

Mitokondriális biogenezis eltérő futókapacitással rendelkező patkányok hereszövetében

Bevezetés:

A XXI. század rengeteg veszélynek teszi ki a szervezetünket. E fajta veszély a civilizációs betegség egyik formája, a metabolikus szindróma. Napjainkban is folynak a kutatások a témával kapcsolatosan, hisz igazi gyógyszert, megoldást nem találtak a problémára, csak javaslatok vannak a kezelés különböző formáira, mint például, helyes életvitel, rendszeres testmozgás...stb. Egyes kutatók, mint például Bratic és Trifunovic (Bratic and Trifunovic 2010) szerint, a metabolikus szindróma a mitokondriális biogenezissel szoros kapcsolatban van. Dolgozatomban a metabolikus szindróma és edzés, illetve a mitokondriális funkciók kapcsolatára kerestem a választ. Kísérletemet Wistar patkányokkal végeztem, és az ő hereszövetük vizsgálatával kaphattam meg a hipotéziseimre a választ. Miért pont a hereszövet? Az eddigi szakirodalmak érdekes eredményeket közöltek a különböző szövetek (izom, agy) (Radak, Taylor és mtsai 2001, Bevilacqua, Ramsey és mtsai 2005) és a mitokondriális biogenezis között fennálló kapcsolatokról, és az engem is foglalkoztatott. A herékben termelődő spermium elengedhetetlen az utódok nemzéséhez, mely a fajfenntartás szempontjából rendkívül fontos. Az utóbbi időben kiderült, hogy a spermiumok életképessége jelentősen csökkent a korábbi adatokhoz képest, és felmerült az, hogy ez összefüggésben van a fizikai inaktivitással. A mitokondriális biogenezis számos szövetben testedzés függő, de a herében ezt még nem vizsgálták. A fentiek miatt fontosnak tartom, hogy kiderüljön, hogy a testedzés és a táplálkozás befolyásolja-e a herékben a mitokondrium mennyiségét, ami összefüggésben van a szabadgyök termeléssel és oxigén ellátással is.

Szakirodalmi áttekintés:

A metabolikus szindróma a modern rohanó világ egy olyan gyakori betegsége, amelyre kóros elhízás (obesitas), magas vérnyomás, magas vércukorszint és kóros vérzsír-

összetétel (diszlipidémia) jellemző. A felsorolt kockázati tényezők együttes jelenléte nagyban megnöveli a koszorúér betegség, a diabetes kialakulásának esélyét.

A metabolikus szindróma diagnózisát akkor mondhatjuk ki, ha az alábbi kockázati tényezők közül legalább három jelen van: elhízás (centrális, ún. alma típusú), kóros vérzsír-összetétel (alacsony HDL-koleszterin, emelkedett triglicerid), magas éhgyomri vércukor, emelkedett vérnyomás.

A helytelen táplálkozás, tehát a vitaminokban, ásványi anyagokban hiányos, nem változatos táplálkozás; a testmozgás hiánya: a mindenkinek ajánlott, lehetőleg a hét minden napján, de legalább 5-ször, legalább 30 perces könnyű, közepes, fizikai aktivitás (lihegtető) + heti 2-szer rezisztenciaedzés (ellenállással szemben) elmaradása befolyásoló tényezői lehetnek a metabolikus szindróma kialakulásának. De ugyanennyire befolyásolhatja a genetikai háttér: genetikai hajlam és a kutatásunkban is szerepet játszó mitokondriális biogenezis megváltozása. Mindezek hatnak a maximális oxigén felvételre (VO_{2max}), amely kapcsolatban lehet az edzettséggel.

