

A magas aerob kapacitás szerepe a programozott sejthalálban patkány herében: rák prevenció?

Bevezetés

Régóta ismert az a tény, hogy az alacsony maximális oxigén felvétel (VO_{2max}) növeli különböző betegségek megjelenésének kockázatát. Szerteágazó ennek preventív jellege, többek között a daganatos megbetegedésekre, a szív-, és érrendszeri betegségekre, a diabéteszre és az obezitásra is igazoltan pozitív hatással van a maximális oxigén felvétel magasabb szintje. Az aerob kapacitás genetika és életmód függő. A fizikai aktivitás és a táplálkozás is egyén specifikus, különböző módon hatnak az eltérő genetikával rendelkezők testösszetételére (Nehrenberg, Hua és mtsai 2009).

A rákos megbetegedések esetében, a magas VO_{2max} csökkenti a mellrák, vastagbélrák és prosztaták előfordulását, ám a mechanizmus mellyel ez a preventív folyamat lejátsszódik eddig még nem igazán ismert. Az egyik támadáspont a programozott sejthalál, apoptózis, megváltozott szabályozása lehet.

Az apoptózis, mechanizmusának megfelelő működése döntő fontosságú mind a sejtciklus folyamatában, mind az egyedfejlődésünk során például az ujjak szétválásában. A kutatásunk kapcsán az apoptózis legnagyobb jelentőségű aspektusa, hogy a daganatok kialakulásában is szerepet játszik, mivel a daganatos sejtekben az apoptózis folyamata nem tud végbemenni, így történhet meg, hogy a daganatos sejtek osztódása nem esik gátlás alá. Éppen ezért az apoptózis vizsgálata elengedhetetlen bármilyen daganatos megbetegedés patogenezisének vizsgálatához.

A Bcl-2 egy onkogén eredetű, apoptózist elnyomó molekula, amely a follikuláris limfómák 90%-ánál kimutatható (Marlene Ochmann, Christiane Copie-Bergman és mtsai 2012). Egyéb daganatos megbetegedésekben is ismert a jelenléte (melanoma, melldaganat,

prosztata daganat, tüdő karcinóma) csakúgy, mint a skizofréniánál és különböző autoimmun betegségeknél (pl. 1-es típusú diabétesz). A Bax elnevezésű pro-apoptikus fehérjével folyamatosan versengenek a programozott sejthalál elnyomásáért illetve serkentéséért (Basu és Haldar 1998).

Az apoptózis regulációjában fontos szerepet játszik a p53 nevezetű protein, mely a sejtciklus G1/S1 fázisát ellenőrzi (Basu és Haldar 1998). Amennyiben a DNS hibás, a p53 fehérje foszforilálódik. Ezzel elindít egy folyamatot, melynek végén a sejtciklus leáll. Ez funkcióvesztéshez, korlátlan osztódáshoz, ezáltal tumorképződéshez vezet. A p53 a humán daganatok több mint felében nem funkcionál megfelelően. Az orvostudomány területén betöltött legfontosabb szerepe, hogy a kemoterápia hatását is pozitívan befolyásolja. Ez a rezveratrolról is igazolást nyert (Wang, Galson és mtsai 2011). Ma már végeznek a p53 jelenlétét vizsgáló eljárást. Amennyiben nincs jelen a szervezetben, a kemoterápia nem tudja kifejteni hatását, a szervezetre így kizárólag negatív hatással van (Goh, Coffill és mtsai 2011). A p53 aktivitásának az egyik aktiválója a SIRT1.

A sejten belüli anyagcsere folyamatok is szorosan kapcsolódnak a sejtosztódáshoz, és az anyagcsere folyamatok egyik fő szabályzója a sirtuin fehérje család. A SIRT1 enzim kiválóan aktiválható rezveratrollal. Így megvizsgáltuk a rezveratrol adagolás hatásait. Ez az anyag gyümölcsökben, ezen belül is kifejezetten a vörös szőlőben található meg. Jelentős mennyiségben tartalmaz rezveratrolt a kakaó, az étcsokoládé és a mogyoró is.

