

Wpływ wysiłku pływackiego na stężenie mitochondrialnego cholesterolu oraz metabolizm energetyczny w warunkach stresu oksydacyjnego

mgr Damian Józef Flis

Rozprawa na stopień doktora nauk o zdrowiu



Promotorzy:

dr hab. Wiesław Ziółkowski

dr hab. Jan Jacek Kaczor

Wydział Nauk o Zdrowiu
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2018

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Moim Promotorom:

*Panu dr hab. Janowi Jackowi Kaczorowi
oraz Panu dr hab. Wiesławowi Ziółkowskiemu,
za zaangażowanie, profesjonalizm, wsparcie i pomoc naukową,
a przede wszystkim za inspirację i możliwość rozwoju naukowego.*

*Współpracownikom z Zakładu Bioenergetyki i Fizjologii Wysiłku Fizycznego
oraz Katedry Chemii Medycznej GUMed, za wsparcie i życzliwą pomoc.*

*Współpracownikom z Katedry Nauk Biologiczno-Medycznych oraz z Katedry Nauk
Przyrodniczych AWFIS, dzięki którym rozpocząłem przygodę badawczą, a których
 optymizm, zaangażowanie, wsparcie i dobre rady towarzyszą mi każdego dnia.*

*Szczególne Podziękowania składam moim Rodzicom i Bliskim,
za cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie.*

Spis treści

1. Wykaz stosowanych skrótów	4
2. Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy.....	5
3. Wprowadzenie	7
4. Cele pracy	10
5. Materiały i metody badań	11
6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy.....	18
6.1 Publikacja 1.....	19
6.2 Publikacja 2.....	21
6.3 Publikacja 3.....	23
7. Wnioski	25
8. Piśmiennictwo.....	26
9. Streszczenie w języku polskim.....	30
10. Streszczenie w języku angielskim.....	33
11. Publikacje wchodzące w skład rozprawy (pełne teksty)	35
12. Oświadczenia współautorów	68

1. Wykaz stosowanych skrótów

Akt - kinaza serynowo/treoninowa (*ang. serine/threonine kinase*)

ALS – stwardnienie zanikowe boczne (*ang. amyotrophic lateral sclerosis*)

CS – syntaza cytrynianowa (*ang. citrate synthase*)

COX - oksydaza cytochromowa (*ang. cytochrome c oxidase*)

CAT – katalaza (*ang. catalase*)

ER – retikulum endoplazmatyczne (*ang. endoplasmic reticulum*)

ERK 1/2 - kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (*extracellular signal - regulated kinases*)

Kaw-1 – kaweolina-1 (*ang. caveolin-1*)

MAMs – błony reticulum endoplazmatycznego związane z mitochondriami (*ang. mitochondria associated membranes*)

mPTP – mitochondrialny megakanal (*ang. mitochondrial permeability transition pore*)

RCR - wskaźnik kontroli oddychania mitochondriów (*ang. respiratory capacity rate*)

RFT – reaktywne formy tlenu (*ang. reactive oxygen species*)

SH - grupy sulfhydrylowe (*ang. sulfhydryl groups*)

SOD1 - dysmutaza ponadtlenkowa 1 (*ang. superoxide dismutase 1*)

WT - typowa, reprezentatywna, zdrowa forma organizmu (*ang. wild type*)

2. Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy

Publikacje naukowe będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych w formie trzech powiązanych tematycznie prac:

1. Ziolkowski W., **Flis D.J.**, Halon M., Vadhana D.M., Olek R.A., Carloni M., Antosiewicz J., Kaczor J.J., Gabbianelli R. 2015. *Prolonged swimming promotes cellular oxidative stress and p66Shc phosphorylation, but does not induce oxidative stress in mitochondria in the rat heart*. Free Radicals Research 49, 7-16.

Impact Factor: 2,949; punktacja MNiSW: 25

Wkład doktoranta: udział w planowaniu eksperymentów; przeprowadzenie procedury przygotowawczej oraz jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego; izolacja mitochondriów z serc szczurów; przeprowadzenie oznaczeń markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i tłuszczu; opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników; analiza statystyczna; pisanie części manuskryptu; korekta pracy przed złożeniem do druku.

2. **Flis D.J.**, Olek R.A., Kaczor J.J., Rodziewicz E., Halon M., Antosiewicz J., Wozniak M., Gabbianelli R., Ziolkowski W. 2016. *Exercise-induced changes in caveolin-1, depletion of mitochondrial cholesterol, and the inhibition of mitochondrial swelling in rat skeletal muscle but not in the liver*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3620929.

