

A rendszeres fizikai aktivitás és a SIRT aktiválás hatása a különböző genetikai háttérrel rendelkező patkányok fiziológiai teljesítményére

Doktori értekezés

Hart Nikolett

Semmelweis Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, D.Sc

Hivatalos bírálók: Dr. Bácsi Attila, egyetemi docens, Ph.D
Dr. Ferdinándy Péter, egyetemi tanár, D.Sc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sipos Kornél, professzor emeritus, C.Sc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Osváth Péter, egyetemi docens, Ph.D
Dr. Pucskó József, egyetemi tanár, D.Sc
Dr. Pavlik Gábor, professzor emeritus, D.Sc

Budapest
2012

Tartalomjegyzék:

Rövidítések jegyzéke	4
Ábrák és táblázatok jegyzéke	6
1. <u>Bevezetés, irodalmi áttekintés:</u>.....	8
1.1 Fizikai aktivitás/ inaktivitás hatásai.....	8
1.1.1 Epigenetikai változások	9
1.1.2 Oxidatív stressz, szabadgyökök	10
1.2 Sirtuinok (silent information regulator).....	11
1.2.1 A SIRT1 enzim működése, és jelentősége.....	12
1.2.2 SIRT4, az oxidatív metabolizmus „negatív regulátora” ...	13
1.2.3 Rezveratrol.....	14
1.3 ATP termelés, energetikai központok- mitokondriumok	15
1.3.1 A szívizom energiatermelése	16
1.3.2 Mitokondriális diszfunkciók	16
1.3.3 Az aerob kapacitás és a genetikailag determinált betegségek összefüggése	18
1.4 Mitokondriális biogenezis izomszövetben	20
1.4.1 Forkhead borsz 01(Foxo1) transzkripció faktor jelentősége	24
1.4.2 Mitokondriális biogenezis szívizom szövetben (fiziológiás- és patológiás változások).....	24
1.5 Mitokondriális-minőség kontroll.....	26
1.5.1 A szabadgyök fogó antioxidáns rendszer (a minőség kontroll első szintje).....	27
1.5.2 Javítás és újrahasznosítás (a minőség kontroll második szintje)	27
1.5.3 Mitokondriális fúzió és fízió (a minőség kontroll harmadik szintje).....	29
1.5.4 Mitofágia (a minőség kontroll negyedik szintje).....	30

2. <u>Célkitűzések:</u>	32
2.1 Hipotézisek vázizom esetén.....	32
2.2 Hipotézisek szívizom esetén	33
3. <u>Anyagok és módszerek:</u>	34
3.1 Állatok és edzés protokoll	34
3.2 Kapaszkodási teszt.....	35
3.3 Rezveratrol adagolás	35
3.4 Western blot analízis	36
3.5 Szabadgyök koncentráció meghatározása.....	38
3.6 SIRT1 aktivitás mérés	39
3.7 Karbonilált fehérjék mennyiségi mérése	39
3.8 mtDNS szeparálása és mennyiségi mérése	39
3.9 Statisztikai analízis	30
4. <u>Eredmények:</u>	41
4.1 Vázizomból született eredmények – változások a gastrocnemius izomszövetben	41
4.2 Szívizomból született eredmények – változások a szívizomszövetben	63

5. <u>Megbeszélés:</u>	71
5.1 A gastrocnemius izomból született eredmények értékelése	71
5.2 A szívizomból született eredmények értékelése	78
6. <u>Következtetések:</u>	83
7. <u>Összefoglalás:</u>	84
8. <u>Summary:</u>	85
9. <u>Irodalomjegyzék</u>	86
10. <u>Saját publikációk jegyzéke:</u>	103
Köszönetnyilvánítás	104

Rövidítések jegyzéke

ADP	Adenozin-difoszfát
AMPK	Adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Cataláz
CH	Control High (kontroll, magas aerob kapacitású állatok)
CL	Control Low (kontroll, alacsony aerob kapacitású állatok)
DNP	Dinitrophenylhydrazone
DNPB	Dinitrophenylhydrazine
DNS	Dezoxiribonukleinsav
CuZnSOD	Réz-Cink Superoxid Dizmutáz
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FIS1	Fission 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
GPX	Glutation peroxidáz
GTP	Guanozin trifoszfát
HCR	High Capacity Runner
HDAC	Hisztin deacetilázok (Histone deacetylases)
H2DCFDA	2-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HRP	Horseradisch peroxidase
HSP78	Heat shock protein 78
H2O2	Hidrogén-peroxid
LCR	Low Capacity Runner
LonP	Lon proteáz enzim
MFN	Mitofusin-1
MnSOD	Mangán Superoxid Dizmutáz
mtDNS	Mitokondriális DNS
NAD+	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAMPT/PBEF	Nicotinamide phosphoribosyltransferase

NP40	Nonidet P-40 (octyl phenoxypolyethoxylethanol)
NRF1	Nuclear respiratory factor 1
NO	Nitrogén-monoxid
OH-	Hidroxyil-gyök
pAMPK	(foszfo-)Adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PNPase	Polynucleotide Phosphorylase
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PVDF membrane	Polyvinylidene Fluoride membrane
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reactive Oxygen Species/ Reaktív oxigén gyökök
RsvH	Resveratrol treated High (Rezveratrollal kezelt, „High”)
RsvL	Resveratrol treated Low (Rezveratrollal kezelt, „Low”)
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate-polyacrilamide gel electroforesis
Sir2/sirtuin	Silent mating-type information regulation 2
SIRT1-7	Humán Sir2 homológok
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween 20
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
TrH	Trainer High (edző, magas aerob kapacitású állatok)
TrL	Trainer Low (edző, alacsony aerob kapacitású állatok)
TrRsvH	Trainer+Resveratrol treated High (edző+rezveratrollal kezelt „High”)
TrRsvL	Trainer+Resveratrol treated Low (edző+rezveratrollal kezelt „Low”)
VO2 max.	Maximális aerob kapacitás

Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák

- 1. ábra:** A vázizom mitokondriális biogenezise.....22
- 2. ábra:** A mitokondriális minőség-kontroll vázlatos rajza.....30
- 3. ábra:** A vizsgálatban résztvevő állatok kezelése (rezveratrol, edzés program).....35
- 4. ábra:** Az aerob kapacitás változása magas aerob kapacitással bíró egyedeknél.....41
- 5. ábra:** Az aerob kapacitás változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedeknél...42
- 6. ábra:** A futási távolság változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedeknél.....43
- 7. ábra:** A futási távolság változása magas aerob kapacitással bíró egyedeknél.....44
- 8. ábra:** A kapaszkodási erő változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedeknél..45
- 9. ábra:** A kapaszkodási erő változása magas aerob kapacitással bíró egyedeknél.....46

(A) kísérlet: eredmények gastrocnemius izomból

- 10. ábra:** A szabadgyökök mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....47
- 11. ábra:** PAMPK-AMPK relatív aktivitásának változása az egyes állat csoportokban48
- 12. ábra:** NAMPT mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....49
- 13. ábra:** SIRT1 relatív aktivitásának változása az egyes állat csoportokban.....50
- 14. ábra:** Acetilált lizin mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....51
- 15. ábra:** Carbonilált fehérjék mennyiségének változása az egyes állat csoportokban..52
- 16. ábra:** PGC1 α mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....53
- 17. ábra:** NRF1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....54
- 18. ábra:** TFAM mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....55
- 19. ábra:** HSP78 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....56
- 20. ábra:** LonP mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....57
- 21. ábra:** Fis1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....58
- 22. ábra:** Mfn1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....59
- 23. ábra:** Foxo1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....60
- 24. ábra:** Sirt4 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....61
- 25. ábra:** A mtDNS relatív denzitása az egyes állat csoportokban.....62

(B) kísérlet: eredmények szívizomból

26. ábra: A szabadgyökök mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	63
27. ábra: PAMPK-AMPK relatív aktivitásának változása az állat csoportokban.....	64
28. ábra: PGC1 α mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	65
29. ábra: NRF1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	66
30. ábra: TFAM mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	67
31. ábra: Mfn1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	68
32. ábra: Fis1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	69
33. ábra: SDHA mennyiségének változása az egyes állat csoportokban.....	70

Összefoglaló ábrák

34. ábra: A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása.....	77
35. ábra: A szívizomból született eredmények összefoglalása.....	82

Táblázatok

1. táblázat: A különböző futási képességű állatok genetikailag determinált jellemzői..	20
2. táblázat: A kísérlet során használt elsődleges antitestek.....	37
3. táblázat: A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása.....	78

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés:

1.1 Fizikai aktivitás/ inaktivitás hatásai

A fizikai inaktivitás az egyik legkiterjedtebb rizikó faktor a modern társadalmakban, és szinte minden betegség előfordulásában szerepet játszik. Különösen a szív-és keringési betegségek, Alzheimer betegség, kettes-típusú cukorbetegség, a metabolikus szindróma előfordulása nő azok között, akik fizikailag inaktívak (Andersen 1995, Aquilano és mtsai 2010). Ezt értelemszerűen alátámasztják humán és laboratóriumi állatokon végzett vizsgálatok is. Az inaktivitás miatt felgyült hasi zsír szisztémás gyulladás forrása, ami inzulin rezisztenciához, atherosclerosishoz, neurodegenerációhoz, tumor növekedéshez vezethet (Kishida és mtsai 2012). Ezzel szemben számos tanulmány és cikk foglalja össze az eredményeket, amelyek hitelesen bizonyítják a rendszeres testmozgás jótékony, halálozási kockázatsökkentő-, valamint az átlagélettartamot növelő hatását, illetve számos betegség kialakulásában közrejátszó preventív hatását (Bucha és mtsai 2012). Vizsgálatok kimutatták, hogy a rendszeres testedzés hozzájárul a lipid értékek javulásához, megakadályozza az elhízást, javítja az általános-közérzetet, serkenti az ember kreativitását, növeli a munkateljesítményt, csökkenti a csontozat és izomzat sérülési kockázatát (Kiss és mtsai 2003). A rendszeres fizikai terhelés hatására javul a vérkeringés is, így a szívizmok oxigén ellátottsága nő. Emellett a szív teljesítő képessége megnő, erősebb és hatékonyabb összehúzódásra lesz képes. Mindezek miatt a rendszeres mozgás a szív egészségnek egyik legfontosabb eleme. Fokozott fizikai aktivitás hatására a szervezet szimpatikus aktivitása csökken és ez értágító típusú anyagok felszabadulásával jár. Ennek köszönhetően a magas vérnyomás és a koszorúér betegségek megelőzésében is kiemelkedő szerepet játszik a rendszeresen végzett testmozgás. A rendszeres fizikai aktivitás előnyösen befolyásolja a szervezet inzulin működését. A tréning során fokozódik az inzulinérzékenység, ami jelentősen hozzájárul a II. típusú cukorbetegség kialakulásának megelőzéséhez (Nagy és mtsai 2011). Ma már természetesnek tekinthető, hogy a kardio-respiratórikus rendszer, az endokrin rendszer és a többi szervrendszer kifogástalan működéséhez szükséges a rendszeres testmozgás.

Statisztikai adatok támasztják alá, hogy a vezető halálokként szereplő betegségek többsége összefüggésbe hozható a mozgásszegény életmóddal, valamint az elhízással (Beary és mtsai 2012). Köztudott, hogy az aerob fizikai aktivitás javítja a metabolikus funkciókat, megnöveli a mitokondriumok számát és oxidatív enzimek aktivitását a vázizomban, valamint hatékonyabb mitokondriális szabályozást alakít ki a szervezetben (Bori és mtsai 2012). Fokozza a mitokondriális biogenezist, biztosítja a fehérje turn over kiegyensúlyozott állandóságát, hatékonyan eliminálja/javítja az esetleges sérüléseket, mutációkat,- ez által csökkenti bizonyos degeneratív betegségek kialakulásának kockázatát, és lassítja az öregedési folyamatokat (Cejudo és mtsai 2005).

1.1.1 Epigenetikai változások

Eddigi kutatások alapján úgy tűnik, hogy a fizikai inaktivitással/aktivitással epigenetikai változások jönnek létre a szervezetben, melyek bizonyos százalékban örökölhetők is. Ez rendkívül fontos megfigyelés, hiszen így, nemcsak a saját életünk minőségét vagyunk képesek az adott életmóddal megváltoztatni - jó illetve rossz irányba -, de ez hatással van/lehet a leszármazottakra is. Az epigenetikus folyamat elméletileg lehetővé teszi a Lamarck által még az 1800-as évek elején megfogalmazott, ám azóta többszörösen megcáfolt evolúciós elmélet megvalósulását, miszerint az élőlények egyedi életük során szerzett tulajdonságaikat továbbörökíthetik utódaiknak (Handel és Ramagopalan 2010). Az epigenetikus öröklődés molekuláris alapjait mostanra - az embert kivéve - egy sor élőlényben tanulmányozták. Az ideális epigenetikus mechanizmust az úgynevezett DNS-metilációs rendszer közelíti meg leginkább. Itt a DNS-hez metilcsoportok (-CH₃) kapcsolódnak, amelyek egy meghatározott mintázatot alkotnak. A változások kellő pontossággal és gyakorisággal át is öröklődnek egyik sejtről a másikra, sőt néha egyik szervezetről a másikra is. A DNS metilációs szintje egyéneként eltérhet, és a túlzott vagy épp csökkent metiláció hozzájárulhat a súlyos betegségek kialakulásához. Előbbi esetben kikapcsolódhatnak, azaz működésképtelenné válhatnak gének, utóbbiban - a metiláció hiányával - adott gének aktiválódhatnak a nem megfelelő időben, vagy épp a nem megfelelő sejtekben (Anderson és mtsai 2012).

Az elmúlt években több ezer tudományos közlemény és számtalan konferencia foglalkozott az epigenetikával. Az egyik legutóbbi fontos kutatási eredményt a Johns Hopkins Egyetem Orvosi Karának Epigenetikai Központja publikálta (Pujadas és Feinberg 2012.). A kutatók önkéntesek genetikai örökítőanyagának metilációs mintázatát vizsgálták. Mivel az alapfeltevés szerint a környezeti hatások, illetve az öregedés hatására mennek végbe az epigenetikai változások, az egyéni metilációs mintázatnak módosulnia kell az évek folyamán. Ezért a tudósok először ugyanazokat az egyéneket vizsgálták meghatározott időközönként. A vizsgált alanyok körülbelül harmadánál tapasztaltak változást a DNS metiláltsági szintjében. A mintavételek között eltelt idő alatt vagy nőtt, vagy csökkent a vizsgálatban részt vevők DNS-állományának metiláltsága. Ezzel bizonyították, hogy az epigenetikus mintázat változik az életkorral. A kutatócsoport a mintázatok átörökítését is vizsgálta: 2-3 generációs családok tagjaitól vettek DNS-t egy 16 évet átfedő időintervallumban, majd ez esetben is megmérték a teljes metiláltsági fokot. Hasonlóan az előző vizsgálatokhoz, itt is kimutatták a metilációs szint időbeli változását, ugyanakkor a változások iránya a családtagok között azonos irányúnak adódott: ha egy adott személy DNS-ének metiláltsági foka növekedett a vizsgálat ideje alatt, a családtagjaié is, illetve fordítva. A kutatók által közölt tanulmány szerint bebizonyosodott, hogy az epigenetikus változások öröklődnek (Bjornsson és mtsai 2008). Következtetesként elmondható, hogy az életmód is jelentősen befolyásolja az életminőséget, meghatározója lehet különböző betegségek kialakulásának, vagy éppen a hosszú, egészséges életnek generációkon keresztül (Chale-Rush 2010, Batsis 2007, Kant 2005).

Ez a megállapítás alapvetően fontos szempont lesz a dolgozatomban tárgyalt, különböző genetikai háttérrel rendelkező állat populációkban edzéshatásra, valamint rezveratrol kezelésre kialakuló változásainak értékelésében.

1.1.2 Oxidatív stressz, szabadgyökök:

Az anyagcsere folyamatok/energiatermelés során, olyan reaktív molekulák képződnek, melyek a mitokondriumból és más forrásokból kiszabadulva oxidációs folyamat révén károsíthatják a sejtalkotó fehérjéket, nukleinsavakat, valamint zsírokat. Ezeket a molekulákat nevezzük szabadgyököknek (ROS - reactive oxygen species).

Keletkezésük természetes folyamat, amit az egészséges szervezet megfelelő védekező rendszere kompenzálni képes, így fent tartva egy megfelelő egyensúlyt a meghibásodás, és a javítás között. Ezeket a folyamatokat a későbbiekben tárgyalom („A szabadgyök fogó antioxidáns rendszer” című fejezetben). Ha az egyensúly felborul, és a szabadgyökök mennyisége bizonyos szint fölé emelkedik, egy idő után visszafordíthatatlan molekuláris károsodások jönnek létre, ami hosszútávon súlyos sejt degenerációhoz, vagy sejthalálhoz vezethet (Harman 1972). Köztudottan a fehérjék oxidációja az egyik legfontosabb formája az oxidatív károsodásoknak (Rice és mtsai 2012). Az ilyen fehérjék felhalmozódása a szervezetben rontja az enzim funkciókat, sejt toxicitást idéz elő, ezáltal gyorsítja az öregedési folyamatokat (Davies 1995, Sohal 2002). A kor előrehaladtával, a szabadgyökök a DNS-en történt sérülések miatt több mutációt okozhatnak, melyek még több szabad gyököt hozhatnak létre. Ez a folyamat az évek során hibák tömkelegét halmozza fel. Hatással leginkább az oxigén-függő szervekre, szövetekre van, úgy mint az agy, a szív, az izmok és a vese. Ennek köszönhetően jönnek létre olyan degeneratív betegségek, mint például a Parkinson-kór, Alzheimer-kór és a koszorúér megbetegedések (Chrissobolis és mtsai 2011). Szoros összefüggés van az anyagcsere folyamatok és szabadgyök képződés között, és az egyik kapcsolat a két rendszer között valószínűleg a sirtuin fehérje család.

1.2 Sirtuinok (silent information regulator)

A Sirtuinok NAD⁺ (nikotinamid adenine dinucleotide) függő lizin deacetilázok, melyek számos biológiai folyamatban játszanak kiemelkedő szerepet, így az energia metabolizmusban, a stressz válaszban, valamint a genomiális szabályozás és DNS javítás megfelelő fenntartásában (Imai és mtsai 2000, Lombard és mtsai 2008). Feltételezett szabályozói továbbá az öregedés folyamatának és a rosttípus differenciálódásának, valamint szoros kapcsolatban vannak a szabadgyökökkel is (Guarente 2000). A Sirtuin családnak 7 homológ tagja van (SIRT1-7). A gyakran vizsgált sirtuinok közül a SIRT1 és a SIRT6 nukleáris fehérje, míg a SIRT3, SIRT4 és SIRT5 enzimek a mitokondriumban találhatóak. Funkciójukat tekintve a SIRT1, SIRT3 és SIRT5 NAD⁺ függő deacetiláz aktivitással bírnak, míg a SIRT4 és SIRT6

homológok ADP-ribozil-transzferáz (adenozin difoszfát riboziltranszferáz) szerepet töltenek be.

Vizsgálatunkban jelentős szerepe lesz a SIRT1 és SIRT4 enzimeknek.

1.2.1 A SIRT1 enzim működése, és jelentősége

Baktériumoktól az emberig szinte mindenfajta élőlényben találtak az élesztőéhez igen hasonló szerkezetű és működésű sir2 (silent information regulator-2) géneket, ami az emberi SIRT1 nevű gén homológja. Élesztőgombákon és *Drosophila* muslicákon végzett kísérletekből már évekkel ezelőtt kimutatták a SIRT1 élettartam növelő hatását. Leonard Guarante 1999-ben írta le, hogy a sörélesztő *Sir2* génjének módosításával meghosszabbítható a sejtek élettartama (Guarente 1999). További kutatások megállapították, hogy a SIRT1 'knock-out' mutáns egerek rövidebb ideig élnek, mint a vad típusúak. Transzgenikus egerekben a SIRT1 kis-, vagy közepes mértékben fokozott expressziója mérsékelte a szívben a hipertrofia és a diszfunkció korfüggő progresszióját (Guarente 1999).

Általánosan elfogadott tény a kalória-megszorításra fokozódó SIRT1 aktivitás, melyet később más aktivátor-faktorokkal próbáltak helyettesíteni, köztük a leghatékonyabb aktivátornak a rezveratrol nevű polifenol bizonyult (lásd. később). A SIRT1 enzim számos jótékony hatása mellett képes befolyásolni az öregedési folyamatokat és sok olyan, az öregedéssel együtt járó betegséget, mint például a II-es típusú Diabetes, az Alzheimer- vagy a Parkinson kór. Továbbá szerepet játszik a különböző típusú rákos megbetegedések, és az oszteoporózis kialakulásának megelőzésében. Különböző transzkripciós faktorokra,- úgymint a protein 53 (p53), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC1 α), nuclear factor *kappa*-light-chain-enhancer of activated B (NF- κ B), CoEnzyme Q70 (Q70) - hatva szerepet játszik többek között gyulladási folyamatokban, DNS sérülések javításában, valamint a mitokondriális biogenezisben, és az izomrost differenciálódásban (Fulco és mtsai 2003, Lavu és mtsai 2008, Radak és mtsai 2004). Fontos megemlíteni a SIRT1 hiszton deacetiláz szerepét is, minek kapcsán a kromatin 'zárt' állapotba kerül, így a

transzkripció folyamatok nem tudnak megvalósulni. Tehát a sirtuin mintegy lecsendesíti az átírási folyamatokat is (Shahbazian és Grunstein 2007).

1.2.2 SIRT4, az oxidatív metabolizmus „negatív regulátora”

A SIRT4 a sirtuin család egyik tagja, mely a mitokondriában található, és ADP-ribozil-transzferáz szerepet tölt be. Hasnyálmirigy β -sejtjein végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a SIRT4 NAD⁺ jelenlétében gátolja a mitokondriumokban a glutamát dehidrogenáz nevű enzimet, minek következtében csökken a β -sejtek inzulin termelése (Haigis és mtsai 2006) (Ahuja és mtsai 2007). Habár más szövetek esetében még sok kérdés nem tisztázott a SIRT4-el kapcsolatban, mitokondriumban való elhelyezkedéséből adódóan feltételezhető, hogy szerepet játszik az oxidatív folyamatokban.

Egy 2010-es vizsgálatban, - melyben SIRT4 „knock-out” egerekkel dolgoztak – megállapították, hogy a SIRT4 hiánya vázizomban növeli az AMPK (adenozin monofoszfát-aktivált protein kináz) aktivitását, a szabad zsírsavak égetését, ezáltal szabályozza a mitokondriumok oxidatív metabolizmusát. Megfordítva tehát a SIRT4 negatív regulátora az oxidatív energiatermelésnek, ellentétben a SIRT1-el, ami mint tudjuk, fokozza a szövetek oxidatív kapacitását (Nasrin és mtsai 2010). Másik fontos megállapítása ennek a vizsgálatnak, hogy a sirtuinok funkcionálisan együttműködve képesek koordinálni az adott metabolikus állapot energiaáramlását. A pontos mechanizmus még nem ismert egészében, de feltételezhető, hogy a SIRT4 „knock-out” egerek fokozott zsír anyagcseréje az AMPK-SIRT1 útvonalon keresztül valósul meg.

A SIRT4 gátlása révén fokozható az izomzat mitokondriális funkciója és más szövetek - pl. a máj - oxidatív metabolizmusa, ez által növelhető a sejtek inzulin-érzékenysége, ami hatékony segítséget jelenthet a 2-es típusú diabétesz kialakulásának megelőzésében.

A sirtuinok egyik legpotensebb természetes aktivátora a rezveratrol, melynek antioxidáns hatásai mellett, SIRT1 serkentő hatásai kerültek a kutatások középpontjába.

1.2.3 Rezveratrol

A rezveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) egy, növényekben előforduló, nem flavonoid típusú, a polifenolok közé tartozó vegyület. Elsősorban a szőlőben, vörös szőlőben, vörösborban, magvakban, kocsányban található meg. Jelentős mennyiségben tartalmaz resveratrolt a kakaó, az étcsokoládé és a mogyoró is. Az 1990-es évektől számos kísérletben tanulmányozták a vegyület rákellenes, gyulladáscsökkentő, vércukorcsökkentő és a kardiovaszkuláris rendszerre gyakorolt jótékony hatását (Das 2007), (Hung és mtsai 2004). A rezveratrol az erek meszesedését is gátolja, csökkenti ugyanis az LDL-koleszterin oxidációját, továbbá fontos gyulladáscsökkentő-, és antioxidáns szereppel is rendelkezik (Baur és Sinclair 2006).

A rezveratrol hatásos aktivátora a sirtuinoknak, mely által stimulálható a PGC-1 α (peroxisome proliferator activated gamma coactivator 1 α) (Pallas és mtsai 2009), így a mitokondriális biogenezis is. Bár azt kimutatták, hogy a SIRT1 útvonalat nem közvetlen úton aktiválja, hanem az AMPK útvonalon keresztül, indirekt módon. Miután a SIRT1 deacetilálta a PGC1 α -t, az a mitokondriális metabolizmushoz fontos transzkripciós faktorokat indukál (Lagouge és mtsai 2006). Feltételezhetően a SIRT útvonalak aktiválása által növeli a sejtek oxidatív stresszel szembeni ellenállását is, ezáltal lassítva öregedésüket, és növelve élethosszukat (Howitz és mtsai 2003), (Valenzano és mtsai 2006), (Holme és Pervaiz 2007). A rezveratrol kiváló antioxidáns hatásának köszönhetően nagy szerepet játszhat az oxidatív szabadgyökök eliminálásában (Csiszar 2011, Ungvari és mtsai 2011). Minimális szintre csökkenti a DNS mutációk mennyiségét és gátolja a szabadgyökök oxidációját. Képes meggátolni a rákos sejteket tápláló erek kialakulását, így vágva el a tumort a tápanyag-utánpótlástól. Egyik különleges tulajdonsága, hogy képes a szervezetben az ösztrogén-receptorokhoz kapcsolódni, és ösztrogénként viselkedni.

Epidemiológiai megfigyelések alapján jól ismert, hogy a legtöbb fejlett országban az étrend magas zsír-, telített zsírsav, és koleszterintartalma, valamint a jelentős kalória bevitel összefüggésbe hozható a szívbetegségekből eredő halálozásokkal. Ugyanakkor Franciaország egyes területein ez az összefüggés nem mutatható ki. A szívbetegségekkel kapcsolatos halálozások aránya Franciaországban mintegy harmada,

mint más, azonos zsírbevitelű országokban, például az Egyesült Államokban vagy Angliában. E jelenség a francia paradoxon elnevezést kapta.