A rezveratrolt a növény immunválasza során termeli, mely ezáltal a fertőzésektől véd. Állatkísérletekben megfigyelt rákellenes, gyulladáscsökkentő, vércukorcsökkentő, és a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt jótékony hatását humán vizsgálatokban is igyekeznek feltérképezni. Az eddig publikált rezveratrollal kapcsolatos pozitív eredményű humán vizsgálatokban a rezveratrol nagy dózisa volt szükséges a vércukorszint csökkentéséhez vagy hasonló, a 2-es típusú cukorbetegséget pozitívan befolyásoló kezelésében (Bhatt, Thomas és

mtsai 2012). Humán vizsgálatok kapcsán számos eltérő eredményt találhatunk, például az obezitással kapcsolatban kétségek merülnek fel a rezveratrol inzulin érzékenységre, vérnyomásra, metabolikus biomarkerekre való hatásosságával kapcsolatban (Poulsen, Vestergaard és mtsai 2012). Ez köszönhető lehet a humán modell még kevésbé kifinomult beállításának is.

A daganatos megbetegedésekre és a gyulladásos folyamatokra pozitív hatást fejt ki. Ez elmondható a SIRT1 fehérjéről is (Olmos, Brosens és mtsai 2011). Ez a fehérje NAD jelenlétében képes deacetilálni más fehérjéket, mely jelenthet aktiválást vagy gátlást is. Mindemellett végeztek olyan vizsgálatot is, mely szerint a rezveratrol nem tudja kifejteni kedvező hatásait megfelelő mennyiségű SIRT1 fehérje nélkül. A fentiek alapján az alábbi hipotéziseket fogalmaztuk meg.

Hipotéziseink

1. A rendszeres edzés és/vagy rezveratrol adagolás befolyásolja a SIRT1 szintjét és az ehhez kapcsolódó folyamatokat.
2. Edzés és/vagy rezveratrol hatására az apoptózissal és a tumor szuppresszióval összefüggésben álló fehérjék (p53, Bax) szintje nő, mindemellett a tumor képződéssel kapcsolatos fehérje (Bcl-2) szintje csökken a herékben.

A vizsgálat menete

Szelektíven tenyésztett patkányokkal végeztük a vizsgálatot. Alacsony futási kapacitású állatokat (LRC) egymással, míg a magas futási kapacitású állatokat (HRC) is egymással pároztatták generációkon keresztül, a tenyésztés Kochnak és Brittonnak köszönhető. Vizsgálataik által az is nyomon követhető, hogy a futási kapacitás milyen mértékben változik a generációk folyamán. Kimutatták, hogy a 6. generáció esetén 171%-os

különbség mutatkozott az állatok futási kapacitásában (Koch and Britton 2001), a 11. generációban pedig 347%-os volt a különbség a két csoport között (Wisloff, Najjar és mtsai 2005). Ez a tendencia kizárólag a genetika hatása, az állatokat nem vetették más beavatkozás alá, nem edzették őket és nem kaptak semmilyen őket befolyásoló anyagot.

Nyolc csoportba soroltuk az állatokat a vizsgálat során: kontroll LRC (C. low), edző LRC (T. low), rezveratrolt kapó (RSV. low), edző és rezveratrolt kapó (T.+RSV. low), kontroll HRC (C. high), edző HRC (T. high), rezveratrolt kapó (RSV. high), edző és rezveratrolt kapó (T.+RSV. high). Tehát mind az alacsony futási kapacitású, mind a magas futási kapacitású csoporton belül négy csoportot különítettünk el.

Két héten keresztül (5 nap/hét) edzettük őket napi fél órán át. A futószalag sebessége 10m/perc volt, amihez 5%-os emelkedőt állítottunk be. Ezután megmértük az állatok maximális oxigén felvételét. A mérési eredmények alapján kezdtük őket futtatni újabb 10 hétig, szintén heti 5 napon át. A sebességet a korábban mért VO_{2max} -uk 60%-ához tartozó sebességben határoztuk meg. Az emelkedő ekkor is 5% volt. Kéthetente mértük az állatok maximális oxigén felvételét, így az alkalmazkodásukat figyelembe véve változtattuk a futási sebességet.

Tizenkét héten át minden második nap 100 mg/kg-ban meghatározott rezveratrolt adtunk szájon át az állatoknak. A rezveratrollal nem kezelt állatok fiziológiás sóoldatot kaptak.

