

A testedzés hatása a bél simaizmaira

Doktori tézisek

Bakonyi Péter

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem

Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Pankotai Tibor, egyetemi adjunktus, PhD

Bartusné Dr. Szmodis Márta, egyetemi tanár, PhD

Budapest

2024

1. Bevezetés

Az egészséges táplálkozás és rendszeres testmozgás elengedhetetlen egy kiegyensúlyozott élethez. A fizikai aktivitás komplexitását és jótékony hatásait nem lehet eléggé hangsúlyozni, mivel ezek szervezetünk minden működési területére pozitív hatással vannak. Az ugrásszerű tudományos és technológiai fejlődés gyökeresen megváltoztatta a mai ember életét. Régen az egyszerű napi teendők fárasztó, hosszadalmas munkát jelentettek, mára viszont mindent gépek végeznek helyettünk, "megspórolva" sok kalóriányi energiát. Gondoljunk csak a közlekedésre: régen hosszú sétákra volt szükség, hogy eljussunk valahová, ma pedig egyszerűen járműbe ülünk, és pillanatok alatt célba érünk.

Régen a levelek és üzenetek kézbesítése is hasonló módon történt. A mai generáció már nem ismeri a képeslapküldés élményét, mivel mindent pillanatok alatt elintézhettek a telefonjukról. A mindennapi teendőket átgondolva hamar belátjuk, hogy szinte mindent meg lehet oldani egy gombnyomással a fotelben ülve. E társadalmi fejlődés negatív hatásait tovább fokozza a könnyen hozzáférhető élelmiszerek mennyisége és minősége. A mindennapi étkezés ma már nem túlélési rizikófaktor, sokkal inkább a fogyasztói társadalom pótcselekvése, melynek célja nem a szükségletek kielégítése, hanem örömhormonok szerzése.

Ha összegezzük az átlagember csökkent energiaigényét és az ehhez kapcsolódó kalóriadús élelmiszereket, nem meglepő, hogy sok "népbetegség" van jelen, mint az elhízás, cukorbetegség, valamint kardiovaszkuláris és idegrendszeri megbetegedések.

A kényelmünket lehetővé tevő nagymértékű és hirtelen fejlődést az ember genetikája nem tudta ilyen léptekben követni. Szervezetünk, bár lassan, de hihetetlenül tökéletesen adaptálódott az ősember idejében, biztosítva a túlélést. Akkoriban az edzettség, mindennapos vándorlás és a tápanyagok hatékony lebontása vagy raktározása volt a túlélés kulcsa. Ehhez alkalmazkodott a gasztrointesztinális bélrendszer is, beleértve a mikrobiomnak nevezett baktériumok összességét és minőségét. Kezdetben, születéskor még nem rendelkezünk bélflórával; ennek kialakulása és minősége számos tényezőtől függ. Az életkorunk, táplálkozásunk, életvitelünk, szokásaink és a sportmozgás jelenléte mind befolyásoló tényezők. Kutatások kimutatták, mennyire fontos, hogy a gyermek anyatejet fogyasszon közvetlenül az édesanyja melléből, nem pedig tápszert cumisüvegen keresztül. Ez ugyanis befolyásolja a belső baktériumok összetételét, alakítva ezzel immunrendszerünk ellenállóképességét. Egy 70 kilogrammos emberi szervezetben körülbelül 2,5 kg baktérium található, ami tízszer annyi, mint ahány emberi sejt van benne. Egészséges szervezetben ezek a mikroorganizmusok a lehető legnagyobb alapossággal igyekeznek felhasználni a tápanyagot. Az ősidőkben a törzsek gyakran küzdöttek az élelemért, és

előfordult, hogy hirtelen jutottak sok ételhez, majd hetekig alig valamihez. Ezért a szervezet az el nem égetett ételmet zsírraktárakban tárolta a túlélés érdekében.

Ezért figyelhető meg a mai világban az az érdekes kettősség, hogy genetikai kódoltságunk nem mindig szolgálja a céljainkat. Azok az egyének, akiknek mikrobiomja optimális összetételű és működésű, szervezetük a lehető leghatékonyabban raktározza el a fel nem használt energiát. Ezzel szemben egy kevésbé hatékony mikroorganizmus összetétellel rendelkező egyén erre kevésbé képes. A szervezetünk elsődleges feladata a túlélés, amire be van kódolva. Ma azonban ez a mechanizmus hátrányosan hat, mivel már nem a szavannán élünk, és nem nehéz ételhez jutni, miközben mozgásszegény életmódunk miatt az energiaigényünk is alacsonyabb.

Számos kutatás alátámasztja a testedzés szisztematikus hatásait mind egészséges, mind betegségben szenvedő egyéneknél. A rendszeres mozgás nemcsak a szervezet teherbírását növeli, hanem jelentősen hozzájárul az immunrendszer ellenállóképességének növeléséhez, amely gyakran a gyomor-béltraktus megfelelő működésével kezdődik.

A gyógyszeripari reklámok és marketing is hangsúlyozzák a belső bélflóra megőrzésének fontosságát, speciálisan összeválogatott baktériumtörzseket tartalmazó termékekkel, mint a bifidus essensis vagy bifidus actiregularis. A humán mikrobiomról és a humán tápcsatornát benépesítő baktériumokról már régóta rendelkezünk ismeretekkel, de alaposabb vizsgálatok csak az elmúlt évtizedben, a molekuláris technológiák fejlődésével került előtérbe. 2007-ben indult el a Humán Mikrobiom Projekt a NIH (National Institutes of Health) támogatásával, hogy többet tudjunk meg a humán mikrobiomról, és választ kapjunk arra, hogy a mikrobiom révén befolyásolható-e az egészség és jobban megérthetők-e a betegségek kialakulásának okai.

A dolgozatom újszerűsége abban rejlik, miszerint bár számos alkalommal mértek különböző GI szegmensek aktivitásában bekövetkező változásokat stressznek, gyógyszernek, vagy valamilyen táplálkozási paraméternek a módosítása révén, azt, hogy a sportolás milyen hatással lehet a bélrendszer működésére, annak dinamikájára, egy kevésbé kutatott területnek számít. Ilyen komplex módon megvizsgálva a sportmozgás hatásait a motilitásra, a mikrobiomra, a kognitív funkciókra és egyéb fiziológiai paraméterekre, legjobb tudomásunk szerint eddig még kevésbé kutatott terület. Disszertációm egyik fő feladata ezen bonyolult folyamatoknak és azok komplexitásának, egymásra esetlegesen oda-vissza ható kölcsönhatásaiknak a jobb megértése, áttanulmányozása.

2. Célkitűzések

A doktori disszertációmban megfogalmazott vizsgálatok legfőbb célja, hogy feltárja az agy-testmozgás-bél-mikrobiom tengely fontosabb összefüggéseit. Feltételezésünk szerint a sportmozgás által kiváltott adaptív válasz nemcsak a tengely egyes részeire hathat külön-külön (amelyről már számos kutatás készült), hanem ezek együttesen, egymásra hatva, kölcsönösen oda-vissza ható kapcsolatban állnak. Tudomásunk szerint azonban mindezen összefüggéseket és komplexitásukat ilyen részletesen még nem vizsgálták. Ezért kutatásunk során biokémiai, morfológiai és fiziológiás vizsgálatokat is elvégeztünk az állatokon, hogy átfogóbb képet kapjunk és jobban megértsük ezeket a bonyolult folyamatokat és azok kihatásait a szervezetre és egymásra.

Disszertációm vizsgálatai két alapvető részre oszthatók. Kutatásunk első szakaszában humán alanyokon végeztünk vizsgálatokat, akik krónikus ér elzárásos (okklúziós) edzésmodszert alkalmaztak, és ennek hatására a vázizomban bekövetkező miRNS-mennyiségi változásokat tanulmányoztuk. Ezen kutatási eredmények alapján alakítottuk ki disszertációm második, markánsabb részének célkitűzéseit. Ebben a szakaszban állatmodellen vizsgáltuk a hosszú távú testmozgás hatását és annak komplex összetételét, különös tekintettel a bélrendszerre.