A mitokondrium egy 5-100 mikrométer nagyságú, többnyire hengeres alakú 2 membránréteggel rendelkező sejtalkotó. Az eukarióta sejtekben legalább egy, de több ezer példányban fordulhat elő. A sejt energiatermelő és energiaraktározó sejtalkotója, a lebontási folyamatokból származó ATP 90%-a itt képződik. Az alapállomány gélszerű, tartalmazza a saját, prokarióta jellegű, gyűrű alakú DNS-t és riboszómát, benne játszódik le a citromsavciklus. A mitokondriumban játszódik le a zsírsavak oxidációja (béta-oxidáció) is. A belső membrán tartalmazza a légzési lánc (terminális oxidáció) működéséhez szükséges fehérjéket, emiatt hozzá köthető a legjelentősebb mértékű ATP-szintézis.

Az endoszimbionta elmélet szerint a mitokondrium őse egykor heterotróf, aerob baktérium lehetett, amit az ős eukarióta sejt bekebelezett, de nem emésztett meg. Így szimbiózis alakult ki köztük. Ezt támasztja alá a sejtszervecske alakja és mérete, a kettős

membránrendszere, a saját DNS-e és fehérjeszintetizáló rendszere. A koevolúció során olyan szoros lett az együttműködés, hogy ma már nem tudnának egymás nélkül megélni (a mitokondrium működéséhez szükséges fehérjék egy részét nem a sejtszervecske, hanem a sejt állítja elő).

A mitokondriális biogenezis az a folyamat, amelynek során új mitokondriumok alakulnak ki a sejtben. Ez a folyamat aktiválódik számos különböző celluláris stressz idején vagy a környezeti ingerekre adott válaszként. Kutatásunkban ezek az ingerek a resveratrol adagolás és a testedzés (1. ábra).

A mitokondrium egy kulcsfontosságú szabályozója a sejtnek, és szintén egy fontos organeluma a szabadgyökök termelésének és lebomlásának. Kutatások szerint a magasabb mitokondriális kópiaszám (vagy magasabb mitokondriális tömeg) védi a sejtet.

A mitokondriumok, amelyek a transzkripció és a transláció gének által állítódnak elő, egyaránt a nukleáris genomban és a mitokondriális genomban találhatóak. A legtöbb mitokondriális fehérje a nukleáris genomból származik, míg a mitokondriális genom kódolja a legtöbb részén az elektron transzport láncot együtt a mitokondriális rRNS-sel és tRNS-sel. (Miranda, Foncea és mtsai 1999, Schmitz, Axmacher és mtsai 1999, Bevilacqua, Ramsey és mtsai 2005, Figueiredo, Powers és mtsai 2009)

Fontos hogy beszéljünk a futási kapacitásról, mivel az edzés kapcsolatban áll a mitokondriális biogenezissel. Ahogy minden ember más, futási kapacitásunk is eltérő. Általánosságban beszélhetünk alacsony és magas futási kapacitású állatokról. Ez a kapacitás lehet szerzett és öröklött.

Egy új tanulmány szerint, amelyet Steven Britton és Lauren Gerard Koch végzett, a kifejezetten kevesebb aerob gyakorlatokra kiválasztott és kitenyésztett patkányok sokkal inkább hajlamosak a civilizációs betegség megszerzésére, mint a magasabb edzés kapacitással rendelkezők. A tanulmányban résztvevő patkányok 11, mesterségesen kiválasztott generáció

utódjai. Bár az összes állat ugyanazon alapító pártól származik, a kísérlet során a patkányok már alaposan különböznek egymástól, ez a különbség az oxigén felhasználásukat és energia termelésüket illeti, mivel naponta más „edzés”-ben részesültek. Például a nagy kapacitású patkányok a 11. generációban 42 percen keresztül képesek megszakítás nélkül rohangálni egy taposómalomban, mielőtt kifulladásnak, míg az alacsony kapacitásúak csak 14 percig. Az átlagos különbség a futási kapacitásban 347 százalék (Koch and Britton 2001).

Hasznos adatokat kaptak abból, hogy az állatok metabolikus szindróma rizikófaktorainak emelkedése és az alacsony aerob edzésben részesülésük között kapcsolatot találtak. Hasonlóságokat fedeztek fel az emberekre jellemző tényezőkkel (Apor 2011).

