

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A szabadidős mozgás kardiovaszkuláris
és vastagbélgyulladást csökkentő hatása patkányban:
a hem-oxigenáz és a nitrogénmonoxid-szintáz enzimek szerepe**

Szalai Zita

Témavezetők:

Dr. Varga Csaba, egyetemi docens

Dr. Pósa Anikó, egyetemi tanársegéd

Kedvesné Dr. Kupai Krisztina, tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2014

A tézisben szereplő rövidítések jegyzéke:

AVP	arginin vazopresszin
CO	szénmonoxid
HO	hem-oxigenáz enzim
HO-1	hem-oxigenáz-1 enzim
MPO	mieloperoxidáz enzim
NO	nitrogénmonoxid
NOS	nitrogénmonoxid-szintáz enzim
cNOS	konstitutív nitrogénmonoxid-szintáz enzim
iNOS	indukálható nitrogénmonoxid-szintáz enzim
SnPP	ón-protoporfirin IX
TNBS	2,4,6 trinitrobenzén szulfonsav

Tudományos háttér

A szabadidős vagy rekreációs testmozgás magába foglal minden belső motivációból, a szabadidő aktív eltöltése érdekében végzett mérsékelt intenzitású fizikai aktivitást, melynek célja az egészségmegőrzés, betegség-megelőzés. A mérsékelt intenzitású mozgásformák jótékony szerepét számos krónikus betegségben feltételezik, többek között szív- és érrendszeri megbetegedésekben, vastagbél-daganatnál, azonban az ilyen jellegű mozgás által indukált folyamatok egyes részletei, összefüggései még tisztázásra várnak mind a kardiovaszkuláris, mind pedig a gyomor-bélrendszerben. Továbbá kevésbé ismert, hogy a rekreációs testmozgás milyen hatással van az akut vastagbélgyulladásra.

A mérsékelt intenzitású fizikai aktivitás kismértékű oxidatív stresszt okoz, amire a szervezet az antioxidáns védő rendszerek fokozott aktivitásával válaszol. Az antioxidáns védekezésben fontos szerepet tölt be a hem-oxigenáz (HO) enzimrendszer. A HO katalizálja a prooxidáns hatású hem bomlását biliverdinné, szénmonoxiddá (CO) és szabad vassá. A biliverdinből a biliverdin reduktáz katalizálta reakcióban bilirubin keletkezik. A bilirubin antioxidáns hatását azáltal is kifejti, hogy a reaktív oxigén származékokkal reagálva visszaalakul biliverdinné. A hem bomlásakor felszabaduló CO egy vazoaktív gáz, az érfal simaizomsejtjeinek relaxációján keresztül vazodilatációt okoz. Mind a CO, mind pedig a bilirubin gyulladáscsökkentő hatással is bír. A HO enzim indukálható formája a HO-1, melyet hősokk protein 32-nek is neveznek. HO-1 transzkripcióját számos tényező képes indukálni: pl. nehézfémek, oxidatív stressz, hipoxia, hősokk. Kísérletes bélgyulladás modellekben igazolták, hogy a HO-1 aktivitását serkentő hemin vagy hipertermia enyhíti, míg a HO-1 aktivitását gátló cink-protoporfirin és ón-protoporfirin (SnPP) súlyosbítja a gyulladást.

Egy másik vazoaktív gáz a nitrogénmonoxid (NO), ami a nitrogénmonoxid-szintáz (NOS) enzim katalizálta reakcióban keletkezik. A NOS által termelt NO jótékony és károsító is lehet, attól függően hogy mekkora mennyiségben keletkezik. A konstitutív izoformák (cNOS) - endoteliális NOS és neuronális NOS – által kis mennyiségben termelt NO a CO-hoz hasonlóan a vazodilatáció biztosítása révén gyulladáscsökkentő hatással is bír. Ezzel ellentétben, a gyulladással mediátorok által is indukálható izoforma (iNOS) katalizálta reakcióban felszabaduló nagy mennyiségű NO oxigén szabadgyökökkel is képes reakcióba lépni, ekkor citotoxikus dinitrogén-trioxid és peroxinitrit keletkezik, melyek reakcióba léphetnek a DNS-sel, fehérjékkel és lipidekkel, ezáltal oxidatív károsodásokat okoznak.

