

Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés kardiális hatásainak vizsgálata patkánymodellen

Oláh Attila¹,
Németh Balázs Tamás¹,
Mátyás Csaba¹,
Horváth Eszter Mária²
Hidi László¹,
Birtalan Ede¹,
Kellermayer Dalma¹,
Ruppert Mihály¹,
Geller László¹,
Szabó Gábor³,
Merkely Béla¹,
Radovits Tamás¹

¹Semmelweis Egyetem,
Városmajori Szív- és
Érgyógyászati Klinika,
Kísérleti Kutató Laboratórium,
Budapest

²Semmelweis Egyetem,
Klinikai Kísérleti Kutató- és
Humán Élettani Intézet, Budapest

³Ruprecht-Karls Egyetem,
Szívsebészeti Klinika,
Kísérleti Kutató Laboratórium,
Heidelberg, Németország

Levelezési cím:

Dr. Oláh Attila

1122 Budapest, Városmajor u. 68.

E-mail: o.attilio@gmail.com

Kulcsszavak:

kimerítő fizikai terhelés,
oxidatív stressz, kardiális funkció,
nyomás-térfogat-analízis,
génexpresszió

Keywords:

exhaustive exercise, oxidative stress,
cardiac function, pressure-volume
analysis, gene expression

Célkitűzés: A rendszeres testmozgás kardiovaszkuláris prevencióban betöltött szerepe közismert, azonban túlzott mértékű fizikai terhelés (pl. ultramaraton-futás) után a vérben megemelkedik a kardiális nekroenzimek szintje. Célunk a kimerítő fizikai megterhelés patkánymodelljének beállítása és a szívet érintő biokémiai, génexpressziós, morfológiai, illetve funkcionális változások vizsgálata volt.

Módszerek: Patkányaink kimerítő fizikai terhelését intenzív úsztatással érték el. Az akut úszó csoport állatait testtömegük 5%-ának megfelelő faroksúly-terheléssel 3 órát, a kontrollcsoportot 5 percet úsztattuk. 2 órás nyugalmi periódust követően nyomás-konduktancia mikrokatéterrel bal kamrai nyomás-térfogat-analízist végeztünk. Az állatoktól vér- és szívizom-mintát vettünk biokémiai és szövettani vizsgálatok céljából, a miokardiális génexpressziós változásokat qRT-PCR-rel detektáltuk.

Eredmények: A kimerítő úszást teljesítő állatainkban szignifikáns emelkedést mutattunk ki a kardiális troponin-T ($0,131 \pm 0,022$ vs. $0,025 \pm 0,006$ ng/ml), kreatin-kináz és laktát-dehidrogenáz plazmaszintjében a kontrollhoz képest. Szövettani vizsgálattal helyenként a szívizomrostok fragmentálódását és leukocita-infiltrációt figyelemtünk meg. A dihidroetidium festés során jelzett jelentős oxidatív stressz mellett az antioxidáns enzimek miokardiális génexpressziójának növekedését találtuk. A TUNEL-festés fokozott DNS-fragmentációt, a Bax/Bcl-2 génexpressziós arány növekedést mutatott a myocardiumban ($1,80 \pm 0,18$ vs. $1,04 \pm 0,04$). Továbbá a mátrix metalloproteináz rendszer diszregulációját detektáltuk. Funkcionális vizsgálatainkkal magasabb végszisztolés térfogatot, csökkent ejekciós frakciót, gyengült kontraktilitást (ESPVR: $2,11 \pm 0,14$ vs. $2,95 \pm 0,29$ Hgmm/ μ l) és a kamraműködés hatásfokának romlását észleltük.

Következtetések: A túlzott mértékű fizikai terhelés káros hatással bír a szívre. A kardiális nekrozis markerek emelkedésének hátterében fokozott oxidatív stressz, valamint apoptotikus és profibrotikus folyamatok állhatnak. A jellemző molekuláris és szövettani változásokhoz funkcionális károsodás is társul.

Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model

Aims: The role of physical exercise in the prevention and treatment of cardiovascular diseases has been well described, however, elevations in cardioneurotic biomarkers after prolonged exercise (i.e. ultramarathon running) were observed. We aimed at understanding the biochemical, molecular biological, structural and functional alterations in the heart after exhaustive exercise in a rat model.

Methods: Rats of the exercise group were forced to swim for 3h with 5% body weight (workload) attached to the tail, control rats were taken into the water for 5min. After a 2-hour recovery period we performed left ventricular (LV) pressure-volume analysis. Additionally, blood and myocardium samples were harvested for biochemical and histological examination. Gene expression changes were detected using qRT-PCR.

Results: When compared to controls, elevated plasma levels of cardiac troponin T ($0,131 \pm 0,022$ vs. $0,025 \pm 0,006$ ng/ml), creatine kinase and lactate dehydrogenase were detected after exhaustive exercise. Histological analysis showed sporadic fragmentation of myocardial structure and leukocyte infiltration in the swimming group. Myocardial expression of major antioxidant enzymes were increased along with myocardial oxidative stress detected by dihydroethidium staining. Bax/Bcl-2 ratio ($1,80 \pm 0,18$ vs. $1,04 \pm 0,04$) and TUNEL staining showed enhanced apoptotic signaling. Exhaustive exercise also resulted in the dysregulation of the matrix metalloproteinase system. We observed increased end-systolic volume, decreased ejection fraction, impaired contractility (ESPVR: $2,11 \pm 0,14$ vs. $2,95 \pm 0,29$ mmHg/ μ l) and mechanical efficiency of LV in the exercised group.

Conclusions: Excessive physical activity has an adverse effect on the heart. The observed functional impairment is associated with increased oxidative stress, enhanced apoptotic signaling and the activation of inflammatory mechanisms after exhaustive exercise.

A rendszeres testmozgás kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt protektív hatásai széles körben ismertek, hiszen olyan jelentős kórállapotok megelőzésében és kezelésben játszik fontos szerepet, mint a koszorúér-betegség vagy a hipertónia (1). Ennek ellenére egészséges egyénekben kardioneotropikus biomarkerek emelkedését igazolták egyszeri, hosszan tartó, magas intenzitású testmozgás után (2–4). Ezen eredmények által az extrém fizikai terhelés lehetséges káros következményeire derült fény és ez kérdésessé tette az ilyen típusú mozgás kardiovaszkuláris egészségre gyakorolt hatásait (5). Az ilyen típusú, nagyfokú terhelést igénylő sportágak, mint az „ironman triatlon” vagy az ultramaraton futás egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek.