Az alacsony aerob kapacitással rendelkező patkányoknál a rizikófaktorok aránya is magasabb volt (melyeket előzőekben már felsoroltam). Emellett a 2 kutató mitokondriális diszfunkciót is tapasztalt. A magasabb edzésben lévő patkányokkal ellentétben a másik csoport patkány alacsonyabb oxidatív enzimekkel és proteinekkal rendelkeztek. Ezeket a proteineket a mitokondrium működésénél játszanak fontos szerepet (Koch and Britton 2001, Radak, Taylor és mtsai 2001).

Koch és Britton olyan gének kifejlesztéséért folytatják a tenyésztést, melyek a mitokondriális funkcióban részt vevő proteinek alacsony szintjét kódolják. Az elmélet szerint a nem megfelelő mitokondriális működés lehet az oka az alacsony aerob kapacitásnak és a betegségeknek.

A 11 generációs szelektív tenyésztés után, az alacsony kapacitású patkányoknál abnormálisan alacsony proteinszinteket mértek, melyek pedig szükségesek lennének a megfelelő ATP termelés fenntartásához. A jó kondícióban lévő patkányoknál viszont felhalmozódtak azon gének, melyek a mitokondriális proteinek és az ATP megnövekedett termelését kódolják.

A tanulmányban, amelyet egy norvég egyetem, az ohioi orvosi főiskola és a Williams, valamint az U-M egészségügyi iskolák végeztek, Koch és társa által a patkányok korábban nem vettek részt edzésben. 11 hetes korukban kezdték el a szoktatást a futószalagos edzéshez. Az eredeti alapító populáció 168 patkányból állt, melyek átlagban 23 percig bírtak futni. Azóta az átlagosan a kapacitásuk 41,8 méterre nőtt generációnként a kondiban lévő, és 16,1 méterrel csökkent a lustább patkányoknál. Az átlagos különbség a futási kapacitásban 347 százalék (Koch and Britton 2001).

A kutatók azt remélik, hogy a patkányok segíthetnek olyan újfajta terápiás készítmények kifejlesztésében, melyeket kardiovaszkuláris betegségek, diabétesz esetén alkalmazhatnak, illetve melyekkel olyan diagnosztizáló tesztekkel alkothatnak meg, amelyek azonosítják a betegségre hajlamos embereket (Koch and Britton 2001).

Tehát ezen tanulmány alapján is megbizonyosodhatunk róla, hogy a futási kapacitás nagy részben öröklött. A tanulmány szerint, ha magas kapacitású állatokat pároztatunk magas kapacitásúakkal akkor az utódok is magas kapacitással fognak rendelkezni, és így igaz az ellenkezőjére is.

Hipotézisek:

A korábban felsorolt ismereteink alapján az alábbi hipotéziseket hoztuk meg.

1. Edzés hatására az alacsony futókapacitású állatok csoportjai képesek elérni a magas futókapacitású kontrol állatok futási teljesítmény szintjét.
2. Feltételeztük, hogy az eltérő genetikával rendelkező állatoknál a testedzés, ill. a resveratrol adagolás hatására a mitokondriális biogenezisben csökken a különbség.

Anyag és módszertan:

22. generációs hím Wistar patkányt használtunk a vizsgálatunkban, amelyek a futási képességeik alapján voltak szelektálva.

Az állatokat két különböző csoportra különültek el tenyésztési sajátosságaik alapján:

1. magas futási kapacitású - „high running capacity” (HRC)
2. alacsony futási kapacitású - „low running capacity” (LRC)

A vizsgálat kezdetén további 4-4 csoportot különítettünk el, a kezelés sajátosságai alapján, miszerint kontroll, edző, resveratrolt kapó illetve kombinált (tehát resveratrolban és edzésben részesülő) csoportról beszéltünk. (1. Kontroll alacsony futó kapacitású (C.low), 2. Edzett alacsony futó kapacitású (T.low), 3. Kontroll resveratrol táplált alacsony futó kapacitású (RSV low), 4. Edzett resveratrol táplált alacsony futó kapacitású (T+RSV low), 5. Kontroll magas futókapacitású (C.high), 6. Edzett magas futókapacitású (T.high), 7. Kontroll resveratrol táplált magas futókapacitású (RSV high), 8. Edzett resveratrol táplált magas futó kapacitású (T+RSV high)).