(Pourageaud és mtsai 1996) kimutatták, hogy a szőlőmagban található vegyületek (procianidin oligomerek), melyek az alkoholos erjedés során a vörösborba is átoldódnak, a NO (nitrogén-monoxid) úton vazorelaxációt indukáltak. A csökkent NO-szint patkányokban a csökkent zsírsav-oxidáció miatt megnövekedett szérumtriglicerid-szintet, és így hyperlipidaemiát eredményezett. Ugyanakkor a helyi NO- termelés koronáriás erekben gátolta a trombociták adhézióját és aggregációját, valamint gátolta a simaizomsejtek proliferációját (Corder és mtsai 2001). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a csökkent NO- termelés felelős lehet az atherosclerosis kialakulásáért. Ezért a vörösbor fogyasztása a fokozott NO- termelésen keresztül is befolyásolhatja a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulását (Li és mtsai 2012).

Számos humán kísérletet is végeztek már a rezveratrollal kapcsolatosan, melyek során a kutatóknak olyan kihívásokkal kellett szembenéznük, mint a rezveratrol nehézkes víz-oldékonysága, korlátolt kémiai stabilitása, valamint gyors metabolizmusa, melyek révén biológiai hatékonysága jelentősen megcsappan orális adagolás alkalmazása esetén (Vang és mtsai 2011).

1.3 ATP termelés, energetikai központok- mitokondriumok

A mitokondriumok az eukarióták energiatermelő sejtalkotói. Endoszimbionta eredetűek, vagyis egy korábban önálló baktérium bekebelezésével váltak az eukarióta sejt részévé. Éppen ezért saját, bakteriális jellegű örökítőanyaggal- mitokondriális dezoxiribonukleinsavval (mtDNS) rendelkeznek. Az emberi sejtben a mtDNS az egyetlen extrakromoszómális DNS, amely mind a nukleáris, mind a mitokondriális genom szabályozása alatt áll. A mitokondriális DNS sok tekintetben eltér a nukleáris DNS-től. Többek között nincsenek benne intronok, és a mitokondriális genom nem tartalmaz hisztonokat sem. Jellemző továbbá a „splicing” és az „exonukleáz aktivitás” hiánya is, így ezen hibajavító mechanizmus hiánya miatt a mtDNS mutációs rátája majdnem tízszerese a nukleáris DNS-ének. Ezáltal a mtDNS mutációi nagy számban felelnek az öröklődő betegségek kialakulásáért (Taylor és Turnbull 2005). A

mitokondriumoknak a sejtek energiatermelése mellett fontos szerepe van a szteroid bioszintézisben, a programozott sejthalálban, a szabadgyökök termelésében, és az öregedésben (Shoubridge és Molnár 2002).

Az oxigén felvételre és az energiatermelésre determinált mitokondriumok a szervezet minden szövet típusában megtalálhatók, igen nagy mennyiségben vannak jelen a vázizomban és a szívizomban.

1.3.1 A szívizom energiatermelése

A szívizom szövettanilag módosult simaizom sejtekből épül fel. Ezen sejtek összefüggő hálózatot, szinciciumot képeznek. Ebben a szövetben az aktin és a miozin speciális elrendezésben található. Működését tekintve a szívizom, a simaizom és a harántcsíkolt izom átmenetét képviseli. Metabolizmusa fokozott, számos mitokondrium található a szívizomban a jelentős energiaigény szükséglet kielégítésére.

A szív 60-80%-ban zsírsavak, 20-30%-ban szénhidrátok és ~10%-ban fehérjék, laktát, ketontestek égetéséből fedezi energiaszükségeit. A felhasznált szubsztrátok arányát a kínálat határozza meg. A zsírsavak oxidációja biztosítja a mitokondriális koenzim-A készlet nagyobb hányadát. Amíg a szív ATP termelésének legfőbb forrása a zsírsavak oxidációja, lebomlásuk során – azonos mennyiségű ATP termeléséhez – több oxigén használódik el, mint amennyi a glükóz lebomlása során szükséges (Nagoshi és mtsai 2011).

1.3.2 Mitokondriális diszfunkciók

A mitokondriumok működészavara kóros állapotokhoz vezethet, amely főként a nagy energiaigényű szöveteket érintő örökletes betegségeket eredményeznek. Ezek mellett számos neurodegeneratív betegség, agyvérzés, szívinfarktus és a rák kialakulásában játszik szerepet (Wei és Lee 2002). A mitokondriális kórképek a multisztémás betegségek csoportját alkotják, melyek elsősorban a központi idegrendszer és a vázizom betegségeit eredményezik, de több szerv-szervrendszer betegségét is okozhatják, azonban akár monoszimptomásan is jelentkezhetnek. A

legtöbb károsodás a nagy energiaigényű szervekben fordul elő, így a legtöbb „kárt” az agy, szív, máj, vázizom, vese, endokrin- és légzési rendszer sejtjeiben, működésében okozza. A klinikai tünetek specifikusak, de nagyon változatosak (DiMauro és Davidzon 2005). Ennek megfelelően számos formája ismert. Izomzat esetén például: izombántalom, izomgyengeség vagy az izom túlzott feszsége, izomsorvadás, neuropátia (Quadrilatero és mtsai 2011).

Szív esetén: szívizombántalom, szívbillentyű problémák, ingerületvezetési zavarok, vérnyomás zavarok (Kurdi és Booz 2011).

A mitokondriumok központi szerepet játszanak a sok esetben multifaktoriális, poligénes etiológiájú neurodegeneratív betegségek kialakulásában is, mint pl. Alzheimer kór, Parkinson kór. Ezen betegségekben jól ismertek a mitokondriumok morfológiai, biokémiai és molekuláris eltérései (Petrozzi és mtsai 2007). Valamennyi fenti kórképben a mitokondriumok diszfunkciójának következtében csökken az ATP termelés, a Ca^{2+} tárolás zavart szenved, a reaktív oxidatív szabadgyökök mennyisége megemelkedik (Beal 2005). A központi idegrendszer különösen érzékeny az oxidatív szabadgyökök károsító hatásával szemben, ugyanis a könnyen peroxidálható zsírsavak aránya rendkívül magas, fokozott oxigén fogyasztás, valamint az antioxidáns enzimek viszonylag alacsony szintje jellemzi (Nunomura és mtsai 2006).

A krónikusan magas szabadgyök szint következtében évek-évtizedek alatt bizonyos károsodások felgyülemlenek. Ennek többek között az öregedés folyamatában van szerepe: idősebb állatok vagy idős, egészséges emberek sejtjeiben kimutatható az antioxidáns rendszerek gyengülése, valamint a különféle, szabadgyökök és oxidánsok által kialakított fehérje-, zsírsav- és DNS-eltérések. Állatokban a szabadgyökök kiiktatása az élettartam meghosszabbításához vezet.

1.3.3 Az aerob kapacitás és a genetikailag determinált betegségek összefüggése

Az emberi izomsejtek több száz, illetve több ezer darab mitokondriumot is tartalmazhatnak. Mennyiségük a vörös-, oxidatív rostokban többszöröse a fehér-, dinamikus rostokéhoz képest. Ebből következik, hogy a lassú, vörös rostok, valamint a glikolitikus, gyors rostok aránya a szervezetben az egyik fő meghatározója a maximális oxigén felvevő képességnek, azaz az aerob kapacitásnak (Hildebrandt és mtsai 2003). Persze egyéb limitáló tényezői is vannak annak, hogy mennyi oxigén tud eljutni a működő izmokba, és hasznosulni ott. Fontos a felvevő rendszer (tüdő), a keringési rendszer (vér, szív, érrendszer) és a hasznosító rendszer (izom mitokondrium) megfelelő állapota, működése, és összehangoltsága. Mindezek mellett meghatározó tényező a kor és a genetika is (Timmons és mtsai 2010). Az aerob kapacitás genetikai meghatározottságához hozzá járul a genetikailag determinált izomrost arány, valamint számos egyéb, a „genomban kódolt” anatómiai, biokémiai, fiziológiai egyedi sajátosság is. Az utóbbi évek kutatásai azt bizonyítják, hogy az alacsony aerob kapacitással rendelkező állatok/emberek esetén nagyobb a kockázata számos betegség kialakulásának, összehasonlítva a magas aerob kapacitású egyedekével (Ferreira, 2003 és mtsai 2003). Lauren Koch és Steven Britton 1996-ban egy heterogén N:NIH patkány csoportból (n=186) futási képességeik alapján vett szelekció alapján kitenyésztett két genetikailag különböző csoportot, ahol az egyik csoport magas aerob kapacitással rendelkezik és nagy futási teljesítménnyel bír (High Running Capacity = HRC/HCR), míg a másik csoport alacsony aerob kapacitású és gyenge futási képességekkel rendelkezik (Low Running Capacity = LRC/LCR). E két csoporton végzett vizsgálatok alapján Britton munkacsoportja 2001-ben a *Science* magazinban írta le azt a megfigyelésüket, hogy az LRC állatok már a 6.generációban sokkal nagyobb testsúllyal rendelkeztek, mint a HRC csoportba tartozó társaik. Ezen felül, futási képességeiket tekintve is jelentősen – mintegy 171%-kal – alul maradtak a magas aerob kapacitású állatokkal szemben (Koch, 2001). Szintén ezzel a módszerrel kitenyésztett állatok 11.generációjával végzett kutatások alapján írták le, hogy azon szülők leszármazottai, akik csak keveset voltak képesek futni (LRC) szív-keringési és mitokondriális problémákat halmoztak fel, megjelentek rajtuk a metabolikus szindróma jelei, míg a

magas aerob kapacitással rendelkező állatok esetében (HRC) nem jelentkeztek ezek a tünetek (Schwarzer és mtsai 2010, Wisloff és mtsai 2005).

Továbbá kimutatták, hogy az LRC állatoknál nem megfelelő az inzulinérzékenység, centrális elhízás jellemezi őket, valamint kimutathatóak a dyslipidemia tünetei (Bowman, 2010) hajlamuk van a metabolikus szindróma kialakulására. Az 1. táblázatban összefoglaltam az LCR és HCR állatok főbb különbségeit.

1.táblázat

A különböző futási képességekkel bíró állatok genetikailag determinált jellemzői

<u>LCR állatok:</u>	<u>HCR állatok:</u>
<i>Nagyobb testsúly</i>	<i>Normál/Alacsony testzsír ill. testsúly</i>
<i>Csökkent futási távolság</i>	<i>Kiemelkedő futási képesség</i>
<i>Csökkent aerob kapacitás</i>	<i>Kiemelkedő aerob kapacitás</i>
<i>Metabolikus-szindróma jellemzői</i>	<i>Jó metabolikus funkciók</i>
<i>Metabolikus- és cardiovascularis-diszfunkció</i>	<i>Megfelelő inzulinérzékenység</i>
<i>Inzulin rezisztencia</i>	<i>Magas oxidatív enzim aktivitási szint</i>

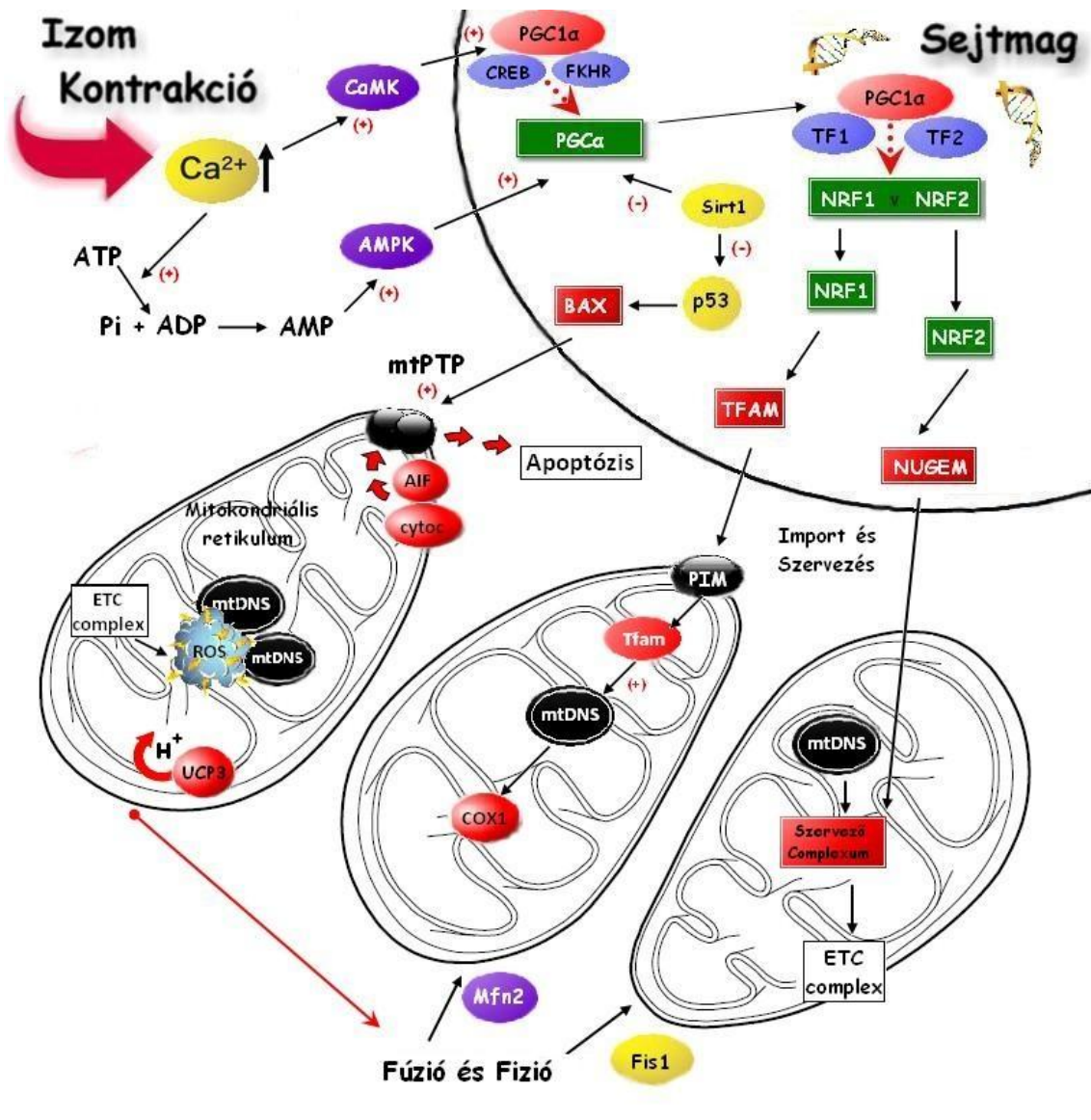
1.4 Mitokondriális biogenezis izomszövetben

Mivel az aerob kapacitás legfőbb meghatározója az izomzatban lévő mitokondriumok mennyisége, minősége és működése, fontos megvizsgálni a különböző genetikával rendelkező egyedek mitokondriális funkcióit, sajátosságait, illetve különbözőségeit. Valamint feltérképezni mitokondriális biogenezisük alapvető eltéréseit, és a továbbiakban választ keresni arra, hogyan befolyásolhatóak pozitívan ezek a folyamatok.

Az emlősök izomzatában zajló mitokondriális biogenezis teljes fiziológiás kontroll alatt áll. Több tényező hatására is beindulhat a folyamat, így például edzés hatás következtében, elektromos izom stimuláció hatására vagy krónikus oxigén hiányos állapotot követően, azaz amikor megnő az izom ATP igénye (Booth és mtsai 1991, Williams és mtsai 1987). Ilyen esetben megnő a szövetben az AMP/ATP arány, ami aktiválja az AMPK-t, és ez a továbbiakban - feltételezhetően a SIRT1 deacetiláló

hatását kiváltva (Rodgers és mtsai 2008), - képes aktiválni a PGC1 α -t (Nemoto és mtsai 2005). A SIRT1 és az AMPK kiemelt szabályozói a PGC1 α -nak (Scarpulla 2010), továbbá a metabolikus stressz által indukált AMPK közvetlenül hat a NAD⁺ szintre, mely befolyásolja a SIRT1 aktivitást (Jeninga és mtsai 2010). Ezen megállapítás nyomán további kutatások rámutattak arra, hogy a szervezet krónikus „stresszre” (fizikai aktivitás, éhezés) adott adaptációs válaszának elsődleges beindítója és fő irányítója az AMPK (Canto és mtsai 2010). Aktivitásának hiányában nem működik megfelelően a SIRT1 aktivációs útvonal sem.

Köztudott, hogy éhezés során, illetve edzés után a szervezet a vázizomban átkapcsolja a metabolikus utakat, és a szénhidrát felhasználást leállítva a lipid felhasználás kerül előtérbe, mint elsődleges energiaforrás. Az izomsejtek által érzékelt krónikus glükóz hiány információja a szervezetben transzkripciós és metabolikus adaptációhoz vezet. A szervezetben megnövekedett AMP/ATP arány aktiválja az AMPK-t, ami katabolikus folyamatok beindításával megkezdi az ATP szintézist. Ezzel egy időben leállítja az olyan ATP igényes folyamatokat, mint a zsír-, a fehérje-, vagy a koleszterin szintézis (Hardie 2007). Aktivitása továbbá a nikotinamid foszforiboziltranszferáz (NAMPT) enzim indukálásával emeli a sejten belüli NAD⁺ szintet, ami befolyásolja a SIRT1 aktivitást (Canto és mtsai 2009, Costford és mtsai 2009, Fulco és mtsai 2008) és a hozzá kapcsolódó útvonalakat. A SIRT1 olyan transzkripciós faktorokat és ko-faktorokat aktivál deacetiláz működésével, mint a PGC1 α , vagy a Forkhead boks-1 (FOXO1), melyekkel szabályozza a sejtek energiafelhasználását, valamint segíti azok stressz-tűrő képességét, és fokozza a mitokondriális biogenezist.



1.ábra

A vázizom mitokondriális biogenezise

Canto és munkatársai nem csak az éhezés, valamint az edzéshatás által indukált AMPK-SIRT1 aktivitás kapcsolatát vizsgálta, hanem a rezveratrol adagolás hatására bekövetkező SIRT1 aktiválódás folyamatát is. 2009-ben közölt cikkében leírta, hogy a rezveratrol nem közvetlen úton aktiválja a SIRT1-et, hanem az AMPK útvonalon keresztül. Továbbá kifejtette, hogy az AMPK foszforilációja nélkülözhetetlen a PGC1 α SIRT1 általi deacetylálásához (Canto és mtsai 2009).

Sok irodalom utal a PGC1 α nélkülözhetetlen szerepére a metabolikus gének aktiválásában, illetve a mitokondriális biogenezisben (Scarapulla 2002, Knutti és mtsai 2001). Ko-aktivátorként számos DNS-hez kapcsolt transzkripciós faktor működését segíti. Többek között az NRF-ekét (nukleáris respiratórikus faktorok), melyek a légzési-lánc elemeinek nukleuszban kódolt génjeinek átírását szabályozzák, (Kelly és mtsai 2004) vagy az mtTFA-ét (mitokondriális transzkripciós faktor A), ami a mtDNS replikációjáért és transzkripciójáért felelős (Garnier 2005).

A transzkripciós folyamatok beindításáért kalcium-függő jelzőrendszer is hozzájárul a vázizomzat estében (Ojuka és mtsai 2002).

Említést érdemel továbbá, hogy a mitokondriális biogenezishez szükséges átírás termogenikus szabályozás révén is indukálható (Puigserver 2005).

A mitokondriális biogenezis szempontjából fontos a nukleáris-, illetve mitokondriális gének megfelelően koordinált expressziója. A mitokondrium saját DNS-sel rendelkezik, mely az oxidatív foszforilációhoz (OXPHOS) kapcsolódó rendszer 13 alegységét kódolja. A többi alegység, valamint az egyéb mitokondriális fehérjék a nukleuszban kódolódnak.

Összességében elmondható, hogy a rendszeres fizikai aktivitás által generált oxidatív stressz, redox egyensúly, és egyéb folyamatok növelik az AMPK- (Terada és mtsai 2002), illetve SIRT1 aktivitást (Rasbach és mtsai 2010, Koltai és mtsai 2010), melyek stimulálják a PGC1 α -t, és ez által a mitokondriális biogenezist izomszövetben. Ennél a résznél kiegészítés gyanánt meg kell említeni FOXO1 transzkripciós faktor jelentőségét a mitokondriális biogenezis „negatív szabályozójaként”.

1.4.1 Forkhead bokszo 01(Foxo1) transzkripciós faktor jelentősége

A FOXO1 transzkripciós faktor számos folyamat koordinátora. Irányítja az izom-növekedést és metabolizmust (Birkenkamp 2003) (Barthel és mtsai 2001), valamint szabályozza az izomrost differenciálódást. Habár ez utóbbi folyamat, még igen kezdetlegesen feltérképezett terület azt már megállapították, hogy a FOXO1 segíti a lassú/gyors izomrostok arányának gyors rostok irányába történő eltolódását, a kalcineurin útvonal gátlása révén. Ez által csökkenti az izom oxidatív metabolizmusát. Ily módon tekinthető a PGC1 α „antagonistájának”, hiszen annak fő jellemzője, hogy fokozza a mitokondriális biogenezishez kapcsolódó faktorok előállítását és aktivitását, így oxidatív irányba tolva a metabolikus folyamatokat, és segítve a lassú rost irányba való eltolódást (Lin és mtsai 2002). Vizsgálták a rezveratrol hatását is a FOXO1-re, aminek eredménye nem volt meglepő, a rezveratrol csökkentette a FOXO1 expresszióját (Lagouge és mtsai 2006). Ez a folyamat érthető, ha figyelembe vesszük, hogy a rezveratrol hatására aktiválódik az AMPK útvonal, mely a SIRT1-en és a PGC1 α -án keresztül indukál fokozott oxidatív aktivitást, és adaptációs következményként segíti az izomrost arány lassú rostok irányába történő eltolódását (Wu 1999).

1.4.2 Mitokondriális biogenezis szívizom szövetben (fiziológiás- és patológiás változások)

A szívizom folyamatosan dolgozik, ezért energia igénye folyamatosan nagyon magas. Ezt az igényt csak fokozza a testedzés vagy egyéb, a szervezet számára extra megterhelésnek számító folyamat, – ám hasonló módon többlet ATP-t kíván bizonyos patológiás elváltozások fennállása is. Szív esetében kifejezetten érzékeny és kiegyensúlyozott dinamikus mitokondriális biogenezis szükséges a megfelelő működés megtartása érdekében (Rimbaud és mtsai 2009). Az köztudott, hogy mind edzés hatás, mind patológiás elváltozások következtében megnő a szív-szövetállománya, hipertrófia mutatható ki. Arról viszont ellentmondásosak az irodalmi adatok, hogy a kialakuló hipertrófia hátterében milyen molekuláris folyamatok állnak. Bizonyos kísérletekben kimutatták, hogy edzés hatás következtében megnő a kardiális enzimek expressziója és

aktivitása (Coleman és mtsai 1988, Stuewe és mtsai 2000). Mások viszont nem találtak változást az OXPHOS enzimek aktivitásában, sem a mitokondriák számában, eloszlásában, vagy biogenezisében (Kayar és mtsai 1986, Kemi és mtsai 2007, Murakami és mtsai 1995). Voltak azonban olyan szerzők is, akik a PGC1 α és az mtTFA enzimek emelkedett szintjét mutatták ki szívizom szövetben edzés hatására, de nem találtak értékelhető változást a mitokondriális enzimek aktivitásában, sem az oxidatív kapacitásban (Matilb és mtsai 1983, Watson és mtsai 2007).

A sok ellentmondásos irodalmi adat ellenére úgy tűnik, hogy a szív mitokondriális biogenezise követi a szervezet megnövekedett szükségleteit.

A PGC1 α kulcs szerepet játszik a szív anyagcseréjében, és funkciójának fent tartásában. Ennek kapcsán több kutatás foglalkozott ennek a faktornak a túl- illetve alul működésével, és annak hatásával szívizom esetében. Irodalmi adatok alapján a PGC1 α emelkedett expressziója mutatható ki szívelégtelenség esetén (Finck és Kelly 2007). Azoknál az állatoknál, ahol ennek a ko-faktornak a túlzott termelődése állt fent, kontrolálatlan mitokondriális proliferáció, a szarkomer struktúra felbomlása, végül kardiomiopátia alakult ki (Lehman és mtsai 2000). Ezzel szemben PGC1 α „knock out” egereknél a kardiális diszfunkció előfordulása csökkent (Arany és mtsai 2005). Ez esetben a mitokondriák száma nem változott, bár a mitokondriális gén-expresszió-, az oxidatív kapacitás- és a zsírsav oxidáció szintje csökkent (Lehman és mtsai 2008, Leone és mtsai 2005). Ezen adatokból látható, hogy szívizom estében a PGC1 α szigorú szabályozottsága elengedhetetlen a megfelelő szív funkciók fent tartásához, mennyiségének ideális tartománya sokkal szűkebb tartományban mozog, mint vázizom esetében.

Azok a vizsgálatok, melyek, a két eltérő hatásra bekövetkező hipertrófia, és kardiális-funkció differencia közötti különbség okát keresték leírták, hogy míg edzés hatására a szív továbbra is a zsírsav-oxidációt használja fő energia forrásként, addig patológias hipertrófia esetén ez a forrás a glükóz felhasználás irányába tolódik (Lehman 2002). Szívelégtelenség esetén tehát a fokozott mitokondriális biogenezis megromlott metabolikus funkciókkal társul, ahol csökken a zsírsav-oxidációért felelős PPAR α enzim szintje a szövetben, és ez által a zsírsav felhasználás mértéke is (Sack és Kelly 1998, Sebastiani és mtsai 2007).

A fokozott energia felhasználás miatt szívizom esetében különösen fontos a hibás mitokondriumok mielőbbi eltávolítása - mitophágia révén (lásd. később) - és azok pótlása. Számos irodalom szerint ez az eltávolítási folyamat az egyik fő kiváltója a mitokondriális biogenezis beindításának myocardiumban (Gottlieb és mtsai 2009).

A vázizom és a szívizom mitokondriális biogenezeise közötti különbségekkel több kutatás foglalkozott már. Ling Li 2011-ben publikált cikkében vizsgálta a krónikus edzés hatására bekövetkező mitokondriális biogenezist és PGC1- α deacetilációt gastrocnemius izomban, illetve szívizomban (Li és mtsai 2011). Vizsgálatai igazolták az előzőekben, a vázizom kapcsán már említett változásokat, ezzel szemben szívizom esetében nem volt kimutatható fokozott mitokondriális biogenezis 12 hetes futószalagos edzés hatására (Rimbaud és mtsai 2009). Összehasonlítva a vázizomnál mért változásokkal (fokozott AMPK aktiváció, SIRT1 indukció, és PGC1 α deacetiláció), szívizomban egyedül az AMPK aktivitás növekedése volt megfigyelhető, valamint morfológiai változásként enyhe hipertrófia jelentkezett. A különbség oka Li magyarázata szerint, hogy szívizomban nem jött létre a SIRT1 függő PGC1 α deacetiláció, ezáltal fokozott mitokondriális biogenezis sem.

1.5 Mitokondriális-minőség kontroll

Az energia-termelés központjának számító mitokondriumok létfontosságú működésekhöz biztosítják a szükséges ATP igényt a szervezetben, mindamellert viszont káros szabadgyökök is termelődnek a folyamat során, melyek kontrolálatlan felszabadulása komoly problémákat okozhat a szervezetben.