Ebből kifolyólag több állatkísérletes és humán tanulmány vizsgálta a szívizom-sérülés általánosan alkalmazott biokémiai markere, a kardiális troponin (cTn) emelkedését kimerítő fizikai terhelés után (6–8). Ezek a vizsgálatok a szívizominfarktus határértékét meghaladó cTn-szinteket mérték, amely fokozott szisztémás nitro-oxidatív stresszel, fehérje oxidációval és lipid-peroxidációval, DNS-károsodás kialakulásával társult (9, 10). Az akut, kimerítő fizikai terhelés szív működésére gyakorolt hatását számos humán tanulmány vizsgálta noninvaszív vizsgálatok, echokardiográfia és mágneses rezonanciavizsgálat használatával (11, 12). Ezen vizsgálatok többsége átmeneti bal kamrai (BK-i) funkcióromlást figyelt meg, melyet „terhelés-indukálta szív fáradtság”-nak („exercise-induced cardiac fatigue”) nevezték el, azonban a jelentősen különböző vizsgálati protokollok és egymásnak részben ellentmondó adatok miatt egyértelmű következtetések nem voltak levonhatók.

A nyomás-térfogat (P-V) analízis a jelenleg elérhető legmegbízhatóbb módszer az intakt kamraműködés különböző aspektusainak mérésére, elő- és utóterheléstől független paramétereinek számítására. Így célunk volt, hogy beállítsuk az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés okozta miokardiális sérülés patkánymodelljét, részletes in vivo hemodinamikai jellemzést adjunk a kialakuló BK-i diszfunkcióról, valamint meghatározzuk a kimerítő fizikai terhelés okozta szívizom-sérüléshez vezető molekuláris és sejtszintű mechanizmusokat (nitro-oxidatív stressz, proapoptotikus és profibrotikus markerek vizsgálata).

Módszerek

Állatok, kísérleti csoportok

Vizsgálatainkat a kísérleti állatok tartásáról és felhasználásáról szóló nemzetközi szabályoknak (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Institutes of Health 1996; 85–23.) megfelelően végeztük. Fiatal felnőtt (325–375 g) Wistar-patkányainkat

(Charles River, Németország) standard körülmények között, konstans 22 ± 2 °C hőmérsékleten, 12 h fény/sötétség ciklusokban tartottuk.

Az akut kimerítő fizikai terhelést állatainkban hosszan tartó, intenzív úsztatással idéztük elő. A stressz minimalizálása érdekében minden patkány 48 órával a kísérlet előtt 20 percet töltött a vízben. Az akut úszó csoport (n=22) egyedeit 3 órán keresztül úsztattuk, 5% faroksúly-terheléssel. A kontrollpatkányok (n=22) 5 percet töltöttek a vízben. A terhelési protokoll befejezése után a patkányokat megszáritottuk, majd 2 órás nyugalmi, megfigyelési periódus következett. Ezután végeztük in vivo hemodinamikai méréseinket, illetve a vér- és szívvizom minta vételezését.

Bal kamrai nyomás-térfogat-analízis

A patkányokat ip. ketamin (100 mg/kg)-xylazin (3 mg/kg) injekcióval elaltattuk, tracheotomia és intubáció után mesterségesen lélegeztettük, testhőmérsékletüket a kísérlet során 37 °C-on tartottuk. A jobb oldali arteria carotis communis felől egy 2 Fr-es nyomás-konduktancia mikrokatétert (SPR-838, Millar Instruments, USA) vezetünk az aorta ascendensbe, ahol stabilizáció után artériás középnyomást (MAP) mértünk. A katétert a bal kamrába továbbvezetve stabilizáció után regisztráltuk a BK-i nyomás- és térfogatviszonyokat és kiszámítottuk a következő hemodinamikai paramétereket: szívfrekvencia (HR), bal kamrai végszisztolés és végdiasztolés nyomás (LVESP és LVEDP), maximális és minimális dp/dt (dp/dt_{max} , dp/dt_{min}), a bal kamrai relaxáció időkonstansa (Tau), bal kamrai végszisztolés és végdiasztolés térfogat (LVESV és LVEDV), verőtérfogat (SV), perc-térfogat (CO), szívindex (CI). A teljes perifériás ellenállást (TPR) a következő képlet határozta meg: MAP/CO .

A vena cava inferior kompressziója mellett regisztrált bal kamrai nyomás-térfogat összefüggések segítségével érzékeny, elő- és utóterheléstől független BK-i kontraktilitás-indexeket számítottunk: a végszisztolés P-V kurvilineáris összefüggés meredekségét (ESPVR), a verőmunka – végdiasztolés térfogat (EDV) összefüggés meredekségét (az ún. preload recruitable stroke work, PRSW) és a dp/dt_{max} – EDV összefüggés meredekségét ($dp/dt_{max}-EDV$) (13, 14). A volumenszignál kalibrációját a korábban leírt módszerrel végeztük (14).

A P-V-analízis során a BK működésének mechan energetikáját jellemző paramétereket mértünk és számítottunk. A mechanikus hatásfokot (Eff) a verőmunka (SW) és a nyomás-térfogat terület (PVA) hányadosa határozta meg (15). Az artériás elasztanciát (E_a) a következő képlet alapján számítottuk: $LVESP/SV$, a BK végszisztolés elasztanciáját (E_{es}) az ESPVR-nek felelt meg. A ventrikulo-arteriális kapcsolás (VAC) az E_a/E_{es} képlet alapján került kiszámításra (16).

Hisztológia

Az állatok egy másik részét az obszervációs idő letele után elaltattuk, majd a szívek in vivo perfúzióját végeztük oxigenált Ringer-oldat segítségével. Ezután az eltávolított szíveket azonnal folyékony nitrogénben sokkfagyasztottuk, majd -80°C -on tároltuk, illetve formalinos fixálás után paraffinba ágyaztuk.

A BK-i transzmurális szívizomszövet metszetek ($5\ \mu\text{m}$ vastag) hematoxilin-eozin (HE) festése után fénymikroszkóppal vizsgáltuk a szöveti szerkezetet.