Hipotéziseinket ezek alapján a következőképpen fogalmaztuk meg:

Az állatmodelles vizsgálatnál feltételeztük, hogy:

1. Az önkéntesen végzett testmozgás változást idézhet elő a bél motilitásában.
2. Mindemellett az önkéntes testmozgás befolyásolja a mikrobiomot, megváltoztatni képes annak összetételét.
3. Feltételezünk egyfajta kapcsolatot, összefüggést a mikrobiom és a bélmotilitás, azok testmozgás által kiváltott alkalmazkodása, módosulása között
4. Valamint kapcsolatot feltételezünk az üres bél biokémiájával kapcsolatosan mért adatok és a mikrobiomnál előforduló baktériumok száma és eloszlása között

A humán vizsgálatnál feltételeztük, hogy:

1. Feltételeztük, hogy a krónikus testmozgás képes befolyásolni olyan miRNS-ek mennyiségi összetevőit, melyek a bélrendszerbe eljutva is képesek lehetnek kifejteni pozitív hatásukat.

3. Anyag és módszer

3.1. Önkéntes testmozgás vizsgálata állat modellen

3.1.1. Vizsgálati állatok

A kutatás során a tizennégy középkorú (11 hónap, súly: $(591.58 \pm 60.9\text{g})$ hím Sprague-Dawley (Charles-River Laboratórium, Budapest, Hungary) patkány két csoportra lett bontva. Egy kontroll (Control=C. $n=6$), valamint egy önkéntesen edző csoportra (Voluntary Exercise=VE, $n=8$). Az önkéntesen edző csoportnak állandó jelleggel futókereket biztosítottunk, a futási távolságokat pedig egy vezetékes kerékpár computer segítségével (MARWI 5 funkciós UNION-5N) minden nap ugyanabban az időpontban reggel feljegyeztük. Mielőtt az önkéntesen edző csoportot behelyeztük volna a futóketreceikbe felmértük a maximális oxigénfelvételt minden állatnak (VO_2max). A 6 hétnyi futás után mértünk az állatoknak Morris Maze vízi útvesztő tesztet, valamint ismét elvégeztük a VO_2max mérést, mely már egy Vita maxima terhelésnek minősült, közvetlenül utána pedig tejsavmérést hajtottunk végre farok vénából.

A vizsgálat során az állatokat kettesével helyeztük el külön-külön ketrecekben és a lakóhelységükben 12 óránkénti fény és sötétség váltakozást alkalmaztunk. Az állatok táplálék és folyadék ellátottsága ad libitum volt.

3.1.2. Morris maze teszt

A kognitív funkció, a térbeli tanulás mérésére a széles körben ismert Morris Maze vízi útvesztő tesztet alkalmaztam. A felmérést 5 egymás utáni napon végeztem el, közvetlenül az testmozgás programjának vége után. Egy 100 cm átmérőjű és 60 cm magas fekete, kör alakú medencében elhelyeztem egy 6 cm átmérőjű platformot, az észak-keleti negyed közepén. A medence vizének hőfoka 22-23 °C volt, a feltöltésének magassága pedig a platform fölé emelkedett 1 cm-rel, amíg el nem lepte azt. Először az állatokat a pihenésül szolgáló platformra raktam 30 másodpercre, hogy megismerjék annak pontos helyét a medencében, majd behelyeztem őket a lehetséges négy kezdőpont (észak, dél, nyugat, kelet) egyikébe. Innentől összesen 90 másodperc állt rendelkezésükre, hogy újból megtalálják a platformot. Abban az esetben, ha ez a másfél perc nem volt elegendő, hogy rátaláljanak a pihenő állomásra, manuálisan helyeztem őket oda további 30 másodpercre. Azt ezt követő, majd a harmadik és a negyedik kísérletek kezdőpontja az előzőekben nem alkalmazott 3 irány valamelyike volt. Minden állat esetében azonosan, pszeudorandom módon változtattam meg a kezdőpontok sorrendjét minden nap. A platform megtalálásához szükséges időt feljegyeztem, a napi négy ismétlés idejét átlagoltam, majd az öt nap során tapasztalt változásokat statisztikai módszerekkel elemeztem. A referencia

memória azon képesség, mely a hosszú távú memórián alapszik. Ennek kiszámítására a tesztnapok első társításait hasonlítjuk össze, míg a munka memória kiszámításához az összes kísérlet heti átlagait vettem számításba.

3.1.3. Maximális oxigénfelvétel mérése (VO₂max)

A familiarizációt minden állat esetében egy öt napos, napi tíz perces szoktató periódussal kezdtünk a motor hajtású futópadunkon (Columbus Inst. Columbus, Ohio). A pontos protokoll melyet alkalmaztunk megegyezik a régebbi kutatásainknál is alkalmazottal. Minden esetben 5%-os emelkedés volt beállítva a futópadon, a sebességet azonban fokozatosan növeltük 8 m/percről egészen 23 m/percig. A VO₂max felmérését minden állat esetében három kritérium alapján mértük fel: (i) a VO₂ nem változott a sebesség növelésekor, a patkányok már nem tartották meg a pozíciójukat a futópadon, és (iii) a légzési hányados ($RQ = VCO_2/VO_2$) > 1 volt.

3.1.4. Vita maxima teszt és tejsav mérés

Az testmozgás programjának végén a VO₂max felmérésénél a protokoll annyiban tért el az első alkalomtól, hogy az állatok a fokozatosan emelkedő terhelés mellett a végső fáradási pontig futottak, ameddig még képesek voltak normálisan megőrizni a helyzetüket a futópadon. Ezt követően a teszt után azonnal az állatok farka vénájából vérvételt végeztünk, majd a Nova Biomedical Lactate Plus tejsav mérő műszerrel tejsavmérést eszközöltünk.

3.1.5. Elektromiográf (EMG) mérés

A kutatásunkhoz legalkalmasabb mérési módszernek a Szűcs és munkatársai által is használt TENS elektróddal történő EMG mérési módszer bizonyult. Választásunk legfőbb oka az volt, hogy így nincs szükség egy szubkután felhelyezhető bipoláris elektrópár beműtésére. Ez ugyanis egy transzkután elektromos idegfelvételi felületi elektródák, mellyel egy teljesen fájdalommentes, non-invazív módszerrel mérhetjük a gyomor, a vékonybél és a vastagbél mioelektromos aktivitását egy időben, egyszerre. Továbbá többszöri újra felhasználhatóságot is kínál számunkra. A TENS elektródokat (Electrode PE Foam Solidgel, Bio Lead-Lok B Sp. Zo.o, Józsefów, Lengyelország) műtét nélkül, egy egyszerű szőrtelenítés után ragtapasszal (Leukoplaszt 5 cm, BSN medical GmbH, Hamburg, Németország) rögzítettük a bőrfelületre. Az elektródák megfelelő vezetőképességének biztosítása érdekében Ten20 EEG vezető gélt (Bio-Medical Instruments, USA) használtunk a bőrfelületen. A standard elektródapárokat (2 elektróda) a hasfal jobb és bal oldalán rögzítettük. Az GIT EMG méréseit 6 hét önkéntes testmozgás után végeztük el az önkéntesen edző csoporttal és a kontroll állatokkal egyidejűleg, stresszmentes körülmények között, 9:00 és 11:00 óra között szobahőmérsékleten (24 °C). Ezt

megelőzőleg 2 hetes familiarizációt alkalmaztunk minden állat esetében, hogy az EMG dobozok ne új környezetként kerüljenek bevezetésre, és a lehető legnyugodtabb méréseket tudjuk majd rögzíteni. Minden mérés előtt egyfajta „metabolikus ketrecként” ételmegvonásban is részesültek az állatok, hogy kizárjuk az emésztésből fakadó EMG jeleknek a rögzítését.