Ennek megelőzése, illetve javítása érdekében a mitokondriumok megfelelő funkciójáról különböző minőségi kontroll folyamatok gondoskodnak. Ezek a folyamatok több szinten valósulnak meg, és protektív hatással bírnak a szabadgyökök által generált károsodásokkal szemben.

1.5.1 A szabadgyök fogó antioxidáns rendszer (a minőség kontroll első szintje)

A légzési láncból „kiszökő” reaktív szabadgyökökkel szembeni védekezésre a szervezetnek van egy genetikailag kódolt antioxidáns rendszere, mely közvetlen, hatékony segítséget biztosít a kártékony elemek gyors eliminálására.

A respiratórikus láncból elsőként kilépő szabadgyök a szuperoxid, minek átalakítását két féle szuperoxid-dizmutáz (SOD) végzi (McCord és Fridovich 1968). Ezek a következők: a mitokondriumban található szuperoxid-dizmutáz, a mangán tartalmú MnSOD, valamint a sejtplazmában található réz-cink tartalmú CuZnSOD. Ezen enzimek a keletkezett szuperoxidot hidrogén-peroxiddá (H₂O₂) alakítják, amit a továbbiakban a kataláz (CAT), illetve a glutation-peroxidáz (GPX) nevű enzimek alakítanak át vízzé. Ily módon semlegesíti a szervezet saját enzimatikus antioxidáns rendszere a mitokondriumban képződött reaktív szabadgyököket. Ha az antioxidáns rendszer működése nem megfelelő, akkor a hidrogén-peroxid semlegesítése nem minden esetben valósul meg, ilyenkor keletkezik a legagresszívebb szabadgyök, a hidroxil-gyök (OH⁻), mely bármilyen sejtalkotóban azonnal képes kárt tenni.

A szervezet saját, belső védőmechanizmusát segíthetik a külső – táplálkozással bevitt – antioxidánsok (E-, C- vitamin, karotinoidok).

Természetesen a legjobban működő semlegesítő rendszerek mellett is maradnak károsító gyökök, melyek szerkezeti-, illetve funkcióbeli változásokat hoznak létre a különböző fehérjékben, zsírokban, vagy akár a DNS-ben.

1.5.2 Javítás és újrahaznosítás (a minőség kontroll második szintje)

Ha a károsodás már bekövetkezett, de még nem hatalmasodott el, akkor lépnek életbe a molekuláris javító folyamatok, hogy visszaállítsák a sérült molekulák funkcióját. Legfontosabb a mtDNS károsodásainak helyreállítása, hiszen ezen sérülések kihatnak számos, a mitokondriális folyamatokat meghatározó fehérjék szintézisére. Erre a feladatra a mitokondria saját javító folyamatai állnak rendelkezésre, mint például a „bázis kivágó mechanizmus” (Gredilla és mtsai 2010, Croteau és mtsai 2010).

A fehérjék sérülése estében csak kevés esetben van lehetőség korrigálásra, ez esetben inkább a fehérjék proteolitikus eltávolítása és újrahasznosítása jelenthet megoldást. A mitokondriális fehérjék „turn over” folyamataiban számos proteáz, chaperon és javító enzim vesz részt. Közülük is a legfontosabb és a leghatékonyabb a mitokondrium mátrixában található Lon proteáz (LonP).

A LonP egy ATP-dependens proteáz, mely kontrolálja a mtDNS replikációját és gén expresszióját, valamint segít eltávolítani a sérült-, oxidált fehérjéket a mitokondriumból (Bota és Davies 2001, Luciakova és mtsai 1999, Ngo és Davies 2009, Rottgers és mtsai 2002).

A cytoszolban ennek a feladatnak az ellátására szolgál a 20S proteaszóm komplex, valamint a lizoszómák. Egy 2009-es vizsgálat arra kereste a választ, hogy fokozott stressz-hatásra (éhezés, hő, H₂O₂), amelyek jelentős fehérje degradációt okozhatnak, vajon fokozódik-e LonP termelődése, más szóval nevezhető-e stressz-proteinnek? (Ngo és Davies 2009) Vizsgálódásuk arra az eredményre vezetett, hogy mindhárom stressz-forrás következtében poszt-transzkripciós LonP indukció alakul ki, ami egy gyors adaptív válasz a toxikus stressz-tényezők káros hatásainak kiküszöbölése végett. Tehát valóban stressz-protein.

2010-ben, egy japán szerzők által publikált cikkben másik fontos szerepét próbálták feltárni. A Lon proteáz, az mtTFA és a mtDNS hármass kapcsolatát vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a LonP oly módon szabályozza a mitokondriális transzkripciót, hogy stabilizálja a TFAM:mtDNS arányt, a TFAM szelektív degradációja révén (Matsushima és mtsai 2010).

Megállapították, hogy a TFAM és mtDNS szintek között kölcsönös összefüggés van. Az egyik csökkenése a másik alulműködését eredményezi, és ugyanígy fordítva. A Lon proteáz over expressziója a mtTFA szintet jelentősen csökkenti, ami a mtDNS csökkenéséhez vezet. Ha csökken a LonP szintje, a TFAM protein szint emelkedik, ami fokozott mtDNS szintézist indukál. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a TFAM turn over-e – és ez által a mitokondriális DNS átírása - erősen függ a LonP megfelelő működésétől.

A molekuláris javító mechanizmusokon túl a sejt szintű folyamatokat is meg kell említeni a mitokondriális minőség kontroll tárgyalásakor.

1.5.3 Mitokondriális fúzió és fizió (a minőség kontroll harmadik szintje)

A mitokondriális fúzió és fizió további két fontos mechanizmus a mitokondriális hálózat minőségének, illetve állandóságának fenntartása szempontjából (Westermann 2010), ezáltal biztosítva a mitokondriális funkciók megfelelő szinten tartását (Otera és Mihara 2011). Egy normális sejtben a mitokondriumok állandóan osztódnak és egyesülnek. A fúziót emlősökben alapvetően három különböző GTP-áz (Guanozine trifoszfátáz) szabályozza. Egy dinamin-rokon fehérje - amely a belső membránon helyezkedik el -, és két úgynevezett mitofuzin (Mfn1 és Mfn2), amelyek a külső membránon találhatóak. Ezek hiányában a mitokondriumok tönkremennek, mert a fúzió az osztódást kompenzáló folyamat. Ha nincs egyesülés, az osztódásokkal keletkező utód-mitokondriumok egyre kisebbek és kisebbek lesznek, és ez együtt jár a mtDNS mennyiségének jelentős csökkenésével (Chan 2007).

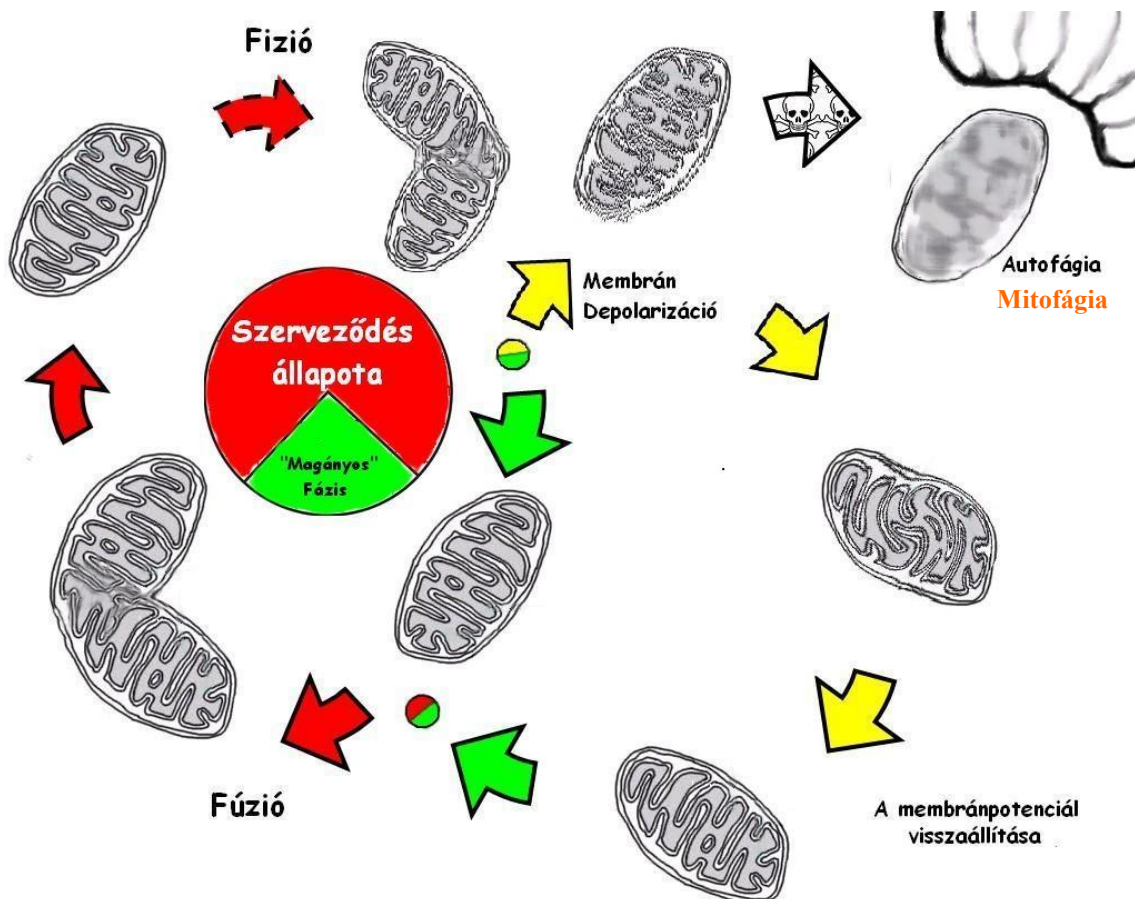
Azt, hogy a mitokondriális-dinámia melyik irányba mozdul, mindig az aktuális „stressz-állapot” határozza meg. A tartós, magas szintű stressz a fokozott fiziót segíti elő, míg az alacsony stressz szint a fúziós folyamatoknak kedvez (van der Blik 2009).

Egérmodelleken végzett kísérletek azt mutatták, hogy az egerekben, amelyek vázizmaiban nem termelődött egyik mitofuzin sem, letális miopátia alakult ki. A tünetek hátterében a csökkent mtDNS mennyiség, és a rengeteg felhalmozódott pontmutáció és deléció állt. Ráadásul, ha olyan háttérből ütötték ki az Mfn1-et, ahol a mitokondriális DNS-polimeráz exonukleáz alegysége hiányzott – tehát a mitokondriumokban nem volt DNS-hibajavítás, sem pedig fúzió -, ez egyedek újszülött korban elpusztultak. Ez arra utal, hogy a fúzió kompenzálhatja a mtDNS mutációkat, és ez állhat a hátterében a sejtek nagy toleranciájának. Az egyesüléssel ugyanis egy mitokondriumba juthat vad típusú és hibás kromoszóma is, ami csökkenti a valószínűségét a hibás fenotípus megjelenésének.

Szívizom esetében kevesebb információ áll rendelkezésre a mitokondriális-dinámiával kapcsolatosan, eddigi cikkek alapján feltételezhető, hogy a fokozott fizió szerepet játszik a myocardialis ischémia/reperfúzió sérüléseinek folyamataiban (Ong és mtsai 2010).

1.5.4 Mitofágia (a minőség kontroll negyedik szintje)

Azok a hibás mitokondriumok, amelyek már funkciójukat veszítették mitofágia révén kerülnek eliminálásra. Ennek a folyamatnak a során (mely az autofágia egy speciális változata) a mitokondriumok alkotóelemeikre esnek szét, és részeik a további metabolikus folyamatok során felhasználásra kerülnek.



2. ábra

A mitokondriális minőség-kontroll vázlatos rajza

A nem megfelelően működő mitofágiás folyamatok kapcsán számos betegség alakulhat ki, mint például a Parkinson kór (Youle és Narendra 2011).

Az utóbbi években egyre több bizonyíték mutat rá arra, hogy a mitokondriális fúzió/fúzió és a mitofágiás folyamatok között szoros összefüggés van (Tanaka és mtsai 2010, Cohen és mtsai 2008).

Feltételezések szerint a sérült mitokondrium osztódása fúziós folyamatok révén, valamint az ezt követő gátolt fúzió az előfeltétele a mitofágia bekövetkezésének. Miután a rossz mitokondriumok így eliminálódnak, az egészségesek újra fuzionálnak, valamint fokozott biogenezis révén új mitokondriumok születnek.

Szívizom estén kimutatták, hogy a mitofágiának fontos szerepe van a kardioprotektív folyamatokban (Gurusamy és mtsai 2009, Brady és mtsai 2006, Huang és mtsai 2010).

Az ischémiás stressz által indukált mitofágia eltávolítja a rosszul működő mitokondriumokat, melyek helyére fokozott biogenezis révén, új, jó minőségű mitokondriumok kerülnek.

Ez által a mitofágia szerepe jelentős lehet az élettartam növelés szempontjából is.

2. Célkitűzések:

A doktori értekezésemben tárgyalt vizsgálatok célja annak feltérképezése volt, hogy a rendszeres fizikai aktivitással, valamint rezveratrol adagolásával hogyan befolyásolható a mitokondriális biogenezis, valamint az aerob teljesítmény különböző genetikai háttérrel rendelkező állatokon (Russel és mtsai 2003).

Vizsgálatunkban arra kerestünk választ, hogy ezen életmódbeli változások, hogyan befolyásolják a mitokondriális biogenezist vázizom-, illetve szívizom szövet esetén. Továbbá hogy ezen változások kapcsán hogyan befolyásolható az LCR állatok kedvezőtlen genetikai hátteréből adódó, különböző betegségek kialakulására való hajlama, és a HCR állatok aerob teljesítménye.

Feltételeztük, hogy a testedzés és a rezveratrol adagolás kedvezően befolyásolja az aerob teljesítményt. Elképzeléseink szerint e két kezelés aktiválja a SIRT1 enzimet, mely a PGC1 α ko-aktivátoron keresztül befolyásolja a mitokondriális biogenezist. Úgy gondoltuk, hogy mind a rezveratrol adagolás, mind a testedzés kedvezően hat az LCR állatokra, és csökkenti a genetikai különbségekből adódó élettani eltéréseket az LCR és HCR állatok között.

Feltételezéseinket vázizom esetében négy, szívizom esetén három pontban összefoglalva fogalmaztam meg.

2.1 Hipotézisek vázizom esetén:

1. A rendszeres fizikai aktivitás és a rezveratrol adagolás növeli az állatok futási teljesítményét és aerob kapacitását.

2. A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására fokozódik a mitokondriális biogenezis izomszövetben (a PGC1 α - SIRT1 útvonal aktiválása révén).

3. A kezelések kedvezően befolyásolják az izomszövet mitokondriális minőségkontrollját biztosító enzimek működését.

4. A testedzés és a rezveratrol kezelés képes kompenzálni/helyreállítani az LCR állatok genetikai deficitjéből adódó mitokondriális problémákat, ez által javítják életminőségüket, csökkenti betegségre-való hajlamukat.

2.2 Hipotézisek szívizom esetén:

1. A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására javuló mitokondriális funkciók várhatóak az “inaktív” genetikával bíró egyedek szívizomában.

2. Edzéshatásra, és rezveratrol adagolásra fokozott AMPK és PGC1 α aktivitás várható szívizom esetén is mely, egyéb transzkripciós faktorok átírását serkentve fokozza a szív mitokondriális biogenezisét.

3. A kezelések javítják, illetve kompenzálják a genetikai hátrányokból adódó cardiovascularis betegségek kialakulásának kockázatát.

3. Anyagok és módszerek:

3.1 Állatok és edzés protokoll

186 fős homogén alap populációból származó, futási képességeik alapján genetikailag szelektált hím patkánycsoport 22. generációjával dolgoztunk (n=48). A mesterséges szelektálás protokollját Koch és Britton írta le és tőlük kaptuk az állatokat is (Koch és Britton 2001). Az így kitenyésztett inaktív (LCR) és aktív (HCR) genetikával rendelkező csoportokból a vizsgálat kezdetén további 4-4 csoportot különítettünk el, a kezelés sajátosságai alapján, következőképpen: 1. Kontroll alacsony futó kapacitású (CL), 2. Edzett alacsony futó kapacitású (TrL), 3. Kontroll rezveratrol táplált alacsony futó kapacitású (RsvL), 4. Edzett rezveratrol táplált alacsony futó kapacitású (TrRsvL), 5. Kontroll magas futó kapacitású (CH), 6. Edzett magas futó kapacitású (TrH), 7. Kontroll rezveratrol táplált magas futó kapacitású (RsvH), 8. Edzett rezveratrol táplált magas futó kapacitású (TrRsvH).

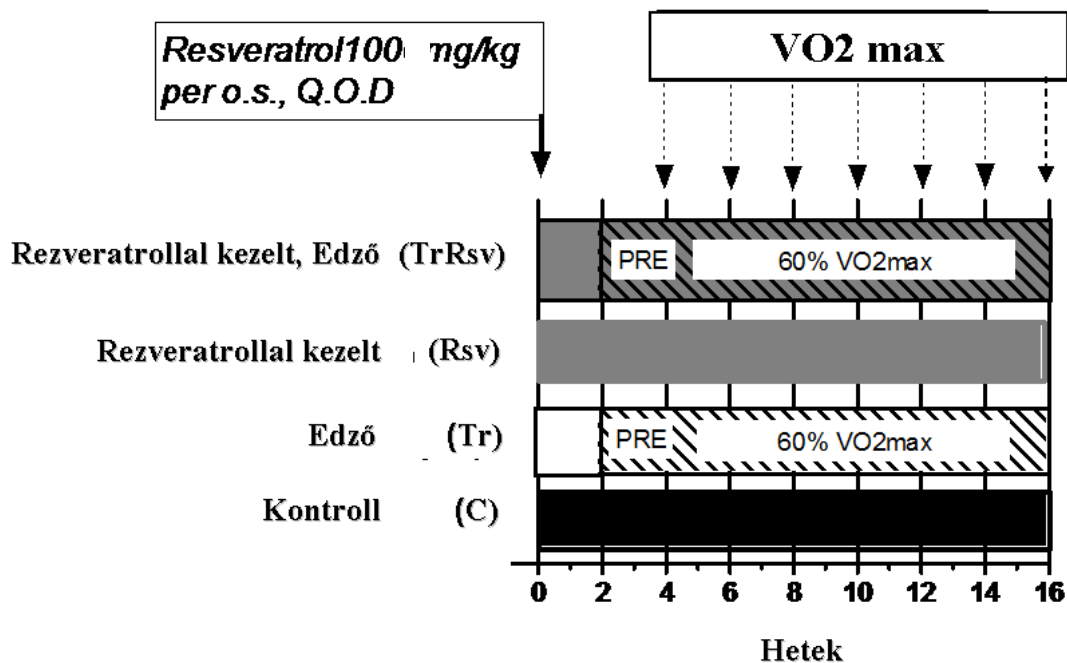
Az edzésben résztvevő állatok a második héttől kezdve egy két hetes szoktatási időszakban adaptálódtak az edzés emelkedő intenzitásához. A két hét leteltével megmértük az állatok aktuális maximális aerob kapacitását. A maximális oxigén felvétel (VO₂max.) mérése egy speciálisan patkányok részére kifejlesztett, zárt rendszerű spiroergométerrel történt. Az állat futószalagra való helyezését követően, 10 perces megnyugvási idő után mért VO₂ értéket tekintettük nyugalmi VO₂ minimumnak. A 10. perctől indítottuk a futószalagot 10m/perc-es sebességről, mely értéket 3 percenként 5m/perccel emeltük, egészen az állat kifulladásáig. Az állat relatív aerob kapacitását a kifulladás előtti idő pillanatban mért maximális VO₂ értékkel azonosítottuk. A negyedik héten mért maximális aerob kapacitás eredményük alapján határoztuk meg a további 12 hetes edzés program intenzitását. Az edző állatok 12 héten keresztül, heti 5 napot, napi 1 órát futottak a maximális aerob kapacitásuk 60%-án (1. ábra).

3.2 Kapaszkodási teszt

Az állatok mellső lábainak erőfejlődését mérő tesztet hetente végeztük mindig azonos napon, az edzést megelőző reggeli órákban. A teszthez egy megközelítőleg 40cm magasságú „kapaszkodó-állványt” használtunk, ami alá szivacsos felületű platformot helyeztünk, az állatok biztonságosabb leérkezése érdekében. A mérés során úgy helyeztük a patkányokat az állványra, hogy csak két mellső lábukkal tarthatták magukat az állvány középső, vízszintes rúdján. Kapaszkodási idejüket stopperórával mértük, majd rögzítettük.

3.3 Rezveratrol adagolás

A rezveratrol kezelésre sorolt állatoknak megérkezésüktől kezdve minden másnap szájon át adagoltuk az 100 mg/testtömeg kg-ra számolt rezveratrol mennyiséget egészen a 4 hónapos kísérlet végéig.



3.ábra

A vizsgálatban résztvevő állatok kezelése: rezveratrol adagolás, 12 hetes edzés program

Hetente ellenőriztük az állatok testsúlyváltozását, valamint vizsgáltuk motoros-képességeiket kapaszkodási-, illetve egyensúlyozási tesztekkel.

Az edzés protokoll befejezését követően az állatokat dekapitáltuk, majd a gastrocnemius izmot és a szívet eltávolítottuk az állatokból. A kivett mintákat azonnal folyékony nitrogénbe tettük, majd a feldolgozás megkezdéséig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

3.4 Western blot analízis

A fehérjék mennyiségének meghatározására Western Blot analízist használtam. A méréshez szükséges mintákat NP40-es lízis-pufferben homogenizáltam, majd az összfehérje koncentráció meghatározására a Bradford-módszert alkalmaztam, a Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad #600-005) használatával.

8-12% v/v polyacrylamide SDS-PAGE gélen elektroforézissel futattam megközelítőleg 50ug proteint, amit a továbbiakban PVDF membránra elektrotranszferáltam. Ezt követően blokkoltam a membránt 5%-os tejporos 1xTBST-ben, vagy 1%-os BSA-s 1xTBST-ben, majd „over night” inkubáltam $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on az elsődleges antitesttel. Ezt követően 3x10 percet mostam a membránt 1xTBST-vel, majd HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel (nyúl/kecske) inkubáltam, egy órán keresztül, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az újabb 3x10 perces mosást követően a membránt 5 percig reagens szubsztráttal kezeltem. A fehérje koncentrációt szemléltető denzitási jeleket röntgen filmen hívtam elő. A band-eket ImageJ szoftver használatával kvantifikáltam, és tubulin housekeeping fehérjéhez normalizáltam.

2.táblázat A kísérlet során használt elsődleges antitestek

	Antitest	Katalógus szám	Koncentráció	Molekula súly
NAMPT	Abcam PBEF	ab37299	1:1000	55 kDa
Acetylated-Lysine	Cell Sig. Ac-Lys.	#9441	1:1000	
SIRT1	Upstate Anti-Sir2	#07-131	1:1000	~ 110 kDa
AMPK α	Cell Sig. AMPK α	#2532	1:1000	62 kDa
pAMPK	Cell Sig. pAMPK α (Thr172)	#2535	1:1000	62 kDa
PGC1 α	Santa Cruz PGC-1 (H-300)	sc-13067	1:1000	90 kDa
NRF1	Santa Cruz NRF1 (H-300)	sc-33771	1:500	68 kDa
TFAM	Santa Cruz mtTFA (E-16)	sc-30963	1:500	25 kDa
SIRT4	Abcam SIRT4	ab10140	1: 1000	~40 kDa
FOXO1	Cell Sig. Foxo01 (L27)	#9454	1:1000	78-82 kDa
PNPase	Santa Cruz PNPase (H-124)	sc-99006	1:1000	~90 kDa
Fis1	Santa Cruz Fis1 (FL-152)	sc-98900	1:500	17 kDa
Mfn1	Santa Cruz Mfn1 (H65)	sc-50330	1:500	86 kDa
LonP	Saját készítésű *		1:500	108 kDa
CLPB/HSP78	Abcam CLPB	ab87253	1:1000	78 kDa
PSMA6	Cell Sig. PSMA6	#2459	1:1000	26 kDa

OGG1	Abcam OGG1	ab204	1:500	39 kDa
α -Tubulin	Sigma anti- α -Tubulin	T 6199	1:1000	~50 kDa
SDHA	Santa Cruz SDH	sc-98253	1:1000	~60 kDa
LDH	Santa Cruz LDH (H-160)	sc-33781	1:1000	35 kDa
Ubiquitin	Calb. Anti-Ubiquitin	662099	1:1000	
Cytochrome C	Santa Cruz Cyto-C (H-104)	sc-7159	1:750	15 kDa

3.5 Szabadgyök koncentráció meghatározása

A teljes szabadgyök mennyiség meghatározására egy módosított festési módszert használtam, ahol festékanyagként dichloridihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) -ot használtam. (Radák és mtsa.2004). A mérésben használt H2DCFDA festékanyagot (Invitrogen-Molecular Probes #D399) ethanolban feloldva 12,5 mM-os koncentrációra hígítva -80°C-on, sötétben tároltam a használatig. A mérés kezdetén kálium-foszfát pufferrel hígítottam 125uM-os koncentrációra a tárolt törzsoldatot. A fluoreszcens reakcióban 96 lyukú, fekete plate-re vittem fel 152ul/lyuk kálium foszfát puffert (pH 7.4), melyhez 8ul hígított izomszövet homogenátot, és 40ul 125uM-os H2DCFDA festéket adtam. Így a 200ul ösztérfogot végső koncentrációja 25uM-os lett. A fluoreszcens intenzitásváltozást 30 percen keresztül 5 percenként regisztráltam 485 nm-es excitációs-, valamint 538 nm-es emissziós hullámhossz használatával (Fluoroskan Ascent FL).

3.6 SIRT1 aktivitás mérés

A nukleáris extraktum SIRT1 deacetyláz aktivitásának mérésére Cyclex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kitet (Cyclex, CY-1151) használtam a mellékelt protokoll alapján. 10ul gastrocnemius izom extraktumot 40ul reakció mix /50mM Tris-HCl (pH 8.8), 4mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 0,25mAU/ml Lysyl endpeptidase, 1uM Trichostatin A, 20uM Fluoro- Substrate peptid, 200uM NAD⁺/ hozzáadásával, mikroplaten összepipettáztam. Ezt követően a mintákat 10 percig, szobahőn inkubáltam. A fluoreszcens intenzitás-változást 10 percenként mértem két órán keresztül 355nm excitációs-, illetve 460nm emissziós hullámhosszon. Az így kapott eredményt a minták fehérje tartalmához normalizáltam.