A fagyasztott szívizommintákból a reaktív oxigéngyökök in situ kimutatására fluoreszcens dihidroetidium (DHE) festést végeztünk. A fagyasztott metszeteket sötét, nedves kamrában 30 percen keresztül megfelelő koncentrációjú DHE-oldatban inkubáltuk (17). A fluoreszcens jelet $590\ \text{nm}$ hullámhosszú szűrőn keresztül jelenítettük meg és háttérkorrekciót végeztünk a negatív kontrollmintákra. Állatonként 8 felvételt készítettünk ($200\times$ -os nagyítás), amelyeket a BK szabad fali részéből véletlenszerűen választottunk ki, és a fluoreszcens jel területét és intenzitását az ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) képelemző szoftver segítségével számoltuk.

A nitro-oxidatív stressz bemutatására a BK-i szívizom-metszeteken a tirozin nitráció mértékét immunhisztokémiával vizsgáltuk. A paraffinba ágyazott metszeteket deparaffináltuk. A nitrotirozin (NT) kimutatását antigénfeltárást követően anti-nitrotirozin nyúl poliklonális antitesttel végeztük (18). Metszetenként 5 felvételt ($200\times$ -os nagyítás) készítettünk véletlenszerűen kiválasztott BK szabadfali területről majd a NT pozitív területek arányát számoltuk.

A fagyasztott szövettani metszeteken a DNS-fragmentáció vizsgálatára TUNEL-festést végeztünk egy kolorimetriás rendszer segítségével a gyártó utasításai szerint. Állatonként a BK 30 véletlenszerűen kiválasztott metszetén ($400\times$ -os nagyítás) megszámoltuk a TUNEL-pozitív sejteket, majd az értékeket egyenként átlagoltuk.

Biokémia

A vena cava inferiorból vénás vérmintákat vettünk a biokémiai vizsgálatokhoz. Ezeket centrifugáltuk, majd a vérplazmát -80°C -on tároltuk. A plazmából kardionekrotikus biomarker (plazma kardiális eredetű troponin-T [cTnT], kreatin-kináz [CK], laktát-dehidrogenáz [LDH], aszpartát-aminotranszferáz [AST]) és kreatinin (a vesefunkció mérésére) szinteket mértünk klinikai laboratóriumi automaták segítségével.

Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A begyűjtött miokardiális szövetből RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót végeztünk kereskedelembe

kapható kitek segítségével. A következő célgénekre kvantitatív, valós idejű PCR-reakciót indítottunk: kataláz, glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD), glutathion-peroxidáz-1 (GPX-1), glutathion-reduktáz (GSR), tioredoxin-1, szuperoxid-diszmutáz-2 (SOD-2), endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS), Bcl-2 asszociált X-protein (Bax), B-sejt limphoma 2 (Bcl-2), mátrix metalloproteináz-2 (MMP-2), metalloproteináz szöveti inhibitor-2 (TIMP-2), mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9), metalloproteináz szöveti inhibitor-1 (TIMP-1), transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β). Adatainkat a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expressziójára normalizáltuk és a kapott értékeket a $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formulával fejeztük ki pozitív kalibrátorra normalizálva.

Statisztika

Minden adatot átlagérték $\pm$ SEM formájában adtuk meg. Adataink normáloszlásának igazolása (Shapiro-Wilks-teszt) után Student-féle kétmintás t-próbát használtunk. A $p < 0,05$ értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Eredmények

Biokémia

A szérumban cTnT koncentráció jelentősen növekedett az akut, kimerítő terhelés hatására. A szérumban CK, LDH és AST-enzimek aktivitási szintje is nagyfokú emelkedést mutatott az akut úszó állatokban a kontrollcsoport állataihoz viszonyítva. A szérumban kreatininértékek nem mutattak különbséget a két csoport között (1. táblázat).

Hisztológia

A kontrollcsoport egészséges szívizom-szerkezetével szemben az akut terhelésnek kitett állatok BK-i myocardiumában helyenként szívizomrost-töredezettséget, fehérvérsejt-infiltrációt, szöveti ödémát és eozinofíliát figyeltünk meg (1. A ábra).

A DHE festett BK-i szívizomszövet-metszeteken a piros színű fluoreszcens jel intenzitása jelentősen növekedett akut terhelést követően, ami markáns reaktív oxigén szabadgyök-(ROS)-termelést tükröz (1. B ábra). Az NT-festés fokozott tirozin-nitrációt mutatott az akut úszó állatok szívizomszövetében (1. C ábra). A TUNEL-pozitív cardiomyocita sejtmagok száma emelkedett volt a terhelés hatására (1. D ábra).

Miokardiális génexpresszió

A miokardiális génexpressziós vizsgálatok a G6PD, GSR, tioredoxin-1, SOD-2 és az eNOS expressziójának szignifikáns emelkedését igazolták, a kataláz és a

1. táblázat. Biokémiai mérések eredményei a kontroll és akut úszó állatok vérplazmájából

	Kontroll (n=12)	Akut Úszó (n=12)	p-érték (vs. kontrollcsoport)
Kardiális troponin T, ng/ml	0,025±0,006	0,131±0,022*	0,0001
CK, U/l	284,5±37,5	2029,3±461,4*	0,0011
LDH, U/l	541,5±58,6	836,7±130,1*	0,0011
AST, U/l	79,3±2,7	247,6±32,2*	<0,0001
Kreatinin, µmol/l	34,6±3,0	33,6±1,9	0,7837

Az adatok átlagérték±SEM formában szerepelnek. CK: kreatin-kináz; LDH: laktát-dehidrogenáz; AST: aszpartát-aminotranszferáz
*p<0,05 vs. kontroll.

GPX-1 erős tendenciális növekedését figyeltük meg a kimerítő terhelés hatására (2. ábra, felső panel). Ezek az eredmények az endogén antioxidáns rendszer aktiválódására utalnak.

A proapoptotikus mediátor Bax miokardiális expressziójának fokozódása és az antiapoptotikus mediátor Bcl-2 expressziójának csökkenése a Bax/Bcl-2 arány jelentős növekedését eredményezte, amely a proapoptotikus szignálutak aktivációjára mutat rá (2. ábra, középső panel).

Az MMP-2 és MMP-9 expressziós értékei növekedtek az intenzív igénybevételt jelentő testmozgás után. A TIMP-2 kifejeződése nem különbözött a két csoport között, a TIMP-1 expressziója pedig szignifikáns növekedést mutatott, ami emelkedett MMP-2/TIMP-2 és csökkent MMP-9/TIMP-1 arányt eredményezett. A TGF-β erős tendenciális növekedést mutatott a terhelés hatására (2. ábra, alsó panel). Ezek az eredmények a megerőltető fizikális terhelés okozta profibrotikus szignálutak aktiválódására utalhatnak a szívben.