A kísérlet 4 hónapos időtartama alatt minden másnap resveratrol, sirtuin aktivátort (SRT) adagoltunk 4 állatcsoportnak.

A resveratrol, polifenol, amely a piros szőlőben előforduló növényi anyag, s úgy hat, hogy egy olyan gént aktivál, amelynek hatására sejtvédő anyag termelődik. Serkenti a sirtuin (lásd később) működését, és egyben erős antioxidáns is (Farina, Ferranti és mtsai 2006).

Nagyon sok betegség ellen nyújthat védelmet. A resveratrolnak a szívbetegség megelőzésében, a gyulladások csökkentésében éppúgy szerepe lehet, mint a rák megelőzésében vagy a hormonpótlásban. A mélyebb okokat még ma is kutatják, egyelőre állatkísérletekre alapozzák a tudósok állításait (Farina, Ferranti és mtsai 2006).

Ez idő alatt az állatok 4 csoportja futópadon edzett (Tréner) heti 5 alkalommal, napi 1 órát a megállapított VO₂max-hoz tartozó sebesség 60%-án. A futást szoktatással kezdtük, majd fokozatosan emeltük a futási sebességet és időtartamot.

Hetente ellenőriztük az állatok testsúly változását. Ezen felül kétheti rendszerességgel mértük az állatok maximális oxigénfelvételének változását. Az állatok relatív kapacitásának mérése egy speciálisan a patkányok részére kifejlesztett, zárt rendszerű spiroergométerrel

történt. Az állat gépbe helyezését követően, 10 perces megnyugvási idő után mért VO₂ értéket tekintettük VO₂ minimumnak. A 10. perctől indítottuk a futószalagot 10 m/perc sebességről, mely értéket 3 percenként 5 m/perccel emeltük, egészen az állat kifulladásáig. Az állat relatív aerob kapacitását a kifulladás előtti idő pillanatban mért maximális VO₂ értékkel azonosítottuk.

Az ezt követő időszakban Western-blot technikát alkalmaztunk, mely során a fehérjék mennyiségi változásait vizsgáltuk az erre tökéletesen megfelelő here szövetben.

Mindezekből a kapott adatokat statisztikailag elemeztük az ANOVA-val 5%-os szignifikancia szint mellett

Eredmények:

Az edzés szignifikánsan, míg a resveratrol mérsékelten növelte a VO_{2max} értékeket az alacsony kapacitású resveratrolt kapó csoportban a kontrol állatokhoz képest. A magas kapacitású állatokban is szignifikánsan nőtt ennél a csoportnál a VO_{2max} (2.ábra).

Számos korábbi kutatás, mint amiket például Suwa és munkatársai (Suwa, Nakano és mtsai 2008) is végeztek kiderült, hogy a sirtuinok szoros kapcsolatban vannak a mitokondriális biogenezissel.

A sirtuinok enzimfehérjék, számos biológiai folyamatban játszanak kiemelkedő szerepet, legyen szó a stressz válaszról, az energia metabolizmusról, vagy a genomiális szabályozás és DNS javítás megfelelő fenntartásáról. Feltételezett szabályozói továbbá az öregedés folyamatának és a rosttípus differenciálódásának, valamint szoros kapcsolatban vannak a szabadgyökökkel is (Hipkiss 2008, Suwa, Nakano és mtsai 2008, Koltai 2011).

A kutatás során láthatóvá vált, hogy szignifikáns a különbség a 2 kontrollcsoport között

Az alacsony futási kapacitású állatoknál resveratrol hatására szignifikánsan nőtt, míg a kombinált kezelés esetén csak mérsékelten nőtt a szintje a kontroll csoportéhoz képest. Ilyen fajta változást nem vettünk észre a magas futó kapacitású állatoknál (3. ábra).

