO) aktivitását, valamint a protein-arginin-deimináz-4 (PAD4) koncentrációját.

Eredmények

A kísérletek eredményei igazolták a mozgás jótékony hatását. Csökkenést találtunk az inflammációs markerek koncentrációját és aktivitását illetően is. Az oxidatív szabadgyökök képződése visszaszorult és az infarktus okozta károsodott terület nagysága is nagyon jól

regenerálódott. Ezzel párhuzamosan az antioxidánsok képződése megemelkedett, és a szívizomszövet vérellátottsága is nagymértékben javult mind a három csoport esetében.

Következtetések

Az eredmények hangsúlyozzák a kardiotoxikus események előtt és után végzett testmozgás fontosságát a legátfogóbb kardioprotekció biztosításában. Bár az úszó terhelés által kiváltott prekondicionálás és poszt kondicionálás összetett és átfedő mechanizmusokat foglal magában, elképzelhető, hogy a HO-1/MPO/PAD4 molekuláris útvonal hozzájárul a szívizomkárosodással szembeni védelemhez.

Kulcsszavak: úszás, oxidatív stressz, antioxidáns, izoproterenol, miokardiális infarktus

1. Bevezetés

A szív- és érrendszeri megbetegedések jelentős globális egészségügyi problémát jelentenek, évente milliók életét követelve (Mendis és mtsai, 2011). Ezek közül a szívinfarktus felelős a legtöbb halálozásért. Miokardiális infarktust (MI) követően a szív - különösen bal kamrája - olyan szerkezeti változásokon megy keresztül, ami rontja annak működését. Ez a kóros átépülési folyamat az infarktus területén kezdeti gyulladásos választ és ezt követő hegesedést, valamint a nem érintett szívizom elváltozásait, például intersticiális fibrózist foglal magában (Giordano és mtsai, 2022). Szívinfarktus után egy inflammatórikus kaszkád aktiválódik (Xiao és mtsai, 2018). Ez gyulladásos sejtek (pl. makrofágok, neutrofilek) szekrécióját és különböző citokinek, például az interleukin-6 (IL-6) és a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) felszabadulását jelenti (Matusovits és mtsai, 2023; Thijssen és mtsai, 2022). Végso soron ez az átalakítás a kamrai funkció csökkenéséhez, és a szív- és érrendszeri okok miatti halálozás fokozott kockázatához vezethet (Garza, 2015).

A veleszületett immunválaszok, valamint a leukociták gyors felszaporodása szabályozva a gyulladást és az azt követő gyógyulást, kulcsszerepet játszanak az akut MI-ban (Eghbalzadeh és mtsai, 2019). Az aktivált neutrofilek extracelluláris csapdákat (NET-eket) hoznak létre, amelyek NETózist, mint specifikus sejthalált eredményeznek. A NET-ek kialakulása erősen függ attól a peptidil-arginin-deimináz 4 (PAD4) enzimtől, amely a hiszton fehérjék argininjének citrullinációjával kromatin dekonzenzációt eredményez. Állatkísérletes körülmények között kimutatták, hogy a PAD4-hiányos egerekből hiányzik a NETózis, ami jelentős védelmet jelent a szívizom iszkémia/ reperfüziós sérülésével szemben (Savchenko és mtsai, 2014). Hasonlóképpen, a megnövekedett neutrofilszám prognosztizálja a nagyobb infarktusméretet (Ma és mtsai, 2014), valamint a neutrofilek depléciója kutya iszkémia/reperfüziós modellben csökkenti az infarktus méretét (Jolly és mtsai, 1986).

A meggyőző preklinikai és klinikai bizonyítékok azonban azt mutatják, hogy a fizikai aktivitás pozitívan befolyásolhatja ezt az átalakulási folyamatot, és javíthatja a szívműködést miokardiális infarktust követően (Alavi és mtsai, 2022; McGregor és mtsai, 2016; Mitchell és mtsai, 2019; Shahsavarnajand Bonab és mtsai, 2024). Általánosságban elmondható, hogy az állóképességi terhelés véd a szívinfarktus ellen, mely hatás mértéke az edzési változók - mint például a terhelés intenzitása, időtartama, gyakorisága - kombinációjától függ. A védőfehérjék

és enzimek termelődése révén a testmozgás olyan fiziológiai válaszokat indukál, amelyek együttesen a szívizom fokozott szerkezeti és funkcionális integritásához és kardioprotektív fenotípushoz vezetnek (Powers és mtsai, 2014).

Az inflammáció az egyik legjelentősebb tényező a szívkárosodás kialakulásában, melynek kapcsán a fizikai aktivitás a gyulladásos markerek csökkentésével segíti megelőzni a patológiás átalakulást és a betegség progresszióját. Alemasi és munkatársai kimutatták, hogy az izoproterenol (ISO), mint β -adrenerg receptor agonista 20 különböző citokin génexpresszióját fokozza egerekben, amelyek közül 18-at a futási gyakorlat ellensúlyoz (Alemasi és mtsai, 2019). Hasonlóképpen, míg az IL-6 és a TNF- α fehérje szintje szignifikánsan megemelkedik az ISO-val kezelt csoportokban patkány szívizomban, a fizikai aktivitás gátolja ezen citokinek expresszióját (Serra és mtsai, 2010).

Ezenkívül a testmozgás fokozhatja a szervezet antioxidáns védekező képességét, csökkentve ezáltal azt az oxidatív stresszt, ami szintén hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásához (Cadenas, 2018; Garza, 2015; Kurian és mtsai, 2016). Kutatási eredmények igazolják, hogy a kombinált fizikai aktivitás és melatonin kezelés javítja a szívizom antioxidáns védelmét, amit a magasabb szuperoxid-diszmutáz (SOD) és glutation (GSH) szint, valamint az alacsonyabb lipid-peroxidációs markerek mutatnak (Rahman és Yang, 2023). Egy másik tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy amíg az ISO beadása növeli a teljes oxidáns státuszt, addig a nagy intenzitású intervallum terhelés sikeresen helyreállítja a teljes antioxidáns kapacitást (Shahsavarnajand Bonab és mtsai, 2024). A testmozgást követő megnövekedett endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) foszforiláció és nitrogén-monoxid (NO) termelés az ISO által kiváltott szívizom-károsodás csökkenésével is összefüggésbe hozható (Ren és mtsai, 2015). További megfigyelés, hogy a NOS inhibitor N-nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) kezelés megszüntette ezeket a hatásokat, valamint az fizikai aktivitás által biztosított szívvédelmet.