A vizsgált elektrofiziológiai paramétereket minimum 30 (de lehetőleg 90) percen keresztül rögzítettük, és egy online számítógépes jel felerősítő rendszerrel elemeztük, melynek 10 S.P.E.L. Advanced ISOSYS adatgyűjtő rendszer a pontos megnevezése (MDE GmbH, Walldorf, Németország). A minél hosszabb rögzítésre a lehető leghosszabb nyugalmi jelek detektálása miatt volt szükség, melyhez a későbbiekben egy digitálisan beépített vágó programot is használtunk. Az elektromiográfiás (EMG) jeleket először az MDE Kft. (Budapest, Magyarország) által tervezett egyedi erősítővel erősítettük. Az artefaktumok csökkentése érdekében kettős szűrőrendszert használtunk. Minden analóg jelet előszűrtünk egy elsőrendű Bessel-típusú aluláteresztő szűrővel, majd 2 Hz-es mintavételi frekvenciával, 80 dB/dekád meredekséggel digitális jelekké alakítottuk. Az előszűrt mioelektromos jeleket ezután Bessel-típusú sávszűrőkkel tovább szűrtük 0-30 ciklus per perc (cpm = contraction per minute) frekvenciával, 140dB/dekád meredekséggel. Mindegyik szűrő digitális IIR-szűrő volt. A rögzített jeleket Fast Fourier-transzformációval (FFT) elemeztük. Az elektromos aktivitás frekvenciáját cpm-ben jellemeztük, az aktivitás nagyságát pedig teljesítményspektrum-sűrűségként (PsD = power spectrum density) írtuk le. A fiziológiai paraméterek értelmezését illetően, ha az értékek egy standard eltérésnél nagyobbak voltak, akkor azokat kiugrónak tekintettük, ezért a korábban leírtak szerint kizártuk az elemzésből.

3.1.6. Biokémiai változások detektálására használt módszerek

Miután az testmozgás programja és az azt követő egyéb fiziológias tesztek is befejeződtek az állatok intraperitoneális ketamin (Richter, koncentráció: 100 mg/ml) /xylazine (Produlab Pharma, koncentráció: 20 mg/ml) altató injekcióval el lettek altatva, melyből 0.1 ml/10g testtömeg aránynak megfelelő dózisban részesültek, továbbá heparinizált, jéghideg sóoldattal transzkardiálisan perfundáltuk őket. A has felnyitása után ~5 mm nagyságú vastagbél gyűrűket gyorsan eltávolítottuk a vastagbél leszálló szakaszából, valamint ~20 mm nagyságúakat az ileocecalis csomópont alatt, a proximális régióban pedig a transzmissziós elektronmikroszkópos mintákhoz (TEM, n=5 csoportonként). Az érintetlen mitokondriumok és a teljes fehérje kivonathoz ~30 mm nagyságú vastagbél metszetet gyűjtöttünk.

3.1.7. Western blot molekuláris biológiai eljárás

A Western blot eljárás, egy olyan szemi-kvantitatív módszer, mely a különféle szövetmintákban fellelhető speciális fehérjék immunreakcióval való kimutatására alkalmas. Jelen kutatásomban a vastagbélben fellelhető különböző fehérjék mennyiségét vizsgáltam. A vastagbél középső részéből kinyert mintákat először Turrax homogenizátorral homogenizáltuk (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX DISPERSER 50/60Hz, Staufen im Breisgau, Németország) lízispuffer hozzáadásával (137mM NaCl, 1% NP 40, 10% glicerol, 20mM Tris 8.0 pH) jégen és hozzáadtunk még proteáz/foszfátáz inhibitorokat [Aprotinin (2µg/ml), Leupeptin (5µg/ml), PMSF (1mM), Na orthovanadát (1mM)]. Ezután 40 percig jégen rázattuk, majd 15000g-n centrifugáltuk a felülúszót pedig lepipettáztuk. A következő lépés a fehérje mérés volt, melyet a Bradford (BioRad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate) és Lowry protokollal végeztünk el. A mintákat triplikátumokban vittük fel, majd 595 nm hullámhosszon vizsgáltuk Multi Scan EX (Thermo Labsystem) géppel, ezután egységes koncentrációra hígítottuk őket. A minták hígítását 2X-es Laemli pufferrel végeztük, majd 5 percig 90 °C fokon melegítettük azokat. Az így keletkezett már vizsgálatra kész mintákat -80 °C fokon tároltuk. A feldolgozás során a mintákat mindig 10%-os Sodium Dodecil Sulfate-poliakrilamide gélelektroforézis (SDS-PAGE) gélekben vizsgáltuk, ahol az időtartam átlagosan 1-1,5 óra hosszúig tartott, konstans 150 V feszültség értéket alkalmazva. Az elektroforézis során Biorad markert (Biorad 1610374) alkalmaztunk. A zsebek feltöltése során a markernél 5 µl-t, a minták esetében pedig mindig egységesen 10 µl-t vittünk fel. A gélelektroforézis befejeztével egy előre méretre vágott PVDF membránt 1 percig metanolban aktiváltunk, majd 5 percre 20%-os metanos transzfer pufferbe áztattuk a blot papírral együtt, billentető eszközzel egybekötve. Ezután elvégeztük a fehérjék transzferálását a gélről a membránra, amely során egy a membránból, a gélből és a blot papírból álló úgy nevezett „szendvicset” helyeztünk a transzfer egységbe. Ennek a szendvicznek az elkészítése során minden összetevőjét 20% metanos transzfer pufferrel nedvesítettünk, hogy elkerüljük az egyes komponensek kiszáradását. A transzfert 1,5 órán keresztül végeztük konstans 30 V feszültségen. Ezt követően a membránt 1 percre Tris-pufferolt sóoldat-Tween 20 (TBST) oldatba helyeztük, a gél pedig 2 órára a billegtetőre gélfestő oldatba (50% metanol, 39,75% H₂O, 10% ecetsav, 0,25% Coomassie Brilliant Blue). A membránt az 1 perc lejárta után áthelyeztük 2 órára vagy 0,5-5%-os tejpórral vagy 5%-os BSA-val kombinált TBST-ben. Ezt a blokkolást 4 °C fokon végeztük el szintén a billegtetőn. Ezután a blokkolás során alkalmazott fehérjének megfelelő beoldott elsődleges antitesttel kezeltük a membránt egy éjszakán keresztül 4 °C fokon billegtetve (1. táblázat). A hígítását az elsődleges antitesteknek, mindig a célfehérjének megfelelő, antitestet gyártó cég utasításai alapján végeztük el. Másnap

reggel háromszor 20 percen keresztül TBST-vel ráztatva mostuk a membránt szobahőmérsékleten, hogy kiküszöböljük a nem specifikus kötődéseket. A következő feladat a másodlagos antitesttel való kezelés volt a membránon, melyet 4 °C fokon 2 órán keresztül végeztünk el egy billegetőn. Az inkubálás során tormaperoxidáz-konjugált egér, kecske és nyúl másodlagos antitesteket alkalmaztunk (Jackson 1:10000). Ezek után ismét a membrán mosása következett háromszor 20 perc TBST-vel szobahőmérsékleten ráztatással egybekötve. Miután a mosásokkal végeztünk a membránt tormaperoxidázzal inkubáltuk 1 percre fénytől védve, szintén szobahőmérsékleten. Az inkubált membránt ezután az AZURE 400 látható fluoreszcencia képalkotó műszer (1.7.6.1202-es verzió) segítségével előhívtuk, majd a megfelelő molekulásúlyoknál megjelenő csíkokat, melyek reprezentálják célfehérjéinket kiértékeljük. Ehhez a kiértékeléshez az ImageJ szoftvert használtuk, melynél a relatív denzitást mindig a „house keeping” fehérjére kalkuláltuk. Az utolsó lépésként a membránfestő oldattal (0,2% Coomassie Brilliant Blue, 45% metanol, 10% ecetsav, 44,8% H₂O) megfestettük a membránt, amit az előbb előhívott képekkel együtt szintén az ImageJ program segítségével kiértékelünk. A house keeping fehérje minden mérésünk esetében a tubulin volt.