3.7 Karbonilált fehérjék mennyiségi mérése

Az oxidált fehérjék mennyiségi változásának meghatározásához Oxyblot Kitet (Chemicon/Millipore) használtam, a gyári leírásnak megfelelően. A szövetmintákat 4-dinitrophenylhydrazine-nal (DNPH) történő 15 perces kezelést követően, szobahőmérsékleten inkubáltam neutralizáló puffer hozzáadásával. Az ily módon átalakított fehérjéket 10%-os SDS-PAGE-gélen futtattam, majd PVDF membránra transzferáltam. A membránt 5% zsírintes tejport tartalmazó Dulbecco-PBS-T-ben (PBS+0,5% Tween 20) blokkoltam 3,5 órán át, majd DNP-ellenes antitesttel inkubáltam egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezt követően háromszor 10 perces időtartamokat mostam a membránt 1x PBST-ben, majd 1 órán át szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitesttel kezeltem. Az immun komplexet kemilumineszcens szubsztrát hozzáadásával röntgenfilmen való előhívással jelenítettem meg.

3.8 mtDNS szeparálása és mennyiségi mérése

A mitokondriális DNS szeparálását Q-BIO gene Fast DNA kittel /# 6540-400/ végeztem, a kitben szereplő 3-as „Lysis Matrix Comb.” felhasználásával, a leírások alapján. 100 mg kiindulási izomszövet mennyiséghez adtam 1ml „Sample – Specific Cell Lysis Solution”-t és a „Lysing Matrix”-ot, majd FAST PREP géppel

homogenizáltam a mintát. Ezt követően centrifugáltam a homogenátumot (14000g, 5perc), és a felülúszóval dolgoztam tovább. Az elkülönített felülúszót „Bindig Matrix” hozzáadásával szobahőmérsékleten inkubáltam, majd egy fugálást követően csak a pellettet használtam. Szuszpendáltam „SEWS-M” folyadékban, és többszöri szűrési lépést követően az utolsó szűrésnél DEPC-es vizet használva nyertem ki a mtDNS-t. A továbbiakban a mintákat egységesre hígítottam, majd kvantitatív PCR használatával mértem meg a mtDNS relatív expresszióját, amit a genomiális DNS-hez normalizálva értékeltem ki.

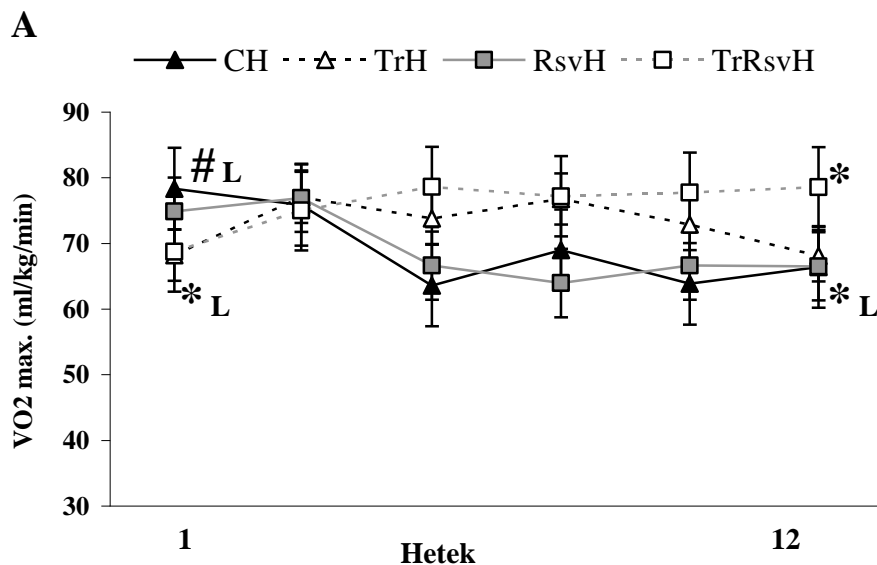
3.9 Statisztikai analízis

A statisztikailag szignifikáns különbségeket normalitás vizsgálatot követően Statisztika 8.0 programmal vizsgáltam. Mivel a változók jelentős része nem mutatott normál eloszlást, így az összes változóm elemzésénél nem paraméteres, Kruskal-Wallis ANOVA-t használtam. Ezt követően post-hock analízist végeztem, melynek alapja a 2 mintás t-próba nem paraméteres vizsgálata (Mann-Whitney próba). Ahol a p-érték kisebb volt, mint 0.05, szignifikáns különbségként tüntettem fel az ábrákon.

4. Eredmények:

4.1 *Vázizimból született eredmények – változások a gastrocnemius izomban*

Az aerob kapacitás változása a „high” állatok esetében kevésbé volt jelentős, a „low” állatokhoz viszonyítva. A különbség valószínűleg azzal magyarázható, hogy az „aktív” állatok eleve sokkal magasabb maximális oxigén felvevő kapacitással rendelkeztek, mint „inaktív” társaik, így a fejlődés lehetséges mértéke is korlátozottabb volt ezen állatok esetében. Szignifikáns változást a „high” állatok esetében a rezveratrol adagolás, valamint az edzés és a rezveratrol együttes alkalmazása eredményezett, míg az edzéshatás magában nem mutatott jelentős fejlődést (4. ábra).



4. ábra

**Az aerob kapacitás változása magas aerob kapacitással bíró egyedek esetében
12 hetes edzés periódus során**

Az aerob kapacitás változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (A).
CH- kontroll; TrH- high edző; RsvH- high, rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.
A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

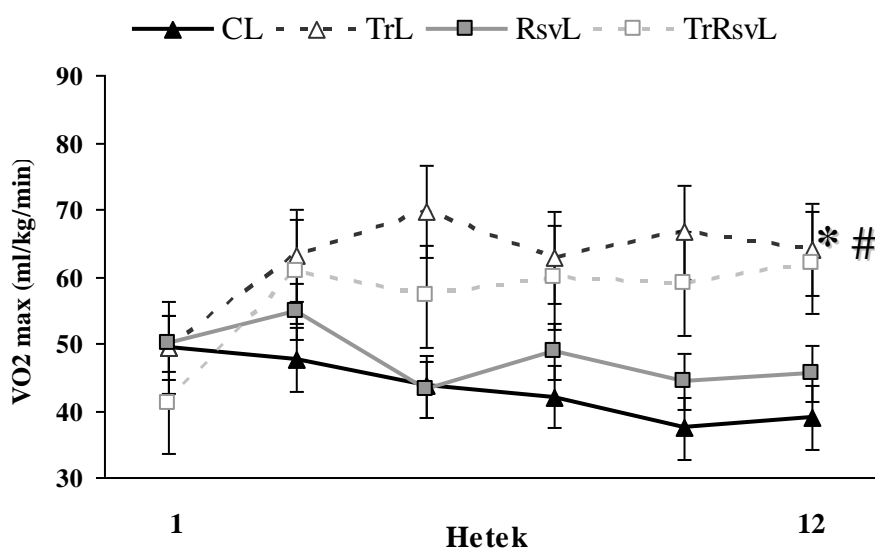
- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A „inaktív” állatok aerob kapacitásbeli változása sokkal látványosabb fejlődést mutatott a 12 hetes mérési periódus végére. Esetükben az edzéshatás önmagában is szignifikáns növekedést eredményezett, míg a rezveratrol adagolás magában nem hozott jelentős változást. A két kezelés együttes alkalmazásával olyan mértékű javulás állt be a „low” állatok maximális oxigén felvevő képességében, mellyel elérte a „high” állatok eleve magas kiindulási VO₂ max. értékeit (5. ábra).

B



5. ábra

**Az aerob kapacitás változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedek esetében
12 hetes edzés periódus során**

Az aerob kapacitás változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (B).
CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

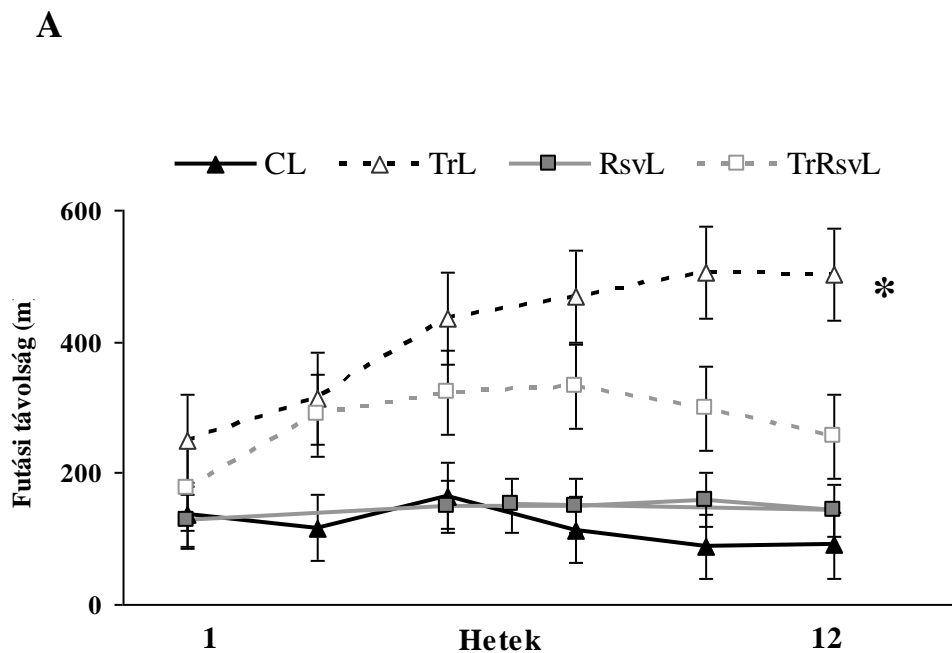
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A maximális oxigén felvétel nem jellemzi egyértelműen az állóképességet, ezért mértük a futási távolságot is. Ez esetben az „inaktív” állatoknál szintén az edzés, valamint a rezveratrol és az edzés hatás együttese eredményezett szignifikáns fejlődést, míg a rezveratrol kezelés önállóan nem volt hatásos (6. ábra).



6. ábra

A futási távolság változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedek esetében 12 hetes edzés periódus során

A futási távolság változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (A).
 CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

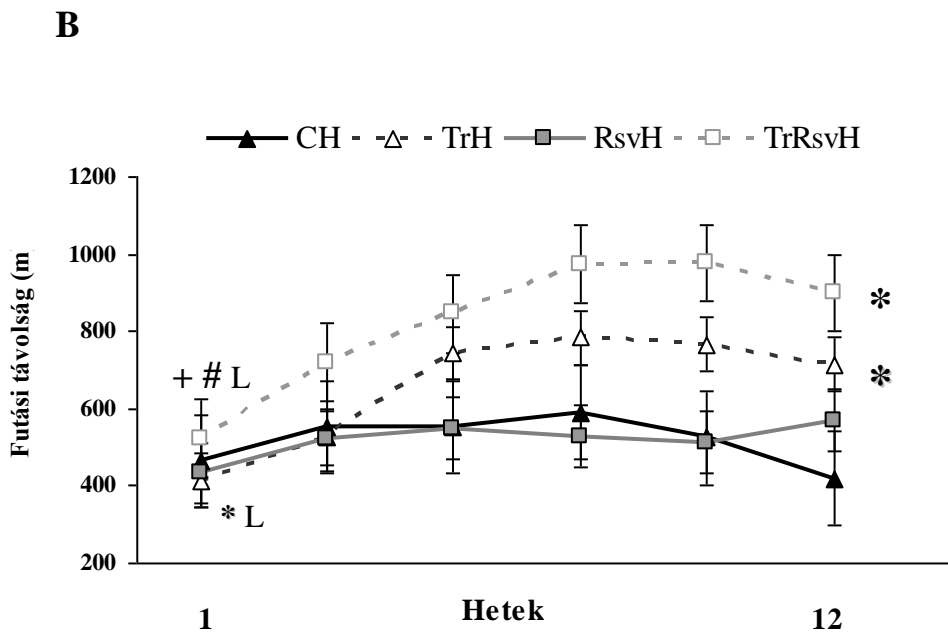
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
 ↔

Az „aktív” állatok esetében sokkal látványosabb a fejlődés a futási távolság tekintetében, mint a maximális oxigén felvétel esetében. Ez esetben mindhárom féle kezelés szignifikáns teljesítmény-növekedést eredményezett. Érdekes módon a „high” állatok esetén a rezveratrol kezelés magában is hatékonynak bizonyult, ellentétben a „low” állatokkal (7. ábra).



7. ábra

**A futási távolság változása magas aerob kapacitással bíró egyedek esetében
12 hetes edzés periódus során**

A futási távolság változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (B).
CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high, rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.
A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

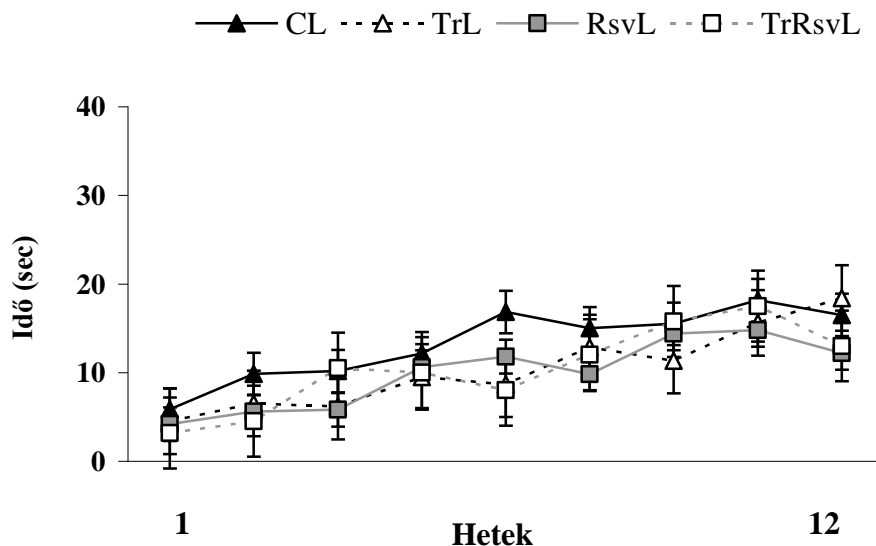
- * - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli
- # - a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:



Kapaszkodási („gripping”) tesztel mértük az állatok mellső lábának erőfejlődését a 12 hetes edzésprogram folyamán. A tesztben a kapaszkodás időtartama jellemzi az egyes egyedek/csoportok erejét (minél hosszabb ideig tud kapaszkodva lógni egy állat, annál erősebb a mellső végtagja). A teszt eredménye azt mutatja, hogy erőfejlődés szempontjából egyik kezelés sem bizonyult elég hatékonynak az „inaktív” állatok esetében, míg az „aktív” állatoknál az edzésterhelés következtében szignifikáns növekedés volt tapasztalható. A rezveratrol adagolás egyik csoport esetében sem volt hatásos a kapaszkodási erő szempontjából (8-9. ábra).

A



8. ábra

A kapaszkodási erő változása alacsony aerob kapacitással bíró egyedek esetében 12 hetes edzés periódus során

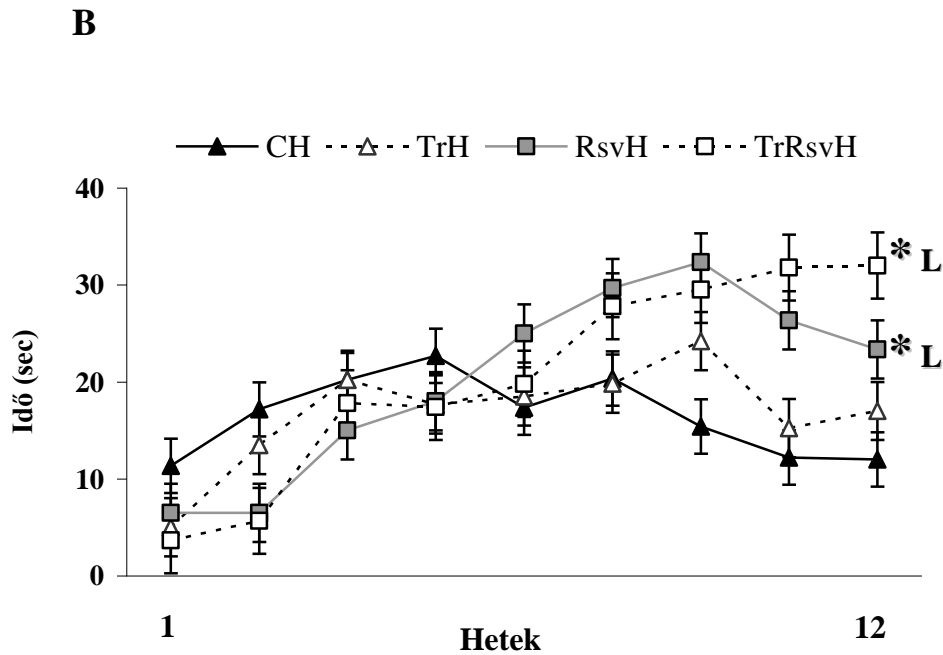
A kapaszkodási erő változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (A). CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző. A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = p <0.05

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

- * - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli
- # - a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:





9. ábra

**A kapaszkodási erő változása magas aerob kapacitással bíró egyedek esetében
12 hetes edzés periódus során**

A kapaszkodási erő változását szemléltető diagram 12 hetes edzés időszak alatt (B).
CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high, rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

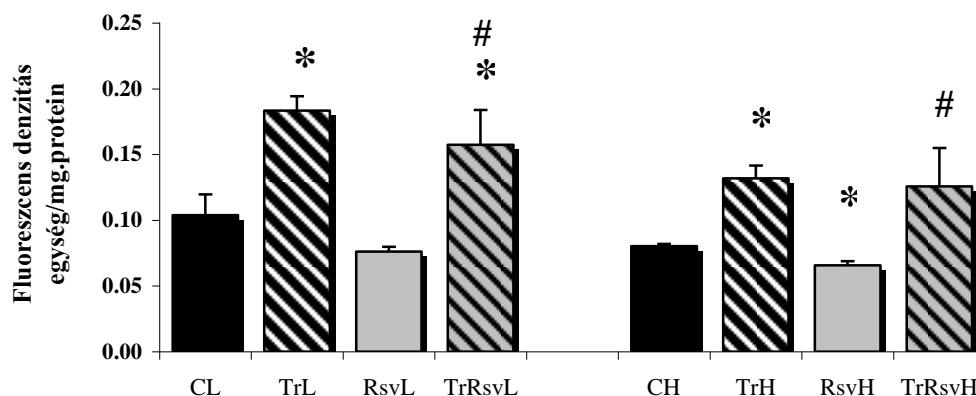
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

←*→

A minták szabadgyök tartalmát H2DCFDA módszerrel mértem. Ahogy az várható volt, mindkét genetikájú csoport esetében nőtt a minták szabadgyök koncentrációja edzés hatás következtében, míg rezveratrol adagolás hatására csökkent a reaktív oxigén gyökök mennyisége mind az „inaktív”, mind az „aktív” csoportok esetében (10. ábra).



10. ábra

A szabadgyökök mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A szabadgyökök mennyiség gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram

CL- kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH- kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

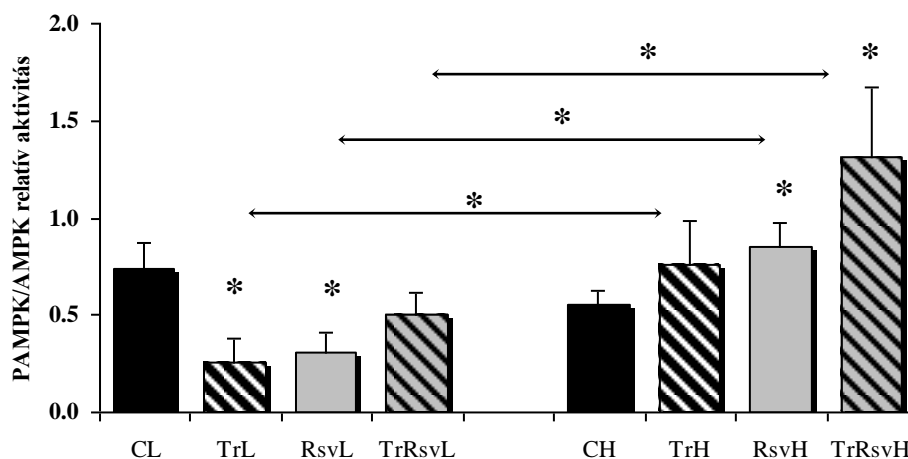
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

Az AMPK aktivitás fontos meghatározója a metabolikus folyamatoknak. Ha az AMP/ATP hányados emelkedni kezd (például fizikai aktivitás, vagy kalória visszafogás hatására), az AMPK aktiválódik, és az elérhető tápanyagok felhasználásával ATP termelésbe kezd, hogy a szervezet számára szükséges energiát biztosítani tudja. Irodalmi adatok alapján edzés hatására növekvő AMPK aktivitás lenne várható vázizom szövetben, ahogy az az „aktív” állatok esetében látszik is. Az „inaktív” állatok esetében ellenben mind edzés hatására, mind pedig rezveratrol adagolás következtében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az AMPK aktivitásában (11. ábra).



11. ábra

PAMPK-AMPK relatív aktivitásának változása az egyes állat csoportokban

PAMPK-AMPK relatív aktivitásának változását mutató hisztogram gastrocnemius izomban
 CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.
 CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

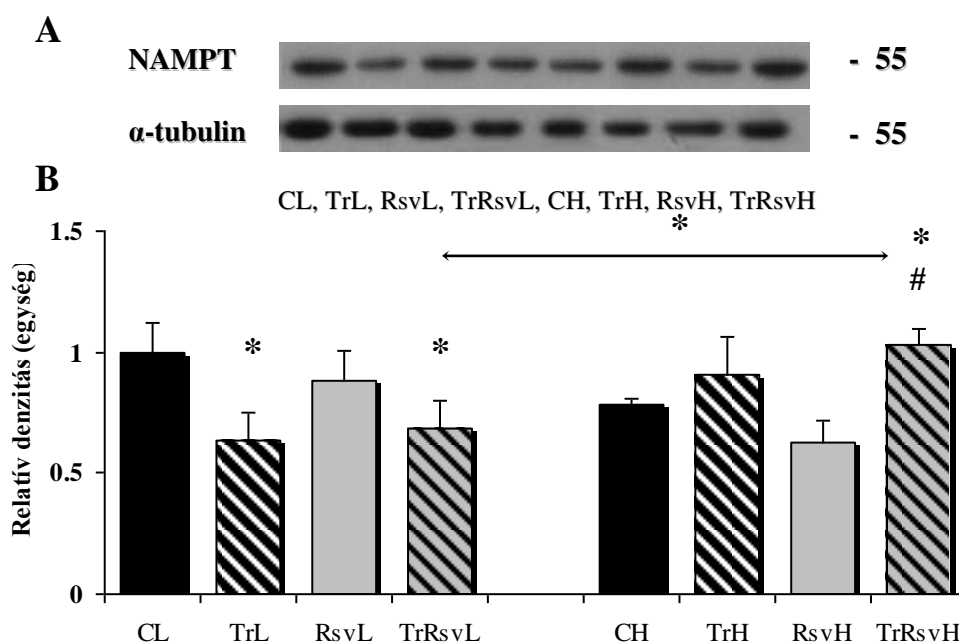
- * - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi
- # - a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
 \longleftrightarrow

A SIRT1 enzimaktivitását meghatározó tényezők fontos eleme a NAD^+ aktuális mennyisége, illetve a NAD^+/NADH hányados, valamint a nikotinamid koncentráció. A NAD^+ bioszintézisét szabályozó egyik enzim, a NAMPT aktivitása pozitív regulátora a SIRT1 aktivitásnak. Ilyen körülményt jelent a szervezet számára többek között a diétázás, illetve testedzés.

Mérésünkben a NAMPT enzimfehérjének a koncentrációja a „low” állatok esetében edzés hatásra és a rezveretrol-edzés kombináció hatására csökkent, míg a „high” állatok esetében az edzés és rezveratrol adagolás együttes hatására szignifikáns növekedés volt tapasztalható a NAMPT fehérje tartalomban (12. ábra).



12. ábra

NAMPT mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A NAMPT fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A NAMPT mennyiség gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

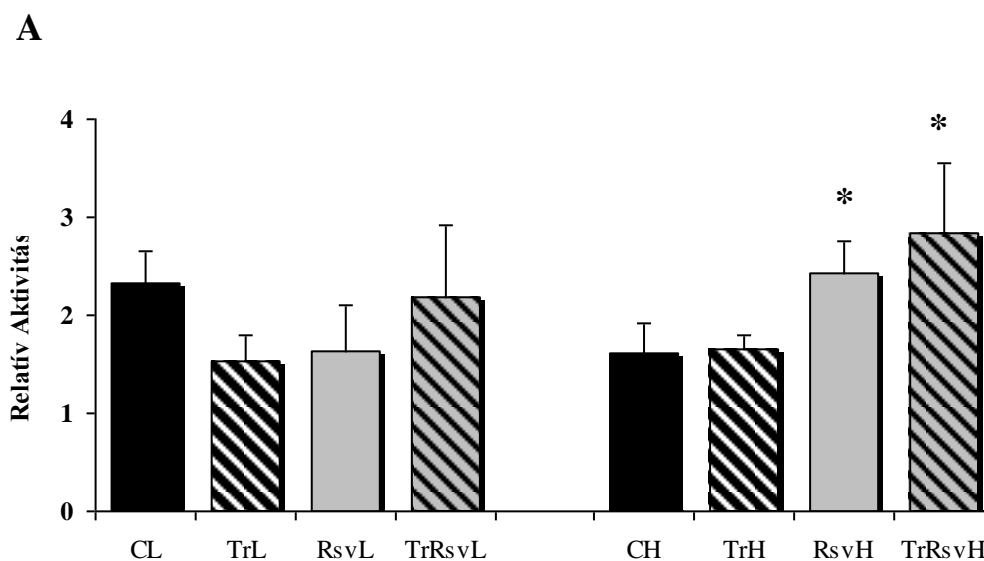
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A sirtuinek családjába tartozó SIRT1 aktivitás valószínűsíthetően szoros összefüggésben áll az AMPK aktivitással. Ezt a tényt látszik megerősíteni a két mért változóból (AMPK aktivitás, SIRT1 aktivitás) készült hisztogram hasonló mintázata is. Eddigi irodalmi adatok szerint a rezveratrolt, mint SIRT1 aktivátort is említették, mely a „high” állatok esetében ebben a mérésben is bizonyítást nyert (mind önálló kezelésként, mind edzéssel kombinálva hatékony aktivátornak bizonyult). Ugyanakkor a „low” állatoknál mind a fizikai terhelés, mind a rezveratrollal történt táplálás hatástalan maradt a SIRT1 aktiválás szempontjából (13. ábra).