Impact Factor: 4,593; punktacja MNiSW: 30

Wkład doktoranta: udział w planowaniu eksperymentów; przeprowadzenie procedury przygotowawczej oraz jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego; izolacja mitochondriów z mięśni szczurów; przeprowadzenie oznaczeń: markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i tłuszczu, indukowanego chlorkiem wapnia pęcznienia mitochondriów, ilości kaweoliny-1 i cholesterolu; opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników; analiza statystyczna; pisanie części manuskryptu; korekta pracy przed złożeniem do druku.

3. **Flis D.J.**, Dzik K., Kaczor J.J., Halon-Golabek M., Wieckowski M.R., Antosiewicz J., Ziolkowski W. 2018. *Swim training modulates skeletal muscle energy metabolism, oxidative stress and the mitochondrial cholesterol content in Amyotrophic Lateral Sclerosis mice*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5940748.

Impact Factor: 4,593; punktacja MNiSW: 30

Wkład doktoranta: udział w planowaniu eksperymentów; przeprowadzenie procedury treningu mysz; izolacja mitochondriów z mięśni mysz; przeprowadzenie oznaczeń: markerów wolnorodnikowego uszkodzenia białek i tłuszczu, ilości kaweoliny-1 i cholesterolu; udział w przeprowadzeniu oznaczeń aktywności enzymatycznej; opracowanie i interpretacja uzyskanych wyników; analiza statystyczna; pisanie manuskryptu.

**Łączna punktacja cyklu publikacji: Impact Factor: 12,135;
punktacja MNiSW: 85**

3. Wprowadzenie

Brak systematycznej aktywności fizycznej jest jedną z głównych przyczyn chorób, które mogą przyczynić się do przedwczesnej śmierci ludzi. Z drugiej strony regularna aktywność fizyczna zapobiega takim schorzeniom jak: nowotwory, cukrzyca, choroby układu krążenia, udary i inne (Booth *i wsp.* 2012). Dane z piśmiennictwa dowodzą również, że trening działa neuroprotekcynie, łagodzi objawy oraz poprawia jakość życia osób chorujących na stwardnienie zanikowe boczne (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*; ALS) (Drory *i wsp.* 2001; Bello-Haas *i wsp.* 2007).

Wielu z wymienionych wyżej schorzeń towarzyszą dysfunkcje mitochondriów. Ostatnio, zainteresowanie naukowców, poszukujących mechanizmów leżących u podstaw tych chorób, skupia się na badaniu struktur komórkowych utworzonych przez mitochondria i błony retikulum endoplazmatycznego (ER), które nazywane są MAMs (*mitochondria associated membranes*) lub MERCs (*mitochondria-associated membranes and the term mitochondria-ER contacts*) (Szymanski *i wsp.* 2017). Struktury te, zawierają zarówno białka jak i lipidy (zwłaszcza cholesterol) oraz biorą udział w regulacji: sygnalizacji jonów wapnia, bioenergetyki mitochondriów i apoptozy (Fujimoto *i wsp.* 2012; Sorice *i wsp.* 2012). Zaburzenie funkcjonowania tych struktur jest ważnym mechanizmem zaangażowanym m.in. w rozwój ALS. W tej neurodegeneracyjnej chorobie nieprawidłowości w obrębie MAMs zakłócają: homeostazę wapnia, funkcjonowanie ER, czemu towarzyszy stres oksydacyjny (Manfredi, Kawamata 2016; Paillusson *i wsp.* 2016; Watanabe *i wsp.* 2016; Oakes *i wsp.* 2017).

Jedną z przyczyn zmniejszenia integralności MAMs, jak również nieprawidłowego gromadzenia wolnego cholesterolu jest niedobór kaweoliny-1 (kaw-1), kluczowego białka w regulacji transportu cholesterolu (Sala-Vila *i wsp.* 2016). Ponadto modyfikacja zawartości mitochondrialnego cholesterolu determinuje liczbę miejsc kontaktowych między mitochondriami a ER. W wyniku nagromadzenia cholesterolu w mitochondriach dochodzi do obniżenia wydajności łańcucha oddechowego oraz obrony antyoksydacyjnej, co sprzyja akumulacji reaktywnych form tlenu (RFT), prowadząc w ten sposób do śmierci komórki (Bosch *i wsp.* 2011). Przedstawiony mechanizm śmierci komórki w następstwie generacji RFT może być związany ze strukturą mitochondrialną zwaną mitochondrialnym megakanalem (mPTP).