Habár a MI előtti testmozgásos prekondicionálás előnyei széles körben ismertek (Ahmadi és mtsai, 2022; Powers és mtsai, 2014; Quindry és Hamilton, 2013; Shahsavarnajand Bonab és mtsai, 2024; Thijssen és mtsai, 2022), a szívinfarktus után végzett fizikai aktivitásos beavatkozások eredményei ellentmondásosak (Azamian Jazi és mtsai, 2017; Batista és mtsai, 2013; Szabó és mtsai, 2019; Tóth és mtsai, 2022). Az infarktus utáni terheléses vizsgálatok azt mutatják, hogy a szívizom károsodás mértéke romolhat, javulhat vagy változatlan maradhat, attól függően, hogy mennyi idő telt el a kezdeti infarktus és a testmozgásos beavatkozás megkezdése között. Azamian Jazi és mtsai a szívinfarktus után két nappal egy négyhetes edzésprogramot kivitelezve megállapították, hogy a szövetsérülés

súlyosbodik a kontrollcsoporthoz képest (Azamian Jazi és mtsai, 2017). Más kutatások szignifikáns javulást mutatnak a szív átépülésében és a kamrai funkcióban az öthetes fizikai aktivitásnak köszönhetően, amikor a beavatkozás hét nappal az infarktus után kezdődött (Tóth és mtsai, 2022). Érdekes módon ez az időszak megfelel a gyulladás időbeli lefolyásának, így a testmozgás a korai gyógyulási szakaszban rontja az eredményt, míg ugyanez a beavatkozás is előnyös lehet, ha a szívfibrózis már nyilvánvaló. Ezeknek a mechanizmusoknak a megértése elengedhetetlen a célzott edzésprogramok létrehozásához, amelyek ellensúlyozhatják a kóros szív-remodellinget, és maximalizálják a szívvédelmet. A jövőbeli kutatások fontossága, hogy a testmozgásnak a szív- és érrendszeri egészségre gyakorolt további előnyei is feltáruljanak, hangsúlyozva a fizikai aktivitás, mint preventív terápiás lehetőség alapvető fontosságát.

2. Célkitűzések

Jelen vizsgálatban az ISO általi szabadgyökök felhalmozódásával kiváltott szívkárosodásnak kitett patkányok mérsékelt terhelése előtti és utáni kardioprotektív hatásainak az elemzésére törekedtünk. Az ISO hatásai közé tartozik a károsodás, a sejthalál, a szívizomsejtek apoptózisa és energia kimerülése, ami a szív működés romlásához vezet (Lobo Filho és mtsai, 2011). Megjegyzendő, hogy ezek a különféle sejtes válaszok hasonlóak a spontán és kísérletileg kiváltott infarktusok esetén. Feltételeztük, hogy a fizikai aktivitás megvédi a szívet az oxidatív jelátviteli útvonalak elnyomásával és a védőmolekulák expressziójának stimulálásával.

Ezen feltételezések tükrében az alábbi konkrét célokat tűztük ki:

1. A rendszeres, mérsékelt intenzitású terhelés anyagcserét fokozó, sejtregenerációt, valamint vaszkularizációt elősegítő hatását alapul véve meghatározni az ISO-indukált károsodott szívizomszövet fizikai aktivitás általi regenerációjának a mértékét.
2. Feltételezve a fizikai terhelés okozta regenerációt, és ezáltal a javult szívizomszöveti hatékonyságot, megvizsgálni a testmozgásnak az ejekciós frakcióra gyakorolt hatását.
3. Az ISO által kiváltott oxidatív stressz körülményei között meghatározni a hemoxigenáz (HO) aktivitását, valamint a hemoxigenáz-1 (HO-1) koncentrációját a különböző kondicionált csoportokban.
4. Az ISO kezeléssel kialakult gyulladás kapcsán nyomon követni a testmozgás mieloperoxidáz (MPO) aktivitásra gyakorolt hatását a kondicionált csoportokban.

5. A mérsékelt intenzitású terhelésnek a PAD4 koncentrációjában bekövetkező változásait az ISO-indukált szívkárosodást követően.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti elrendezés

A vizsgálatban 8 hónapos hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat standard 20-23 °C-os hőmérsékleten, megfelelő fény/sötét ciklusban tartottuk. Csoportonként legfeljebb 10 patkányt használtunk. A kísérlet kezdetén a patkányokat öt csoportra osztottuk az alábbiak szerint: (1) beavatkozás nélküli kontrollok (CTRL), (2) izoproterenollal kezelt (ISO), (3) kezelés előtti úszás + ISO (PRE + ISO), (4) ISO + kezelés utáni úszás (ISO+POST) és (5) kezelés előtti úszás + ISO + kezelés utáni úszás (PRE + ISO + POST) csoportok. 1,0 mg/kg ISO-t (Sigma Chemicals Co., Poole, UK) 1 ml fiziológiás sóoldatban hígítva bőr alá injektáltunk. Az állatok egy héttel az úszás megkezdése előtt alkalmazkodtak a vízhez. Ezt követően heti 5 napon át, 3 héten keresztül egyénileg edzettük őket egy 20 cm × 20 cm-es medencében, amely ~60 cm mély, 32-33 °C-os vízzel volt feltöltve. Minden egyes úszóedzés 30 percig tartott. Ezt követően a patkányokat törölközővel megszáritottuk, majd visszatettük őket a ketrecükbe. A PRE+ISO csoportba tartozó állatok az ISO beadása előtt 3 hétig, míg az ISO+POST csoportba tartozó állatok az ISO injekció beadása után 3 hétig edzettek, amit egy pihenőidőszak követett. A PRE + ISO + POST csoportban lévő patkányokat 3 hétig edzettük az ISO-kezelés előtt, illetve után (Osváth és mtsai, 2022).