3.1.8. Mitokondriális, citoszolikus és nukleáris frakciók preparálása

Scorrano és munkatársai által használt protokollt használtuk a frakcionálás során, kisebb módosításokat eszközölve. Az eljárás minden lépését 4 °C fokon végeztük el. A friss kötőszövet-, illetve zsírmentes vastagbéliszövetet 10 mM EDTA-val kiegészített jéghideg PBS-be merítettük, majd a lehető legkisebb darabokra daráltuk. Ezután a mintákat a Turrax homogenizátorral homogenizáltuk (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX DISPERSER 50/60Hz, Staufen im Breisgau, Németország). A minták feltárását 0,05%-os tripszinnel végeztük 30 percnyi enyhe rázogatással (200 rpm), majd 1000 g-n 5 percre centrifugáltuk. A pelletet 10-szeres mennyiségű IBm1 pufferben (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 0,2 % BSA és 0,067 M szukróz pH 7,4) újra szuszpendáltuk, és pár enyhe ütögetéssel homogenizáltuk annak tartalmát. Ezt a homogenátumot 10 percre 600 g-n 4 °C fokon centrifugáltuk. A sejtmag egy részét, beleértve a pelletet és a citoszolikus felülúszót is, egyéb Western blot elemzéshez tartogattuk. Az mintát ezután óvatosan kivettük a centrifugálóból, majd a felülúszót leszívtuk és külön egy új eppendorfba helyeztük át, mely a mitokondriális és citoszolikus részeket tartalmazta. Az alján maradt csapadékból egy csapott hegyű pipettával 100 µl-t új eppendorfba helyeztünk 20 µl NP40 lizáló pufferrel és 66 µl 4XSDS^{DDT} hozzáadásával a csomók elkerülése miatt. Ezt mind felsuszpendáltuk, finom ütögetésekkel összeráztuk, majd szonikátor segítségével 2 percre 3-4-es fokozaton még apróbb részalkotókra homogenizáltuk, amíg fehéres

világoskék színt nem kaptunk. Ezt követően 5 percig forraltuk 100 °C fokon, majd 14000 rpm sebességgel ismét lecentrifugáltuk. A felülúszót leszedve megkaptuk a Nukleáris frakciót, melyet -70 °C fokon későbbi felhasználásig tároltunk. A félretett mitokondriális, citoszolikus részeket tartalmazó eppendorffal a centrifugálási lépést megismételtük az IB ml puffer homogenizálása után, hogy jó minőségű intakt mitokondriumokat nyerjünk. Mindezt 8000 g-n (14000 rpm) 10 percig 4 °C fokon hajtottuk végre. A felülúszó citoszolikus részből 100 µl-t óvatosan áthelyeztük egy tiszta eppendorfba 20 µl NP40 lizáló pufferrel és 66 µl 4XSDS^{DDT} hozzáadásával. Ezután a már ismert módon felszuszpendáltuk, összeráztuk, szonikátorral 2 percig 3-4-es fokozaton homogenizáltuk, majd 5 percig forraltuk 100 °C fokon. Mindezek után pedig -70 °C fokon tároltuk későbbi felhasználásig. A mitokondriális pelletet a lehető legkevesebb mennyiségű IBm2 pufferben (10 mM Tris-HCl, 3 mM Tris-EGTA és 0,25 M szukróz pH 7,4) szuszpendáltuk. A fehérjekoncentrációt a már fentebb említett módon a Bradford-méréssel mértük.

3.1.9. Reaktív oxigén szabadgyök (ROS) termelődés vizsgálata

A mitokondriumokat (0,3 mg/ml) a kísérleti pufferoldatunkban (10 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM EGTA/Tris, 250 mM szukróz pH 7. 4) 1 µM Amplex Reddel (gerjesztés: 560 nm; emisszió: 584 nm) és torna-peroxidázzal (10 NE) kiegészítve inkubáltuk a ROS termelés értékeléséhez, a H₂O₂ által kiváltott fluoreszcencia monitorozásával. Mindezt Votyakova és munkatársainak egy korábbi kutatása alapján végeztük el, kisebb módosításokkal végrehajtva. Miután felmértük az alap ROS képződést, 10 mM szukcinát (Suc) és/vagy 1 µM rotenon került hozzáadásra. Szukcinát szubsztrát esetén a ROS-termelés az 1-es komplex szintjén a fordított elektronáramlással összefüggő ROS-termeléssel együtt fog növekedni. Ennek bevlésére a rotenonnal való gátlást használtuk. Ez utóbbi esetében a rotenon hozzáadásának kettő lehetséges hatása van az I. komplex szintjén: A ROS termelődés növekedése az előrefele irányuló elektronáramláshoz köthető, míg annak csökkenése pedig a visszafele áramló elektronokkal. A hidrogén peroxid (H₂O₂) termelés kalibrálását általunk ismert mennyiségű H₂O₂ hozzáadásával értük el. A fluorimetriás vizsgálatokhoz a Fluorskan Ascent FL fluorimétert használtunk 30 °C fokon a 96 lyukból álló lemezekben. Minden pontot triplikátumokban mértünk.

3.1.10. 16sRNS génamplikon szekvenálás

A mikrobiomra jellemző sajátosságokat az állatok fécesz mintájának elemzésével vizsgáltuk meg, amely a SeqOmics Kft.-vel való kollaboráció során valósult meg. Ez az eljárás módszertanában megegyező egy korábbi humán kutatásunkéval, ahol sportoló és inaktív

személyek mikrobiom elemzését hajtottuk végre COVID-19 fertőzés ideje alatt, illetve az után. Mind a bélmintákat, mind a frissen begyűjtött fécesz mintákat az eltávolítás után azonnal folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk, majd a hosszútávú tárolás érdekében -80°C fokon tároltuk. Minden minta esetében a DNeasy PowerSoil kit segítségével izoláltuk a teljes DNS-t a gyártó által meghatározott protokoll szerint (kat. sz. 12888-100; Qiagen GmbH, Hilden, Németország). A 16S rRNS gén V3-V4 régióit Polimerációs láncreakciós módszerrel (PCR) amplifikáltuk a következő primerek segítségével: 16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGTCAGATGTGTGTATAAGAGAGACAGCCTACGGGNGGGC WGCAG, és 16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'-GTCTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTGTGTATAAGAGAGACAGGACTACHVGGGT ATCTAATCC

Az Illumina MiSeq szekvenáláshoz szükséges DNS könyvtárat a Nextera XT DNS-könyvtárkészítő készlet (Illumina Inc., CA, USA) segítségével állítottuk elő szintén a gyártó protokollja alapján. A DNS könyvtár szekvenálását az Illumina MiSeq 2×300 bp platformon végeztük a MiSeq v3 Reagent Kit (Illumina Inc., CA, USA) használatával, a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvenálásokat a további elemzések előtt mintánként 10 000 olvasásra korlátoztuk.

3.1.11. Caveolák transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálata

A metszetek elkészítésében az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Biológiai Intézetének az Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék munkatársai voltak segítségünkre.