A fehérjék mennyiségi vizsgálata Western-blot technikával történt, a minta vétele pedig a patkányok hereszövetéből.

Az adatok elemzését ANOVA-val végeztük 5%-os szignifikancia szintet meghatározva.

Eredményeink

Rezveratrol adagolás hatására szignifikánsan megnőtt a SIRT1 szintje az LRC csoportok hereszövetében. Azonban az is elmondható, hogy a kontroll LRC csoport és a kontroll HRC csoport SIRT1 szintje nagymértékben eltér egymástól. Edzés hatására a HRC csoport SIRT1 szintje jelentősen alacsonyabb a kontroll állatokhoz viszonyítva (1. ábra).

Az LRC csoportba tartozó edző és rezveratrollal is kezelt csoport értékei jóval magasabbak, mint a kizárólag edző illetve a kizárólag rezveratrolt kapó állatok p53 értékei ($p < 0.05$). Mindez arra enged következtetni, hogy a fizikai aktivitás és a táplálkozás hatása összeadódik. A genetikailag magas futási kapacitású állatoknál mind az edzés, mind külön a rezveratrol adagolás szignifikánsan megnövelte a p53 értékeket az állatokban (2. ábra).

A Bax fehérje változásai mutatják legjobban, hogy a metabolikus szindróma jeleit is mutató LRC csoportba tartozó állatok mennyire különbözően reagáltak az edzésre, illetve a rezveratrollal való kezelésre, mint a genetikailag magas futási kapacitású állatok. A rezveratrollal kezelt állatok csoportjának eredményei növekvő tendenciát mutatnak a kontroll csoporthoz képest. Azoknál az állatoknál pedig, akik edzettek is és rezveratrolt is kaptak már szignifikánsan magasabb volt a Bax nevű fehérje szintje. Ellentétben a HRC-es állatokkal, amelyeknél a kontroll csoporthoz képest nem változott a másik három csoport Bax szintje (3. ábra). Ezzel egészen jól tudjuk modellezni a már beteg szervezetet (LRC-alacsony futási kapacitású állatok) és az egészséges szervezetet (HRC-magas futási kapacitású állatok). Az egészséges szervezetnek nincs szüksége az apoptózis nagy mértékű befolyásolására, ami nem mondható el a daganatos szervezetről.

A Bcl-2 fehérje mérésénél azt találtuk, hogy a mennyisége ennek a fehérjének csökkent a testedzés hatására (4. ábra). Ez rendkívül fontos megfigyelés, mert indokolhatja azt, hogy miért van a rendszeres testedzésnek preventív hatása a rák előfordulására bizonyos rák típusok esetében.

Hipotézisvizsgálat

Az eredményeink alapján az első hipotézis valósnak bizonyult, a második hipotézis esetén pedig a már említett Bcl-2 fehérje változása miatt, lehetséges, hogy megtaláltuk a molekuláris vonalat, mellyel a testedzés csökkentheti bizonyos rák típusok előfordulását.

Összefoglalás

Összegzésként kijelenthetjük, hogy az alacsony és magas futási kapacitású csoport tagjai több fehérje kapcsán is különbözően reagáltak a rezveratrol nevezetű anyag adására, illetve az edzésre a hereszövetben. Ennek okát az eltérő genetikával magyarázhatjuk, hiszen a szelektív tenyésztés miatt esetünkben ez kifejezett volt. Eredményeinkre támaszkodva felvethetjük, hogy a tumorképződés gátlása, a daganatos megbetegedések prevenciója testedzéssel és a helyes táplálkozással valószínűsíthetően kivitelezhető. Feltételezzük, hogy ha közös gyógyszer nincs is a civilizációs betegségekre, azok prevenciójában (és részben akár kezelésében is) az általunk vizsgált módszerek hatásosnak bizonyulhatnak. Rendkívül fontos, hogy ezt a megfigyelést a hereszövetben tettük, melynek működése elengedhetetlen a fajfenntartás szempontjából.

Irodalomjegyzék:

Basu, A. and S. Haldar (1998). "The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death." Mol Hum Reprod **4**(12): 1099-1109.

Bhatt, J. K., S. Thomas and M. J. Nanjan (2012). "Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus." Nutr Res **32**(7): 537-541.