13. ábra

SIRT1 relatív aktivitásának változása az egyes állat csoportokban

SIRT1 relatív aktivitásának gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (A)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezveratrol kezelt; TrRsvL- low rezveratrol kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezveratrol kezelt; TrRsvH- high rezveratrol kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

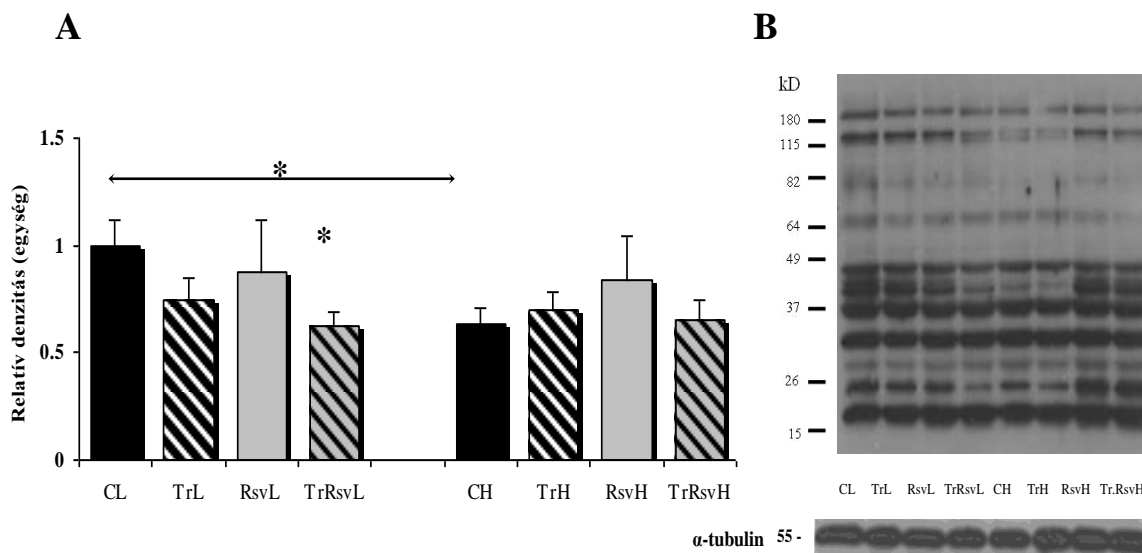
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A SIRT1 enzimfehérje deacetiláz aktivitásával képes megváltoztatni különböző fehérjék, illetve transzkripciós faktorok aktivitását (aktivál/deaktivál), és ez által szabályozni bizonyos metabolikus folyamatokat. Az acetilált lizin mennyiségéből következtethetünk a SIRT1 aktivitásra is. A „CL” állatok estén szignifikánsan magasabb az acetilált lizin mennyisége a „CH” állatokhoz képest. A „low” állatok esetében az edzés hatás és a rezveratrol adagolás együttese jelentősen csökkentette az acetilált lizin mennyiségét izomszövetben, míg a „high” állatok esetében nem tapasztaltunk jelentős változást a különböző kezelések hatására (14. ábra).



14. ábra

Acetilált lizin mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

Acetilált lizin mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (A)

Az acetilált lizin fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

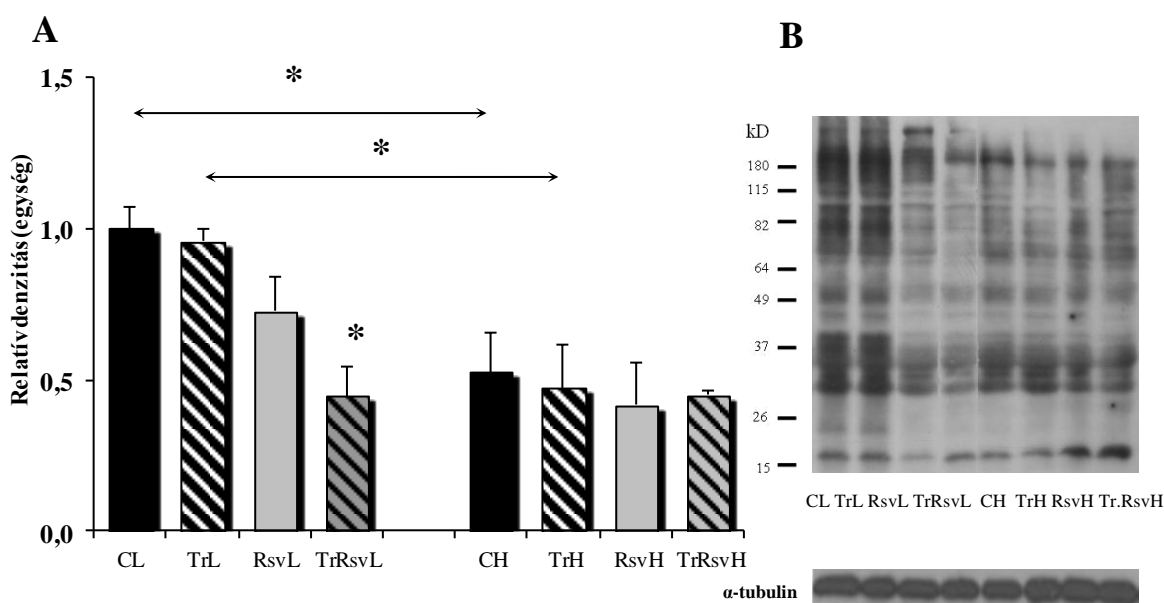
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A karbonilált fehérjék mennyisége jelzi az oxidatív fehérjesérülések mértékét. A karbonilálódott fehérjék általában nem tudnak ubiquitinálódni, így a proteaszóm általi eltávolításuk, és újrahasznosításuk sem tud megvalósulni. A felhalmozódott sérült fehérjék számos betegség kialakulásának forrásai lehetnek. Mért értékeinkből jól látszik, hogy az "inaktív" állatok esetében kezdetben igen magas karbonilációs szintet jótékonyan csökkenti a két kezelés együttes hatása. A gyors állatok eleve kedvező értékeit szignifikánsan nem változtatta meg egyik kezelés hatása sem (15.ábra).



15. ábra

Karbonilált fehérjék mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A karbonilált fehérjék gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (A)

A karbonilált fehérjék mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH- kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

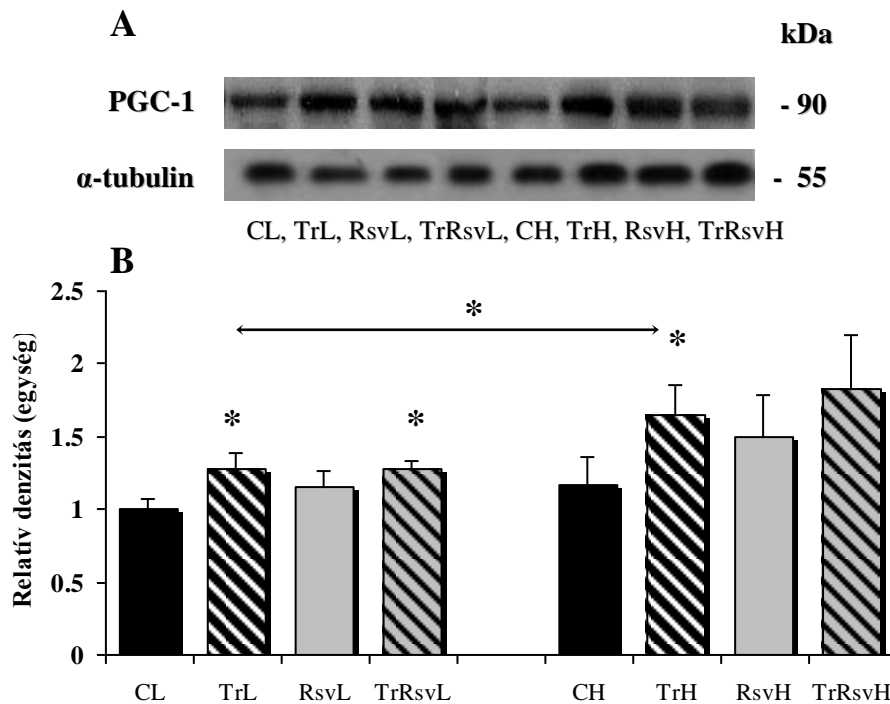
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

Továbbá a SIRT1 befolyásolja a PGC-1 α működését is, mely a mitokondriális biogenezis folyamatában játszik jelentős szerepet. A PGC1 α fehérje koncentrációja edzés hatásra mindkét genetikájú csoport esetén szignifikáns növekedést eredményezett, míg magában a rezveratrol adagolás nem befolyásolta számottevően a PGC1 α mennyiségét (16.ábra).



16. ábra

PGC-1 α mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A PGC1- α fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A PGC-1 α mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

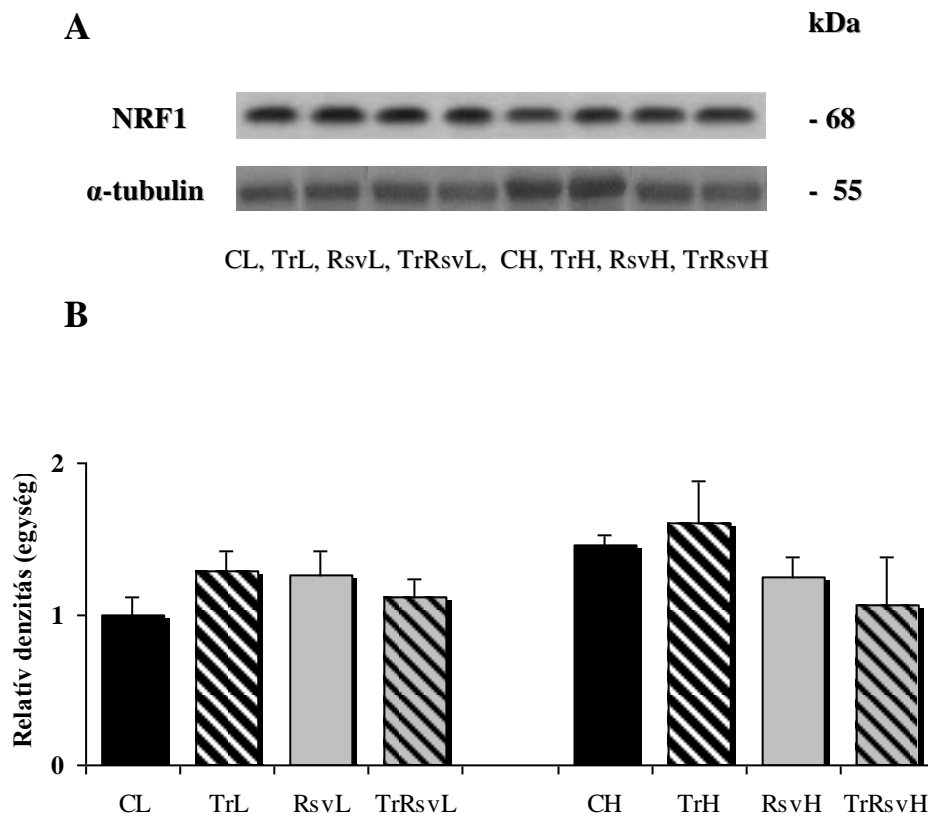
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

Az NRF1 egy, a mitokondriális biogenezisben jelentős szerepet játszó transzkripciós faktor, fehérjéje pedig fontos tényezője az oxidatív stressz elleni küzdelemnek. Mérésünk során a fehérje tartalomban nem találtunk szignifikáns változást egyik kezelés hatására sem (17. ábra).



17. ábra

NRF1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

Az NRF1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

Az NRF1 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

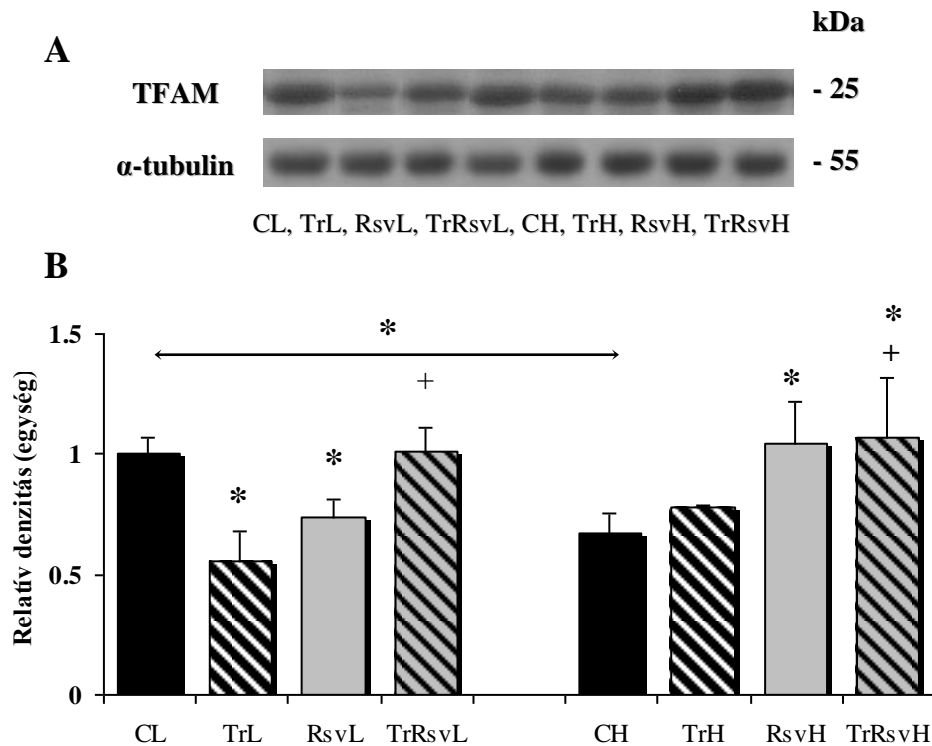
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A TFAM az egyik legjelentősebb transzkripció faktor a mitokondriális genom replikációja, illetve transzkripciója szempontjából, tehát fontos meghatározója a mitokondriális biogenezisnek. Vizsgálataink során azt az eredményt kaptuk, hogy mind az “aktív”-, mind az “inaktív” állatok esetén az edzés hatás és a rezveratrol adagolás együttes alkalmazása emelte meg szignifikánsan ezen fehérje mennyiségét a gastrocnemius szövetben (18. ábra).



18. ábra

TFAM mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A TFAM fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A TFAM mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

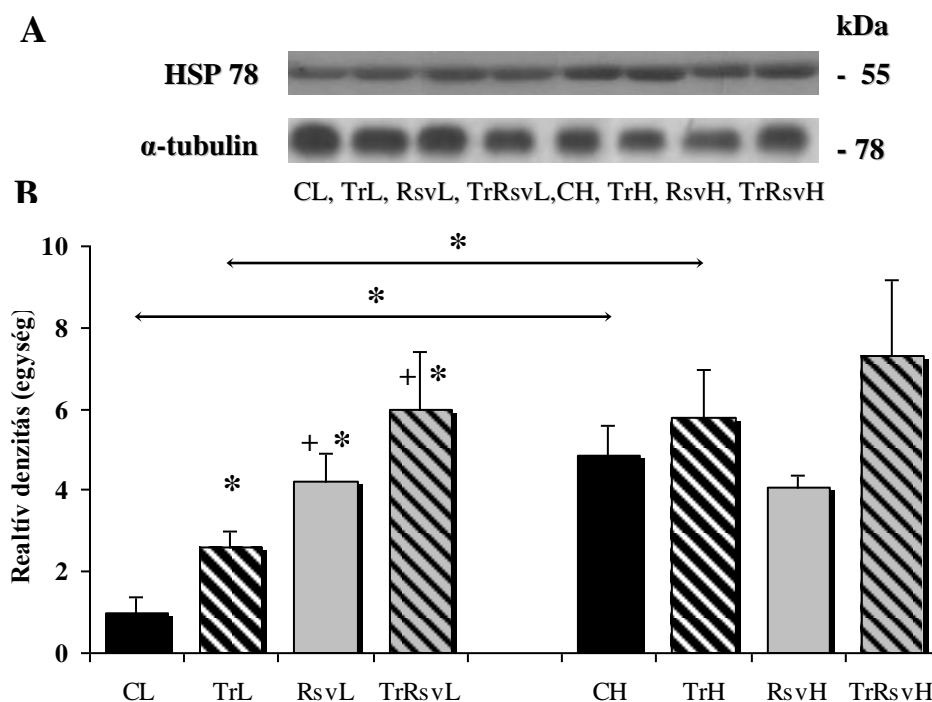
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A fehérjék rendszeres turn over-e nélkülözhetetlen a sejtek megfelelő működése szempontjából. A sérült/ „elhasználódott” fehérjéket jelölő molekulák jelzik a lebontó egységek számára. Ahogy a ubiquitin a cytosolban, úgy a HSP78 a mitokondriumban tölti be ezt a jelölő szerepet. Eredményeink azt mutatják, hogy a jelölő rendszer aktívabban, hatékonyabban működik az edző-rezveratrolos csoportok estén, mint a kontrol csoportoknál, de szignifikáns különbségről csak a “low” állatok esetében beszélhetünk. A (19. ábra) szemlélteti, hogy az “inaktív” genetikájú állatok kezdeti hátrányait segít javítani mindkét kezelés hatása.



19. ábra

HSP78 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A HSP78 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A HSP78 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH- high kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

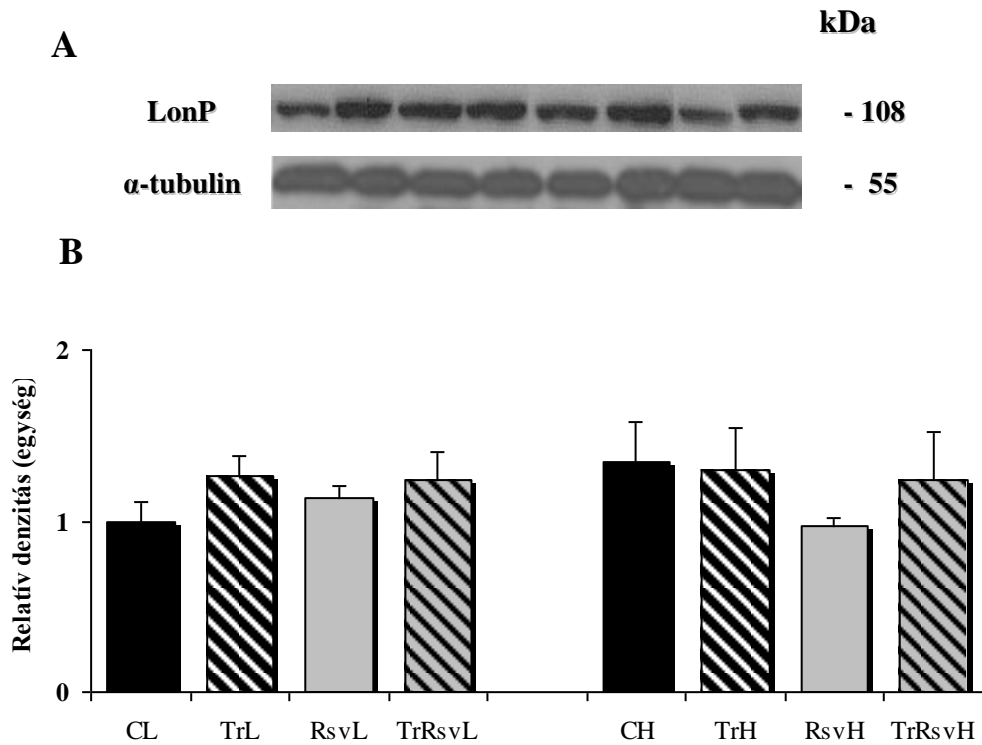
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A cytosolban a ubiquitin megjelöli a degradált fehérjét a proteaszóm számára, mely azt képes felismerni, és eliminálni. A mitokondriumban a sérült fehérjék lebontását a LonP végzi, a fehérjék kiegyenesítésért (unfolding) HSP78 a felelős. Mérésünk során nem találtunk változást a LonP mennyiségében egyik kezelés hatására sem (20. ábra).



20. ábra

LonP mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A LonP fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A LonP mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

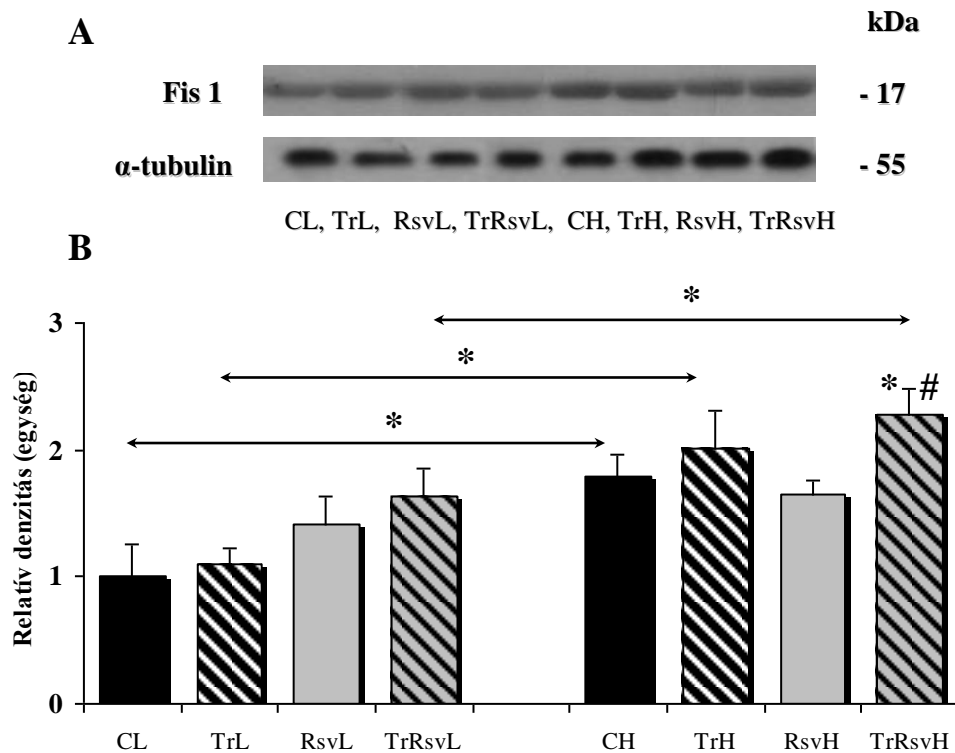
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:



A mitokondriák megfelelő működéséhez nélkülözhetetlen azok dinamikus egyensúlya, azaz a rendszeres fizió és fúzió kiegyensúlyozott váltakozása. A Fis1 a fizióért felelős. Méréseink alapján arra lehet következtetni, hogy a “high” állatok esetében alapvetően hatékonyabban működik a fizió folyamat, mint a “low” állatoknál. Ezt mutatja a két kontroll csoport közötti szignifikáns különbség, valamint az edzett csoportok különbsége is (21. ábra).



21. ábra

Fis-1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A Fis1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A Fis1 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)
 CL- kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.
 CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

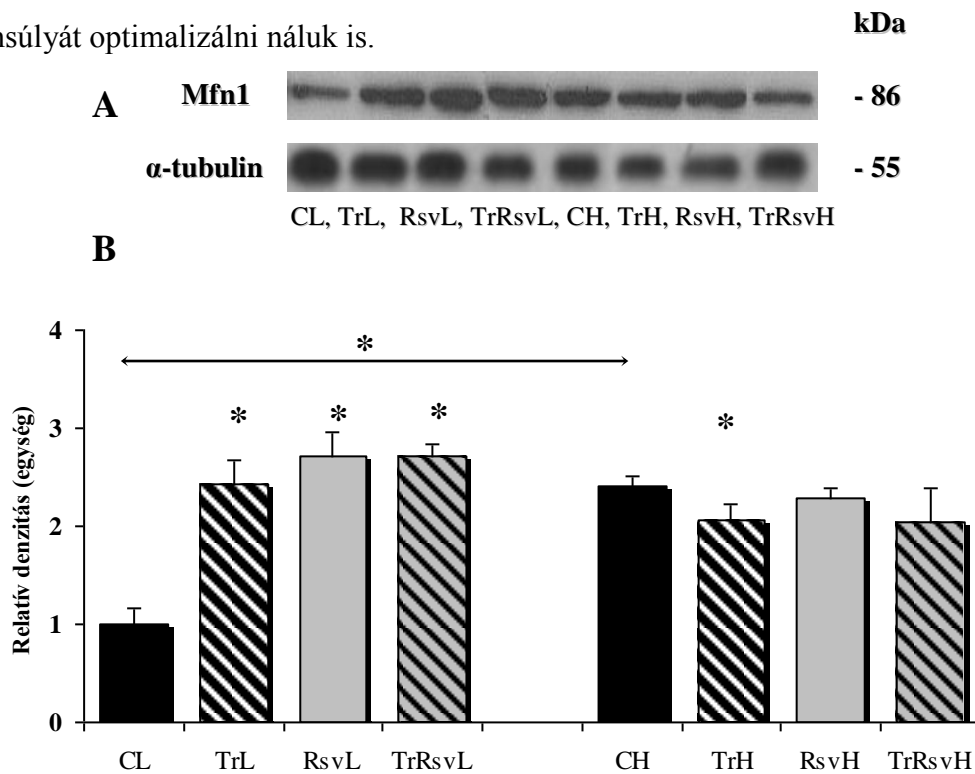
A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi
 # - a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
 ↔

A mitokondriális fúzió a fizót kiegészítő/ felváltó folyamat. A két folyamat összehangolt, kiegyensúlyozott működése biztosítja a mitokondriák megfelelő homeosztázisát. Méréseinkből látszik, a kontroll csoportokat összehasonlítva, hogy az “aktív” állatok fiziós-fúziós szabályozása alapvetően hatékonyabban működik, mint az “inaktív” állatoké. Viszont az edzés és a rezveratrol adagolás kompenzálni képes ilyen irányú genetikai hátrányokat az inaktív állatoknál, és az osztódás-szétválás egyensúlyát optimalizálni náluk is.



22. ábra

Mfn-1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A Mfn1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A Mfn1 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

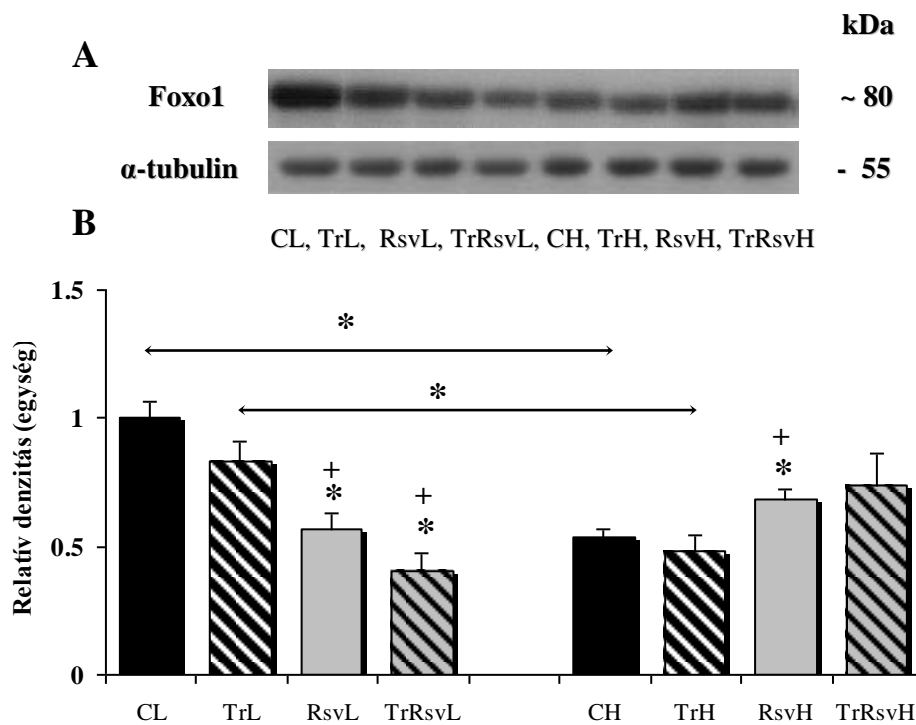
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A FOXO1 transzkripció faktor negatív szabályozója a mitokondriális oxidatív folyamatoknak. Szerepe meghatározó az izomrost differenciálódásban, magas szintje a glikolitikus rostok irányába tolja el ezt a folyamatot. Méréseink azt mutatják, hogy az “aktív” állatok alapvetően alacsonyabb FOXO1 szinttel rendelkeznek, amit jelentősen egyik kezelés sem befolyásol, míg az “inaktív” állatok kontroll csoportjánál mért magas FOXO1 szintet mindkét kezelés típus szignifikánsan csökkentette – tehát javította az oxidatív funkciókat és a zsír felhasználás irányába tolta el az energia felhasználást.