3.2. Iszkémia/reperfúziós protokoll

A szívszöveteket gyorsan kimetszettük, és jéghideg Krebs-Henseleit pufferoldatba helyezük, amely 11,2 mM glükózt, 1,24 mM KH_2PO_4 -et, 20,1 mM nátrium-hidrogén-karbonátot (NaHCO_3) és 4,4 mM CaCl_2 -ot, 1,119 mM nátrium-kloridot (NaCl) és 1,24 mM KH_2PO_4 -ot tartalmazott. A szívet Langendorff perfúziós rendszerre szereltük fel. Retrográd perfúziót alkalmaztunk az aortán keresztül, 75 Hgmm nyomáson 5% CO_2 -ot és 95% O_2 -t tartalmazó Krebs-Henseleit pufferrel 37 °C-on. A perfúziót követően helyi iszkémiát váltottunk ki a LAD 30 vagy 45 perces elzárásával, majd ezt követően 120 perces reperfúzió követett. Minden kísérlet végén a LAD-t újra elzártuk, a perfúziót leállítottuk és a szíveket 1%-os Evans-kék oldattal megfestettük. A szívmintákat egy éjszakán át -20 °C-on lefagyasztottuk. A fagyasztott szívszövet-mintákat 2 mm vastag keresztmetszetű szeletekre vágtuk, és 1%-os 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid (TTC) oldatba merítettük foszfátpuffer

sóoldatban (pH 7,4) 10 percre 37°C-on. A TTC festést követően a szövetszeleteket formalin (10%-os) oldatba vittük át 10 percre, majd foszfátpufferbe (pH 7,4) helyeztük. Az inkubálást követően minden szelet mindkét oldalát lefényképeztük, szkenneltük (Szabó és mtsai, 2018).

3.3. HO aktivitás mérése

A szívsvövegetek 4 °C-on homogenizáltak. A homogenizáló puffer 10,0 mM HEPES-t, 32,0 mM szacharózt, 1,0 mM ditiotritol 1,4-bisz-(szulfanil) -bután-2,3-diolt (DTT), 0,10 mM etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), 10,0 µg/ml tripszin inhibitort, 10,0 µg/ml leupeptint és 2,0 µg/ml aprotonint tartalmazott, pH 7,4. 15 000 g-vel 20 percig 4 °C-on végzett centrifugálás után a felülúszó folyadékot összegyűjtöttük. A reakcióelegy a következő vegyületeket tartalmazta 1,50 ml össztérfogatban: 2,0 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, 15,0 µM hemin, 120,0 µg/ml patkánymáj citoszol, 2,0 mM magnézium-klorid-hexahidrát ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 100,0 mM kálium-dihidrogén-foszfát (KH_2PO_4) és 150,0 µl felülúszó. A reakciót 100,0 µl redukált béta-nikotinamid adenin-dinukleotid-foszfát ($\beta\text{-NADPH}$) hozzáadásával és sötétben, 37 °C-on 60 percig tartó inkubálással indítottuk és jeges hűtéssel állítottuk le. A bilirubintartalmat a következőképpen határoztuk meg: 465 és 530 nm-en mértük az optikai denzitást és kiszámítottuk a két sűrűség közötti különbséget. A HO-aktivitást az óránként termelt bilirubin mennyiségeként határoztuk meg (nmol-ban) milligramm fehérjére vonatkoztatva (Szabó és mtsai, 2019).

3.4. HO-1 és PAD4 koncentráció mérése ELISA módszerrel

A porított kamrai mintából körülbelül 40 mg-ot jéghideg foszfát pufferben (pH 7,4) 20 másodpercig homogenizáltunk, majd 4 °C-on történő centrifugálás után (20 perc, 2500 rpm) felülúszót nyertünk a további ELISA- és fehérjeelemzésekhez. Minden lyukba 40 µL szívsvöveti felülúszóból vagy 50 µL standard oldatot adtunk, beleértve a monoklonális antitestet (Gen Asia Biotech Co., Ltd., Shanghai, Kína). Ezután 10 µL biotinnal jelölt másodlagos ellenanyagot adtunk minden egyes mélyedésbe, majd 50 µL Streptavidin-HRP-t adtunk a felülúszóhoz és a standardhoz; a következőkben biotinnal jelölt ellenanyaggal alkottunk immunkomplexet. Ezt követően a lemezt 60 perc 37 °C-on történő inkubálás után ötször mostuk, hogy a nem kötött enzimeket eltávolítsuk. Az A és B szubsztrátot (50 µL) adtuk a lyukakba, és 10 percig inkubáltuk 37 °C-on a színfejlődés érdekében. Az utolsó lépésben 50 µL stop-oldatot adtunk a lyukakba és pipettáztuk, ami a színváltozást eredményezte kékről sárgára. Az adatokat 450 nm-es optikai sűrűségen gyűjtöttük egy mikroplassen olvasó készülékben (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.5. A mieloperoxidáz (MPO) aktivitás mérése

A mintákat jégen foszfátpufferből és 0,5% hexadecil-trimetil-ammonium-umbromidból (pH 6,0) álló oldatban homogenizáltuk. Háromszori fagyasztás és olvasztás után 15 000 g-vel centrifugáltuk 15 percig 4 °C-on. A felülúszót eltávolítottuk és egy 12 µl alikvot részt pipettáztunk 280 µl PBS (pH 6,0) és 0,167 mg/ml O-dianizidin-dihidroklorid keverékébe. A reakciót 10 µl 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk, majd a MPO aktivitását spektrofotometriásan mértük 490 nm-en (Szabó és mtsai, 2019).

3.6. Fehérje meghatározás

A kereskedelembe kapható protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) segítségével a hígított minták alikvotjait (20 µl) összekevertük 980 µl desztillált vízzel és minden mintához 200 µl Bradford reagenst adtunk. Keverés és 10 perces inkubálás után a mintákat spektrofotometriásan vizsgáltuk 595 nm-en. A fehérjeszinteket mg fehérje/ml-ben fejezzük ki (Szabó és mtsai, 2019).