A TEM vizsgálathoz a mintákat módosított Carnovsky-fixálóba (3,2% PFA, 0,2% glutaraldehyd, 1% szacharóz, 40 mM CaCl_2 0.1M kakodilát puffer) helyezve 24 órán át 4°C -on fixáltuk. Ezután mielőtt az utófixálásként szolgáló 5%-os glutaraldehydben / 0,1 M kakodilát pufferbe kerültek volna 12 órára 4°C -on, minden mintát két egyenlő részre vágunk a midsagittális síkban. A dehidratálást propilén-oxiddal telített, fokozatosan adagolt etanol hozzáadásával értük el. Mielőtt Spurr alacsony viszkozitású epoxigyantába ágyaztuk volna a szöveteket, azok integritását és orientációját a 0,8-1 μm -es félvékony metszeteiken leellenőriztük. Minden szegmensből 2 miniblokk (1 mm^2) került kivágásra. Az „E” miniblokk a teljes nyálkahártyát (epithelium, lamina propria, muscularis mucosa), míg az „M” miniblokk a submucosa, muscularis propria és serosa rétegeket tartalmazta. Az "E" miniblokkokat (2/állat, 10/állat csoportonként) a hámsejtek morfológiai vizsgálatára, míg az "M" miniblokkokat a caveola mennyiségének számszerűsítésére használtuk fel a körkörös izomréteg (CML) legbelső simaizomsejtjeiben (SMC). Miniblokkonként 6 db 50-60 nm ultravékony metszet vágunk ki a

Reichert OMU3 ultramikrorotomban, majd Formwar (Agar Sci., Essex, UK) bevonatú réz résrácsra gyűjtöttük. Az egyes részek megfestéséhez uránil-acetátot és Reynolds ólom-citrátot használtunk. A morfometriához Morada 11 megapixeles kamerával (Olympus) felszerelt JEOL JEM 1011 transzmissziós elektronmikroszkópot alkalmaztunk. A caveolák számának elemzéséhez a legbelső rétegből származó SMC sejtek közül választottunk 2-2 egymással szomszédosat, mindig különböző szelvényekből (4 SMC/állat 2 különböző helyen). A mikrofelvételek azonos nagyítással (x 30 000) készültek és a kiválasztott teljes SMC hosszt lefedték. A plazmalemma hosszát (C – 386467,82±160708,19 nm, VE – 414775,53±226673,91 nm) és a caveolák számát (C – 16,24±1,24 µm, VE – 24,14±2,67 µm) az iTEM szoftver mérési funkciójával határoztuk meg.

3.1.12. Morfológiai mérések

A mitokondriumok és vezikulák morfológiai mérését az APEER Online Machine Learning Platform segítségével vizsgáltuk, a Zeiss és a Fiji programok által. A megkülönböztethető mitokondriumokat és vezikulákat korábbi felmérés alapján egy definiált „mélytanulási” módszerrel (deep learning) követtük nyomon a felnőtt patkányok vastagbélmintáin (5 állat/csoport, 3-4 független kép 20 000×-es nagyításban), egy már előre meghatározott morfológiai beállítással kezelve. Az Apeer program által vezérelt mélytanulás három különböző csoportot hozott létre a mitokondriumok egyes osztályai között, azok morfológiai megjelenése alapján: Az „A csoportban” helyezkedtek el a normális, sűrű mátrixsal benne párhuzamos, keskeny cristákkal rendelkező mitokondriumok; a „B csoport” esetében a rendezetlen mitokondriumokról beszélhetünk, ahol a mátrix még ugyan mindig sűrű, de már rendezetlen cristák, és egyes lipidcseppek is találhatóak; a „C csoportban” pedig a duzzadt mitokondriumok vannak, ahol a cristáknak és a mátrix sűrűségének széles kiterjedésében vagy teljes egészében a hiányáról, a belső szerkezet jelentős elvesztéséről számolhatunk be. A kérdéses mitokondriumokat és/vagy vezikulákat újraértékeltek. Az így kapott eredményeinket először a Fiji programba átexportáltuk, majd annak segítségével megkaptuk a következő paramétereket: relatív mitokondriális és vezikuláris terület, mitokondriális méret; kerület; aspect ratio (AR, hossz-szélesség arány) mint $[(\text{nagy tengely})/(\text{kis tengely})]$; formafaktor (FF, a mitokondriumok komplexitási aspektusát tükrözi) mint $[(\text{kerület}^2)/(4\pi * \text{felület})]$. A további adatelemzéshez a kiszámított értékeket a Prism 6 (GraphPad Software) programba importáltuk. A statisztikai szignifikanciát az átlag 95%-os konfidenciaintervalluma (C.I.) alapján értékeltük.

3.2. Krónikus okklúziós módszer alkalmazása human modellen

3.2.1. Vizsgálati személyek

A vizsgálatunkra 22 egészséges fiatal férfi jelentkezett önként. Ezután véletlenszerűen két egyenlő csoportba osztottuk az alanyokat, egy okklúziós (O – életkor: 23.9 ± 1.7 év, testsúly: 77 ± 8.9 kg, magasság: 182.3 ± 7.8 cm, terhelési egység: 82.2 ± 18.6 kg) és egy kontroll (C – életkor: 24.1 ± 6.1 év, testsúly: 81.3 ± 6 kg, magasság: 184.5 ± 7.2 cm, terhelési egység: 86.7 ± 12.9 kg) csoportra. Minden résztvevő részletes tájékoztatást kapott a vizsgálat céljáról és annak eljárásairól. A kutatás megkezdése előtt mindenki átesett egy orvosi vizsgálaton, valamint kitöltöttek egy orvosi kérdőívet is, mellyel így kizártunk minden kardiológiai, metabolikus, neurológiai vagy mozgásszervi rendellenességet. Minden eljárást jóváhagyott a Testnevelési Egyetem Etikai Bizottsága (ET-KEB/No8/2017), és a kutatás a Helsinkii Nyilatkozat előírásai szerint zajlott. Minden résztvevőnek felmértük az edzésprogram előtt, illetve után a maximális erejét és az erő állóképességét. Történt ezeken kívül szintén kétszer mikro izombiopszia mintavétel is, melyeket a későbbiekben laborunkban analizáltuk.

3.2.2. Maximális erő felmérése

Az okklúziós edzésprogram megkezdése előtt egy héttel minden alany maximális erőfelmérésen vett részt, melyet egy guggoló keretben, rögzített pályán hajtottak végre a sérülések megelőzése érdekében. Minden alany számára már ismert mozgás volt a guggolás, valamint végeztek már korábban hasonló erőedzéseket. A maximális erő felmérése a három ismétléses maximum (3RM) teszttel történt, a National Strength and Conditioning Association irányelvei szerint vizsgálták. A tesztet egy 10 perces kerékpár ergométeren végzett bemelegítés előzte meg. A vizsgálati fázisban a résztvevők tíz ismétlést végeztek a testsúlyuk felének megfelelő ellenállással. Ezt egy 4-6 ismétlésből álló sorozat követte teljes testsúllyal. Az utolsó szakasznál az önkénteseknek négy alkalomuk volt a 3RM elérésére. Az így elért érték az egy ismétléses maximum (1RM) 90-93%-aként definiálható. A terhelést fokozatosan növeltük, és a próbák között legalább két, de maximum 5 perces pihenőidőt alkalmaztunk. Sikeresnek akkor volt tekinthető egy ismétlés, amennyiben nem volt szükség külső segítségre a súly megmozgatásához, továbbá, ha a comb a talajjal párhuzamos helyzetet ért el.

3.2.3. Terhelési protokoll

Három nappal az utolsó mikro izombiopszia mintavétel után és négy nappal az első edzés előtt megmértük a maximális erőt a 3RM teszttel. Két pihenőnap után erő állóképességi tesztet

eszközöltünk, ahol a terhelést az 1RM 70%-ának megfelelő ellenállásban határoztunk meg, teljes guggolásos erőfelméréssel. Mindezt a négyhetes edzések előtt, illetve után végeztük el.