Hemodinamika

NYUGALMI HEMODINAMIKAI PARAMÉTEREK

A 3. ábra felső részén eredeti, reprezentatív nyugalmi P-V-hurkokat mutat be egy-egy akut úszó és kontrollpatkány esetén. A MAP, HR, LVESP, LVEDP, τ dp/dt_{max} and dp/dt_{min} értékei változatlanok maradtak az akut terhelés hatására. A nyugalmi P-V-hurok szélességének csökkenése az SV redukcióját tükrözi változatlan LVEDV és növekedett LVESV mellett. Következésképpen az EF, a CO és a CI is csökkent. A TPR emelkedett az akut úszó csoportban (2. táblázat).

A CSÖKKENŐ ELŐTERHELÉS MELLETT VÉGZETT P-V-ANALÍZIS FUNKCIONÁLIS PARAMÉTEREI

A 3. ábra alsó részén a tranziens vena cava inferior okklúzió során egy-egy kontroll és akut úszó állatban regisztrált P-V-viszonyokat eredeti regisztrátumok szemléltetik. Az ESPVR meredeksége csökkent a kimerítő terhelés hatására, amely jelentősen gyengült kontraktilitást tükröz. A másik két érzékeny kontraktilitás-paraméter is ezt támasztotta alá: a PRSW és dp/dt_{max} -EDV lineáris összefüggésének meredeksége is jelentősen csökkent (3. ábra). Az EDPVR nem muta-

tott különbséget, mely érték a BK falmerevségének változatlanóságát mutatja (2. táblázat).

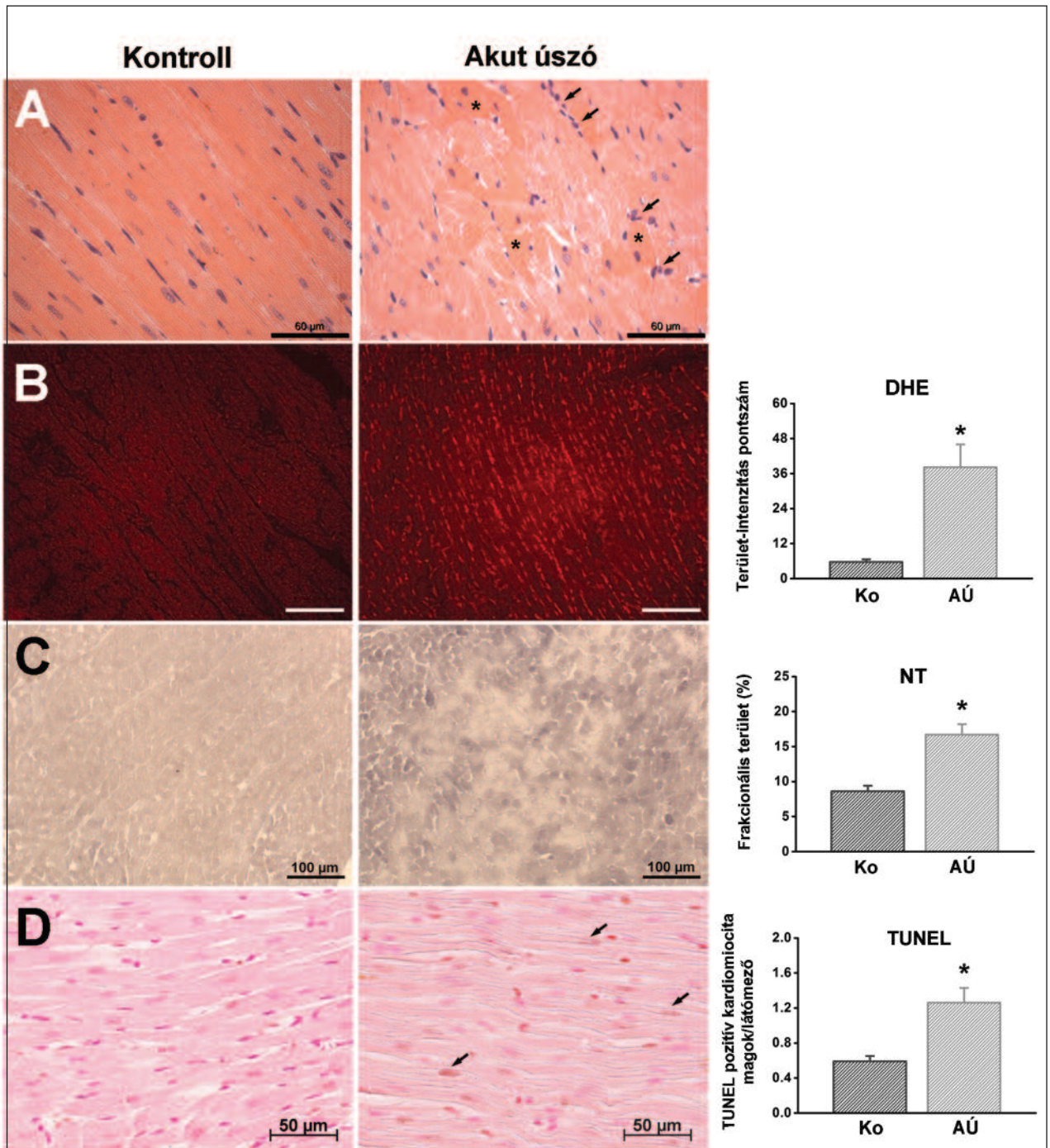
MECHANOENERGETIKA

A csökkent SW ellenére a PVA változatlanok mutatkozott, így a BK munkájának mechanikus hatásfoka (Eff) csökkent akut úzás hatására. Az akut terhelés csökkent kontraktilitással (E_{es}) és az E_a emelkedésével járt. Ezen változások következtében emelkedett a VAC, ami a BK és az artériás rendszer kontraktilitástóterhelés illeszkedési zavarára utal (2. táblázat).