A PGC-1 alfa egy transzkripció koaktivátor amely szabályozza a géneket az energia-anyagcserében. Kölcsönhatásban van, és szabályozza a tevékenységét a nukleáris légzési faktoroknak (NRFs). Biztosítja a közvetlen kapcsolatot a külső fiziológiai ingerek és a mitokondriális biogenezis között, és jelentős tényező, amely szabályozza az izomrost típus meghatározást (Wu, Puigserver és mtsai 1999, Suwa, Nakano és mtsai 2008). Így ennek a faktornak is a vizsgálatát is fontosnak tartottam. Megfigyelhettük, hogy az alacsony futókapacitású állatoknál szignifikánsan nőtt az edző, míg a resveratrolt kapó állatoknál csak mérsékelten nőtt a szintje a kontroll csoportéhoz képest. A magas kapacitásúaknál pedig a resveratrolt kapóknak szignifikánsan nőtt a szintje mind a kontroll és mind az edző csoportéhoz képest. Megállapíthatjuk még, hogy szignifikáns a különbség a csak resveratrolt kapó és a kombinált kezelésben részt vevő patkányoknál. Az alacsony és magas futókapacitású állatok csoportjában egymáshoz képest szignifikáns volt a különbség a két edző és a két resveratrolt kapó csoport között. (4. ábra)

A NRFs aktiválja a mitokondriális transzkripció faktort (TFAM), és az expresszióját néhány kulcsfontosságú metabolikus gént szabályozó, a sejtnövekedéshez és légzéshez szükséges nukleáris géneknek (Tiranti, Rossi és mtsai 1995). Az alacsony kapacitású állatoknál a kontroll csoportéhoz képest nőtt a resveratrolt kapó állatoknál a szintje. A magas kapacitású állatoknál a kontroll csoportéhoz képest szignifikánsan nőtt a NRFs szintje mind az edző és a resveratrolt kapó állatoknál. A két különböző kapacitású csoportnál szignifikáns a különbség a resveratrol és az edző csoportoknál (5. ábra).

A mitochondrial transcription factor A (TFAM) közvetlenül felelős a nukleáris-kódolt mitokondriális fehérjék átírásáért. A beavatkozás hatására változás a magas kapacitású

állatoknál volt megfigyelhető. Miszerint az edzőhöz képest szignifikáns a különbség a resveratrolt és a kombinált kezelést kapó állatoknál. A csupán resveratrol és a kombinált kezelésben résztvevőknél is szignifikáns a különbség. A két kapacitású csoport összehasonlításánál az edzőknél és a kombinált kezelésben résztvevőknél figyelhető meg különbség (6. ábra).

Összefoglalás:

Összefoglalásul elmondhatjuk, hogy egy teljesen új területet volt alkalmunk megvizsgálni, hiszen az eddigi szakirodalmak más szövetekkel végeztek kutatást, mint pl szív, izom, máj. Így csak feltételeztük, hogy a hereszövet szöveti különbségének ellenére hasonló változásokat fogunk tapasztalni, mint az eddigi tanulmányokban. Továbbá megállapíthatjuk, hogy a resveratrol adagolás jó hatással van a mitokondriális biogenezis folyamatának erősítésére. És a kutatás jó alapul szolgál további kutató munka folytatására.

Irodalomjegyzék:

Apor, P. (2011). Aporizmak. Budapest, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió

Bevilacqua, L., J. J. Ramsey, K. Hagopian, R. Weindruch and M. E. Harper (2005). "Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria." Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(3): E429-438.

Bratic, I. and A. Trifunovic (2010). "Mitochondrial energy metabolism and ageing." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 961-967.

Farina, A., C. Ferranti and C. Marra (2006). "An improved synthesis of resveratrol." Nat Prod Res **20**(3): 247-252.