3.2.4. Biopszia mintavétel

Az edzésprogram megkezdése előtt 3 nappal vettük az első mikro izombiopszia mintákat a vizsgálati személyektől, a másodikat pedig az edzésprogram lejárta után 24 órával. A biopszia kinyerése egy félautomata tűvel (EASY-RAM 14Gauge 100 mm (hossz) helyi fájdalomcsillapítás (20 mg/ml lidokain-hidroklorid; EGIS, Budapest, Magyarország) alkalmazásával történt, szakképzett személy által a jobb oldali vastus lateralis izomból. Ezután egyből az izommintákat PBS pH 7,4-es oldattal lemostuk, majd folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk. A későbbi miRNS mérések idejéig pedig -80 C°-on tároltuk.

3.2.5. RNS kitermelés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) a mikroRNS átíratok vizsgálatához

A minták miRNS méréséhez Kvantitatív valós idejű polimerációs láncreakciós módszert (qRT-PCR) alkalmaztunk. Az 5-10 mg nagyságú izomdarabokból az RNS kinyerése Trizol reagensek (TRI Reagents®: TR 118, MRC Inc., Cincinnati, OH, USA) segítségével történt. 260 nm-en és 280 nm-en hullámhosszon megmért abszorbancia alapján vizsgáltuk az RNS tisztaságát. A kinyert RNS, melynek aránya 1,8-nál nagyobb volt, későbbi elemzéshez is felhasználtuk. A teljes RNS (10ng) visszaállítása a MicroRNA Reverse Transcription Kit (TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit: A28007, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével történt. A gyártó protokollja alapján, kisebb módosításokkal határoztuk meg az egyes cél miRNS-ek mennyiségét. A következő TaqMan MikroRNS Analíziseket használtuk: miR-486, miR-499, miR-206, miR-1, miR-133a és miR-233b. Minden anyagot az Applied Biosystems szállította (TaqMan™ Advanced miRNA Assay: A25576, Applied Biosystems). A qRT-PCR-t a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Kat#: 4366072, Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük egy 7500 Fast Real-Time PCR rendszerben, a gyártó protokollja szerint. Minden mintát triplikátumokban futtattunk, és a korábban leírtak szerint történt a normalizálásuk. Normalizálóként a miR-191-et használtuk minden mintában, továbbá minden reakciót külön futtattunk és a kvantifikációhoz Ct ($\Delta\Delta C_t$) módszert alkalmaztunk.

3.3. Statisztikai analízis

Az állatmodellen elvégzett Morris maze teszt során a csoportkülönbségeket kétirányú ANOVA-val vizsgáltuk, a csoportos átlagokat pedig Tukey teszttel hasonlítottuk össze. Az állatok maximális oxigénfelvételében bekövetkező változásokat egy mintás T próbával mértük.

A kontroll és edző csoport közötti különbségek kimutatására (a vita maxima tesztet követő laktátszint, a bélperisztaltika EMG mérései, a bélszakaszok mitokondrium és szabadgyök mérései, a fehérjék Western blot vizsgálata, valamint a bélszakaszok morfológiai mérései során) két mintás T próbát alkalmaztunk. A normális eloszlás kimutatására Shapiro-Wilk tesztet használtunk. Ha nem találtunk normál eloszlást, Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk Tukey teszt helyett. Minden mikrobiommal kapcsolatos bioinformatikai analízist a Snaq programmal, a 16S mikrobiom adatok elemzését pedig a QIIME2 programmal végeztük. Az amplikonszekvencia-változatok levezetésére a DADA2 algoritmust használtuk, és taxonómiai osztályozásukat a SILVA 128 referencia adatbázis segítségével végeztük el, a törzstől a nemzetség szintjéig. A mintákon belüli faji diverzitás mérésére a Shannon-diverzitási indexet használtuk. A humán modellben Shapiro-Wilk teszttel vizsgáltuk a normalitást, és minden bemutatott változó normál eloszlást követett. A testmozgás előtti és utáni statisztikai különbségek meghatározásához egy mintás T próbát, a csoportok közötti különbségek kimutatásához pedig két mintás T próbát alkalmaztunk. Az összefüggések vizsgálatánál Pearson korrelációt használtunk, és a szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. Önkéntes testmozgást végző állat modell eredményei

4.1.1. Morris Maze teszt értékei

A kognitív tesztként szolgáló Morris Maze vízi útvesztő esetében, habár mind a referencia-, mind a munka memória esetében megfigyelhető volt a tendencia, miszerint a VE csoport állatai a kontroll állatokhoz viszonyítva rövidebb idő alatt találták meg az elrejtett platformot a medencében; szignifikáns különbséget csupán a munkamemória második ($C - 70,55 \pm 27,68$ sec, $VE - 45,13 \pm 36,85$ sec, $p < 0,001$) és a negyedik napján ($C - 46,86 \pm 28,49$ sec, $VE - 30,75 \pm 30,64$ sec, $p < 0,001$) figyelhattunk meg. A munkamemóriát az egyes napokon a vízben töltött 4 próba átlagaként, míg a referenciamemóriát az egyes napok első próbáinak átlagaként számoltuk ki. Az eredmények a kontroll (C , $n=6$) és az önkéntes testmozgáson részt vevő (VE , $n=8$) patkányok átlaga \pm SE.

4.1.2. Maximális oxigénfelvétel ($VO_2\max$) eredmények

A $VO_2\max$ szintjében szignifikáns emelkedést mértünk a VE csoport esetében ($62,95 \pm 14,53$ ml/kg/perc \rightarrow $75,32 \pm 11,56$ ml/kg/perc, $p < 0,001$), míg a kontroll csoportnál szignifikáns csökkenést ($65,77 \pm 14,18$ ml/kg/perc \rightarrow $60,69 \pm 9,09$ ml/kg/perc, $p < 0,05$) figyeltünk meg.

4.1.3. Vita maxima eljárás és tejsav mérési eredmények

A Vita maxima teszt elvégzése után a levett vérvétel laktát szint értékei a VE csoportban mutattak ki szignifikánsan értéket, összehasonlítva a C csoporttal (C - $6\pm 2,8$ mmol/l, VE - $3,2\pm 1,4$ mmol/l, $p < 0,001$).

4.1.4. Elektromiográfia (EMG) mérések eredményei

A simaizmok EMG méréseinek eredményei hasonlóak voltak a VE és a C csoportokban. Minden VE csoportnál mért traktus esetében azonban (vékonybél, vastagbél és gyomor) a simaizmok mioelektromos jelei kisebbek voltak. Szignifikáns összefüggést azonban ezen méréseinknél nem találtunk, csak némi tendencia figyelhető meg.

A kontroll és az edzett patkányok esetében sem a vékonybélnek (C - $1,133\pm 0,51$ μV^2 , VE - $0,887\pm 0,51$ μV^2), sem a vastagbélnek (C - $2,273\pm 0,73$ μV^2 , VE - $1,99\pm 0,91$ μV^2), sem pedig a gyomornak (C - $2,777\pm 1,34$ μV^2 , VE - $2,493\pm 1,31$ μV^2) az elektromos jelaktivitásában nem találtunk szignifikáns különbséget. A jelek kiértékelését a Szűcs és munkatársai által kidolgozott módszer alapján történt.

4.1.5. Western blot molekuláris biológiai eljárás eredményei

A vastagbél minták Western blot analízise során az eNOS ($p < 0,05$) és az Akt1 ($p < 0,01$) szignifikánsan megnövekedett szintjét mutatta ki a VE csoportban, míg a SIRT1, SIRT3, NRF1, PGC-1 α , NFkB, CS és NAMPT fehérjeszintjén nem észleltünk jelentős változásokat.

4.1.6. Reaktív oxigén szabadgyök (ROS) termelődés vizsgálatának eredménye

A bélből frissen izolált mitokondriumok ROS termelődését vizsgálva nem találtunk szignifikánsnak tekinthető különbséget a C és VE csoportok között. Az önkéntes testmozgás módszere tehát nem eredményezett jelentős változást a ROS termelésben sem a szukcinát beadása előtt, sem pedig azután. A szukcinát beadását követő rotononkezelés pedig minden esetben a ROS termelés teljes gátlását eredményezte.