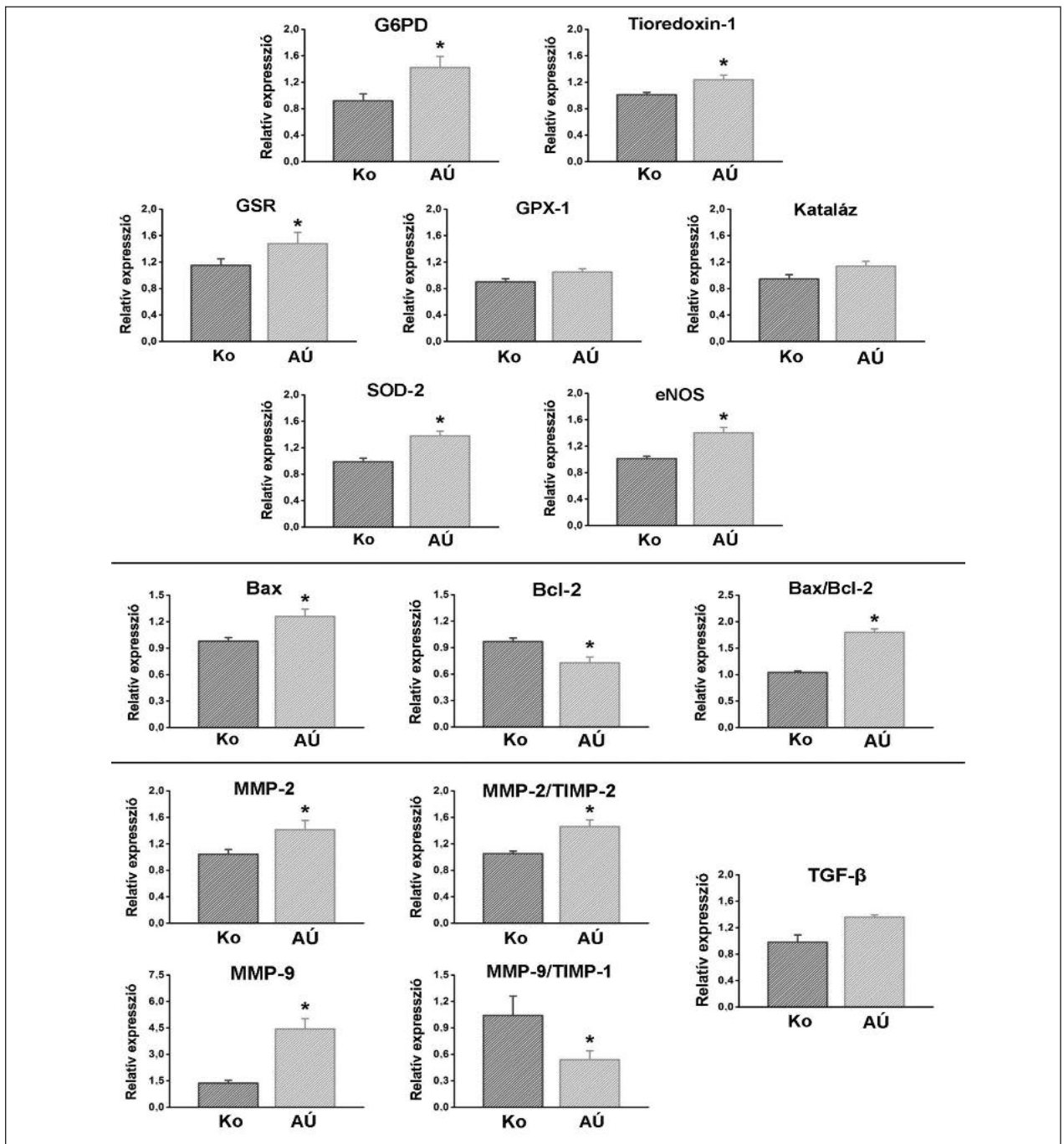
Megbeszélés, következtetések

A jelen tanulmányban észlelt cTnT és a nem specifikus kardiális nekroenzimek (CK, LDH, AST) plazmaszintjének jelentős emelkedése miokardiális károsodást jelzett a kimerítő fizikai terhelés hatására, amelyet korábban több humán (3, 4) és állatkísérletes (7, 8) tanulmányban is igazoltak (1. táblázat). A nem specifikus markerek emelkedéséhez a vázizomzat jelentős megterhelése is hozzájárulhatott (vázizomból kiáramló CK és LDH). A BK-i szívizom-metszeteken megfigyelt sporadikus szívizom-sérülés jelei is a korábbi szakirodalomban leírtaknak megfelelőek (1. ábra) (19).