23. ábra

Foxo-1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A Foxo1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (A)

A Foxo1 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = p < 0.05

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

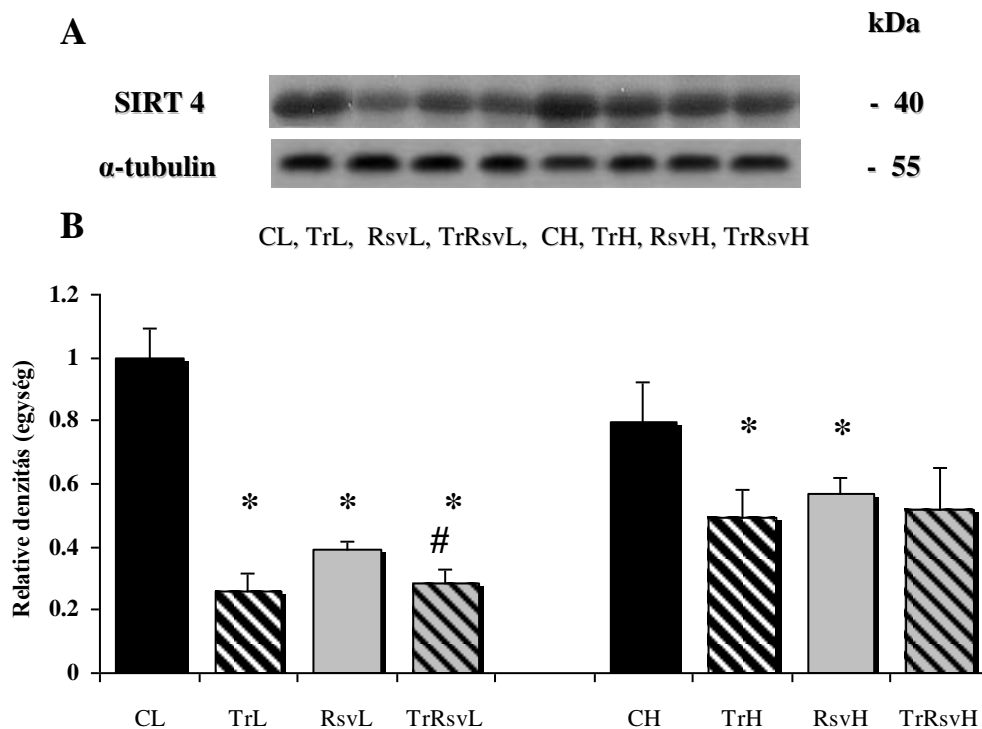
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A SIRT4, mint mitokondriális enzim a FOXO1-hez hasonlóan negatív szabályozója az oxidatív zsírsavanyagcserenek. Minél magasabb a szintje a szövetben, annál jobban gátolja a mitokondriában zajló oxidatív folyamatokat. Az alábbi diagramm szépen szemlélteti, hogy mindkét csoport kontroll állatainál emelkedettebb a SIRT4 fehérje szintje (24. ábra). Ezt a magas szintet hatékonyan csökkentette mind az edzés hatás, mind a rezveratrol adagolás mind két állat csoport esetén.



24. ábra

Sirt-4 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A Sirt4 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

A Sirt4 mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

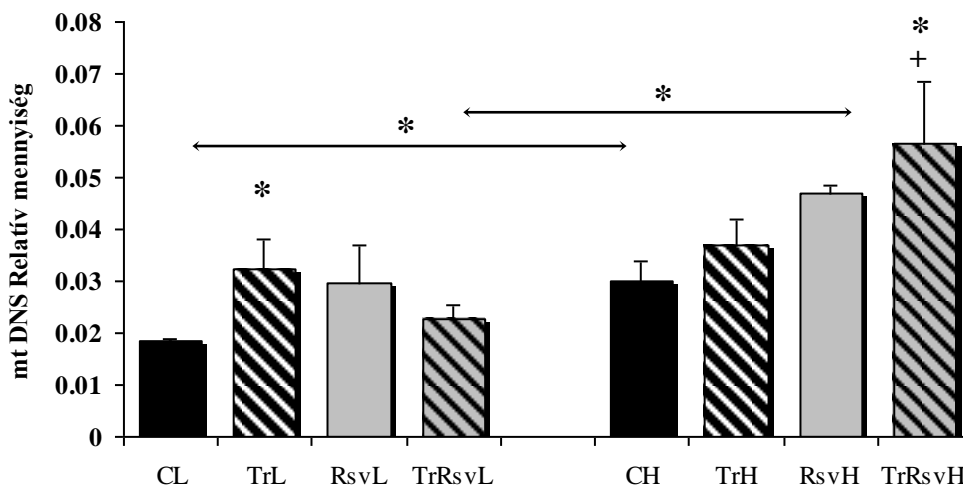
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A mtDNS mennyiségi változásából következtethetünk a mitokondriális biogenesis mértékére. Az “inaktív” genetikai háttérrel rendelkező állatok esetében az edzés hatás eredményezett szignifikáns növekedést a mtDNS mennyiségében, míg az “aktív” állatok amúgy is kedvező mtDNS szintjét a két kezelés együttes hatása tudta még fokozni (25. ábra).



25. ábra

A mtDNS relatív mennyisége az egyes állat csoportokban

A mtDNS mennyiségének gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző. CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

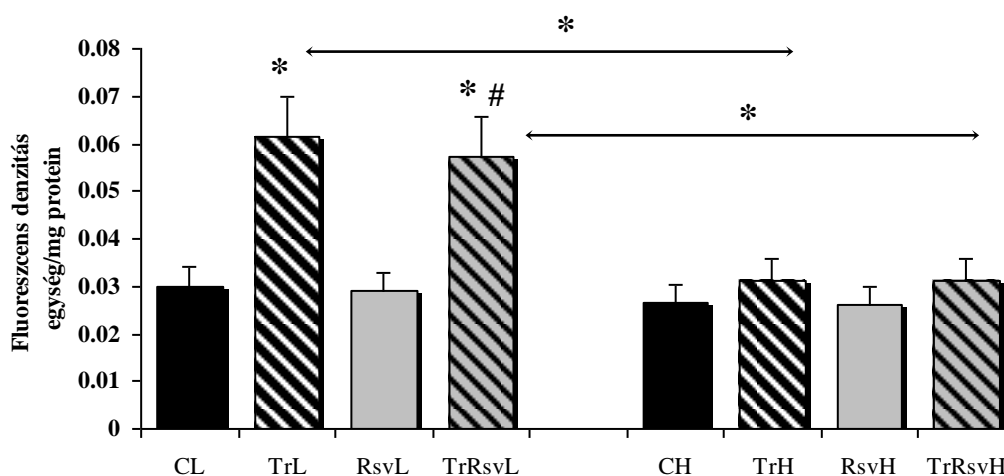
- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

4.2 Szívizomból született eredmények-változások a szívizomban

A minták szabadgyök tartalmát ahogy vázizom esetén, úgy szívizomban is H2DCFDA módszerrel. A vártnak megfelelően edzéshatásra nőtt a reaktív oxigén-
gyökök mennyisége a “low” állatok szívizmában, bár érdekes módon a “high”
állatoknál ez a növekedés nem volt szignifikáns (26. ábra).



26. ábra

A szabadgyökök mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A szabadgyökök mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram
CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.
CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

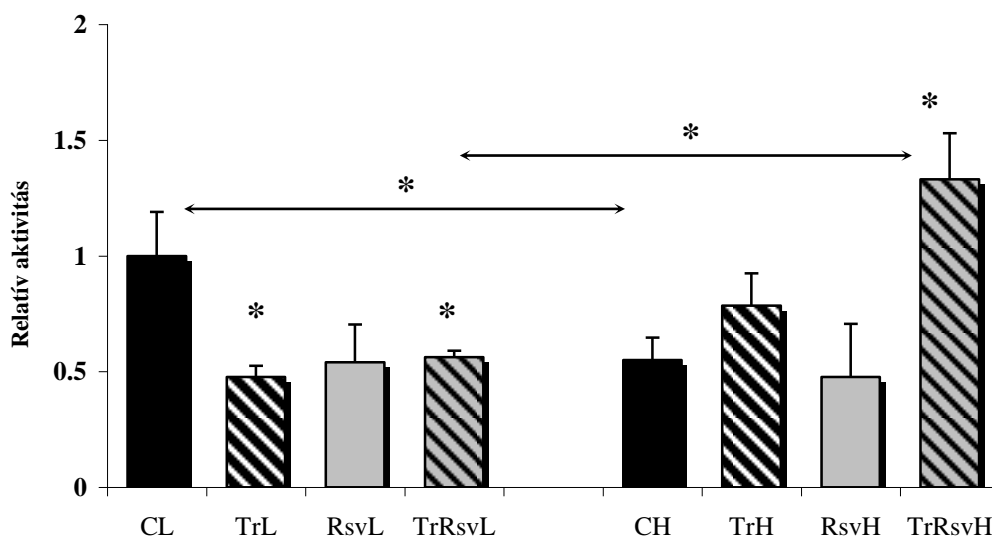
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

Az AMPK a legfőbb sejtenergia-szenzor, ami kontrolálja a szabadzsírsav felhasználást, a mitokondriális biogenezist, és a myocardialis morfológiát, illetve funkciót. Irodalmi adatok alapján edzés hatására növekvő AMPK aktivitás lenne várható szívizom szövetben is csakúgy, mint vázizomban. Ez a változás az „aktív” állatok esetében látszik is. Az „inaktív” állatok esetében ellenben mind edzés hatására, mind pedig rezveratrol adagolás következtében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható az AMPK aktivitásában (27. ábra).



27. ábra

PAMPK-AMPK relatív aktivitásának változása az egyes állat csoportokban

A PAMPK-AMPK relatív aktivitásának szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző. CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

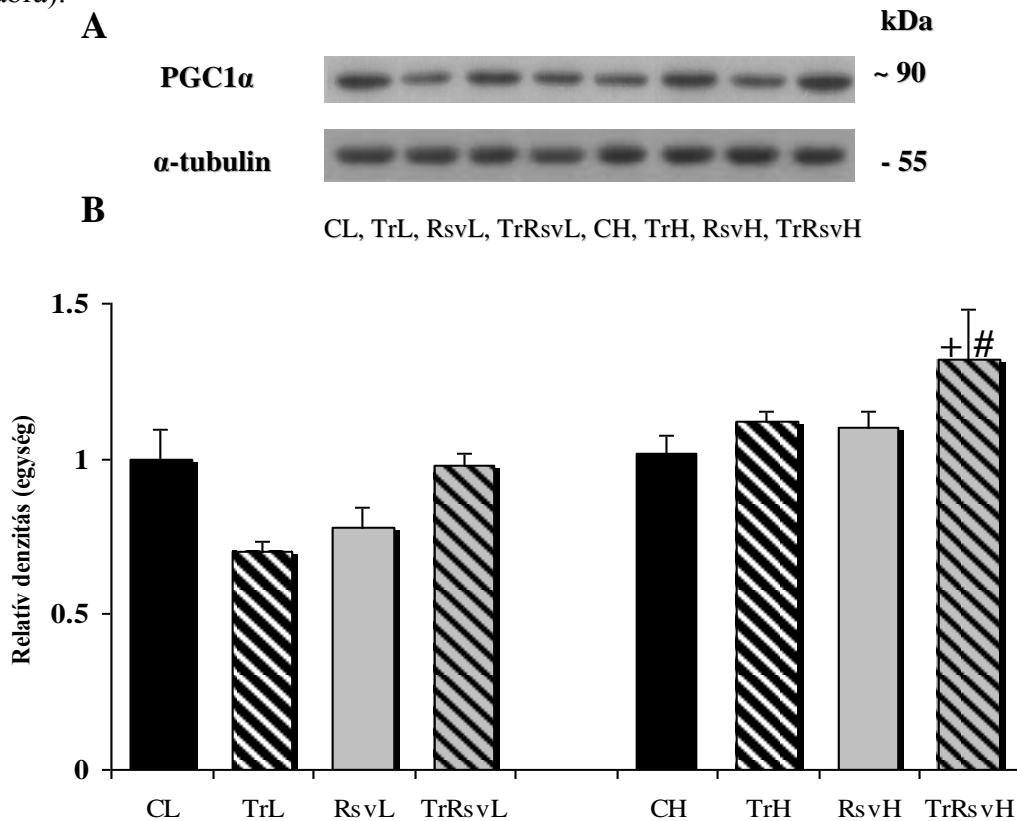
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A mitokondriális biogenezis legfőbb koordinátorának számító PGC1 α szívizom esetében nem mutatott szignifikáns változást egyik kezelés hatására sem a “hátrányos” genetikával bíró állat csoportnál. A “kedvező” genetikájú csoportnál az edzés hatás és a rezveratrol adagolás együttes hatása eredményezett növekedés a PGC1 α fehérjében (28.ábra).



28. ábra

PGC1 α mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A PGC1 α fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

A PGC1 α mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

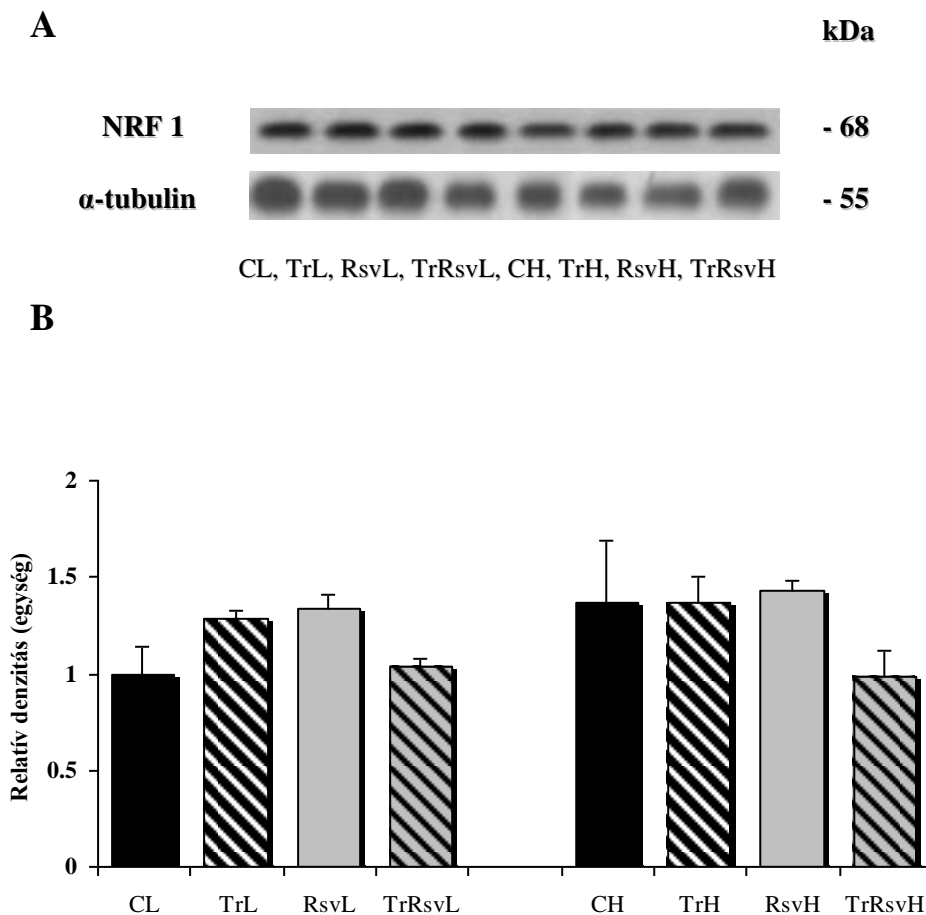
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A nuklális respiratórikus faktor mennyiségében nem találtunk változást egyik kezelés hatására sem. A két csoport eredményei hasonló mintázatot mutattak ebben az esetben (29. ábra).



29. ábra

NRF1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

Az NRF1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

Az NRF1 mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

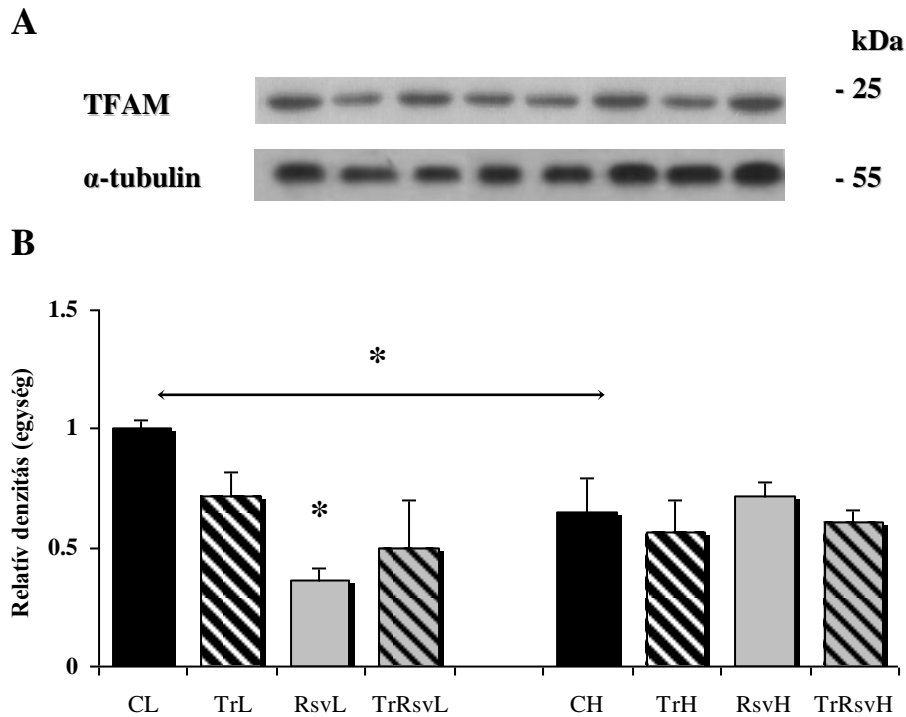
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A mitokondriális transzkripciós faktor egyik kulcs eleme a mitokondriális biogenezisnek. Esetünkben érdekes módon a TFAM szintje az “inaktív” állatoknál csökkenést mutatott a rezveratrol kezelés hatására, míg az “aktív” állatok esetében nem okozott változást egyik kezelés sem (30. ábra).



30. ábra

TFAM mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A TFAM fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

Az TFAM mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

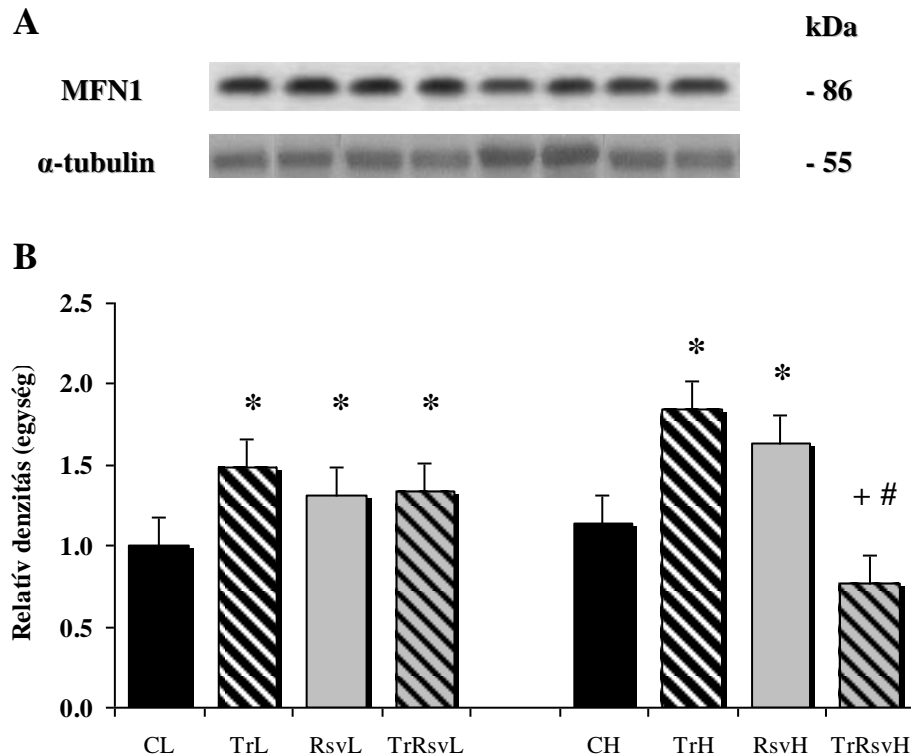
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A mitokondriális minőség-kontroll egyik fő faktora a fúziós fehérje, melynek szintje edzéshatásra emelkedik az “inaktív” genetikával rendelkező csoportban, míg rezveratrol hatásra is növekvő tendencia figyelhető meg – bár ez esetben a szignifikáns szintet nem éri el a változás mértéke. Az “gaktív” állatok esetében mindkét kezelés eredményesnek bizonyult, ám különös megfigyelés, hogy a két kezelés együttes hatása nem érte el ugyanazt a hatást, mint külön-külön alkalmazva (31. ábra).



31. ábra

MFN1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

Az Mfn1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

Az Mfn1 mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL- low kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH- high kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

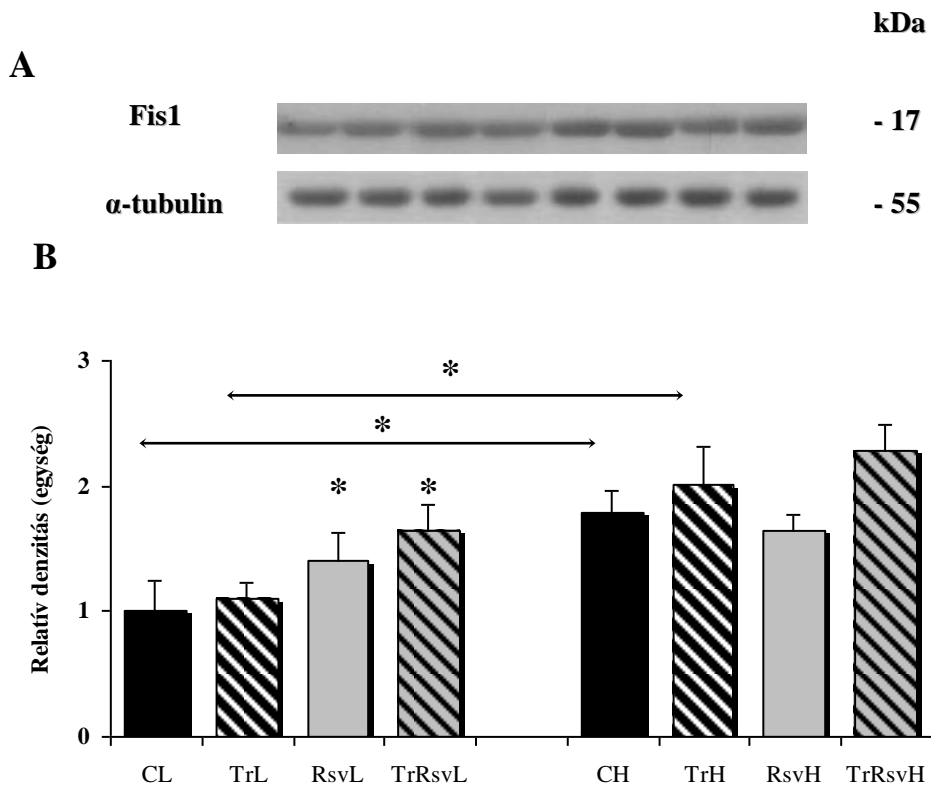
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

A fiziós fehérje a mitokondriális minőségkontroll másik főszereplője. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy míg az “előnyösebb” genetikával bíró állatok esetén kiegyensúlyozott fiziós folyamatot már nem befolyásolja jelentősen egyik kezelés sem, addig a “hátrányosabb” genetikájú csoport esetén az eleve csökkent Fis1 termelődést a rezveratrol kezelés és az edzés hatás együttesen a “high” állatok szintjére emelte.



32. ábra

Fis1 mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A Fis1 fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

A Fis1 mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.
CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

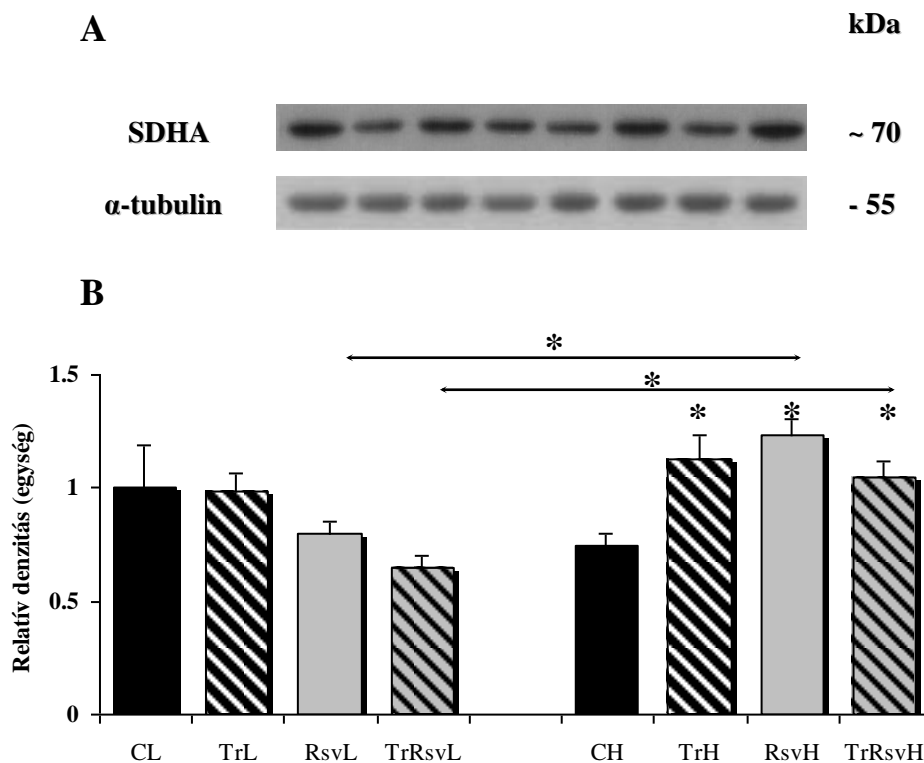
* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelzi

- a rezveratrolal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

Az SDHA (succinate dehydrogenase complex subunit A) fehérje mennyiségének mérésével következtethetünk a mitokondriális biogenezis mértékére, a mitokondriumok mennyiségére. Mért adataink azt mutatják, hogy míg a kezelések az “aktív” genetikájú csoportnál hatékonyan növelték az SDHA szintjét, addig az “inaktív” állatok esetén nem eredményezett szignifikáns változást egyik kezelés sem (33.ábra).