Nadprodukcja RFT i nadmierna akumulacja jonów wapnia prowadzi do otwarcia mPTP (Halestrap *i wsp.* 1998; Weiss *i wsp.* 2003; Halestrap *i wsp.* 2004). W otwieraniu tej struktury bierze również udział białko zlokalizowane w MAMs - p66Shc. W wyniku sygnału proapoptotycznego dochodzi do przeniesienia p66Shc do przestrzeni międzybłonowej mitochondriów. Następnie aktywna forma p66Shc utlenia zredukowany cytochrom c i katalizuje redukcję O_2 do H_2O_2 , co prowadzi do otwarcia mPTP (Giorgio *i wsp.* 2005). Długotrwałe otwarcie tej struktury wywołuje pęcznienie mitochondriów, rozprzęganie fosforylacji oksydacyjnej, zmniejszenie produkcji ATP, ucieczkę cytochromu c, co w efekcie może powodować śmierć komórki (na drodze indukowanej apoptozy bądź nekrozy) (Halestrap *i wsp.* 1998; Di Lisa *i wsp.* 2003; Hausenloy, Yellon 2003).

Z drugiej strony, obniżenie stężenia cholesterolu, we frakcji błon opornych na detergenty, powoduje relokalizację białek w obrębie MAMs (Hayashi, Fujimoto 2010). Ponadto, zmiana ta, zwiększa ilość połączeń między ER a mitochondriami (Fujimoto *i wsp.* 2012), co może wywoływać zmiany adaptacyjne, zabezpieczające przed otwarciem mPTP. Badania na modelu *in vitro* wykazały, że poprzez obniżenie stężenia cholesterolu w mitochondriach można wywołać zwiększenie oporności mitochondriów na indukowane chlorkiem wapnia pęcznienie. Zmiana ta uważana jest za czynnik protekcyjny, chroniący komórki przed śmiercią (Ziolkowski *i wsp.* 2010).

Zahamowanie otwierania mPTP jest również czynnikiem kluczowym dla uzyskania kardioprotekcji. Badania zespołu Halestrap dowodzą, że zwiększoną oporność mitochondriów na pęcznienie w trakcie reperfuzji obserwowano po wcześniejszym hartowaniu serca przez niedokrwienie (Clarke *i wsp.* 2008) i hipotermie (Khaliulin *i wsp.* 2007). Ponadto, w obu modelach protekcyjne zmiany wywołane hartowaniem związane były z obniżeniem stresu oksydacyjnego.

W warunkach fizjologicznych do obniżenia stężenia cholesterolu w mitochondriach izolowanych z serc szczurów dochodzi po długotrwałym wysiłku pływackim (Keatisuwan *i wsp.* 1991; Ziolkowski *i wsp.* 2013). Tego rodzaju wysiłek powoduje również zwiększoną oporność mitochondriów na pęcznienie indukowane chlorkiem wapnia. W ten sposób może działać, jako czynnik protekcyjny, chroniący komórki narażone na czynniki szkodliwe. Jednocześnie zmiany te nie powodują zaburzeń

bioenergetyki mitochondriów, co oznacza, że proces ten jest pożądanym, fizjologicznym zjawiskiem (Ziolkowski *i wsp.* 2013).

Niezwykle ważny jest fakt, że systematyczny wysiłek pływacki wywołuje pozytywne zmiany u zmodyfikowanych genetycznie myszy (mysi model ludzkiej choroby ALS). Wyniki badań Deforges i współpracowników wykazały, że trening pływacki przedłuża okres poprzedzający pojawienie się pierwszych objawów choroby, podtrzymuje funkcję motoryczną i wydłuża życie mysz z ALS (Deforges *i wsp.* 2009). Mimo to mechanizm ochronnego wpływu tego treningu na włókna mięśniowe pozostaje nieznany.

Wyjaśnienie mechanizmu, dzięki któremu wysiłek pływacki wywołuje zmiany protekcyjne, pozwoli wnioskować o podłożach mitoprotekcji w warunkach stresu. Dlatego też, badania te mogą przyczynić się do powstania nowych możliwości terapeutycznych w chorobach układu krwionośnego, cukrzycy, chorobach neurodegeneracyjnych oraz innych patologiach związanych z dysfunkcjami mitochondriów.