4.1.7. 16sRNS génapmlikon szekvenálás eredménye

A mikrobiom analízis során nagyon hasonló adatokat figyelhettünk meg a baktérium kultúra Shannon diverzitási indexénél.

Az önkéntes testmozgás növelte a bélmikrobióta négy fő fájának egyikeként ismert fajnak, az *Actinobacteria*-nak a relatív abundanciáját. A Család szintjén létrejövő változásoknál a *Bifidobacteria* és a *Ruminococcaceae* relatív abundanciája nőtt, feltételezhetően az SCFA fokozott termelésének következményeként. Bár az NF-kB nem változott, az *Acetatifactor* abundanciája csökkent a VE csoportban a C állatokhoz képest.

4.1.8. Összefüggések vizsgálata

A mért adatok összefüggéseit vizsgálva azt lehetett megállapítani, hogy a laktát szint negatívan korrelált az Akt és eNOS szintekkel ($r=-0,646$ és $r=-0,511$), valamint pozitívan korrelált az NRF1 szintjével ($r=0,742$). A térbeli memória negatívan korrelált a $VO_2\text{max}$ szintjével ($r=-0,457$). A *Bifidobacteriales* és *Bifidobacteriaceae* mennyiségi előfordulása a mikrobiomban pedig összefüggést mutatott a $VO_2\text{max}$ szintjével ($r=0,436$).

4.1.9. Morfológiai mérések eredménye

Az elektronmikroszkópos adatok alapján azt lehetett kijelenteni a mitokondriumok morfológiai vizsgálatából, hogy bár a VE növelte a mitokondriumok mennyiségét, ezzel együtt a normál mitokondriumok megnyúlását is okozta.

Az Apeer program által vezérelt mélytanulás három különböző csoportot hozott létre a mitokondriumok egyes osztályai között, azok morfológiai megjelenése alapján: Az (a) csoportban helyezkedtek el a normális, sűrű mátrixsal benne párhuzamos, keskeny cristákkal rendelkező mitokondriumok; a (b) csoport esetében a rendezetlen mitokondriumok voltak, a mátrix még ugyan mindig sűrű, de már rendezetlen cristákkal található, és egyes lipidcseppek is megjelennek; a (c) csoportba pedig a duzzadt mitokondriumok tartoznak, ahol a cristák és a mátrix sűrűségének széles kiterjedésében vagy teljes egészében a hiányáról, a belső szerkezet jelentős elvesztéséről számolhatunk be. Az Apeer program továbbá a vezikulákat is szintén azonosította.

A caveolák mennyiségét mikroszkóp segítségével mértük fel (C – $16,24\pm 1,24$ μm , VE – $24,14\pm 2,67$ μm), amelyek száma úgy tűnik a VE hatására növekszik a GIT falában.

A számszerűsítés során csupán azok az üvegcese alakú membrán befűződéseket vettük figyelembe, amelyeken látható nyílások helyezkednek el a sejt felszínén, vagy amelyeken a membrán fedésben van a nyílással. A megnyúlt vagy a metszet síkjában a plazmalemmával kapcsolatot nem mutató membránképződményeket nem vettük figyelembe.

4.2. Krónikus okklúziós módszert alkalmazó human modell eredményei

A humán vizsgálat során mind a miRNS-1 (C – $7,45\pm 1,78$ \rightarrow $7,31\pm 2,29$, O – $7,71\pm 1,00$ \rightarrow $5,62\pm 2,37$, $p<0,05$), mind a miRNS-133a (C – $11,11\pm 2,56$ \rightarrow $10,76\pm 3,97$, O – $12,06\pm 2,1$ \rightarrow $9,07\pm 4,40$, $p<0,05$) szintje csökkent szignifikánsan az okklúzió átesett edző emberek izommintáiban, összehasonlítva a kontroll csoporttal. Figyelemre méltó módon továbbá szignifikáns pozitív korrelációt tudunk kimutatni e között a két miRNS relatív expressziós szintje között, amely feltételezhetően utalhat egyfajta közös fiziológiai szabályozásra.

5. Következtetések

5.1. Az önkéntesen végzett testmozgás változást idézhet elő a bél motilitásában

A patkányok simaizomzatának EMG mérése során hasonló eredmények születtek a VE és a C csoport között, mind a vékonybél, a gyomor, vagy akár a vastagbél mioelektromos aktivitását megfigyelve. Habár egyfajta tendencia megfigyelhető, miszerint a kontroll állatok EMG jelei magasabbak a VE csoportéhoz viszonyítva, szignifikáns különbséget nem tudunk megállapítani a két csoport között, így ezt az állításunkat NEM FOGADJUK EL.

Ezen adatokra támaszkodva arra következtetünk, hogy egy ilyen enyhébb intenzitású, döntően inkább aerob jellegű sportmozgás hatására a szervezet nem kifejezetten a motilitás módosításával próbál meg alkalmazkodni az őt ért ingerek ellen. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a szervezet számára sokkal inkább biokémiai és/vagy strukturális változásokat megcélzó folyamatok bizonyulnak hatásosabb stratégiának, esetleg a mikrobiom összetételének módosításával éri el a szervezet az adaptációt.

Azt fontosnak tartom azonban megjegyezni, hogy az önkéntes testmozgást végző patkányok EMG jeleinek rögzítésében a mozgásos artefaktumok jelentették a legnagyobb limitáló faktort. Éppen ezen okokból kifolyólag sok adatot kénytelenek voltunk kizárni a méréseinkből. Egy későbbi kutatás esetében még több elemszám és/vagy még több familiarizáció alkalmazásával talán mérsékelni lehetne az artefaktumok előfordulását, ezzel több adatot megőrizve a későbbi analízáláshoz. Így meglehet a jelenleg látható tendencia a későbbiekben már egy szignifikáns különbséget jelenthetne számunkra.

5.2. Az önkéntes testmozgás befolyásolja a mikrobiomot, megváltoztatni képes annak összetételét

A 16sRNS génamplikon szekvenálás során a baktérium kultúra Shannon diverzitási indexét figyelembe véve nagyon hasonló adatokat figyelhettünk meg a C és a VE csoport esetében. Mindazonáltal az állítást ELFOGADJUK, mivel az önkéntes testmozgás növelte a bélmikrobióta négy fő fajának egyikeként ismert *Actinobacteria*-nak a relatív abundanciáját, Család szintjén a *Bifidobacteria* és a *Ruminococcaceae* relatív abundanciája nőtt a C csoporthoz képest, (véltetően a rövid szénláncú zsírsavak fokozott termelésének köszönhetően), Nemzetség szinten pedig az *Acetatifactor* abundanciája csökkenést mutatott a C csoporthoz képest.

Ezen baktériumtörzsek közül az *Actinobacteria* habár csak igen kis százalékát teszik ki a mikrobiomnak, szerepe kulcsfontosságú a GIT homeosztázisának fenntartásában. Az elmúlt

időszakban több kutatás témája fókuszált az *Actinobacteriumok*-ra. Ennek a törzsnek az osztályait (, kiváltképp a nálunk szintén különbséget mutató *Bifidobacterium*-t) széles körben alkalmazzák probiotikumként védelmi funkciójuk miatt, jótékony hatásukat már számos patológiás betegségben bebizonyították.

A *Ruminococcaceae* és a *Lachnospiraceae* tagjai kiegészítik egymást a butirát termelésében és ezáltal a gyulladás szabályozásában foglalnak szerepet. Ugyanezen baktériumcsaládok nagy mennyiségű rostbevitel után nagy mennyiségű butirát baktérium-metabolitot termelnek, amelyeknek preventív szerepet tulajdonítottak a vastagbélrák esetében.