Goh, A. M., C. R. Coffill and D. P. Lane (2011). "The role of mutant p53 in human cancer." J Pathol **223**(2): 116-126.

Koch, L. G. and S. L. Britton (2001). "Artificial selection for intrinsic aerobic endurance

running capacity in rats." Physiol Genomics 5(1): 45-52.

Marlene Ochmann, Christiane Copie-Bergman, Maryse Baia, Philippe Ruminy, Christian Bastard, Corinne Haïoun, Philippe Gaulard, Fabrice Jardin and K. Leroy (2012). BCL2 Negative Follicular Lymphoma with BCL6 Gene Rearrangement Show Mutations of STAT6 DNA Binding Domain. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA.

Nehrenberg, D. L., K. Hua, D. Estrada-Smith, T. Garland, Jr. and D. Pomp (2009). "Voluntary exercise and its effects on body composition depend on genetic selection history." Obesity (Silver Spring) 17(7): 1402-1409.

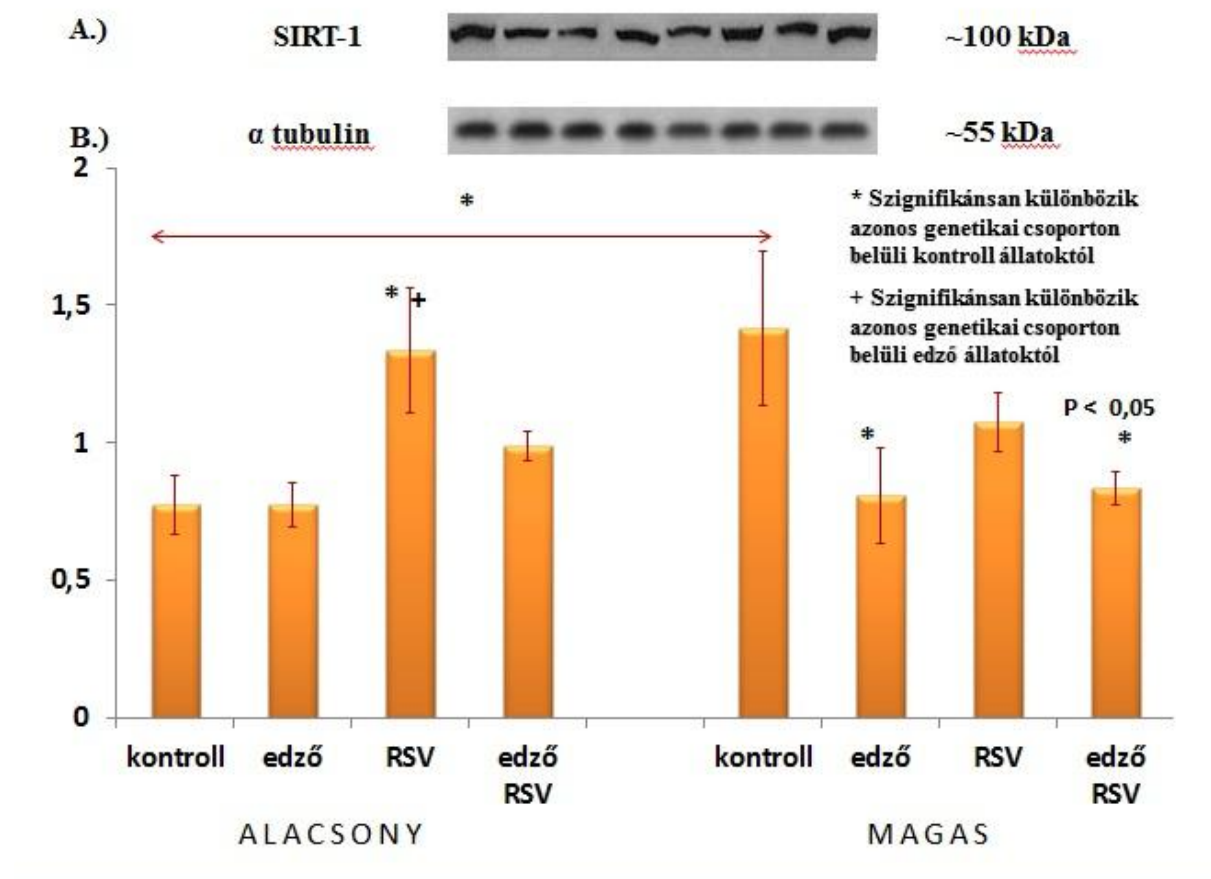
Olmos, Y., J. J. Brosens and E. W. Lam (2011). "Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer." Drug Resist Updat 14(1): 35-44.