33. ábra

SDHA mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

Az SDHA fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép (A)

A SDHA mennyiségének szívizomban létrejövő változását mutató hisztogram (B)

CL-kontroll; TrL- low edző; RsvL- low rezv.lal kezelt; TrRsvL- low rezv.lal kezelt, edző.

CH-kontroll; TrH- high edző; RsvH- high rezv.lal kezelt; TrRsvH- high rezv.lal kezelt, edző.

A feltüntetett értékek: átlag ± SE, hat állat esetében csoportonként; *, +, # = $p < 0.05$

A jelölések értelmezése egy azon genetikai csoporton belüli különbségek esetén:

* - a kontroll csoporttól való különbséget jelöli, + - az edző csoporttól való különbséget jelöli

- a rezveratrollal kezelt csoporttól való különbséget jelöli

A két különböző genetikával bíró csoportok azonos kezelést kapott csoportjai közti különbség:

*
↔

5. Megbeszélés:

5.1 A gastrocnemius izomból született eredmények értékelése

Feltételeztük, hogy a testedzés, illetve a rezveratrol adagolás kedvezőbb hatással bír azon populációk esetén, ahol genetikailag kódolt szinten nagyobb a valószínűsége bizonyos betegségek kialakulásának (Bravata, 2007 Goel, 2011 Kreider, 2011 Pevear, 1990). Hipotézisünk vizsgálatához két, különböző genetikai állománnyal rendelkező patkány csoporttal dolgoztunk. Kísérleti eredményeink is igazolták, hogy az edzéshatás jelentősen (Wisloff és mtsai 2005) növelte a kedvezőtlenebb genetikai háttérű (LCR) csoport futási teljesítményét, illetve aerob kapacitását. Fejlődésük sokkal kifejezettebb volt, mint az amúgy is magas VO₂ maximummal rendelkező (HCR) állatok esetén.

A méréseink során tapasztalt aerob kapacitás növekedése feltételezi számos fiziológiai funkció javulását, az oxidatív stressz káros hatásainak mérséklését, molekuláris folyamatok beindítását, illetve a mitokondriális biogenezis fokozódását (Ferrara és mtsai 2008).

Irodalmakban tárgyalt adatok alapján az LCR állatok élettartama általánosan rövidebb, mint a HCR állatoké (Koch és mtsai 2011) hátrányos genetikai adottságaik miatt jellemzőbb esetükben különböző betegségek, metabolikus rendellenességek kialakulása (Kivela és mtsai 2010, Thyfault és mtsai 2009, Wisloff és mtsai 2005). Ezen diszfunkciókat látszanak kompenzálni az edzéshatásra bekövetkező jótékony változások.

Rezveratrol adagolás hatásra a futási teljesítmény az „LCR” csoport esetén nem eredményezett javulást, ezzel szemben a „HCR” állatok esetén jelentősen nőtt a megtett futási távolság, valamint a VO₂ max. értéke. Érdekes, hogy az ezzel kapcsolatos fehérjék közül egyedül az AMPK aktivitásában volt tapasztalható szignifikáns eltérés a rezveratrollal kezelt állatcsoportok között. A rezveratrol kezelés hatására kialakuló nagy mértékű eltérés az “inaktív”, illetve “aktív” állatok aerob teljesítménye között arra enged következtetni, hogy a rezveratrol hatása is erőteljesen függ a genetikai háttértől.

Következő célja a vizsgálatomnak, annak megállapítása volt, hogy a testedzés, illetve a rezveratrol adagolás hogyan befolyásolja a mitokondriális biogenezist vázizom esetén.

A mitokondriális funkciók megfelelő fent tartásához mintegy 1200-1500 gén (nukleáris- és mitokondriális gén) összehangolt expressziója szükséges (Sickmann és mtsai 2003), ezeket a folyamatokat azonban számos egyéb faktor befolyásolja (Scarpulla 2008), többek között a szabadgyökök termelődése (Davies és mtsai 1982, Koltai és mtsai 2010). Méréseink nem mutattak jelentős különbséget a két genetikai csoport kontroll állatainak szabadgyök szintje között. Viszont edzés hatására mindkét esetben jelentősen megnőtt a ROS termelés, ahogy az várható volt. Az edzéshatás, illetve a fokozott szabadgyök képződés a PGC1 α fehérje mennyiségi növekedését eredményezte, ami az NRF1 és az mtTFA együttműködésével egyik fő koordinátora a mitokondriális biogenezisnek (Gleyzer és mtsai 2005).

Irodalmi adatok alapján a PGC1 α útvonal „beindításához” fontos az AMPK általi SIRT1 aktiváció, ami a továbbiakban deacetiláz működése révén képes aktiválni a PGC1 α -t (Rodgers és mtsai 2008), (Nemoto és mtsai 2005), (Scarpulla, 2010).

Érdekes módon vizsgálatunkban az AMPK aktivitás az LCR állatoknál csökkenést mutatott mind edzés, mind rezveratrol hatásra, és ezt a mintázatot követte a SIRT1 aktivitása is ezen állatok gastrocnemius izmában. Ezzel szemben a HCR állatok esetében a rezveratrol adagolás magában, illetve edzéshatással kombinálva is a SIRT1 aktivitás növekedését mutatta. Az utóbbi évek irodalmában találunk adatokat azzal kapcsolatosan, hogy a SIRT1 enzim a mitokondriában is jelen van, és ott az mtTFA-val együttműködve lényeges szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben (Aquilano és mtsai 2010). Ennek a funkcionális protein-protein interakciónak a fennállását látszik alátámasztani, a SIRT1 aktivitás és az mtTFA denzitás általunk mért változásainak hasonló mintázata is.

Köztudott, hogy az mtTFA a mtDNS replikációjáért és transzkripciójáért felelős (Garnier 2005), ezért emelkedett szintje a szövetben utalhat fokozott mitokondriális biogenezisre.

A Lon proteáz fontos szerepet játszik a mitokondriális fehérjék minőség-kontrolljában, az oxidatív károsodást szenvedett fehérjék eltávolítása révén (Ngo és Davies 2009, Rottgers és mtsai 2002). A legújabb kutatások alapján a LonP-nek szerepet tulajdonítanak az mtTFA metabolizmusában (Matsushima és mtsai 2010). Az összefüggés ellentétes irányú változásokat mutat, a LonP csökkent szintje az mtTFA emelkedett szintjével jár együtt, és fordítva. Habár vizsgálatunkban a LonP

izomszövetben nem változott szignifikánsan, de tendenciájában követi az mtTFA változásának ellentétes irányú rajzolatát.

A HSP78 egy mitokondriális chaperon, mely együtt működve a LonP-vel fontos szerepet játszik a mitokondriális minőség kontrollban, illetve a sérült fehérjék lebontásának folyamatában (Rottgers 2002). Eredményeink alapján az LCR kontroll állatok izmában meglehetősen alacsony a HSP78 szintje. Ez feltételezi a nem megfelelő protein lebontást, minek következtében a felgyülemelő sérült fehérjék funkció-romlást hoznak létre az LCR csoportnál. A kezelések hatására nőtt a HSP78 mennyisége a kedvezőtlen genetikával rendelkező állatoknál, így ez esetben is hatékony segítségnek bizonyult a rezveratrolal való táplálás, valamint az edzés hatás.

A mitokondriális minőség kontroll további fontos szabályozó folyamata a fúzió és fizio, két egymást kiegészítő folyamat. E két folyamat megfelelő egyensúlya nélkülözhetetlen a metabolikus funkciók kifogástalan működése -, illetve az adódó hibák javítása/kiküszöbölése érdekében.

A fúzió során a mitokondriumok összeolvadnak, egyesítik tartalmukat, és így minimalizálják a lehetséges mutációk számát. Ez a folyamat jótékony szerepet játszik többek között izom atrófia esetében (Romanello és mtsai 2010) élettartam növelés szempontjából (Schekhuber és mtsai 2007), valamint a szabadgyök-termelés tekintetéből (Yu és mtsai 2006). Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a fúziós fehérjeként mért Mfn1 szignifikánsan alacsonyabb volt az LCR állatoknál, mint a HCR csoportnál. Ám ezt a deficitet a rezveratrol kezelés és a testedzés is hatékonyan orvosolta az LCR csoportnál, ezáltal elérték a HCR állatok esetén mért magasabb Mfn1 szintet. Így a kezelések pozitívan befolyásolták a kedvezőtlen genetikájú csoport mitokondriális hálózatának fúzióját.

A fizio folyamata a sérült-, funkcióját veszített mitokondriumokat távolítja el a mitokondriális hálózatból autophágia révén (Benard és Karbowski 2009). Azok a sejtek melyek a fizio fehérje (Fis1) hiányában nem képesek eltávolítani a meghibásodott mitokondriumokat, öregedéssel együtt járó fenotipikus változásokat mutatnak (Lee és mtsai 2007). Méréseink alapján a kontroll állatok tekintetében az LCR csoportnál jóval alacsonyabb a Fis1 fehérje szintje, mint HCR állatok esetén. Többek között ez a különbség lehet az egyik oka az LCR csoportra jellemző mitokondriális diszfunkciók fennállásának. Ellenben ezt a differenciát szinte teljes mértékben eliminálja a

rezveratrol adagolás, illetve az edzéshatással kombinált rezveratrol táplálás. Így az LCR állatok fizióis szintje eléri a HCR állatok kiindulási szintjét.

A HCR állatok esetében sem a fúziós-, sem a fizióis fehérjék szintje nem változott szignifikánsan egyik kezelés hatására sem. Ennek oka valószínűleg az, hogy náluk amúgy is jól működő fúziós-fizióis dinamizmus állt fent. Eredményeink alapján hatékony eszköznek bizonyult ellenben az LCR állatok mitokondriális minőség-kontrollja szempontjából mind a rezveratrol kezelés, mind az edzéshatás.

A FOXO1 nevű transzkripciós faktor irányítja az izom-növekedést és metabolizmust (Birkenkamp 2003, Barthel és mtsai 2001), valamint szabályozza az izomrost differenciálódást. Metabolikus hatása a PGC1 α -val ellentétes irányú. Vázizomban való fokozott expressziója kedvezőtlen, csökkenti az aerob futási teljesítményt, rontja a glikémiás kontrollt, csökkenő izom tömeget eredményez, és elhízáshoz vezet (Kamei és mtsai 2004). Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy az LCR állatok esetén majdnem kétszer magasabb volt a FOXO1 szintje a kontroll csoport esetén, mint a HCR csoport kontroll állataiban. Ez is egyik tényezője lehet az LCR állatokra jellemző elhízás kialakulásának (Wisloff és mtsai 2005), illetve az alacsony aerob teljesítményüknek. Az emelkedett FOXO1 szintet nagymértékben csökkentette mind a rezveratrol, mind az edzés – ahogy az az irodalmi adatok alapján is várható volt (Lagouge és mtsai 2006).

A HCR állatoknál alapvetően lényegesen alacsonyabb volt a FOXO1 szintje, amit nem változtatott meg különösebb módon egyik kezelés sem. Ennek oka vélhetően az, hogy az eleve megfelelően működő szabályozáson nincs mit javítani.

Ahogy már az előzőekben tárgyaltam, kísérletünkben az AMPK aktivitása csökkent az LCR állatoknál edzéshatásra, míg a HCR állatok esetében nőtt – az irodalmi adatoknak megfelelően-. Ez a különös változás lehet az egyik fő okozója a mitokondriális biogenezis, illetve –funkció nagymértékű különbségének a két, eltérő genetikájú csoport között. Az AMPK aktivitás differenciáját okozhatja többek között az izomban mért SIRT4 szintje.

Habár ennek a mitokondriában található enzimnek a pontos funkciója még kérdéses, SIRT4 „knock down” egereken végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy ezen állatoknál nőtt a zsírsavcsere mértéke a vázizomban (Nasri és mtsai 2010). Ez egy fontos megfigyelés, mely alapján feltételezhető, hogy alacsonyabb SIRT4 szint az

izomszövetben fokozott zsírsav felhasználást eredményez, ami az egyik kulcs tényezője az aerob teljesítmény növekedésének (Holloszy és Coyle 1984).

Másképp fogalmazva a SIRT4 (csakúgy, mint a FOXO1) negatív szabályozója az oxidatív anyagcsere folyamatoknak (Nasrin és mtsai 2010). Vizsgálatunkban kapott eredmények megfelelnek ezen adatoknak. A rezveratrol adagolás következtében, valamint edzés hatására is szignifikáns csökkenést mértünk a SIRT4 szintben az LCR állatok esetén, mely feltételezi a fokozott zsíryanycsere bekövetkezését a kezelések hatására. A folyamat pontos mechanizmusa még nem ismert, de elképzelhető, hogy a SIRT4 ADP-ribozil aktivitása révén csökkenti bizonyos proteinek mennyiségét, amelyek kulcs szerepet játszanak a zsír-metabolizmusban.

Mint már említettem, a rezveratrol jól ismert aktivátora a SIRT1 nevű enzimnek (Lomb és mtsai 2010). Jelen vizsgálatunkban ez a hatás csak a HCR állatoknál volt megfigyelhető, míg az LCR csoportnál nem érvényesült a rezveratrol SIRT1 aktiváló hatása. Ellenben a SIRT4 protein szintje mindkét csoport esetén csökkenést mutatott rezveratrol táplálás hatására. Ennek a megfigyelésnek a kapcsán feltételezhetjük a rezveratrol szelektív hatását a különböző Sirtuinokon, továbbá a SIRT4-re gyakorolt hatása révén kimondható zsíryanycsereben játszott szerepe is (Pfluger és mtsai 2008). Vizsgálatunkban két különböző genetikával rendelkező - aerob kapacitásában lényegesen eltérő - állatcsoportot használtunk annak vizsgálatára, hogy megállapítsuk, milyen komplex molekuláris változásokat eredményez a rezveratrol adagolás, illetve a rendszeres fizikai aktivitás. Hosszú távú céljaink a humán diagnosztika és kezelés irányába mutatnak. Tudvalevő, hogy azok az emberek, akiknek edzéstoleranciájuk csökkent, hajlamosabbak olyan betegségek kialakulásra, mint a cukorbetegség, vagy különböző cardiovasculáris betegségek. Ennek a csoportnak a kísérleti képviselői a LCR csoport állatai, akik hasonló kockázati tényezőkkel bírnak, jellemzően kialakul náluk az elhízás, az inzulin rezisztencia, valamint egyéb metabolikus rendellenességek. Jelen kísérletünk eredményei alapján elmondható, hogy az edzéshatás, valamint a rezveratrol adagolás komplex hatása jótékonyan befolyásolja az izomszövet mitokondriális biogenezisét, csökkenti az LCR és HCR állatok között mért metabolikus paraméterek különbségét, valamint növeli az aerob teljesítményt.

Fontos eredménynek tűnik, hogy a FOXO1 transzkripciós faktor kiemelkedő szerepet játszik a különböző genetikájú állatok között tapasztalható metabolikus- és fiziológiás differenciák kialakításában gastrocnemius izom esetén.

További lényeges megfigyelés, hogy a rezveratrol hatása nem általánosítható, hiszen adagolásának hatására több esetben genetikai függő változásokat tapasztalhattunk méréseink során. Ez arra a felismerésre vezet, hogy nincs általános gyógyszer/gyógymód, különböző genetikával bíró alanyok különbözőképpen reagálhatnak egy azonos kezelésre.

A gastrocnemius izom vizsgálatához megfogalmazott hipotézisekre a válaszok tehát a következők:

1. A rendszeres fizikai aktivitás és a rezveratrol adagolás növeli az állatok futási teljesítményét és aerob kapacitását: **részben IGAZ**
2. A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására fokozódik a mitokondriális biogenezis izomszövetben (a PGC1 α - SIRT1 útvonal aktiválása révén): **IGAZ**
3. A kezelések kedvezően befolyásolják az izomszövet mitokondriális minőségkontrollját biztosító enzimek működését: **IGAZ**
4. A testedzés és a rezveratrol kezelés képes kompenzálni/helyreállítani az LCR állatok genetikai deficitjéből adódó mitokondriális problémákat, ez által javítják életminőségüket, csökkentik betegségre-való hajlamukat: **IGAZ**

A gastrocnemius izomból született eredményeket a (34.ábra) foglalja össze.

Edzés	Rezveratrol	Együttes hat.		Edzés	Rezveratrol	Együttes hat.
↑	↓		H2DCFDA	↑	↓	
↓	↓		pPMPK/AMPK		↑	↑
			NAMPT			↑
↓	↓		Karbonilált fehérjék			
			SIRT1		↑	↑
↑		↑	PGC1		↑	
			NRF1			
↓	↓	↑	TFAM		↑	↑
		↑	Fis1			↑
↑	↑	↑	MFN1			
↑	↑	↑	HSP 78			
			LonP			
	↓	↓	FOXO1			
↓	↓	↓	SIRT4		↓	↓
↑	↑		mt DNS			↑

34. ábra

A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása (1.)



A kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest szignifikáns növekedés volt tapasztalható



A kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest szignifikáns csökkenés volt tapasztalható

3. táblázat

A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása (2.)

	LCRC- LCRT _f	LCRC- LCRR _{sv}	LCRC- LCRT _r sv	LCRC- HCRC	LCRT _f - LCRR _{sv}	LCRT _f - LCRT _r sv	LCRT _f - HCRT _f	LCRR _{sv} - LCRT _r sv	LCRR _{sv} - HCRR _{sv}	LCRT _r sv- HCRT _r sv	HCRC- HCRT _f	HCRC- HCRR _{sv}	HCRC- HCRT _r sv	HCRT _f - HCRR _{sv}	HCRT _f - HCRT _r sv	HCRR _{sv} - HCRT _r sv
Carbonylated Pr.			▼	▼			▼									
H2DCFDA	▲		▲					▲			▲	▼				▲
PGC1	▲		▲				▲				▲					
NAMPT	▼		▼							▲			▲			▲
PAMPK/AMPK	▼	▼					▲		▲	▲		▲	▲			
SIRT1												▲	▲			
NRF1																
TFAM	▼	▼		▼		▲						▲	▲		▲	
Fis1				▲			▲			▲			▲			▲
Mfn1	▲	▲	▲	▲							▼					
LonP																
HSP78	▲	▲	▲	▲		▲	▲									
Foxo1		▼	▼	▼	▼	▼	▼					▲		▲		
SIRT4	▼	▼	▼					▼			▼	▼				
PNPase			▲	▲	▲	▲		▲		▼		▼				▲
mtDNS	▲			▲						▲			▲		▲	
SDHA		▲											▲			

5.2 A szívizomból született eredmények értékelése

Wisloff 2005-ben leírta az „inaktív” és az „aktív” genetikájú patkány csoportok vizsgálata kapcsán, hogy az alacsony aerob kapacitással rendelkező állatok (LCR) szív-keringési és mitokondriális problémákat halmoztak fel, megjelentek rajtuk a metabolikus szindróma jelei, míg a magas aerob kapacitással rendelkező állatok esetében (HCR) nem jelentkeztek ezek a tünetek (Schwarzer és mtsai 2010, Wisloff és mtsai 2005). Tehát az alacsony maximális oxigénfelvételi képesség komoly rizikófaktora a különböző betegségek – többek között a szív- és érrendszeri megbetegedések- kialakulásának.

Feltételeztük, hogy a vizsgálatunkban alkalmazott kezelések pozitív irányú mitokondriális változásokat eredményeznek szívizom esetében is az LCR állatoknál, mely változások hatására csökken a genetikai hátrányból adódó cardio-vasculáris betegségek kialakulásának kockázata.

Szív esetében kifejezetten érzékeny és kiegyensúlyozott dinamikus mitokondriális biogenezis szükséges a megfelelő működés megtartása érdekében (Rimbaud és mtsai 2009). Bizonyos kísérletekben kimutatták, hogy edzéshatás következtében megnő a kardiális enzimek expressziója és aktivitása (Coleman és mtsai 1988, Stuewe és mtsai 2000), mások viszont nem találtak változást az OXPHOS enzimek aktivitásában, sem a mitokondriák számában, eloszlásában, vagy biogenezisében (Kayar és mtsai 1986, Kemi és mtsai 2007, Murakami és mtsai 1995).

Ling Li 2011-ben publikált cikkében szívizom esetében nem volt kimutatható fokozott mitokondriális biogenezis 12 hetes futószalagos edzés hatására (Rimbaud és mtsai 2009). Vizsgálatai során összehasonlítást tett a vázizomnál mért változásokkal (fokozott AMPK aktiváció, SIRT1 indukció, és PGC1 α deacetiláció), minek kapcsán azt találta, hogy szívizomban egyedül az AMPK aktivitás növekedett, valamint morfológiai változásként enyhe hipertrófia jelentkezett.

Az AMPK a legfőbb sejtenergia-szenzor, ami kontrolálja a szabadzsírsav felhasználást, a mitokondriális biogenezist, és a myocardialis morfológiát, illetve funkciót. Vizsgálatunkban az edzés hatására bekövetkező AMPK aktivitás-növekedés a „high” állatok esetében látszik is, ezzel szemben „low” állatok esetében mind edzés hatására, mind pedig rezveratrol adagolás következtében szignifikáns csökkenés volt

tapasztalható az AMPK aktivitásában. Talán ez a deffektus az egyik fő momentuma az LCR és HCR állatok közti metabolikus különbségeknek.

A PGC1 α kulcs szerepet játszik a szív anyagcseréjében. Szigorú szabályozottsága elengedhetetlen a megfelelő szív funkciók fent tartásához, mennyiségének ideális tartománya sokkal szűkebb tartományban mozog, mint vázizom esetében. Ennek kapcsán több kutatás foglalkozott ennek a faktornak a túl- illetve alul működésével. A PGC1 α túlzott expressziója mutatható ki szívelégtelenség esetén (Finck és Kelly 2007). A túltermelés hatására először kontrolálatlan mitokondriális proliferáció, majd kardiomiopátia alakult ki (Lehman és mtsai 2000), míg alul-termelődése esetén csökkent a mitokondriális gén-expresszió-, az oxidatív kapacitás- és a zsírsav oxidáció szintje (Lehman és mtsai 2008, Leone és mtsai 2005). Voltak olyan szerzők is, akik a PGC1 α és az mtTFA enzimek emelkedett szintjét mutatták ki szívizom szövetben edzés hatására, de nem találtak értékelhető változást a mitokondriális enzimek aktivitásában, sem az oxidatív kapacitásban (Matilb és mtsai 1983, Watson és mtsai 2007). Vizsgálatunkban a PGC1 α szintje csak a „high” állatok esetén mutatott minimális emelkedést a két kezelés együttes hatására, míg az mtTFA tekintetében a rezveratrol kezelés csökkenést mutatott az enzim szintjében a „low” állatoknál, egyéb változás azonban nem volt tapasztalható a kezelések hatására. Ez a megfigyelés megerősíteni látszik Li-nek azt a feltételezését, hogy szívizomban nem jött létre a SIRT1 függő PGC1 α deacetiláció, ezáltal fokozott mitokondriális biogenezis sem (Li és mtsai 2011). Szívizom esetében kevesebb információ áll rendelkezésre a mitokondriális-dinámiával kapcsolatosan, mint vázizom esetén (Ong és mtsai 2010), de az egyértelmű, hogy a fokozott energia felhasználás miatt szívizom esetében különösen fontos a hibás mitokondriumok mielőbbi eltávolítása - mitofágia révén - és azok pótlása. Számos irodalom szerint ez az eltávolítási folyamat az egyik fő kiváltója a mitokondriális biogenezis beindításának myocardiumban (Gottlieb és mtsai 2009).

Az utóbbi években egyre több bizonyíték mutat rá arra, hogy a mitokondriális fizió/fúzió és a mitofágiás folyamatok között szoros összefüggés van (Tanaka és mtsai 2010, Cohen és mtsai 2008).

Szívizom estén kimutatták, hogy a mitofágiának fontos szerepe van a kardioprotektív folyamatokban (Gurusamy és mtsai 2009, Brady és mtsai 2006, Huang és mtsai 2010). Ez által a mitofágia szerepe jelentős lehet az élettartam növelés szempontjából is.

Vizsgálatainkban a fúziós Mfn1 fehérje szintje mind rezveratrol, mind edzés hatás következtében megemelkedett mindkét genetikával rendelkező csoport szívizma esetén. A fúziós fehérjében lényeges változás csak az „inaktív” állatok esetében következett be, míg az „aktív” állatok esetén nem volt tapasztalható változás. Ennek oka vélhetően az, hogy a HCR állatok esetén amúgy is jobban működő mitokondriális dinámia már nem fejleszhető olyan mértékben, mint az LCR állatok „deficit rendszerében.”

Az SDHA fehérje szintjéből általánosságban lehet következtetni a mitokondriák mennyiségére, valamint a mitokondriális biogenezis mértékére. A kísérletünkben kapott mennyiségi adatok alapján a „low” állatoknál nem találtunk különbséget az SDHA szintben szívizomban, ellenben a „high” állatok esetén emelkedett SDHA szintet regisztráltunk mind a rezveratrol adagolás, mind az edzés hatására.