4. Cele pracy

1. wykazanie czy długotrwały wysiłek pływacki, w różnych tkankach zdrowych szczurów, wpłynie na:

- a. modyfikacje stężenia cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej;
- b. poprawę funkcji mitochondriów;
- c. stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł;

2. wykazanie czy trening pływacki, w mięśniach szkieletowych myszy z ALS wpłynie na:

- a. modyfikacje stężenia cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej;
- b. stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł;
- c. poprawę metabolizmu energetycznego.

Hipoteza badawcza:

Trening, podobnie jak wysiłek pływacki, jest modyfikatorem stężenia cholesterolu w mitochondriach izolowanych z tkanek kurczliwych.

W warunkach patologicznych, w dystroficznych mięśniach szkieletowych mysz chorych na stwardnienie zanikowe boczne, zmianom tym towarzyszy poprawa metabolizmu energetycznego oraz obniżenie wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł.

5. Materiały i metody badań

Wyniki badań ujęte w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej wykorzystują dwa modele eksperymentalne. Badania dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego na stres oksydacyjny, modyfikację stężeń cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej oraz funkcję mitochondriów zostały przeprowadzone na szczurach rasy Wistar. Eksperymenty na tych zwierzętach zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Bioetyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr zgody 13/2007).

Z kolei, badania dotyczące wpływu treningu pływackiego na stres oksydacyjny, metabolizm energetyczny oraz stężenie cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej w atroficznych mięśniach szkieletowych, zostały przeprowadzone na myszach transgenicznym B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J, które są mysim modelem ludzkiej choroby ALS, oraz myszach B6SJL, które posłużyły, jako zwierzęta kontrolne. Eksperymenty na myszach zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Bioetyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr zgody 11/2013), po wcześniejszym uzyskaniu zgody na zamknięte użycie organizmów zmodyfikowanych genetycznie (nr decyzji 155/2012). Opisane poniżej metody dotyczą zadań badawczych, ujętych w publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej, które wykonywałem.

5.1 Badania dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego na stres oksydacyjny, modyfikację stężeń cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej oraz funkcję mitochondriów

W czasie trwania eksperymentu zwierzęta (12 szczurów rasy Wistar, samce, masa 260-300 g) przebywały w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach sanitarno-bytowych ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 h/12 h cykl dzień-noć), a także spożywały karmę oraz piły wodę bez ograniczeń.

5.1.1 Procedura wysiłkowa

Zwierzęta zostały podzielone na dwie grupy: grupę kontrolną oraz grupę poddaną wysiłkowi pływackiemu. Procedura przygotowania zwierząt do pływania, jak i samego

wysiłku została przeprowadzona zgodnie z procedurą przedstawioną przez (Keatisuwan *i wsp.* 1991). Zwierzęta z grupy wysiłkowej zostały poddane procedurze przygotowawczej, mającej na celu zminimalizowanie stresu związanego ze środowiskiem wodnym. Zwierzęta pływały przez cztery kolejne dni w wodzie o temperaturze 35°C przez 30 minut. Pierwszego dnia pływały bez dodatkowego obciążenia, drugiego dnia obciążenie to wynosiło 1% masy ich ciał, trzeciego i czwartego dnia obciążenie wynosiło odpowiednio 2% i 3% masy ich ciał. Po zakończeniu procedury przygotowawczej zwierzęta z grupy wysiłkowej zostały poddane wytrzymałościowemu wysiłkowi pływackiemu, który polegał na pływaniu przez 3 godziny w wodzie o temperaturze 35°C z dodatkowym obciążeniem 3% masy ciała zwierzęcia.

Od szczurów z grupy kontrolnej oraz wysiłkowej (bezpośrednio po zakończeniu wysiłku) zostały pobrane serca, mięśnie czworogłowe ud oraz wątroby. Pobrane tkanki posłużyły do przygotowania homogenatu oraz wyizolowania frakcji mitochondrialnej.

5.1.2 Izolacja mitochondriów

Mitochondria z pobranych tkanek zostały wyizolowane metodą wirowań frakcjonujących, które zostały przeprowadzone w temperaturze 4°C, w wirówce SIGMA 3K30. Szczegółowy opis procedur został zamieszczony w odpowiednich podrozdziałach publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej. Mitochondria serc zostały wyizolowane na podstawie metody (Marcil *i wsp.* 2006) (publikacja nr 1). Mitochondria wątrób zostały wyizolowane na podstawie metody (Broekemeier *i wsp.* 1985) (publikacja nr 2). Mitochondria mięśni szkieletowych zostały wyizolowane na podstawie metody (Fontaine *i wsp.* 1998) (publikacja nr 2).