3.7. Statisztikai analízis

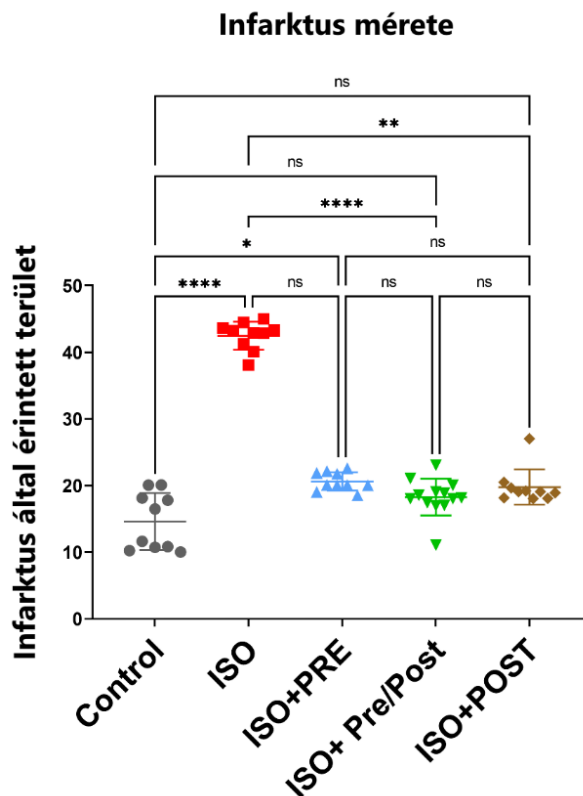
Az adatok a csoport átlagértékeként $\pm$ standard eltérés (SD) szerepelnek. A végpontparaméterek - az in vivo és in vitro adatokat tartalmazó - három csoporton belüli összehasonlításához a Gauss-eloszlást a Shapiro-Wilk-féle normalitásvizsgálat segítségével értékeltük. Ezt követően statisztikai elemzéseket végeztünk egyirányú varianciaanalízis (ANOVA) alkalmazásával, Tukey post-hoc teszttel kísérve, azon feltételek mellett, hogy az F elérte a $p < 0,05$ értéket, a normalitás tesztje megfelelt, és nem észleltünk jelentős variancia heterogenitást. Azokban az esetekben, amikor a normalitásvizsgálat nem felelt meg a szükséges kritériumoknak, a Kruskal-Wallis-tesztet alkalmazták, amelyet Dunn post-hoc tesztje követett. Minden statisztikai elemzést a GraphPad Prism szoftverrel végeztünk Windows alatt.

4. Eredmények

4.1. Az infarktus által érintett terület nagysága

Amint azt az 1. ábra is mutatja, az ISO kezelés szignifikáns mértékben ($p < 0,0001$) megnövelte az infarktus által érintett terület nagyságát a kontrollhoz képest. Ezzel szemben elmondható, hogy mind a pre-, mind a posztkondicionált úszás szignifikánsan ($p < 0,0001$) csökkentette a szívkárosodás mértékét a nem edzett ISO csoporthoz viszonyítva. További

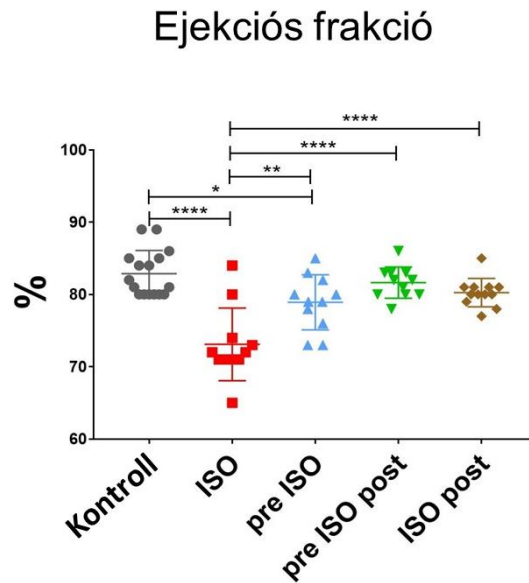
megfigyelés, hogy hasonló eredményhez vezetett az ISO kezelés előtti és utáni fizikai aktivitás kombinációja is. Kijelenthető, hogy mindhárom kondicionált állapot elősegíti az izomszövet regenerációját.



1. ábra: Az infarktussal érintett terület változása a kezelt (ISO), illetve a kezelésben és mérsékelt intenzitású terhelésben részt vett patkányok szívizomszövetében. (ISO+PRE: kezelés előtt terhelte csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után terhelte csoport, ISO+POST: kezelés után terhelte csoport). Az eredmények legalább 10 patkány adatainak átlag ± szórása. Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.2. Az ejekciós frakció térfogat változása

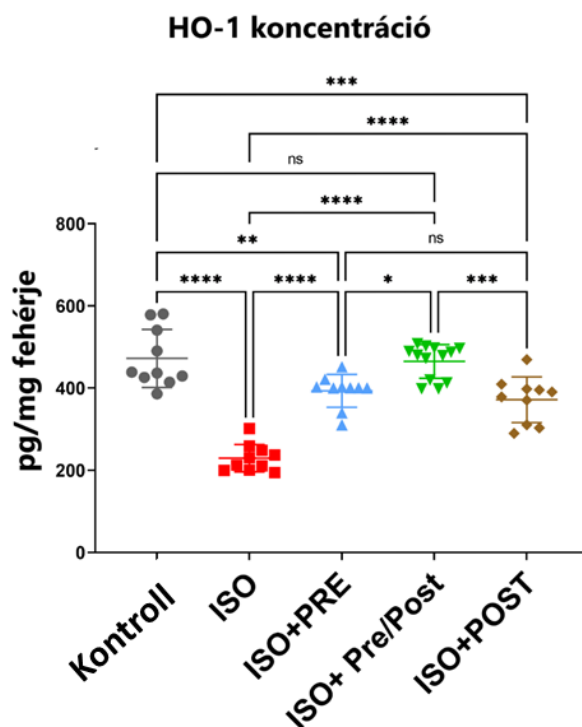
Az ejekciós frakció nagysága szignifikánsan ($p < 0,0001$) csökkent az ISO által indukált szívkárosodást követően. Megfigyelésünk, hogy ezt a térfogat csökkenést mindhárom kondicionált állapot jelentős arányban kivédte. A legnagyobb mértékű szignifikáns ($p < 0,0001$) javulást a ISO+PRE/POST csoport mutatta. Ez alapján elmondható, hogy a fizikai terhelés fontos indikátora a szívfunkció javulásának. Az eredményeket a 2. ábra mutatja be.