Célkitűzések

Korunk civilizációs betegsége a mozgásszegény életmód. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a szabadidős testmozgás milyen hatással van a szív- és érrendszerre és az akut, kísérletes vastagbélgyulladásra patkányban.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ.

1. Célul tűztük ki az antioxidáns HO enzim szerepének igazolását aortagyűrű-modellben?
2. Van-e nemek közötti különbség az aortagyűrű kontrakciós válaszában a HO aktivitás gátlását követően?
3. A 6 hetes szabadidős testmozgás hogyan befolyásolja a HO aktivitást aortában és szív bal kamrában?
4. A 6 hetes szabadidős testmozgás hogyan befolyásolja a cNOS aktivitást aortában és szív bal kamrában?
5. A 6 hetes futás során, illetve a TNBS kezelést követően hogyan változik az állatok testtömege?
6. Milyen hatással van az előzetesen 3, 6 és 10 héten át végzett futókerekes mozgás a TNBS kiváltotta akut colitis súlyosságára és kiterjedésére, továbbá a mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitására?
7. A 6 hetes szabadidős mozgás indukálta folyamatok következtében vagy akut gyulladásban, továbbá a kettő kombinációjakor hogyan változik a HO aktivitás patkány vastagbélben?
8. A 6 hetes szabadidős mozgás indukálta folyamatok következtében vagy akut gyulladásban és a kettő kombinációjakor hogyan változik a cNOS és az iNOS aktivitás patkány vastagbélben?

Módszerek

Kardiovaszkuláris vizsgálatok

Az aortagyűrű vizsgálatokhoz hím és nőstény Wistar patkányokat használtunk, 24 és 1 órás SnPP előkezelést (30 $\mu\text{mol/kg}$, s.c., pH 7,4) követően mértük az arginin vazopresszinre (AVP, 2,0 $\mu\text{g/ml}$) adott kontrakciós választ.

További kísérleteinkhez hím állatokat használtunk, melyeket a vizsgálatok megkezdésekor két csoportba osztottunk: abszolút kontroll és futó kontroll csoport. A szabadidős mozgást úgy modelleztük, hogy a patkányokat futókerékkel felszerelt ketrecekben tartottuk a kísérletek teljes ideje alatt, míg az abszolút kontroll állatok hagyományos ketrecben voltak. A 6 hetes szabadidős mozgást követően kivettük az állatok hasi aortáját és szív bal kamráját. A mintákból meghatároztuk a HO és a cNOS enzimek aktivitását.

Vastagbél vizsgálatok

A hím Wistar patkányokat négy csoportra osztottuk: abszolút kontroll (nem futott és nem kapott 2,4,6 trinitrobenzén szulfonsavat; TNBS), futó kontroll (futott, nem kapott TNBS-t), nem-futó TNBS (nem futott, kapott TNBS-t) és futó TNBS (futott és TNBS-t is kapott). 3, 6 és 10 hetes futást követően kezeltük a megfelelő csoportokban a vastagbélgyulladást 10 mg, 50 %-os etanolban oldott, 0,25 ml térfogatban beadott TNBS-val váltottuk ki. A kezelés előtt 12 órával az állatokat éhezettük. A TNBS kezelés előtt hetente, a TNBS kezelést követően naponta mértük az állatok testtömegét. A mintavétel a TNBS kezelést követően 72 órával történt, kivettük az állatok vastagbelének végbéltől számított 8 cm-es szakaszát. A vastagbél-mintákból meghatároztuk a nyálkahártya-gyulladás makroszkopikus paramétereit (súlyossági skála, lézió kiterjedése) és spektrofotometriás módszerrel a MPO enzim aktivitását. A 6 hetes szabadidős testmozgást végző állatok mintáiból mértük a HO, a cNOS és az iNOS aktivitásokat.