5.1.3 Pomiar markerów stresu oksydacyjnego

Stężenie grup karbonylowych (produkt peroksydacji białek) zostało zmierzone metodą kolorymetryczną według (Levine *i wsp.* 1990). Pomiar poziomu dienów -markera peroksydacji lipidów, został wykonany metodą spektrofotometryczną według (Misik *i wsp.* 1992). Pomiar został wykonany przy użyciu spektrofotometru Cecil 9200 Super Aquarius.

5.1.4 Pomiar pęcznienia mitochondriów indukowanego chlorkiem wapnia

Pomiaru pęcznienia mitochondriów indukowanego chlorkiem wapnia dokonano metodą spektrofotometryczną zgodnie z procedurą: dla mitochondriów izolowanych z wątróbki (Crouser *i wsp.* 2003) oraz dla mitochondriów izolowanych z mięśni szkieletowych (Csukly *i wsp.* 2006). Mitochondria (1 mg/ml) były inkubowane w odpowiednim buforze, który dodatkowo zawierał 5 mM bursztynian i 1 μ M rotenon. Induktorem otwarcia mPTP było dodanie 100 μ M chlorku wapnia. W celu sprawdzenia, czy pęcznienie wynika z otwierania mPTP, do pomiarów kontrolnych, użyto inhibitora otwierania tej struktury - cyklosporyny A. Pęcznienie mitochondriów określano poprzez spadek absorbancji przy długości fali 540 nm. Pomiarów dokonano w temperaturze 25°C przy użyciu spektrofotometru Cecil 9200 Super Aquarius.

5.1.5 Oznaczenie stężenia cholesterolu

Cholesterol oraz pozostałe lipidy zostały wyodrębnione z homogenatów i frakcji mitochondrialnych na drodze ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (chloroform i metanol). Procedura została znormalizowana pod względem ilości białka, z której wykonano ekstrakcję i wykonana zgodnie z metodą opisaną przez (Vadhana *i wsp.* 2011). Stężenie cholesterolu w wyekstrahowanych lipidach zostało zmierzone metodą kolorymetryczną z użyciem odczynników firmy CHEMA Diagnostica: Cholesterol FL (nr kat. CTF 400 CH), zgodnie z instrukcją producenta.

5.1.6 Oznaczenie ilości białka kaweoliny-1

Ilość białka kaweoliny-1 została oznaczona metodą immunoenzymatyczną z wykorzystaniem zestawu odczynników firmy Cloud-Clone: Caveolin-1 ELISA Kit (nr kat. SEA214Ra), zgodnie z instrukcją producenta.

5.1.7 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica (Statistica v. 10.0, StatSoft Inc.). Wyniki wyrażono, jako średnia \pm błąd standardowy. Różnice średnich wyników pomiędzy grupami zostały wyznaczone za pomocą testu t-studenta dla prób niezależnych (publikacja nr 2) lub jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Jeżeli w wyniku analizy wariancji została wykryta różnica, istotność została określona za pomocą testu post hoc - Newman-Keuls (publikacja nr 1). Istotność statystyczną określono dla $p < 0,05$.

5.2 Badania dotyczące wpływu treningu pływackiego na stres oksydacyjny, metabolizm energetyczny oraz stężenie cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej w atroficznych mięśniach szkieletowych

Samce myszy transgeniczných B6SJL-Tg (SOD1^{G93A}) 1Gur/J z ludzką mutacją genu SOD1 (myszy ALS) (n=36) oraz myszy typu dzikiego (*Wild-type*, WT) B6SJL (n=24), wykorzystane, jako zwierzęta kontrolne dla zwierząt zmodyfikowanych genetycznie zostały zakupione z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA).

W czasie trwania eksperymentu zwierzęta przebywały w pomieszczeniu o kontrolowanych warunkach sanitarno-bytowych (23±1°C, 12 h/12 h cykl dziennie-noctny), a także spożywały karmę oraz piły wodę bez ograniczeń.

Po 14 dniach aklimatyzacji, myszy zostały losowo podzielone na następujące grupy: ALS 0 – myszy nietrenujące, bez widocznych objawów choroby (n=8), ALS TER – myszy ALS nietrenujące (n=8), and ALS SWIM – myszy ALS trenujące (n=8). Odpowiednio do tych grup, zostały utworzone grupy zwierząt WT: WT 0 – myszy WT nietrenowane (n=8), WT TER – myszy WT nietrenowane (n=8), and WT SWIM – myszy WT trenowane (n=8).