Figueiredo, P. A., S. K. Powers, R. M. Ferreira, H. J. Appell and J. A. Duarte (2009). "Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(1): 21-33.

Hipkiss, A. R. (2008). "Energy metabolism, altered proteins, sirtuins and ageing: converging mechanisms?" Biogerontology **9**(1): 49-55.

Koch, L. G. and S. L. Britton (2001). "Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats." Physiol Genomics **5**(1): 45-52.

Koltai, E. (2011). Az IGF-1 és a rendszeres testedzés hatása az öregedés molekuláris folyamataira: a sirtuinok szerepe, Semmelweis Egyetem.

Miranda, S., R. Foncea, J. Guerrero and F. Leighton (1999). "Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells." Biochem Biophys Res Commun **258**(1): 44-49.

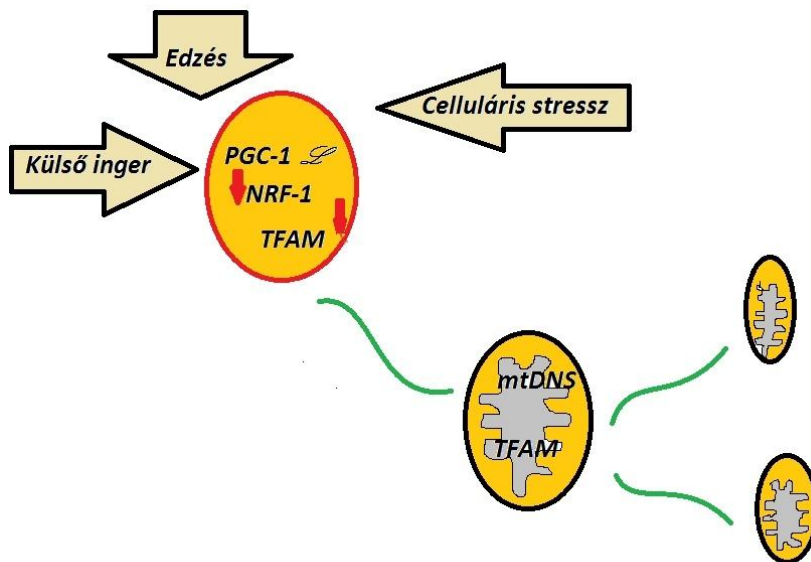
Radak, Z., A. W. Taylor, H. Ohno and S. Goto (2001). "Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain." Exerc Immunol Rev **7**: 90-107.

Schmitz, C., B. Axmacher, U. Zunker and H. Korr (1999). "Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain." Acta Neuropathol **97**(1): 71-81.

Suwa, M., H. Nakano, Z. Radak and S. Kumagai (2008). "Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle." Metabolism **57**(7): 986-998.

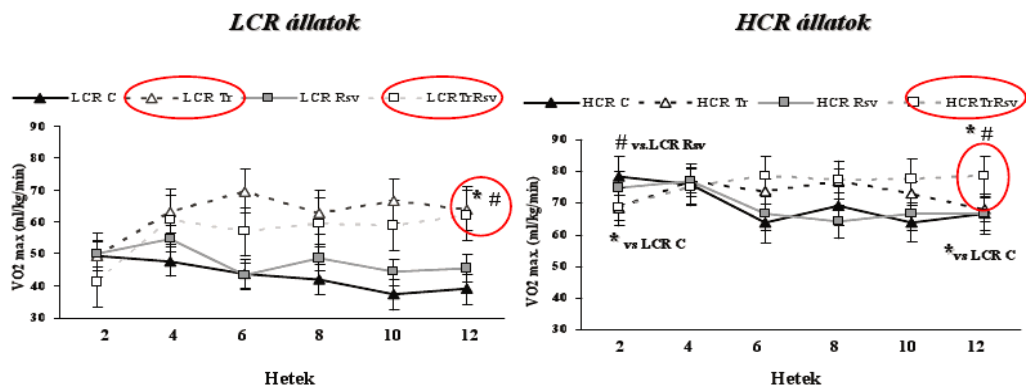
Tiranti, V., E. Rossi, M. Rocchi, S. DiDonato, O. Zuffardi and M. Zeviani (1995). "The gene (NFE2L1) for human NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, maps to 7q32." Genomics **27**(3): 555-557.

Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla and B. M. Spiegelman (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-124.



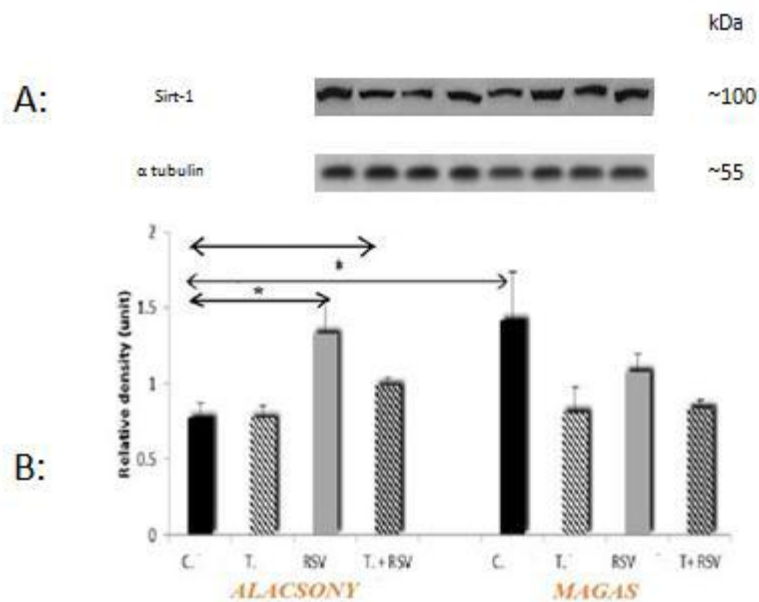
1. ábra: Mitochondriális biogenezis folyamata

Maximális aerob kapacitás ($VO_2 \max$)



- * Szignifikánsan különbözik azonos genetikai csoporton belüli kontroll állatoktól
- + Szignifikánsan különbözik azonos genetikai csoporton belüli edző állatoktól
- # Szignifikánsan különbözik azonos genetikai csoporton belüli rezveratrollal táplált állatoktól
- * Szignifikánsan különbözik LCR és HCR genetikájú állatok azonos kezelést kapott csoportja

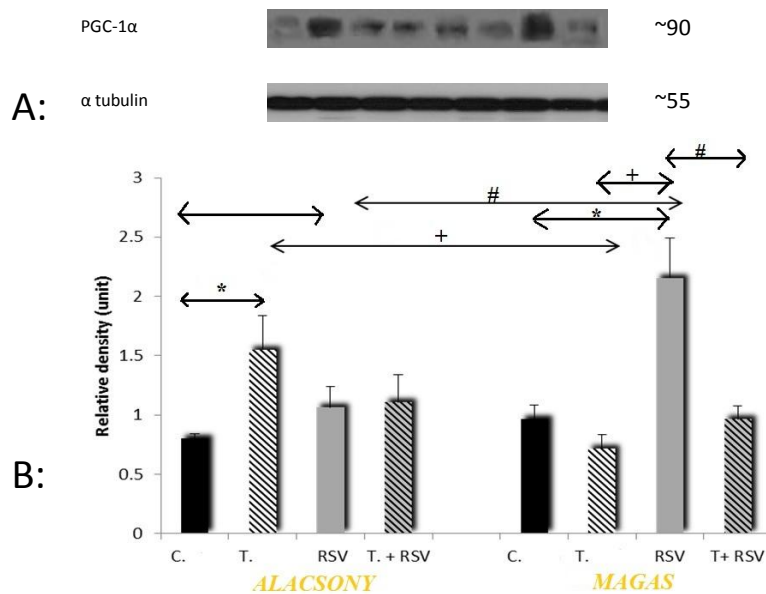
2. Maximális aerob kapacitás változás



3. ábra: SIRT-1 szint változás

A: A SIRT1 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel.