Poulsen, M. M., P. F. Vestergaard, B. F. Clasen, Y. Radko, L. P. Christensen, H. Stodkilde-Jorgensen, N. Moller, N. Jessen, S. B. Pedersen and J. O. Jorgensen (2012). "High-Dose Resveratrol Supplementation in Obese Men: An Investigator-Initiated, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Substrate Metabolism, Insulin Sensitivity, and Body Composition." Diabetes.

Wang, F. M., D. L. Galson, G. D. Roodman and H. Ouyang (2011). "Resveratrol triggers the pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress response and represses pro-survival XBP1 signaling in human multiple myeloma cells." Exp Hematol 39(10): 999-1006.

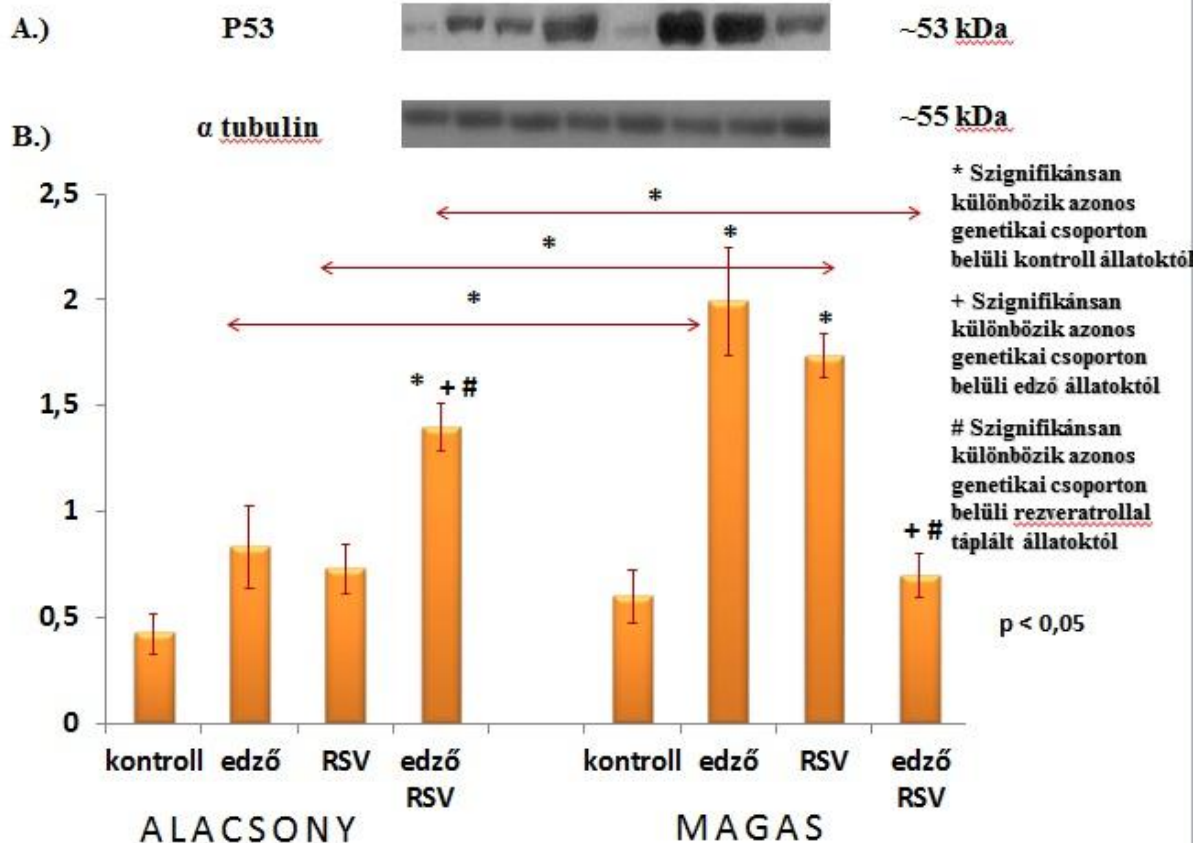
Wisloff, U., S. M. Najjar, O. Ellingsen, P. M. Haram, S. Swoap, Q. Al-Share, M. Fernstrom, K. Rezaei, S. J. Lee, L. G. Koch and S. L. Britton (2005). "Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity." Science 307(5708): 418-420.