Ezek az eredmények mind igazolják a sportmozgás mikrobiomra kifejtett pozitív hatásait, melynek igen fontos prediktív szerepe van a betegségekkel szemben, valamint kihatással van az általános állóképességre egyaránt.

5.3. Kapcsolat, összefüggés a mikrobiom és a bélmotilitás, azok testmozgás által kiváltott alkalmazkodása, módosulása között

A bél mikrobiom és a GIT mioelektromos aktivitásának adatai között semmilyen közvetlen összefüggést, korrelációt nem tudtunk megállapítani, így ezt az állítást NEM FOGADJUK EL. Miután viszont az agy-bél-edzés-mikrobiom tengely egy nagyon komplex, igen összetett rendszert alkot, amelynek minden komponense megannyi útvonalon keresztül képes szabályozni a másikat, meglehet, hogy közvetett módon képesek kihathatni egymásra. Ebből kifolyólag nem vetném el teljesen annak lehetőségét, hogy egy későbbi kutatás keretein belül ezen hipotézist újra teszteljük, más mérési stratégiát alkalmazva, esetleg egy nagyobb elemszám használatával.

5.4. Kapcsolat a bél biokémiájával kapcsolatosan mért adatok és a mikrobiomnál előforduló baktériumok száma és eloszlása között

A vastagbél minták Western blot analízise során az eNOS, illetve az Akt1 fehérjék esetében figyeltünk meg szignifikánsan magasabb szintet, míg a SIRT1, SIRT3, NRF1, PGC-1 α , NF κ B, CS és NAMPT fehérjeszintjén nem észleltünk jelentős változásokat az önkéntesen edző csoportban a kontrollhoz viszonyítva.

A bélből frissen izolált mitokondriumok ROS termelődését vizsgálva szintén nem találtunk szignifikánsnak tekinthető különbséget a C és VE csoportok között. Az önkéntes testmozgás módszere tehát nem eredményezett jelentős változást a ROS termelésben sem a szukcinát beadása előtt, sem pedig azután. A szukcinát beadását követő rotononkezelés pedig minden esetben a ROS termelés teljes gátlását eredményezte.

A mért adatok összefüggéseit vizsgálva azt lehet megállapítani, hogy a laktát szint negatívan korrelált az Akt és eNOS szintekkel, valamint pozitívan korrelált az NRF1 szintjével. A térbeli memória szintén negatívan korrelált a VO₂max szintjével. A *Bifidobacteriales* és *Bifidobacteriaceae* mennyiségi előfordulása a mikrobiomban összefüggést mutatott a VO₂max szintjével.

Ezen hipotézis aspektusából figyelembe véve az egyetlen igen fontos és kiemelkedő kapcsolat, melyet találtunk az Akt1 fehérjetartalmának és a székletben található *Bifidobaktériumok* mennyiségének korrelációja.

Az Akt fehérjének számos élettanilag fontos szerepe van, közöttük ismeretes a perifériás glükózfelvétel, az inzulinérzékenységre gyakorolt hatása. egyes kutatások annak jelátviteli szerepét összefüggésbe hozták az agyban keletkező depresszióval egyaránt.

Ezek alapján állításunkat miszerint van kapcsolat a bél biokémiájával kapcsolatosan mért adatok és a mikrobiomnál előforduló baktériumok száma és eloszlása között: ELFOGADJUK.

5.5. A krónikus testmozgás képes befolyásolni olyan miRNS-ek mennyiségi összetevőit, melyek a bélrendszerbe eljutva is képesek lehetnek kifejtetni pozitív hatásukat

A krónikus testmozgás hatására szignifikáns csökkenést mértünk az okklúziós edzőcsoport izommintáival a miRNS-1 és miRNS_133a szintjében, összehasonlítva a kontroll csoporttal, így ezt az állítást ELFOGADJUK.

Fontos kihangsúlyozni, hogy ezek a kódolni nem képes RNS-ek, igen komplex folyamatokon keresztül számos szabályozásban részt tudnak venni, mind az izomban, mind a véráram által eljutva a szervezet más egyéb területein. Igen sokrétű, egymásra oda-vissza ható hatásmechanizmusainak pontosabb feltérképezése érdekében, mindenképpen fontos lenne az eredmények más aspektusból történő újbóli vizsgálata.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Peter Bakonyi, Attila Kolonics, Dora Aczel, Lei Zhou, Soroosh Mozaffaritarbar, Kinga Molnar, Lajos Laszlo, Balazs Kutasi, Kumpei Tanisawa, Jonguk Park, Yaodong Gu, Ricardo A. Pinho, Zsolt Radak. 2023. „Voluntary exercise does not increase gastrointestinal motility but increases spatial memory, intestinal eNOS, Akt levels, and Bifidobacteria abundance in the microbiome”. *Frontiers in Physiology* Volume 14 – 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1173636>.

Torma, Ferenc, Peter Bakonyi, Zsolt Regdon, Zoltan Gombos, Matyas Jokai, Gergely Babszki, Marcell Fridvalszki, és mtsai. 2021. „Blood Flow Restriction during the Resting Periods of High-Intensity Resistance Training Does Not Alter Performance but Decreases MIR-1 and MIR-133A Levels in Human Skeletal Muscle”. *Sports Medicine and Health Science* 3 (1): 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.smhs.2021.02.002>.

Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Torma Ferenc, Gombos Zoltán, Bakonyi Péter, Radák Zsolt. „Az edzés pihenő idejében alkalmazott okklúzió hatása négyhetes guggoló edzést végző egyének átlagsebesség mutatóira. *Testnevelés, sport, tudomány – Physical, Education, Sport, Science - Original Research Paper* (96): 3-4. <http://doi.org/10.21846/TST.2018.3-4.5>.

Gergely Babszky, Ferenc Torma, Dora Aczel, Peter Bakonyi, Zoltan Gombos, Janos Feher, Dora Szabo, Balázs Ligeti, Sándor Pongor, Laszlo Balogh, Anikó Pósa, Zsolt Radak. 2021. „COVID-19 Infection Alters the Microbiome: Elite Athletes and Sedentary Patients Have Similar Bacterial Flora”. *Genes* 2021, 12(10), 1577; <https://doi.org/10.3390/genes12101577>

Gombos, Zoltan, Erika Koltai, Ferenc Torma, Peter Bakonyi, Attila Kolonics, Dora Aczel, Tamas Ditroi, Peter Nagy, Takuji Kawamura, és Zsolt Radak. 2021. „Hypertrophy of Rat Skeletal Muscle Is Associated with Increased SIRT1/Akt/MTOR/S6 and Suppressed Sestrin2/SIRT3/FOXO1 Levels”. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (14): 7588. <https://doi.org/10.3390/ijms22147588>.

Dora Aczel, Bernadett Gyorgy, Peter Bakonyi, RehAn BukhAri, Ricardo Pinho, Istvan Boldogh, Gu Yaodong és Zsolt Radak. „The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer’s Disease”. *Antioxidants* 2022, 11(5), 1028; <https://doi.org/10.3390/antiox11051028>.

Matyas Jokai, Ferenc Torma, Kristen M. McGreevy, Erika Koltai, Zoltan Bori, Gergely Babszki, Peter Bakonyi, Zoltan Gombos, Bernadett Gyorgy, Dora Aczel, Laszlo Toth, Peter Osvath, Marcell Fridvalszky, Timea Teglas, Balazs Ligeti, Regina Kalcsevszki, Aniko Posa, Sylwester Kujach, Robert Olek, Takuji Kawamura, Yasuhiro Seki, Katsuhiko Suzuki, Kumpei Tanisawa, Sataro Goto, Istvan Boldogh, Xueqing Ba, Dora Szabo, Kelvin J. A. Davies, Steve Horvath, Zsolt Radak. „DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation”. *Geroscience* 2023 May 20. [https://doi: 10.1007/s11357-023-00826-1](https://doi.org/10.1007/s11357-023-00826-1).