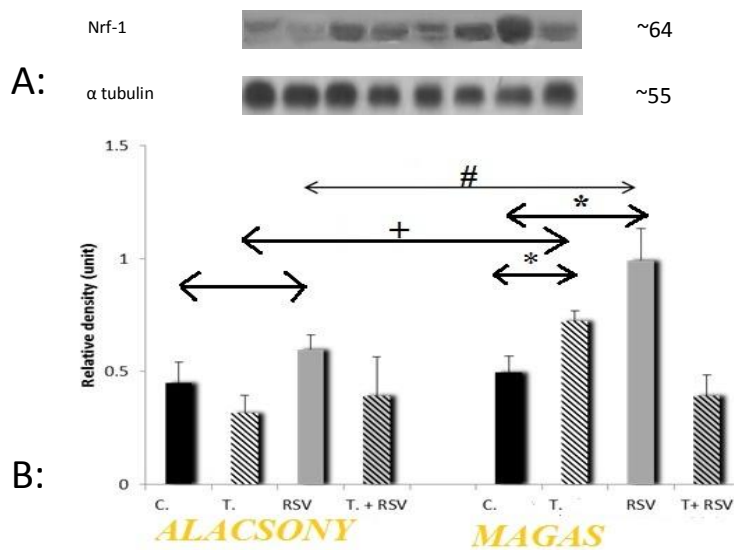
B: A SIRT1 öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: C – kontroll, T – edzett, RSV – rezveratrol kezelt, T+RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; * $p < 0.05$.



4. ábra: PGC-1 α szint változás

A: A PGC-1 α fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel.

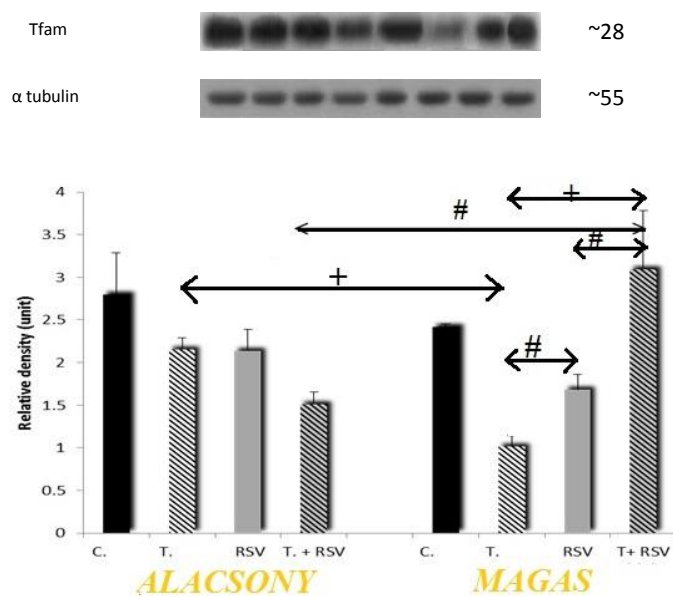
B: A PGC-1 α öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: C – kontroll, T – edzett, RSV – rezveratrol kezelt, T+RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; * $p < 0.05$. # $p < 0.05$



5. ábra: NRF1 szint változás

A: A NRF1 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel.

B: A NRF1 öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: C – kontroll, T – edzett, RSV – rezveratrol kezelt, T+RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; * $p < 0.05$. # $p < 0.05$



6. ábra: TFAM szint változás

A: A TFAM fehérje mennyiségének auto-radiogramja a here szövetben. A csíkok denzitásának normalizálása az α -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel.

B: A TFAM öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. Az ábrákon: C – kontroll, T – edzett, RSV – rezveratrol kezelt, T+RSV – edző és rezveratrollal kezelt. A feltüntetett értékek: átlag $\pm$ SE; *p<0.05. # <p 0.05