Ábrák:

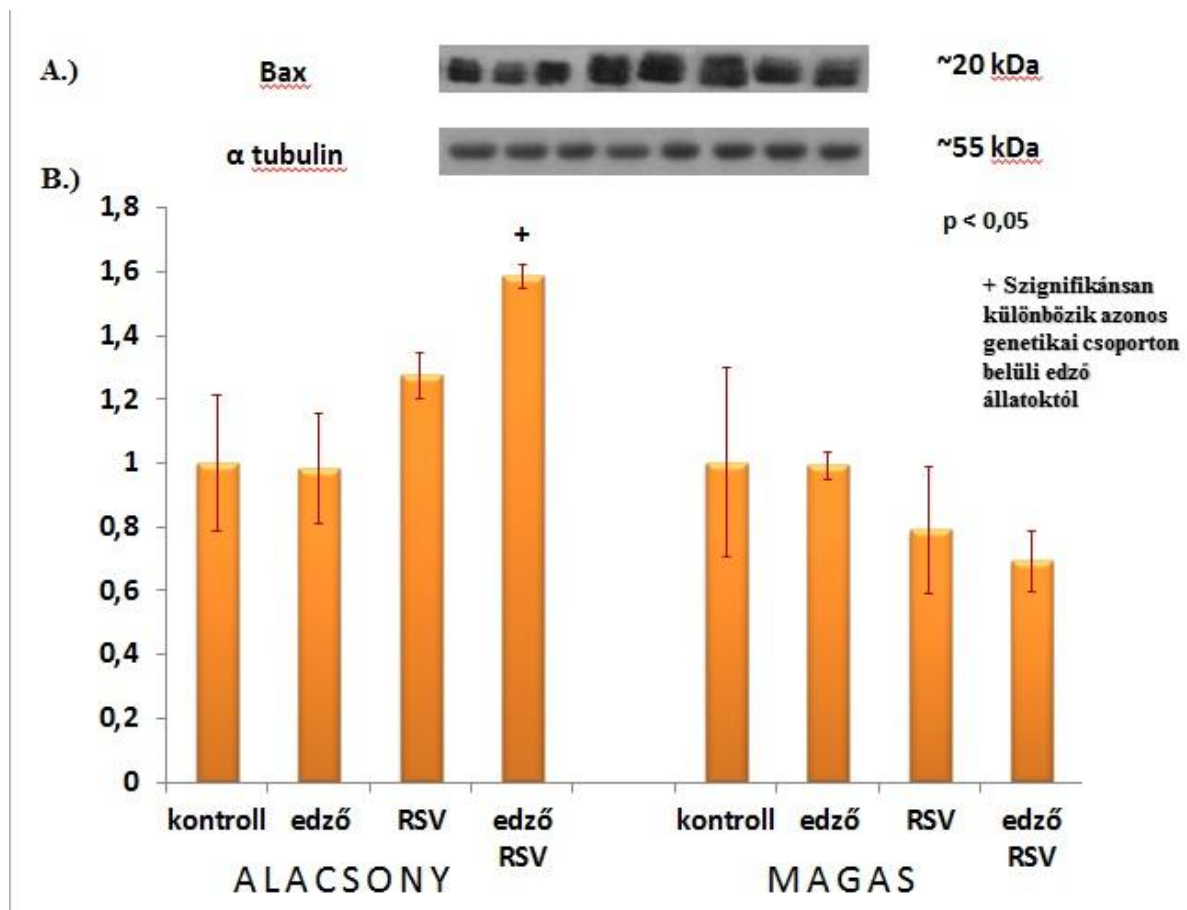


1. ábra A SIRT1 mennyiségi változása here szövetben

(A) A SIRT1 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. (B) A SIRT1 edzés és rezveratrol adás hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: RSV – rezveratrol kezelt, edző +RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; * $p < 0.05$, + $p < 0.05$.