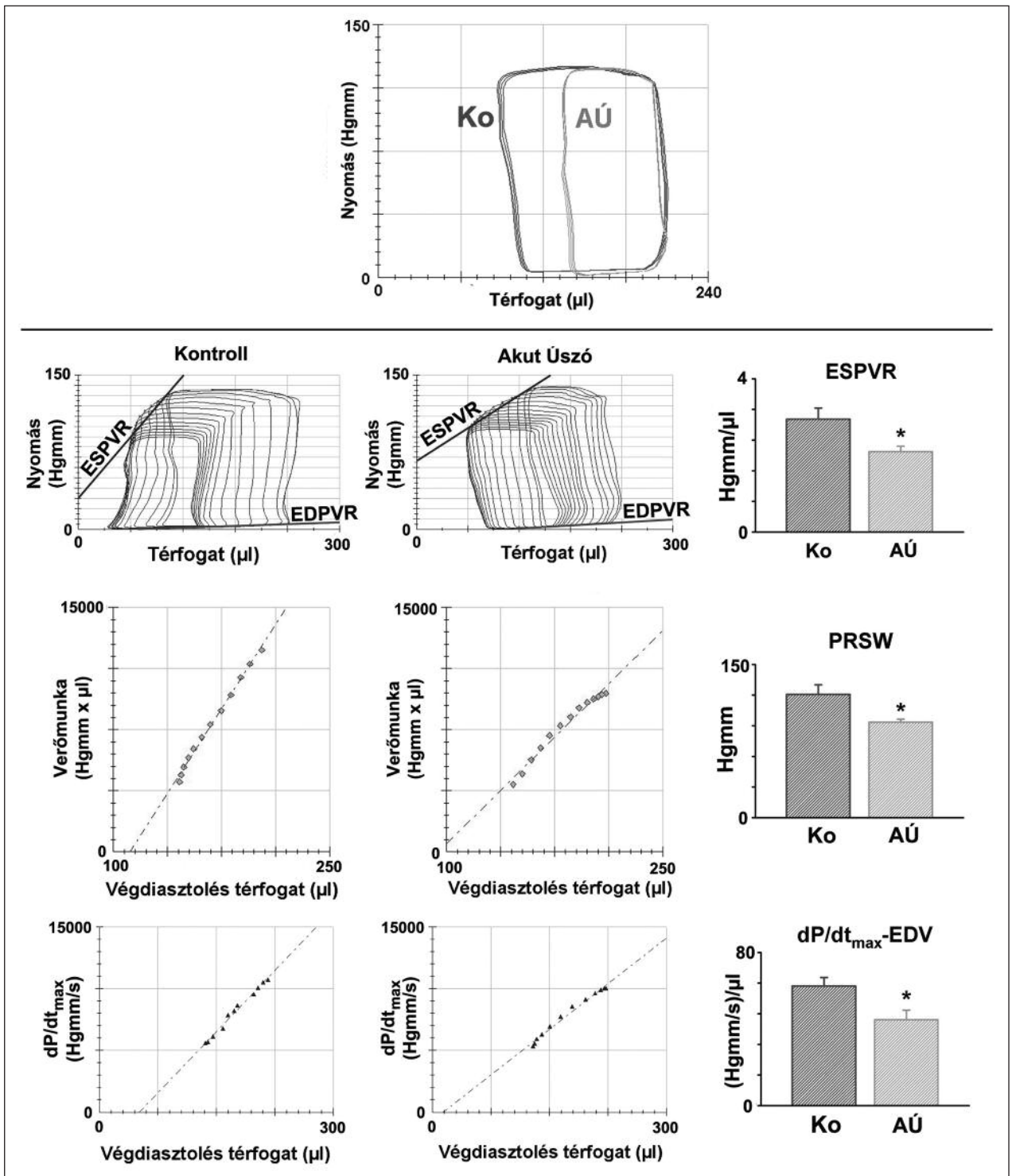
Habár a megerőltető terhelés által indukált szívizom-sérülés mechanizmusa pontosan nem ismert, az oxidatív stresszt okozó ROS felhalmozódását, valamint ennek következtében az antioxidáns enzimek expressziójának kompenzatorikus fokozódását figyelték meg patkányok szívizomzatában akut, fizikai terhelést követően (20). Ezen tanulmánnyal összhangban jelentős miokardiális ROS-képződést észleltünk DHE-festés segítségével és ehhez kapcsolódóan az endogén antioxidáns mechanizmusok aktiválódását figyeltük meg (1. B ábra, 2. ábra). A szuperoxid-anionok koncentrációjának emelkedése a toxikus peroxinitrit keletkezése által csökkenti az NO biohasznosíthatóságát (21). Az akut úszó állatok szívizomzatában az NT-festés jelentősen emelkedett fehérje nitrációt mutatott, amely fokozott peroxinitrit-képződést, nitro-oxidatív stresszt tükröz. Az eNOS miokardiális génexpressziója a csökkent NO biohasznosíthatóság következményeként kompenzatorikusan emelkedhetett meg (2. ábra).



1. ábra. Hisztológia: reprezentatív bal kamrai (BK-i) szívmuszkó szövet mikroszkópos felvételek és a szövettani kiértékelés eredményei. A-panel: a hematoxilin-eozinnal (HE) festett BK-i metszeteken helyenként a szívmuszkórostok töredezettsége, szöveti ödéma, eozinofília (csillag jelölés) és leukocita-infiltráció (nyilak), vagyis a miokardiális sérülés jelei mutatkoztak az akut úszó (AÚ) csoportban az egészséges kontroll (Ko) myocardiumhoz viszonyítva (400 $\times$ -os nagyítás, skála 60 μ m). B-panel: a dihidroetidium (DHE) festett BK szívmuszkó szöveti metszeteken a piros színű fluoreszcens jel intenzitása (jellemzően a sejtmagokban) jelentősen növekedett akut terhelést követően, ami markáns reaktív oxigén szabadgyök-termelést tükröz (200 $\times$ -os nagyítás, skála 100 μ m). C-panel: A nitro tirozin (NT)-festés fokozott tirozin-nitrációt (a sötétszürke szín jelzi a NT pozitív területeket) mutatott az AÚ állatok szívmuszkó szövetében (200 $\times$ -os nagyítás, skála 100 μ m). D-panel: A TUNEL-pozitív cardiomyocita sejtmagok (nyilak) száma emelkedett volt kimerítő fizikai terhelés hatására, amely fokozott DNS-fragmentációt jelzett AÚ állatokban (400 $\times$ -os nagyítás, skála 50 μ m) * p <0,05 vs. Ko.



2. ábra. Miokardiális génexpressziós analízis eredményei a kontroll (Ko) és az akut úszó (AÚ) csoport esetén. Felső panel: A miokardiális génexpressziós vizsgálatok a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PD), a glutation-reduktáz (GSR), a thioredoxin-1, a szuperoxid-dizmutáz-2 (SOD-2) és az endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) expressziójának szignifikáns emelkedését igazolták, a kataláz és a glutation-peroxidáz-1 (GPX-1) erős tendenciális növekedését figyeltük meg a kimerítő terhelés hatására. Ezek az eredmények a miokardiális oxidatív stressz hatására létrejövő endogén antioxidáns rendszer aktiválódására utalnak. Középső panel: A proapoptotikus mediátor Bcl-2 asszociált X-protein (Bax) miokardiális expressziójának fokozódása és az antiapoptotikus mediátor B-sejt lymphoma 2 (Bcl-2) expressziójának csökkenése a Bax/Bcl-2 arány jelentős növekedését eredményezte, amely a proapoptotikus szignálutak aktivációjára mutat rá. Alsó panel: A mátrix metalloproteináz (MMP)-2 és MMP-9 miokardiális expressziós értékei növekedtek az intenzív igénybevételt jelentő testmozgás után. Az emelkedett MMP-2/metalloproteináz szöveti inhibitor (TIMP)-2 és csökkent MMP-9/TIMP-1 arány az MMP rendszer diszregulációjára utal. A transzformáló növekedési faktor-β (TGF-β) erős tendenciális növekedést mutatott a terhelés hatására. Ezek az eredmények a megerőltető fizikai terhelés okozta profibrotikus szignálutak aktiválódására utalhatnak a szívben. * $p < 0,05$ vs. Ko.