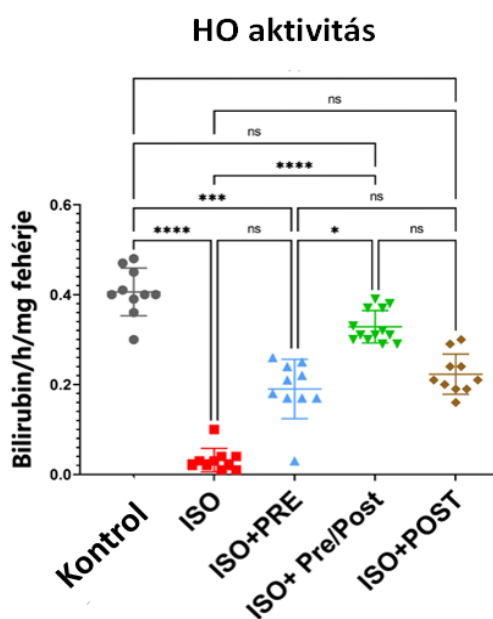
2. ábra: Az ejekciós frakció (%-ban kifejezve) változása a kezelt (ISO), illetve a kezelésben és mérsékelt intenzitású terhelésben részt vett patkányok esetén. (ISO+PRE: kezelés előtt terhelt csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után terhelt csoport, ISO+POST: kezelés után terhelt csoport) Az eredmények legalább 10 patkány adatainak átlag+szórása. Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.3. HO-1 enzim koncentráció és HO aktivitás mérése

A HO-1 enzim koncentrációja szignifikáns mértékben ($p < 0,0001$) csökkent az ISO-kezelt állatok esetén a kontrollcsoporthoz viszonyítva (3. ábra). További megfigyelésünk, hogy a HO-1 koncentráció szignifikánsan ($p < 0,0001$) megemelkedett mindhárom kondicionált csoportnál, összehasonlítva az ISO-kezelt állatokkal. A legnagyobb mértékű ilyen jellegű változást az ISO+PRE/POST csoport mutatta. Ezzel párhuzamosan a HO aktivitását nyomon követve elmondható, hogy a mérsékelt intenzitású úszás mindhárom kondicionált csoportban fokozta a HO aktivitását (4. ábra). A legnagyobb mértékű, szignifikáns ($p < 0,0001$) aktivitásbeli növekedés szintén az ISO+PRE/POST csoportnál volt megfigyelhető.



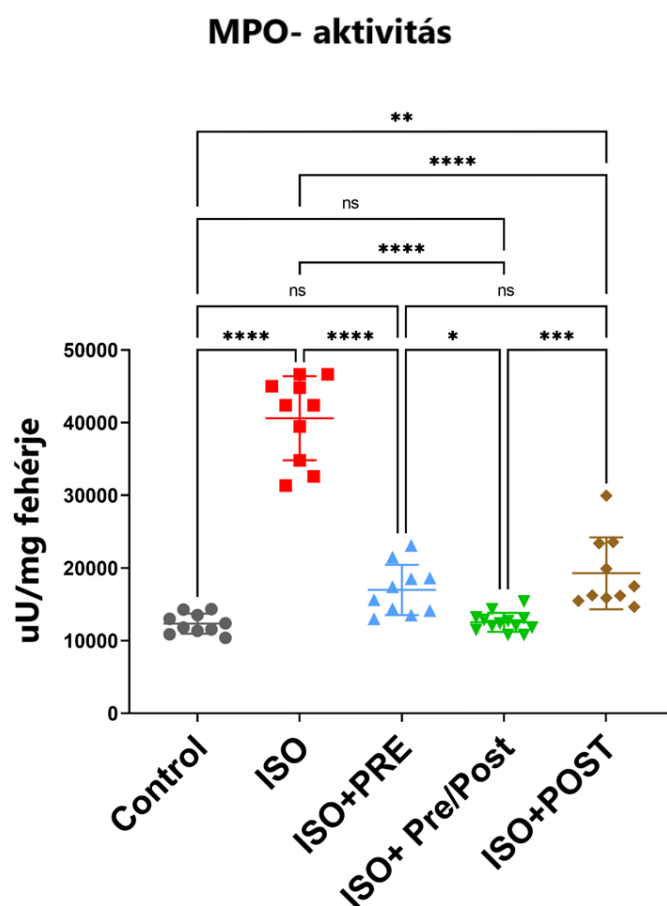
3. ábra: A HO-1 koncentráció (pg/mg fehérjében kifejezve) alakulása a kezelés (ISO), illetve a különböző kondicionálás hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (ISO+PRE: kezelés előtt terhelt csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után terhelt csoport, ISO+POST: kezelés után terhelt csoport) Az eredmények legalább 10 patkány eredményeinek átlag±szórása. Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$**



4. ábra: A HO aktivitás (bilirubin/h/mg fehérjében megadva) változása a kezelés (ISO), illetve a különböző kondicionálás hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (ISO+PRE: kezelés előtt kondicionált csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után kondicionált csoport, ISO+POST: kezelés után kondicionált csoport). Az eredmények legalább 10 patkány adatainak átlag±szórása. Statisztikai szignifikancia: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$

4.4. MPO aktivitás mérése

Az 5. ábra az MPO aktivitásának alakulását mutatja, mely szerint az ISO kezelés következtében szignifikánsan ($p<0,0001$) megemelkedett enzimaktivitás tapasztalható a kezeletlen, kontroll állatokhoz képest. Ezzel szemben a fizikai aktivitás mindhárom kondicionált csoportban szignifikánsan ($p<0,0001$) csökkentette az MPO aktivitást az ISO-kezelt csoporttal összehasonlítva.

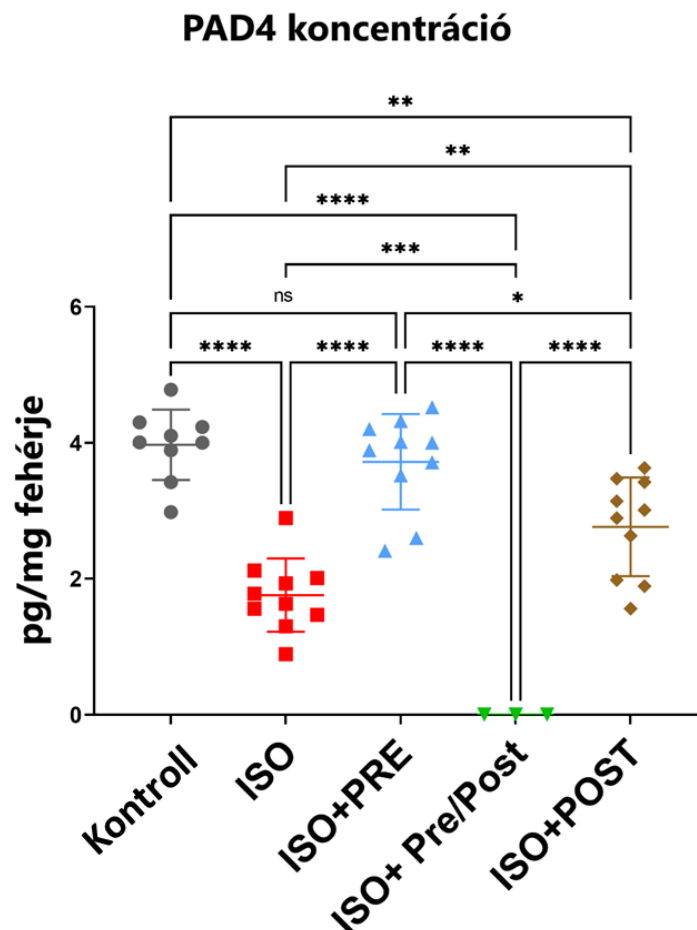


5. ábra: Az MPO aktivitás (uU/mg fehérjében megadva) változása a kezelés (ISO), illetve a különböző kondicionálás hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (ISO+PRE: kezelés előtt kondicionált csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után kondicionált csoport, ISO+POST: kezelés