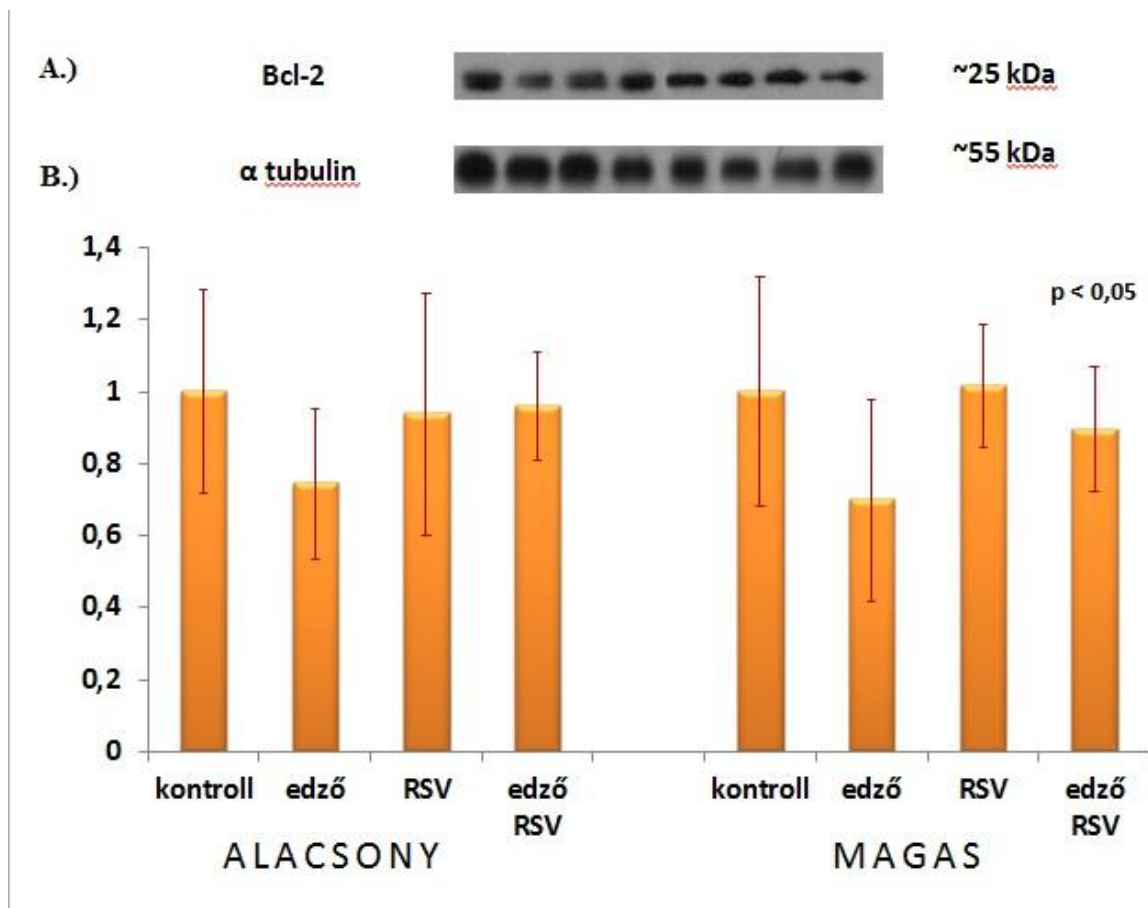


(A) A p53 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. (B) A p53 edzés és rezveratrol adás hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: RSV–rezveratrol kezelt, edző +RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; * $p < 0,05$, + $p < 0,05$, # $p < 0,05$.



3. ábra A Bax mennyiségi változása here szövetben

(A) A Bax fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. (B) A Bax edzés és rezveratrol adás hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: RSV – rezveratrol kezelt, edző +RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; +p<0,05.



4. ábra A Bcl-2 mennyiségi változása here szövetben

(A) A Bcl-2 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. (B) A Bcl-2 edzés és rezveratrol adás hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: RSV – rezveratrol kezelt, edző +RSV – edző és rezveratrollal kezelt.