Makroszkopikus gyulladási paraméterek meghatározása

A bélszakaszokról készített képeken egy, a laborunk által fejlesztett számítógépes planimetriás program (Stat_2_1_1) segítségével lemértük a keletkezett gyulladások százalékos kiterjedését a 8 cm-es bélszakaszhoz viszonyítva. A gyulladások súlyosságát a fotók alapján egy 11 pontos skála segítségével értékeltük.

Mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitásának mérése

A MPO enzim a neutrofil granulocitákban található, mennyisége jól jellemzi a gyulladás mértékét. A MPO aktivitását spektrofotometriásan peroxidáz módszerrel határoztuk meg.

HO aktivitás mérése

A HO aktivitásának mérésénél a hem átalakulása során keletkező bilirubin szintet mértük spektrofotometriás módszerrel.

NOS aktivitás mérése

NOS aktivitásméréssel a [¹⁴C]-jelölt L-arginin L-citrullinná alakult mennyiségét határoztuk meg.

Fehérjetartalom mérése

A minták összfehérje-tartalmát Bradford mikromódszerrel mértük meg. Az enzimaktivitás értékeket minden esetben összfehérje-tartalomra vonatkoztattuk.

Statisztikai analízis

Eredményeink értékelése során a kétmintás student „t” tesztet alkalmaztuk. Az eredményeket $P < 0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Az aortagyűrű AVP kezelésre adott kontrakciója fokozódott, ha a HO aktivitás gátlószerével, SnPP-nel előkezelést végeztünk. A hímek és nőstények között tapasztalt szignifikáns különbséget a HO aktivitás blokkolásával megszüntettük.

A kardiovaszkuláris rendszerben a 6 hetes szabadidős testmozgást követően szignifikánsan megemelkedett a HO és a cNOS aktivitása hasi aortában és szív bal kamrában.

A 6 hetes mozgásprogram végére nem volt különbség a nem-futó és futó állatok testtömegében. A TNBS kezelést követően fogytak az állatok, de az előzetesen testmozgást végző csoportban ez a testtömeg csökkenés a harmadik napra megállt. Az előzetesen végzett 6 és 10 hétig tartó futás szignifikánsan csökkentette a kiváltott vastagbélgyulladás kiterjedését és súlyosságát, illetve a MPO aktivitását, viszont a 3 hetes szabadidős testmozgás nem csökkentette a vastagbélgyulladást. További vizsgálatainkhoz a 6 hetes futás protokollt alkalmaztuk.

A 6 hétig tartó futás önmagában mintegy háromszorosára megemelte a HO aktivitást a vastagbélben az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva. A gyulladást követően kialakuló magas HO aktivitást a futás kis mértékben fokozta. Kontroll állatokban cNOS aktivitását a futás szignifikánsan megemelte mind a futó kontroll, mind a futó TNBS csoportban a megfelelő nem-futó csoportokhoz viszonyítva. A gyulladós folyamat a cNOS alapaktivitásának csökkenését eredményezte, ám az előzetesen végzett mozgás következtében emelkedett alap cNOS aktivitást csupán a kontroll szintig csökkentette. Az iNOS aktivitásában a gyulladás szignifikáns emelkedést okozott. A mozgás pozitív hatása ezen enzim esetén is megmutatkozott, mivel csökkentette az iNOS aktivitásának nagyfokú megemelkedését.

Eredmények megbeszélése

Az aortagyűrű-kontrakció vizsgálatok igazolták, hogy a HO enzim is részt vesz az aorta kontrakciójának szabályozásában. A HO aktivitás blokkolása megszünteti az AVP-re adott kontrakciós válaszban megmutatkozó nemek közötti különbséget. Továbbá ezen eredmények is alátámasztják, hogy hímek esetén nagyobb a rizikó a kardiovaszkuláris megbetegedésekre.

A 6 hetes futókerékben végzett futás aortában és szív bal kamrában fokozta a HO és a cNOS enzimek aktivitását. A HO és a NOS katalizálta folyamatban keletkező vazoaktív gázok, a CO és a NO egyaránt szerepet játszhat a vérkeringés fizikai aktivitáshoz igazításában.