után kondicionált csoport). Az eredmények legalább 10 patkány adatainak $\text{átlag} \pm \text{szórása}$. Statisztikai szignifikancia: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.5. PAD4 enzim koncentráció mérése

A PAD4 enzim koncentrációjának vizsgálata során tett megfigyelésünk, hogy az ISO-val kezelt állatok PAD4 mennyisége szignifikánsan ($p < 0,0001$) lecsökkent a kontroll állatokhoz képest (6. ábra). A fizikai aktivitás a pre-, valamint posztkondicionált csoportok esetén szignifikáns mértékben megemelte a PAD4 koncentrációját az ISO-kezelt csoporthoz viszonyítva. Érdekes megfigyelés, hogy az ISO+PRE/POST állatoknál az ISO csoporthoz hasonlóan, szintén szignifikánsan ($p < 0,0001$) csökkent a PAD4 jelenléte, összehasonlítva kontrollcsoporttal. Megjegyzendő, hogy ennél a csoportnál szükséges az elemszám bővítése ahhoz, hogy egyértelmű következtetést tudjunk levonni.



6. ábra: A PAD4 enzim koncentráció (pg/mg fehérjében megadva) változása a kezelés (ISO), illetve a különböző kondicionálás hatására a kontrollcsoporthoz viszonyítva. (ISO+PRE: kezelés előtt kondicionált csoport, ISO+PRE/POST: kezelés előtt és után kondicionált csoport, ISO+POST: kezelés

után kondicionált csoport). Az eredmények legalább 10 patkány adatainak átlag±szórása. Statisztikai szignifikancia: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$

5. Diskusszió

A jelenlegi vizsgálat kimutatta, hogy a mérsékelt úszó edzés jelentős kardioprotektív hatást fejt ki az ISO-kezelésnek kitett patkányoknál. Figyelemre méltó, hogy ez volt az első olyan vizsgálat, amely szisztematikusan összehasonlította a MI előtti és utáni edzés hatását ebben a modellben. Az itt bemutatott echokardiográfiás és molekuláris adatok szerint az ISO által kiváltott szívizomkárosodásra a kombinált edzés volt a leghatékonyabb. Vizsgálatunkban azt is megfigyeltük, hogy a MI utáni testmozgás pozitív hatású volt, amely eredmény összhangban van mások megfigyeléseivel (Azamian Jazi és mtsai, 2017; Batista és mtsai, 2013; Szabó és mtsai, 2019; Tóth, Oroszi, Van Der Zee és mtsai, 2022; Tóth, Oroszi, Zee és mtsai, 2022).

Továbbá eredményeink arra utalnak, hogy csak a PRE + ISO + POST, illetve az ISO + POST edzésprotokoll eredményezte az infarktus méretének csökkenését, míg az MI előtti edzésnek nem volt jelentős hatása a szívizomkárosodásra. Mindazonáltal Veiga és munkatársai (Veiga és mtsai, 2011) leírták, hogy az iszkémia-reperfúziós sérülést megelőző 8 hetes úszóedzés nem mérsékelte a szívizomkárosodást. A mi vizsgálatunkhoz képest azonban fontos különbségek voltak a vizsgálati tervben. A kutatók nőstény patkányokat használtak és koszorúér-lekötést végeztek, közepes és nagy infarktusméretű állatokat vontak be, ami befolyásolhatta az eredményeket. Megállapításaink összhangban vannak a korábbi adatokkal, amelyek azt mutatják, hogy a testmozgás képes helyreállítani mind a szisztolés, mind a diasztolés funkciókat (Ren és mtsai, 2015; Shanmugam és mtsai, 2019; Yusifov és mtsai, 2023). Bár a mért paraméterek gyakran eltérnek a jelenlegi elemzéstől, a testmozgás következetesen javította az EF értéket az ISO-indukált szívizomkárosodásban, ahogyan azt a mi vizsgálatunkban is megfigyeltük. Bár a mi vizsgálatunkban nem mértünk fibrotikus markereket, jól elfogadott, hogy az ISO beadása szívfibrózishoz vezet, ami szívizom működési zavarokat eredményez, és a testmozgás bizonyítottan ellensúlyozza ezt a negatív hatást (Ma és mtsai, 2015; Peng és mtsai, 2024; Tóth, Oroszi, Van Der Zee és mtsai, 2022). Az ISO adása a gyulladáshoz kapcsolódó MPO enzim jelentős növekedését eredményezte, miközben egyidejűleg csökkentette a HO-1 antioxidáns enzim szintjét és gátolta aktivitását a bal kamrában. Másrészt, amikor az ISO-kezelést mérsékelt úszóedzés előzte meg vagy követte, ezen enzimek szintje visszatért a kontrollban tapasztalthoz. Mivel a HO-1 egy stressz-indukált

fehérje, amely nélkülözhetetlen a hem-anyagcserében, mivel katalizálja a hem szabad vassá, szén-monoxiddá (CO) és biliverdinné történő átalakulását (Ryter és mtsai, 2006). A biliverdin/bilirubin és a CO gyulladáscsökkentő, anti-apoptotikus és antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik. Ezért a HO-1 fehérje expressziójának helyreállítása hozzájárulhatott a vizsgálatunkban megfigyelt kardioprotektív hatáshoz.