A szívizom vizsgálatához megfogalmazott hipotézisekre a válaszok tehát a következők:

1. A vizsgálatban alkalmazott kezelések hatására javuló mitokondriális funkciók várhatóak a “lassú” genetikával bíró egyedek szívizmában: **részben IGAZ**
2. Edzés hatására, és rezveratrol adagolásra fokozott AMPK és PGC1 α aktivitás várható szívizom esetén is mely, egyéb transzkripciós faktorok átírását serkentve fokozza a szív mitokondriális biogenezisét: **részben IGAZ mert a SDHA szint emelkedett**
3. A kezelések javítják, illetve kompenzálják a genetikai hátrányokból adódó cardiovascularis betegségek kialakulásának kockázatát: **részben IGAZ**

Edzés	Rezveratrol	Együttes hat.		Edzés	Rezveratrol	Együttes hat.
↑		↑	H2DCFDA			
↓		↓	pAMPK/AMPK			↑
			SDHA	↑	↑	↑
			PGC1			↑
			NRF1			
	↓		TFAM			
	↑	↑	Fis1			
↑	↑	↑	MFN1	↑	↑	

35. ábra

A szívizomból született eredmények összefoglalása

↑ A kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest szignifikáns növekedés volt tapasztalható

↓ A kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest szignifikáns csökkenés volt tapasztalható

6. Következtetések:

Vázizom esetében az a következtetés vonható le, hogy az edzéshatás jótékonyan befolyásolja mindkét genetikával bíró állatcsoport aerob teljesítményét, és futási képességeit, míg a rezveratrol hatás csak a HCR állatok esetében bizonyult hatékonynak ebből a szempontból. Az edzéshatás az AMPK aktivitást növelte a HCR állatoknál, ellenben csökkentette az LCR állatoknál, ez a rendellenes válasz jelezheti az LCR állatokra jellemző metabolikus rendellenességek kialakulásának egyik metabolikus deficitjét. A SIRT1 aktivitás változása, és a PGC1 α fehérje tartalom változásának mintázata követi az AMPK aktivitását. Azon csoportoknál, ahol emelkedett az AMPK aktivitás, ott nőtt a SIRT1 deacetyláz aktivitás is, melyet jól reprezentál az adott csoportnál létrejövő acetylált lizin, illetve carbonilált fehérje mennyiségének ellentétes irányú változása. A mitokondriális biogenezis fő koordinátora - a PGC1 α -, és az NRF1 bár nem mutatott különösebb változást a kezelések hatására, mégis a mitokondriális transzkripciós faktor A (mtTFA) mindkét genetikával bíró csoportnál szignifikáns emelkedést mutatott a két kezelés együttes hatására. Az mtTFA mintázatát követi a mitokondriális biogenezis mértékét reprezentáló mtDNA, valamint az SDHA mennyisége is, mi szerint a leghatékonyabbnak a két kezelés együttes hatása bizonyult mindkét csoportnál. A mitokondriális minőség kontroll szempontjából fontos fiziológiai és fűziós fehérjék, valamint HSP78 nagy mértékű növekedése a kezelések hatására LCR állatoknál a javuló mitokondriális funkciókat jelzi, míg a HCR állatoknál alapvetően jól működő szabályozáson már nem változtatott egyik kezelés sem. A zsír metabolizmus és az izomrost differenciálódás szempontjából meghatározó SIRT4 és FOXO1 változása is a „low” állatoknál mutatott kedvező változást mindkét kezelés hatására, míg a „high” állatok jó értekeit már kevésbé befolyásolták a kezelések. Szívizom esetében a mért faktorok kevésbé mutattak látványos változásokat a kezelések hatására, jellemzően a mitokondriális minőség-kontrollért felelős Fis1-Mfn1 fehérjék mennyiségében volt növekedés megfigyelhető mindkét állatcsoportnál. Valamint az AMPK aktivitás esetében itt is hasonlóan negatív változás volt tapasztalható az LCR állatok esetében, mint a vázizom eredményeinél.

Edzéshatásra általánosságban pozitív változások voltak tapasztalhatóak, míg rezveratrol hatására a változások genetikafüggő különbséget mutatott.

7. Összefoglalás:

Futási képességeik alapján mesterségesen szelektált, és szaporított patkány populációk (alacsony aerob teljesítményű- LCR, illetve magas aerob teljesítményű- HCR állatok) álltak rendelkezésünkre a genetikailag determinált különbségek tesztelésére. Kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja egy 12 hetes futószalagos edzésprogram, és/vagy a rezveratrol adagolás az eltérő genetikával bíró patkányok fiziológiai paramétereit. Az edzés hatás mindkét csoport esetében jelentősen növelte a futási teljesítményt, ezzel szemben a rezveratrol önmagában nem volt egyértelműen hatásos az aerob teljesítmény befolyásolásában. Az állatok gastrocnemius izmát feldolgozva 15, a mitokondriális biogenezis szempontjából meghatározó faktort, illetve azok kezelésre történő változásait vizsgáltuk. Rezveratrol adagolás hatására az AMPK, SIRT1, és a TFAM nőtt a HCR-, ellenben csökkent az LCR állatok esetében. A mitokondriális fizió-, illetve fúziós fehérjék szintje alapvetően jóval alacsonyabb volt az LCR állatok esetében, de az edzés és a rezveratrol együttes hatására szintjük megemelkedett, és elérte a HCR állatok esetében mért szintet. Hasonló eredményt tapasztaltunk a mtDNS mennyiségi összehasonlítása során is.

Szívizom esetében vizsgálva a mitokondriális biogenezis faktorait hasonló megfigyeléseket tehattünk, bár kevesebb faktor esetében jött létre szignifikáns változás a 12 hetes kezelés hatására. Edzés hatására a Fis1, Mfn1 fehérjék mennyisége emelkedett mindkét állat csoport esetében, míg HCR állatoknál az SDHA szintje is jelentősen nőtt. Ezzel szemben az AMPK aktivitás csökkent az LCR állatoknál edzés hatására. A rezveratrol adagolásnak jótékony hatása nem volt kifejezett, bár HCR állatoknál növelte az SDHA mennyiségét, ellenben az LCR csoport esetén csökkentette a TFAM mennyiségét. A két kezelés együttes hatása a HCR állatok esetében volt megfigyelhető a PGC1 α , valamint az AMPK aktivitás növelésében.

Összességében úgy tűnik, hogy míg az edzés hatás mindkét genetika esetében jótékony változásokat eredményez, addig a rezveratrol hatása erőteljesen különbözik az eltérő genetikával bíró csoportoknál.

8. Summary:

There is strong statistical association between low aerobic exercise capacity and increased risk for development of complex diseases that remains mechanistically unresolved. Low capacity runner (LCR) and high capacity runner (HCR) rats have been developed by divergent artificial selection for treadmill endurance running capacity as a model system to explore the aerobic biology-disease connection. Here we test if 12 weeks of treadmill exercise training and/or resveratrol can retrieve the low running performance of the LCR and enhance performance in HCR. Training increased running performance in both strains but resveratrol alone did not change running performance in either strain. Resveratrol degraded running performance in trained LCR and increased running performance in trained HCR. Resveratrol increased performance on a test of forearm gripping strength in HCR but had no effect in LCR. Activities of 15 factors that regulate mitochondrial biogenesis and differentiation from gastrocnemius muscle were interrogated for explanation. AMPK, SIRT1, and TFAM increased in HCR and decreased in LCR by resveratrol. Mitochondrial fission and fusion levels were significantly lower in LCR rats and increased to levels not different from HCR by exercise and resveratrol. mtDNA was lower in LCR compared to HCR, and was increased by resveratrol given alone or in combination with training HCR group. In case of myocardium- factors of mitochondrial biogenesis shows less, but similar changes then in skeletal muscle. Fis1 and Mfn1 levels altered in both group-, and SDHA level in HCR group by exercise. But in case of LCR group exercise decreased the activity of AMPK. The effect of resveratrol wasn't so pronounced, although it increased SDHA content in HCR rats, but decreased TFAM level in LCR rats. The two treatment together had positive effect on PGC1 α level, and AMPK activity in case of HCR animals, but not in LCR.

Thus, it appears that although exercise could be an effective treatment for both group, ergogenic responses to resveratrol can be influenced differentially by heritable determinants of exercise performance.

9. Irodalomjegyzék:

Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, and Verdin E. (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*, 282: 33583-33592.

Andersen LB. (1995) Physical activity and physical fitness as protection against premature disease or death. *Scand J Med Sci Sports*, 5: 318-328.

Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, and Ciriolo MR. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*, 285: 21590-21599.

Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin, II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, and Spiegelman BM. (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab*, 1: 259-271.

Barthel A, Schmoll D, Kruger KD, Bahrenberg G, Walther R, Roth RA, and Joost HG. (2001) Differential regulation of endogenous glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by the forkhead transcription factor FKHR in H4IIE-hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 897-902.

Batsis JA, Nieto-Martinez RE, and Lopez-Jimenez F. (2007) Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 82: 509-524.

Baur JA, Sinclair DA. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5: 493-506.

Beal MF. (2005) Oxidative damage as an early marker of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 26: 585-586.

Beary M, Hodgson R, and Wildgust HJ. (2012) A critical review of major mortality risk factors for all-cause mortality in first-episode schizophrenia: clinical and research implications. *J Psychopharmacol.*,

Birkenkamp KU, Coffey PJ. (2003) Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochem Soc Trans*, 31: 292-297.

Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekstrom TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, and Feinberg AP. (2008) Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA*, 299: 2877-2883.

Booth FW, Thomason DB. (1991) Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev*, 71: 541-585.

Bori Z, Zhao Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos, II, Terzis G, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Draganidis D, Boldogh I, and Radak Z. (2012) The effects of aging, physical training, and a single bout of exercise on mitochondrial protein expression in human skeletal muscle. *Exp Gerontol.*,

Bota DA, Davies KJ. (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion*, 1: 33-49.

Bowman TA, Ramakrishnan SK, Kaw M, Lee SJ, Patel PR, Golla VK, Bourey RE, Haram PM, Koch LG, Britton SL, Wisloff U, Lee AD, and Najjar SM. (2010) Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance and steatosis in rats with low aerobic capacity. *Endocrinology*, 151: 5157-5164.

Bravata DM, Smith-Spangler C, Sundaram V, Gienger AL, Lin N, Lewis R, Stave CD, Olkin I, and Sirard JR. (2007) Using pedometers to increase physical activity and improve health: a systematic review. *JAMA*, 298: 2296-2304.

Canto C, Auwerx J. (2010) AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*, 67: 3407-3423.

Canto C, Auwerx J. (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 20: 98-105.

Cejudo P, Bautista J, Montemayor T, Villagomez R, Jimenez L, Ortega F, Campos Y, Sanchez H, and Arenas J. (2005) Exercise training in mitochondrial myopathy: a randomized controlled trial. *Muscle Nerve*, 32: 342-350.

Chale-Rush A, Guralnik JM, Walkup MP, Miller ME, Rejeski WJ, Katula JA, King AC, Glynn NW, Manini TM, Blair SN, and Fielding RA. (2010) Relationship between physical functioning and physical activity in the lifestyle interventions and independence for elders pilot. *J Am Geriatr Soc*, 58: 1918-1924.

Chan DC. Mitochondrial dynamics in disease. (2007) *N Engl J Med*, 356: 1707-1709.

Cohen MM, Leboucher GP, Livnat-Levanon N, Glickman MH, and Weissman AM. (2008) Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*, 19: 2457-2464.

Coleman R, Weiss A, Finkelbrand S, and Silbermann M. (1988) Age and exercise-related changes in myocardial mitochondria in mice. *Acta Histochem*, 83: 81-90.

Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, and Carrier MJ. (2001) Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, 414: 863-864.

Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church TS, Jubrias SA, Conley KE, and Smith SR. (2009) Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E117-126.

Croteau DL, Stierum RH, and Bohr VA. (1999) Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res*, 434: 137-148.

Csiszar A. (2011) Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1215: 117-122.

Das S, Das DK. (2007) Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2: 133-138.

Davies KJ. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 61: 1-31.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, and Packer L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107: 1198-1205.

Dimauro S and Davidzon G. (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*, 37: 222-232.

Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, Conti V, Stiuso P, Boccuti S, Rengo G, Rossi F, and Filippelli A. (2008) Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res*, 11: 139-150.

Ferreira I, Twisk JW, Stehouwer CD, van Mechelen W, and Kemper HC. (2003) Longitudinal changes in $\dot{V}O_2\text{max}$: associations with carotid IMT and arterial stiffness. *Med Sci Sports Exerc*, 35: 1670-1678.

Finck BN, Kelly DP. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, 115: 2540-2548.

Fulco M, Sartorelli V. (2008) Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell Cycle*, 7: 3669-3679.

Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, and Sartorelli V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, 12: 51-62.

Garnier A, Fortin D, Zoll J, N'Guessan B, Mettauer B, Lampert E, Veksler V, and Ventura-Clapier R. (2005) Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J*, 19: 43-52.

Gleyzer N, Vercauteren K, and Scarpulla RC. (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol*, 25: 1354-1366.

Goel K, Thomas RJ, Squires RW, Coutinho T, Trejo-Gutierrez JF, Somers VK, Miles JM, and Lopez-Jimenez F. (2011) Combined effect of cardiorespiratory fitness and adiposity on mortality in patients with coronary artery disease. *Am Heart J*, 161: 590-597.

Gottlieb RA, Finley KD, and Mentzer RM, Jr. (2009) Cardioprotection requires taking out the trash. *Basic Res Cardiol*, 104: 169-180.

Gredilla R, Bohr VA, and Stevnsner T. (2010) Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. *Exp Gerontol*, 45: 478-488.

Guarente L. (1999) Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet*, 23: 281-285.

Guarente L. (1999) Mutant mice live longer. *Nature*, 402: 243, 245.

Guarente L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*, 14: 1021-1026.

Gurusamy N, Lekli I, Gherghiceanu M, Popescu LM, and Das DK. (2009) BAG-1 induces autophagy for cardiac cell survival. *Autophagy*, 5: 120-121.

Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, and Guarente L. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, 126: 941-954.

Handel AE and Ramagopalan SV. (2010) Is Lamarckian evolution relevant to medicine? *BMC Med Genet*, 11: 73.

Hardie DG. (2008) Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett*, 582: 81-89.

Harman D. (1972) The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc*, 20: 145-147.

Hildebrandt AL, Pilegaard H, and Neufer PD. (2003) Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285: E1021-1027.

Holloszy JO, Coyle EF. (1984) Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol*, 56: 831-838.

Holme AL, Pervaiz S. (2007) Resveratrol in cell fate decisions. *J Bioenerg Biomembr*, 39: 59-63.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, and Sinclair DA. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425: 191-196.

Huang JP, Huang SS, Deng JY, Chang CC, Day YJ, and Hung LM. (2010) Insulin and resveratrol act synergistically, preventing cardiac dysfunction in diabetes, but the advantage of resveratrol in diabetics with acute heart attack is antagonized by insulin. *Free Radic Biol Med*, 49: 1710-1721.

Hung LM, Su MJ, and Chen JK. (2004) Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 36: 774-781.

Imai S, Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Park PU, and Guarente L. (2000) Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65: 297-302.

Jeninga EH, Schoonjans K, and Auwerx J. (2010) Reversible acetylation of PGC-1: connecting energy sensors and effectors to guarantee metabolic flexibility. *Oncogene*, 29: 4617-4624.

Kant AK, Graubard BI. (2005) A comparison of three dietary pattern indexes for predicting biomarkers of diet and disease. *J Am Coll Nutr*, 24: 294-303.

Kayar SR, Conley KE, Claassen H, and Hoppeler H. (1986) Capillarity and mitochondrial distribution in rat myocardium following exercise training. *J Exp Biol*, 120: 189-199.

Kelly DP, Scarpulla RC. (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*, 18: 357-368.

Kemi OJ, Hoydal MA, Haram PM, Garnier A, Fortin D, Ventura-Clapier R, and Ellingsen O. (2007) Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. *Cardiovasc Res*, 76: 91-99.

Kiss C, Poor G, Donath J, Gergely P, Jr., Paksy A, Zajkas G, and Antal M. (2003) Prevalence of obesity in an elderly Hungarian population. *Eur J Epidemiol*, 18: 653-657.

Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Rinnankoski-Tuikka R, Purhonen T, Ketola T, Pullinen K, Vuento M, Mutanen N, Sartor MA, Reunanen H, Koch LG, Britton SL, and Kainulainen H. (2010) Gene expression centroids that link with low intrinsic aerobic exercise capacity and complex disease risk. *FASEB J*, 24: 4565-4574.

Knutti D, Kralli A. (2001) PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*, 12: 360-365.

Koch LG, Britton SL. (2001) Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*, 5: 45-52.

Koch LG, Britton SL, Barbato JC, Rodenbaugh DW, and DiCarlo SE. (1999) Phenotypic differences in cardiovascular regulation in inbred rat models of aerobic capacity. *Physiol Genomics*, 1: 63-69.

Koch LG, Kemi OJ, Qi N, Leng SX, Bijma P, Gilligan LJ, Wilkinson JE, Wisloff H, Hoydal MA, Rolim N, Abadir PM, van Grevenhof EM, Smith GL, Burant CF, Ellingsen O, Britton SL, and Wisloff U. (2011) Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. *Circ Res*, 109: 1162-1172.

Koltai E, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, Nyakas C, and Radak Z. (2010) Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev*, 131: 21-28.

Kreider RB, Serra M, Beavers KM, Moreillon J, Kresta JY, Byrd M, Oliver JM, Gutierrez J, Hudson G, Deike E, Shelmadine B, Leeke P, Rasmussen C, Greenwood M, Cooke MB, Kerksick C, Campbell JK, Beiseigel J, and Jonnalagadda SS. (2011) A structured diet and exercise program promotes favorable changes in weight loss, body composition, and weight maintenance. *J Am Diet Assoc*, 111: 828-843.

Kurdi M and Booz GW. (2011) Focus on mitochondria dysfunction and dysregulation in heart failure: towards new therapeutic strategies to improve heart function. *Congest Heart Fail*, 17: 255-256.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, and Auwerx J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 127: 1109-1122.

Lavu S, Boss O, Elliott PJ, and Lambert PD. (2008) Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 841-853.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, and Kelly DP. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*, 106: 847-856.

Lehman JJ, Boudina S, Banke NH, Sambandam N, Han X, Young DM, Leone TC, Gross RW, Lewandowski ED, Abel ED, and Kelly DP. (2008) The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295: H185-196.

Lehman JJ and Kelly DP. (2002) Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail Rev*, 7: 175-185.

Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, Courtois M, Wozniak DF, Sambandam N, Bernal-Mizrachi C, Chen Z, Holloszy JO, Medeiros DM, Schmidt RE, Saffitz JE, Abel ED, Semenkovich CF, and Kelly DP. (2005) PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol*, 3: e101.

Li H, Xia N, and Forstermann U. (2012) Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*, 26: 102-110.

Li L, Muhlfeld C, Niemann B, Pan R, Li R, Hilfiker-Kleiner D, Chen Y, and Rohrbach S. (2011) Mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle. *Basic Res Cardiol*, 106: 1221-1234.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, and Spiegelman BM. (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418: 797-801.

Lombard DB, Schwer B, Alt FW, and Mostoslavsky R. (2008) SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing. *J Intern Med*, 263: 128-141.

Luciakova K, Sokolikova B, Chloupkova M, and Nelson BD. (1999) Enhanced mitochondrial biogenesis is associated with increased expression of the mitochondrial ATP-dependent Lon protease. *FEBS Lett*, 444: 186-188.

Matlib MA, Rembert JC, Millard RW, Ashraf M, Rouslin W, Asano G, Greenfield JC, Jr., and Schwartz A. (1983) Mitochondrial function in canine experimental cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 15: 221-232.

Matsushima Y, Goto Y, and Kaguni LS. (2010) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 18410-18415.

McCord JM, Fridovich I. (1986) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 243: 5753-5760.

Mensink M, Hesselink MK, Russell AP, Schaart G, Sels JP, and Schrauwen P. (2007) Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 alpha and PPAR beta/delta gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes (Lond)*, 31: 1302-1310.

Murakami T, Shimomura Y, Fujitsuka N, and Sugiyama S. (1995) Differential adaptation to endurance training between heart and gastrocnemius muscle mitochondria in rats. *Biochem Mol Biol Int*, 36: 285-290.

Nagoshi T, Yoshimura M, Rosano GM, Lopaschuk GD, and Mochizuki S. (2011) Optimization of cardiac metabolism in heart failure. *Curr Pharm Des*, 17: 3846-3853.

Nagy A, Adany R, and Sandor J. (2011) Effect of diagnosis-time and initial treatment on the onset of type 2 diabetes mellitus complications: a population-based representative cross-sectional study in Hungary. *Diabetes Res Clin Pract*, 94: e65-67.

Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare OC, Chen S, Ren X, Wu Z, Streeper RS, and Bordone L. (2010) SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J Biol Chem*, 285: 31995-32002.

Nemoto S, Fergusson MM, and Finkel T. (2005) SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem*, 280: 16456-16460.

Ngo JK, Davies KJ. (2009) Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic Biol Med*, 46: 1042-1048.

Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, and Perry G. (2006) Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2006: 82323.

Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, and Holloszy J. (2002) Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E1040-1045.

Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, and Hausenloy DJ. (2010) Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 121: 2012-2022.

Otera H, Mihara K. (2011) Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small Gtpases*, 2: 167-172.

Pallas M, Casadesus G, Smith MA, Coto-Montes A, Pelegri C, Vilaplana J, and Camins A. (2009) Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res*, 6: 70-81.

Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, and Mancuso M. (2007) Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep*, 27: 87-104.

Pevear DC, Oh CK, Cunningham LL, Calenoff M, and Jubelt B. (1990) Localization of genomic regions specific for the attenuated, mouse-adapted poliovirus type 2 strain W-2. *J Gen Virol*, 71 (Pt 1): 43-52.

Pourageaud F and Freslon JL. (1996) Effects of nitric oxide and sodium nitroprusside on the intrinsic elastic properties of pressurized rat coronary artery. *Fundam Clin Pharmacol*, 10: 136-143.

Puigserver P. (2005) Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond)*, 29 Suppl 1: S5-9.

Pujadas E, Feinberg AP. (2012) Regulated noise in the epigenetic landscape of development and disease. *Cell*, 148: 1123-1131.

Quadrilatero J, Alway SE, and Dupont-Versteegden EE. (2011) Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Appl Physiol Nutr Metab*, 36: 608-617.

Radak Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, and Goto S. (2004) Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*, 18: 749-750.

Rasbach KA, Gupta RK, Ruas JL, Wu J, Naseri E, Estall JL, and Spiegelman BM. (2010) PGC-1alpha regulates a HIF2alpha-dependent switch in skeletal muscle fiber types. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 21866-21871.

Rimbaud S, Garnier A, and Ventura-Clapier R. (2009) Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol Rep*, 61: 131-138.

Rimbaud S, Sanchez H, Garnier A, Fortin D, Bigard X, Veksler V, and Ventura-Clapier R. (2009) Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J Mol Cell Cardiol*, 46: 952-959.

Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, and Puigserver P. (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett*, 582: 46-53.

Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R, and Sandri M. (2010) Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*, 29: 1774-1785.

Rottgers K, Zufall N, Guiard B, and Voos W. (2002) The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*, 277: 45829-45837.

Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, and Deriaz O. (2003) Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*, 52: 2874-2881.

Sack MN, Kelly DP. (1998) The energy substrate switch during development of heart failure: gene regulatory mechanisms (Review). *Int J Mol Med*, 1: 17-24.

Scarpulla RC. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 1269-1278.

Scarpulla RC. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, 286: 81-89.

Scarpulla RC. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*, 88: 611-638.

Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nystrom T, and Osiewacz HD. (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol*, 9: 99-105.

Schwarzer M, Britton SL, Koch LG, Wisloff U, and Doenst T. (2010) Low intrinsic aerobic exercise capacity and systemic insulin resistance are not associated with changes in myocardial substrate oxidation or insulin sensitivity. *Basic Res Cardiol*, 105: 357-364.

Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchini E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW, and d'Amati G. (2007) Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*, 50: 1362-1369.

Shahbazian MD and Grunstein M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76: 75-100.

Shoubridge EA. The ABCs of mitochondrial transcription. (2002) *Nat Genet*, 31: 227-228.

Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, and Meisinger C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 13207-13212.

Sohal RS. (2002) Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radic Biol Med*, 33: 37-44.

Stuewe SR, Gwartz PA, Agarwal N, and Mallet RT. (2000) Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 32: 903-913.

Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, and Youle RJ. (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol*, 191: 1367-1380.

Taylor RW, Turnbull DM. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6: 389-402.

Thyfault JP, Rector RS, Uptergrove GM, Borengasser SJ, Morris EM, Wei Y, Laye MJ, Burant CF, Qi NR, Ridenhour SE, Koch LG, Britton SL, and Ibdah JA. (2009) Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *J Physiol*, 587: 1805-1816.

Timmons JA, Knudsen S, Rankinen T, Koch LG, Sarzynski M, Jensen T, Keller P, Scheele C, Vollaard NB, Nielsen S, Akerstrom T, MacDougald OA, Jansson E, Greenhaff PL, Tarnopolsky MA, van Loon LJ, Pedersen BK, Sundberg CJ, Wahlestedt C, Britton SL, and Bouchard C. (2010) Using molecular classification to predict gains in maximal aerobic capacity following endurance exercise training in humans. *J Appl Physiol*, 108: 1487-1496.

Ungvari Z, Sonntag WE, de Cabo R, Baur JA, and Csiszar A. (2011) Mitochondrial protection by resveratrol. *Exerc Sport Sci Rev*, 39: 128-132.

Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, and Cellierino A. (2006) Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol*, 16: 296-300.

Van der Blik AM. (2009) Fussy mitochondria fuse in response to stress. *EMBO J*, 28: 1533-1534.

Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, Das DK, Delmas D, Gottfried C, Lin HY, Ma QY, Mukhopadhyay P, Nalini N, Pezzuto JM, Richard T, Shukla Y, Surh YJ, Szekeres T, Szkudelski T, Walle T, and Wu JM. (2011) What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*, 6: e19881.

Watson PA, Reusch JE, McCune SA, Leinwand LA, Luckey SW, Konhilas JP, Brown DA, Chicco AJ, Sparagna GC, Long CS, and Moore RL. (2007) Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H246-259.

Wei YH, Lee HC. (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* (Maywood), 227: 671-682.

Westermann B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 872-884.

Williams RS, Garcia-Moll M, Mellor J, Salmons S, and Harlan W. (1987) Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *J Biol Chem*, 262: 2764-2767.

Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, and Britton SL. (2005) Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307: 418-420.

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

Youle RJ, Narendra DP. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12: 9-14.

Yu T, Robotham JL, and Yoon Y. (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 2653-2658.

10. Saját publikációk jegyzéke:

A tézis témájához kapcsolódó közlemények:

Hart N, Sarga L, Csende Z, Koltai E, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Kouretas D, Wessner B, Radak Z. (2013) Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. Food Chem Toxicol. [Epub ahead of print]

IF: 2.999

Koltai E, **Hart N**, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ, Radak Z. (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 303: R127-34. **IF: 3.336**

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények:

Radak Z, **Hart N**, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. (2010) Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 20(3):777-83.

IF: 4.261

Marosi K, Bori Z, **Hart N**, Sarga L, Koltai E, Radák Z, Nyakas C. (2012) Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of ageing rats. Neuroscience. 226:21-8.

IF: 3.380

Radak Z, Koltai E, **Hart N**, Szabo Z (2009) The role of reactive oxygen and nitrogen species in skeletal muscle In: Magalhaes J, Ascensao A (szerk.)

Muscle Plasticity: Advances in Biochemical and Physiological Research Karella: Research Signpost Karella, pp. 37-46.

Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Radák Zsoltnak, aki az elmúlt évek során sok hasznos gyakorlati és elméleti tudást adott át nekem, mindvégig segítette a munkámat és biztosította a lehetőséget és a feltételeket, hogy a kutatóintézetben dolgozhassak.

Továbbá szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Sporttudományi Kutatóintézet egykori és jelenlegi munkatársainak, hogy tudásuk átadásával, türelmükkel és bátorításukkal segítették kezdeti lépéseimet a tudományos kutatások világában.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Mustafa Atalaynak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a Koupio-i Egyetemen kutatómunkát végezhsek, és új módszereket sajátíthassak el.

Köszönöm ezen felül, Dr. Csende Zsolt, Varga Istvánné és a Sporttudományi Kutatóintézet összes dolgozójának áldozatkész segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindig mellettem álltak, segítettek a munkámban és támogattak a döntéseimben.