3. ábra. A bal kamrai nyomás-térfogat-analízis reprezentatív ábrái. Felső panel: Eredeti, reprezentatív regisztrátumok egy kontroll (Ko) és egy akut úszó (AÚ) állat nyugalmi P-V viszonyairól. A P-V-hurok csökkent szélessége változatlan végdiasztolés térfogat mellett csökkent verőtérfogatot és ejekciós frakciót tükröz a kimerítő fizikai terhelés hatására. Alsó panel: Nyomás-térfogat (P-V) analízis során nyert elő- és utóterheléstől független bal kamrai kontraktilitás-paraméterek változása az akut kimerítő fizikai terhelés hatására. A végszisztolés P-V összefüggés (ESPVR); az ún. preload recruitable stroke work, vagyis a vérőmunka és a végdiasztolés térfogat összefüggése (PRSW); valamint a maximális dP/dt és végdiasztolés térfogat összefüggés (dP/dt_{max}-EDV) egy-egy reprezentatív felvétele a Ko, illetve az AÚ csoportból. Mindhárom összefüggés meredeksége jelentősen csökkent, mely a kontraktilitás károsodására utal kimerítő fizikai terhelés után. *p<0,05 vs. Ko.

2. táblázat. Hemodinamikai paraméterek a kontroll és akut úszó csoportban

	Kontroll (n=10)	Akut Úszó (n=10)	p-érték (vs. kontrollcsoport)
HR, ütés/min	418,6±13,1	417,5±8,0	0,9436
MAP, Hgmm	112,5±4,4	109,8±3,5	0,6400
LVESP, Hgmm	125,7±4,4	125,1±3,7	0,9272
LVEDP, Hgmm	3,9±0,6	4,4±0,3	0,4208
LVEDV, μ l	214,7±15,5	211,9±13,7	0,8943
LVESV, μ l	100,1±6,7	140,4±8,5*	0,0015
SV, μ l	139,1±9,4	102,3±11,3*	0,0226
CO, ml/min	58,48±4,67	42,39±4,53*	0,0235
CI (ml/min)/100 g testtömeg	17,31±1,68	12,32±1,22*	0,0271
EF, %	59,5±1,8	44,1±3,4*	<0,0001
dP/dt _{max} , Hgmm/s	8350±465	7700±458	0,3329
dP/dt _{min} , Hgmm/s	11095±741	10183±693	0,3805
Tau (Glantz), ms	10,9±0,6	11,2±0,6	0,7297
EDPVR, Hgmm/ μ l	0,036±0,004	0,041±0,004	0,3133
TPR, Hgmm/(ml/min)	2,02±0,16	2,84±0,29*	0,0228
E _a , Hgmm/ μ l	0,93±0,05	1,38±0,17*	0,0208
E _{es} , Hgmm/ μ l	2,95±0,29	2,11±0,14*	0,0155
VAC	0,38±0,03	0,66±0,08*	0,0026
SW, Hgmm · ml	13,4±0,6	9,1±0,1*	0,0030
PVA, Hgmm · ml	22,0±0,9	19,6±2,3	0,3456
Eff, %	59,4±1,5	48,5±1,8*	0,0003

Az adatok átlagérték±SEM formában szerepelnek. A táblázatban használt rövidítések: HR: szívfrekvencia; MAP: artériás középnyomás; LVESP és LVEDP: bal kamrai végszisztolés, illetve végdiasztolés nyomás; LVEDV és LVESV: bal kamrai végdiasztolés, illetve végszisztolés térfogat; SV: verővolumen; CO: perctérfogat; CI: szívindex; EF: ejekciós frakció; dP/dt_{max} és dP/dt_{min}: maximális, illetve minimális dP/dt; Tau: bal kamrai relaxációs időkonstans; EDPVR: bal kamrai végdiasztolés nyomás-térfogat összefüggés meredeksége; TPR: teljes perifériás ellenállás; E_a: artériás elasztancia; E_{es}: bal kamrai végszisztolés elasztancia; VAC: ventrikulo-arteriális kapcsolás; SW: bal kamrai verőmunka; PVA: nyomás-térfogat terület; Eff: mechanikus hatások. *p<0,05 vs. kontroll

A ROS-felhalmozódás számos hipertrófiás útvonalat és transzkripciósi faktort képes aktiválni, valamint a DNS- és mitokondriális károsodás által apoptózist indukál (22). A proapoptotikus és antiapoptotikus fehérjék (mint pl. Bax és Bcl-2) egyensúlya szabályozza a sejt túlélését a mitokondriális permeabilitás szabályozása által. Eredményeink szerint a jelentősen növekedett Bax/Bcl-2 arány fokozott miokardiális apoptotikus aktivitást jelzett kimerítő fizikai terhelés után (2. ábra). Ezt alátámasztotta, hogy a TUNEL-festés fokozott DNS-fragmentációt mutatott akut úszó állataink myocardiumában (1. C ábra). A ROS serkenteni tudja a fibroblasztok osztódását és aktiválni a MMP-rendszert, amely a szív-izom extracelluláris mátrix homeosztázisában játszik kulcsszerepet. Az emelkedett MMP-expresszió a szív-izomsejtek extracelluláris környezetének kóros átépüléséhez vezethet (23). A MMP-ok kifejeződésének fokozódása és az MMP-rendszer diszregulációja felveti a lehetőségét, hogy az egyszeri, kimerítő terhelés okozta oxidatív stressz profibrotikus folyamatokat indíthat el a szívizomban (2. ábra). A szívizom sérülése esetén aktiválódó és profibrotikus szignálutak aktivációjában kulcsszerepet játszó TGF- β expressziójának tendenciális emelkedése is a reparatív folyamatok és profibrotikus me-

chanizmusok aktiválódására utal az intenzív terhelés által indukált miokardiális sérülés után (2. ábra).

Habár számos, leginkább echokardiográfiát használó tanulmány középpontjában a megterhelő fizikai aktivitás okozta szívfunkció-változás állt, mind amatőr, mind élsportolók esetén, a BK-i szisztolés és diasztolés funkció változásáról ellentmondásos adatok kerültek leírásra (12). Tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amely részletes hemodinamikai jellemzést szolgáltat az akut, túlzott mértékű fizikai aktivitás okozta BK-i funkcionális változásokról. A hasonló HR, BK-i nyomásviszonyok és LVEDV mellett mért növekedett LVESV a SV, az EF, a CO és a CI csökkenéséhez vezetett, amely egyértelműen a szisztolés funkció romlását jelezte, amely több állatkísérletes (19) és humán (24) tanulmány eredményével is összhangban van.

A szív terhelési viszonyaitól függő, hagyományos kontraktilitás-paraméterekkel (EF, dP/dt_{max}) szemben a P-V-analízis során elő- és utóterheléstől független, kontraktilis funkciót jellemző indexeket tudunk számolni (13, 14). Az érzékeny indexek, az ESPVR, a PRSW és a dP/dt_{max}-EDV, jelentős csökkenést mutattak, amely egyértelműen jelzi a BK-i kontraktilitás romlását extrém fizikai terhelés után (3. ábra).