Az antioxidáns és gyulladáscsökkentő HO-1, PAD4 fehérje expressziójának és aktivitásának fokozása mellett a testedzés gátolta a gyulladásos MPO-t is. Ezek az eredmények megerősítik korábbi eredményeinket, amikor ösztrogénhiányos nőstény állatokban kimutattuk, hogy a testmozgás hatékonyan csökkentette az MPO-t és növelte a HO-1 és a GSH mennyiségét ISO-kezelést követően (Szabó és mtsai, 2019). Bár ebben a vizsgálatban nem mértünk más antioxidáns molekulákat, Ma és munkatársai (Ma és mtsai, 2015) arról számoltak be, hogy az úszódzés a szuperoxid-diszmutáz (SOD1 és SOD2) mRNS és fehérje expressziójának jelentős növekedését eredményezte ISO kezelt egerekben.

Az érintett mechanizmusok átfogó megértése érdekében a jövőbeli kutatásoknak a reaktív oxigénfajok (ROS) mérésére is ki kell terjedniük ebben a modellben. Az ilyen mérések tisztáznák, hogy a testmozgás megfigyelt kardioprotektív hatásai elsősorban az oxidáns-termelés elnyomásának vagy a ROS-felszabadítás fokozódásának köszönhetőek. Ezek a további adatok értékes betekintést nyújthatnának abba, hogy a testmozgás milyen specifikus utakon keresztül fejti ki kedvező hatását, ami végső soron célzottabb terápiás stratégiákhoz vezethet.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. habil. Pósa Anikó egyetemi docensnek, Szász András főiskolai docensnek a sok segítségért, a belefektetett munkaórákért, valamint figyelmességükért és megtisztelő bizalmukért.

Külön szeretném megköszönni a laborban dolgozó munkatársaimnak: Dr. Kupai Krisztina, Dr. Varga-Matusovits Danica, Szekeres-Varnyú Andrea, Hsu Lin Kang, Dr. Ungvári Krisztina, Baráth Dorka, Regős Eszter. A kutatást a Szegedi Tudományegyetem Interdiszciplináris Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Kiválósági Központjának Inkubációs Kompetencia Központja támogatta, GINOP_PLUSZ-2.1.1-21-2022-00083.

7. Irodalomjegyzék

1. Ahmadi, M.N., Clare, P.J., Katzmarzyk, P.T., Del Pozo Cruz, B., Lee, I.M., Stamatakis, E. (2022): Vigorous physical activity, incident heart disease, and cancer: how little is enough? *Eur Heart J* 7;43(46):4801-4814.
2. Alavi, S.S., Joukar, S., Rostamzadeh, F., Najafipour, H., Darvishzadeh-Mahani, F., Mortezaeizade, A. (2022): Exercise Training Attenuates Cardiac Vulnerability and Promotes Cardiac Resistance to Isoproterenol-Induced Injury Following Hookah Smoke Inhalation in Male Rats: Role of Klotho and Sirtuins. *Cardiovasc Toxicol* Jun;22(6):501-514.
3. Alemasi, A., Cao, N., An, X., Wu, J., Gu, H., Yu, H., Song, Y., Wang, H., Zhang, Y., Xiao, H., Gao, W. (2019): Exercise Attenuates Acute β -Adrenergic Overactivation-Induced Cardiac Fibrosis by Modulating Cytokines. *J Cardiovasc Transl Res* Dec;12(6):528-538.
4. Azamian Jazi, A., Abdi, H. , Ahmadi, M.R.H., Cheraghi, J. (2017): Effect of endurance exercise training on morphological changes in rat heart tissue following experimental myocardial infarction. *J Bas Res Med Sci* 4(1): 8-16.
5. Batista, D.F., Gonçalves, A.F., Rafacho, B.P., Santos, P.P., Minicucci, M.F., Azevedo, P.S., Polegato, B.F., Fernandes, A.A., Okoshi, K., Paiva, S.A., Zornoff, L.A. (2013): Delayed rather than early exercise training attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol* 5;170(1):e3-4.
6. Cadenas, S. (2018): ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med* Mar;117:76-89.
7. Eghbalzadeh, K., Georgi, L., Louis, T., Zhao, H., Keser, U., Weber, C., Mollenhauer, M., Conforti, A., Wahlers, T., Paunel-Görgülü, A. (2019): Compromised Anti-inflammatory Action of Neutrophil Extracellular Traps in PAD4-Deficient Mice Contributes to Aggravated Acute Inflammation After Myocardial Infarction. *Front Immunol* Oct 1;10:2313.
8. Garza, M.A., Wason, E.A., Zhang, J.Q. (2015): Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction. *World J Cardiol* Feb 26;7(2):52-64.
9. Giordano, C., Francone, M., Cundari, G., Pisano, A., d'Amati, G. (2022): Myocardial fibrosis: morphologic patterns and role of imaging in diagnosis and prognostication. *Cardiovasc Pathol* Jan-Feb;56:107391.
10. Jolly, S.R., Kane, W.J., Hook, B.G., Abrams, G.D., Kunkel, S.L., Lucchesi, B.R. (1986): Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am Heart J* Oct;112(4):682-90.

11. Kurian, G.A., Rajagopal, R., Vedantham, S., Rajesh, M. (2016): The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1656450.
12. Lobo Filho, H.G., Ferreira, N.L., Sousa, R.B., Carvalho, E.R., Lobo, P.L., Lobo Filho, J.G. (2011): Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Rev Bras Cir Cardiovasc* Jul-Sep;26(3):469-76.
13. Ma, P., Zhang, Z., Song, T., Yang, Y., Meng, G., Zhao, J., Wang, C., Gu, K., Peng, J., Jiang, B., Qi, Y., Yan, R., Ma, X. (2014): Combining ECMO with IABP for the treatment of critically ill adult heart failure patients. *Heart Lung Circ* Apr;23(4):363-8.
14. Matusovits, D., Murlasits, Z., Kupai, K., Baráth, Z., Kang, H.L., Osváth, P., Szűcs, M., Priksz, D., Juhász, B., Radák, Z., Várkonyi, T., Pavo, I., Pósa, A. (2023): Paclitaxel Protects against Isoproterenol-Induced Damage in Rat Myocardium: Its Heme-Oxygenase Mediated Role in Cardiovascular Research. *Antioxidants (Basel)* May 20;12(5):1129.
15. McGregor, G., Gaze, D., Oxborough, D., O'Driscoll, J., Shave, R. (2016): Reverse left ventricular remodeling: effect of cardiac rehabilitation exercise training in myocardial infarction patients with preserved ejection fraction. *Eur J Phys Rehabil Med* Jun;52(3):370-8.
16. Mendis, S., Thygesen, K., Kuulasmaa, K., Giampaoli, S., Mähönen, M., Ngu Blackett, K., Lisheng, L. (2011): World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. Writing group on behalf of the participating experts of the WHO consultation for revision of WHO definition of myocardial infarction. *Int J Epidemiol* Feb;40(1):139-46.
17. Mitchell, B.L., Lock, M.J., Davison, K., Parfitt, G., Buckley, J.P., Eston, R.G. (2019): What is the effect of aerobic exercise intensity on cardiorespiratory fitness in those undergoing cardiac rehabilitation? A systematic review with meta-analysis. *Br J Sports Med* Nov;53(21):1341-1351.
18. Osvath, P., M. Szucs, D. Borzsei, R. Szabo, Z. N. Lesi, Z. Turcsan, M. Veszeka, J. Sebestyen, B. Juhasz, D. Priksz, C. Varga and A. Posa (2022): Andrological Aspects of Exercise: Moderate Swimming Protects against Isoproterenol Induced Testis and Semen Abnormalities in Rats. *Antioxidants (Basel)* 11(3).
19. Peng, Y., Qin, D., Wang, Y., Gao, W., & Xu, X. (2024). Pharmacological inhibition of ICOS attenuates the protective effect of exercise on cardiac fibrosis induced by isoproterenol. *European Journal of Pharmacology*, 965, 176327. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176327>
20. Powers, S.K., Smuder, A.J., Kavazis, A.N., Quindry, J.C. (2014): Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda)* Jan;29(1):27-38.