A vastagbél mintákból végzett méréseink alapján elmondhatjuk, hogy a 3 hetes szabadidős testmozgás nem elegendő az antioxidáns rendszerek aktiválásához. A szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentőnek bizonyult, ha 6 illetve 10 héten át tartott: csökkent a TNBS indukálta vastagbélgyulladás makroszkopikusan megfigyelhető kiterjedése és súlyossága, továbbá a MPO enzim aktivitása. A 6 hetes futókerékben végzett mozgás indukálta folyamatok következtében megemelkedik a HO és a cNOS aktivitás, míg az iNOS aktivitás nem változik a vastagbélben. A TNBS kiváltotta HO aktivitás emelkedését a 6 hetes szabadidős testmozgás nem emeli meg szignifikánsan. A mozgás hatására megemelkedett cNOS aktivitás miatt, a TNBS által kiváltott gyulladás miatti cNOS aktivitás csökkenés után a cNOS aktivitás értékek a normál szinten maradtak. A mozgás következtében kialakuló magasabb enzim szintek és aktivitások (HO, cNOS) miatt kisebb gyulladások alakultak ki, ami a kisebb iNOS aktivitás értékben is megmutatkozott.

Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a különböző NOS és HO izoformák aktivitásában mért változások hozzájárulnak a szabadidős testmozgás gyulladáscsökkentő hatásához.

Tudományos közlemények listája

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Szalai Z, Szász A, Nagy I, Puskás LG, Kupai K, Király A, Berkó AM, Pósa A, Strifler G, Baráth Z, Nagy LI, Szabó R, Pávó I, Murlasits Z, Gyöngyösi M, Varga C. (2014) Anti-Inflammatory Effect of Recreational Exercise in TNBS-Induced Colitis in Rats: Role of NOS/HO/MPO System. *Oxid Med Cell Longev*. 2014: 925981. doi: 10.1155/2014/925981. **IF: 3,393**

Pósa A, Kupai K, Ménesi R, **Szalai Z**, Szabó R, Pintér Z, Pálfi G, Gyöngyösi M, Berkó A, Pávó I, Varga C. (2013) Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase. *Oxid Med Cell Longev*. 2013:521563. doi: 10.1155/2013/521563. **IF: 3,393**

Nyomtatásban megjelent konferencia kivonatok

Szalai Z, Kupai K, Magyariné Berkó A, Pósa A, Szabó R, Varga C (2013) Time-dependent changes in inflammatory markers in a rat model of colitis by leisure sport activity; Magyar Gasztroenterológiai Társaság 55. Nagygyűlése, Tihany, *Z Gastroenterol* 51: 477; IF: 1,408

Posa A, Szabo R, Szablics P, Berko MA, **Szalai Z**, Orban K, Balogh L, Varga C (2011) Long term recreational physical exercise decreases angina susceptible and reduces myocardial infarct size. XXX Annual meeting of the European Section of the ISHR, Haifa, Israel, Bologna: Monduzzi International Proceedings Division, 2012. p. 39.

Szalai, Z, Berkó, M. A., Pósa, A., Szabó, R., Orbán, K., Király, A., László, F., Varga, Cs. (2011) Long term low intensity recreational physical exercise attenuates colonic inflammation in rats: the role of heme oxygenase system. 13th European Congress of Endocrinology Rotterdam, Niederland. ENDOCRINE ABSTRACTS 26: Paper P340. (2011)

Renáta Szabó, Anikó Pósa, **Zita Szalai**, Péter Szablics, Csaba Varga, Anikó Berkó, Kornélia Orbán, Ferenc László (2011) Long term recreational physical exercise decreases angina susceptibility and induces cardiovascular protective shifts in nitric oxide synthase, heme oxygenase and matrix metalloproteinase enzyme regulation in rats. 13th European Congress of Endocrinology Rotterdam, Niederland. ENDOCRINE ABSTRACTS 26: Paper P581. (2011)