A diasztolés funkciót jellemző paraméterek nem különböztek csoportjaink között: az aktív relaxáció (τ , $dp/dt_{\min}$), illetve a BK-i falmerevség (LVEDP, EDPVR) tekintetében sem volt szignifikáns funkcióromlás a 2 órás obszervációs idő elteltével (2. táblázat). Ezzel szemben néhány humán vizsgálat tranzienst diasztolés diszfunkciót (csökkent E/A arány szívtultrahangos mérések során) írt le (12). Az eltérés hátterében több magyarázat is állhat:

- ❖ egyrészt az akut, hosszan tartó fizikai terhelés a szív terhelési viszonyait megváltoztathatja, mely az E/A arányt jelentősen befolyásolni tudja;
- ❖ másrészt lehetséges, hogy az ATP-függő aktív relaxáció a 2 órás időtartamot követően normalizálódott patkányainkban. További kísérletes eredmények szükségesek az akut terhelés utáni diasztolés funkció vizsgálatára.

A P-V-analízis segítségével elsőként írtuk le a BK mechanoenergetikai állapotát extrém fizikai terhelés hatására. Az E_a és TPR emelkedése az akut, kimerítő fizikai aktivitás vaszkuláris rendszerre gyakorolt károsodását jelezheti, mely a BK növekedett utóterhelését eredményezi. A kontraktilitás károsodása (E_{es}) mellett az E_a növekedése emelkedett VAC-értékhez vezet, amely kontraktilitás-utóterhelés aránytalanságot tükröz, a BK és az artériás rendszer illeszkedési zavarát jelzi (16) (2. táblázat). A BK mechanoenergetikáját további paraméterekkel jellemeztük. A SW csökkenése mellett tapasztalható változatlan PVA a mechanikus hatások csökkenéséhez vezetett, amely arra utallhat, hogy a BK-i szívtomzat változatlan oxigénfogyasztás mellett csök-

kent mechanikus munkát végez (15) (2. táblázat). Ezek az adatok a BK mechanoenergetikájának romlására utalnak az egyszeri kimerítő fizikai terhelés hatására.

Az egyszeri, kimerítő fizikai terhelés miokardiális sérülést és nitro-oxidatív stresszt okozott patkánymodelünkben, valamint a proapoptotikus és profibrotikus folyamatok aktivációját találtuk. Elsőként adtunk részletes hemodinamikai jellemzést a megerőltető terhelés okozta bal kamrai diszfunkcióról nyomás-konduktancia mikrokatéter segítségével. Az érzékeny indexek alapján a szisztolés funkció romlása (csökkent kontraktilitás) volt kimutatható az akut úszás hatására, változatlan diasztolés funkció és károsodott mechanoenergetika (csökkent mechanikus hatások, ventrikulo-arteriális illeszkedési zavar) mellett. Kérdéses azonban, hogy e károsodások átmeneti, reverzibilis változásnak tekinthetők vagy tartós miokardiális sérülést, irreverzibilis diszfunkciót eredményeznek. További kísérletek szükségesek annak vizsgálatához is, hogy az edzettség (hosszas edzésprogram egy versenyre történő felkészülés során) védő hatással bír-e a fent leírt kardiális változásokkal szemben.

Köszönetnyilvánítás

A munkát támogatta az Országos Tudományos Kutatási Alapprogram (OTKA 105555, M.B.), a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (R.T.) és a Nemzeti Fejlesztési Ügynökség (TÁMOP-4.2.2-08/1/KMR-2008-004 és TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013). Elismerés illeti Biró Henriett, Alt Gábor és Fritz Gábor asszisztenseket kiváló technikai munkájukért.

Irodalom

1. Lee C. The definition and assessment of physical activity in cardiovascular risk reduction research. *Aust J Public Health* 1993; 17: 190–194.
2. Middleton N, George K, Whyte G, et al. Cardiac troponin T release is stimulated by endurance exercise in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1813–1814.
3. Shave R, George KP, Atkinson G, et al. Exercise-induced cardiac troponin T release: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 2099–2106.
4. Scharhag J, George K, Shave R, et al. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 1408–1415.
5. La Gerche A, Prior DL. Exercise – is it possible to have too much of a good thing? *Heart Lung Circ* 2007; 16 Suppl 3: S102–104.
6. Chen Y, Serfass RC, Mackey-Bojack SM, et al. Cardiac troponin T alterations in myocardium and serum of rats after stressful, prolonged intense exercise. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1749–1755.
7. Nie J, Close G, George KP, et al. Temporal association of elevations in serum cardiac troponin T and myocardial oxidative stress after prolonged exercise in rats. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110: 1299–1303.
8. Shave R, Baggish A, George K, et al. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 169–176.
9. Radák Z, Ogonovszky H, Dubecz J, et al. Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 726–730.
10. Vollaard NB, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 2005; 35: 1045–1062.
11. Mousavi N, Czarnecki A, Kumar K, et al. Relation of biomarkers and cardiac magnetic resonance imaging after marathon running. *Am J Cardiol* 2009; 103: 1467–1472.
12. Oxenburgh D, Birch K, Shave R, et al. “Exercise-induced cardiac fatigue” – a review of the echocardiographic literature. *Echocardiography* 2010; 27: 1130–1140.
13. Cingolani OH, Kass DA. Pressure-volume relation analysis of mouse ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: 2198–2206.
14. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008; 3: 1422–1434.
15. Suga H. Cardiac energetics: from $E(\max)$ to pressure-volume area. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30: 580–585.
16. Sunagawa K, Maughan WL, Burkhoff D, et al. Left ventricular interaction with arterial load studied in isolated canine ventricle. *Am J Physiol* 1983; 245: H773–780.
17. Csont T, Bereczki E, Bencsik P, et al. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 100–109.
18. Masszi G, Benko R, Csibi N, et al. Endothelial relaxation mechanisms and nitrate stress are partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Life Sci* 2013; 93: 133–138.
19. Li T, Zhu D, Zhou R, et al. HBOC attenuates intense exercise-induced cardiac dysfunction. *Int J Sports Med* 2012; 33: 338–345.
20. Muthusamy VR, Kannan S, Sadhaasivam K, et al. Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 366–376.
21. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315–424.
22. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 731–740.
23. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H2181–2190.
24. Middleton N, Shave R, George K, et al. Left ventricular function immediately following prolonged exercise: A meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 681–687.