21. Quindry, J.C., Hamilton, K.L. (2013): Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury. *Curr Cardiol Rev* Aug;9(3):220-9.
22. Rahman, M.M., Yang, D.K. (2023): Melatonin Supplement Plus Exercise Effectively Counteracts the Challenges of Isoproterenol-Induced Cardiac Injury in Rats. *Biomedicines* Feb 1;11(2):428.
23. Ren, J., Yang, L., Tian, W., Zhu, M., Liu, J., Lu, P., Li, J., Yang, L., Qi, Z. (2015): Nitric oxide synthase inhibition abolishes exercise-mediated protection against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in female mice. *Cardiology* 2015;130(3):175-184.
24. Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. K. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiological Reviews*, 86(2), 583–650. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2005>
25. Savchenko, A.S., Borissoff, J.I., Martinod, K., De Meyer, S.F., Gallant, M., Erpenbeck, L., Brill, A., Wang, Y., Wagner, D.D. (2014): VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* Jan 2;123(1):141-8.
26. Shahsavarnajand Bonab, H., Azar, J.T., Soraya, H., Habashi, A.N. (2024): Aerobic interval training preconditioning protocols inhibit isoproterenol-induced pathological cardiac remodeling in rats: Implications on oxidative balance, autophagy, and apoptosis. *Sports Med Health Sci* Feb 2;6(4):344-357.
27. Serra, A.J., Santos, M.H., Bocalini, D.S., Antônio, E.L., Levy, R.F., Santos, A.A., Higuchi, M.L., Silva, J.A., Magalhães, F.C., Baraúna, V.G., Krieger, J.E., Tucci, P.J. (2010): Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity. *J Physiol* Jul 1;588(Pt 13):2431-42.
28. Shanmugam, G., Challa, A. K., Devarajan, A., Athmanathan, B., Litovsky, S. H., Krishnamurthy, P., Davidson, C. J., & Rajasekaran, N. S. (2019). Exercise Mediated Nrf2 Signaling Protects the Myocardium From Isoproterenol-Induced Pathological Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 68. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00068>
29. Szabo, R., D. Borzsei, Z. Karacsonyi, R. Gesztelyi, K. Nemes, A. M. Berko, M. Veszélka, S. Torók, K. Kupai, C. Varga, B. Juhasz and A. Posa (2019): Postconditioning-like effect of exercis: new paradigm in experimental menopause. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 316(2): H400-H407.

30. Szabo, R., Z. Karacsonyi, D. Borzsei, B. Juhasz, A. Al-Awar, S. Torok, A. M. Berko, I. Takacs, K. Kupai, C. Varga and A. Posa (2018): Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 6709742.
31. Thijssen, D.H.J., Uthman, L., Somani, Y., van Royen, N. (2022): Short-term exercise-induced protection of cardiovascular function and health: why and how fast does the heart benefit from exercise? *J Physiol* Mar;600(6):1339-1355.
32. Tóth, K., Oroszi, T., van der Zee, E.A., Nyakas, C., Schoemaker, R.G. (2022): The effects of exercise training on heart, brain and behavior, in the isoproterenol-induced cardiac infarct model in middle-aged female rats. *Sci Rep* 16;12(1):10095.
33. Tóth, K., Oroszi, T., Zee, E. A., Nyakas, C., & Schoemaker, R. G. (2022). *Exercise Training After Isoproterenol in Middle-Aged Female Rats Reversed Effects on the Heart, Without Affecting the Brain*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1273661/v1>
34. Veiga, E.C.A., Antonio, E.L., Bocalini, D.S., Murad, N., Abreu, L.C., Tucci, P.J.F., & Sato, M.A. (2011). Prior exercise training does not prevent acute cardiac alterations after myocardial infarction in female rats. *Clinics*, 66(5), 889–893. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000500028>
35. Veiga, E.C.D.A., Melo, B.L.D., Vieira, S.D.S., Simões, R.S., Valenti, V.E., Campos, M.F., Vale, J.E.T.M.R.D., Rica, R.L., Soares-Júnior, J.M., Baracat, E.C., Serra, A.J., Baker, J.S., Bocalini, D.S. (2020). Prior exercise training and experimental myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Clinics*, 75, e1293. <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e1293>
36. Xiao, H., Li, H., Wang, J.J., Zhang, J.S., Shen, J., An, X.B., Zhang, C.C., Wu, J.M., Song, Y., Wang, X.Y., Yu, H.Y., Deng, X.N., Li, Z.J., Xu, M., Lu, Z.Z., Du, J., Gao, W., Zhang, A.H., Feng, Y., Zhang, Y.Y. (2018): IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon beta-adrenergic insult. *Eur Heart J* Jan 1;39(1):60-69.
37. Yusifov, A., Borders, M. O., DeHoff, M. A., Polson, S. M., Schmitt, E. E., & Bruns, D. R. (2023). Juvenile physical activity protects against isoproterenol-induced cardiac dysfunction later in life. *Journal of Applied Physiology*, 135(3), 572–583. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00010.2023>