W celu potwierdzenia, czy trening pływacki wydłuża życie zwierząt z ALS, zostały również utworzone grupy przeżywalnościowe: ALS S (n=6) i ALS SWIM S (n=6).

Zwierzęta zostały uśmiercane przez dyslokację kręgow szyjnych. Myszy z grup ALS 0 i WT 0 zostały uśmiercone w wieku 70 dni. Myszy z grupy ALS TER zostały uśmiercone po zaobserwowaniu u tych zwierząt terminalnego stadium choroby (funkcjonalny paraliż obu kończyn tylnych oraz brak możliwości obrotu przez 20 sekund po położeniu zwierzęcia na bok). Myszy z grup ALS SWIM, WT TER oraz WT SWIM zostały uśmiercone w tym samym wieku, co zwierzęta z grupy ALS TER. Zwierzęta z grup przeżywalnościowych (ALS S i ALS SWIM S) żyły do momentu pojawienia się stadium terminalnego choroby.

5.2.1 Procedura treningu pływackiego

W 10 tygodniu życia, zwierzęta transgeniczne (grupy: ALS SWIM i ALS SWIM S) oraz kontrolne (grupa WT SWIM) rozpoczęły trening pływacki, który został przeprowadzony na podstawie procedury opisanej przez (Deforges *i* wsp. 2009).

Trening pływacki był wykonywany 5 razy w tygodniu. W czasie treningu myszy pływały 30 min w wodzie o temperaturze 30°C, w specjalnie wykonanym zbiorniku o regulowanym przepływie prądu wody (maksymalnie 5l/min). W 105 dniu życia częstotliwość treningu została zredukowana do trzech sesji w tygodniu. Zmianie uległy również obciążenia zwierząt: przepływ prądu wody (maksymalnie 5l/min) oraz czas wysiłku (maksymalnie 30 min), które zostały dobierane indywidualnie do możliwości wysiłkowych myszy. Trening trwał do 115 dnia życia zwierząt zarówno ALS jak i WT.

5.2.2 Izolacja mitochondriów z mięśni szkieletowych

Mitochondria z mięśni szkieletowych zostały wyizolowane metodą wirowań frakcjonujących, które zostały przeprowadzone w 4°C, w wirówce SIGMA 3K30 na podstawie metody (Makinen, Lee 1968). Szczegółowy opis procedury został zamieszczony w podrozdziale publikacji będącej podstawą rozprawy doktorskiej (publikacja nr 3).

5.2.3 Oznaczanie stężenia cholesterolu

Cholesterol oraz pozostałe lipidy zostały wyodrębnione z homogenatów i frakcji mitochondrialnych na drodze ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi (chloroform i metanol). Frakcja lipidów została przygotowana poprzez zmieszanie 0,5 mg białka mitochondrialnego lub homogenatu z 1 ml roztworu metanol/chloroform (11:7). Następnie mieszanina została wirowana przez 10 min, przy prędkości 15 000 x g. Po odwirowaniu część płynna została przeniesiona do szklanych probówek i zostawiona w temperaturze 80°C do kompletnego odparowania płynu. Pozostały osad został rozpuszczony w 200 µl 1X Assay Diluent. Stężenie cholesterolu zostało zmierzone za pomocą metody fluorymetrycznej, przy użyciu zestawu odczynników firmy Cell Biolabs Inc.- Total Cholesterol Assay Kit (nr kat. STA-390), zgodnie z instrukcją producenta.

5.2.4 Oznaczenie ilości białka kaweoliny-1

Ilość białka kaweoliny-1 została oznaczona metodą immunoenzymatyczną z wykorzystaniem zestawu odczynników firmy Cloud-Clone: Caveolin-1 ELISA Kit (nr kat. SEA214Mu), zgodnie z instrukcją producenta.

5.2.5 Pomiar wysokoczułej respirometrii

Oddychanie mitochondriów zostało zmierzone w temperaturze 37°C przy użyciu elektrody tlenowej wysokiej czułości (Oroboros, Oxygraph; Austria) zgodnie z procedurą opisaną przez (Kristensen *i wsp.* 2013). Do pomiaru użyto świeżo wyizolowanych mitochondriów (0,1 mg białka mitochondrialnego). Stan 2 oddychania został określony po dodaniu 2 mM jabłczanu (substrat kompleksu I łańcucha oddechowego). Stan 3 oddychania został zmierzony po dodaniu 5 mM ADP oraz 10 mM glutaminianu (kolejny substrat kompleksu I łańcucha oddechowego). W celu sprawdzenia integralności zewnętrznej błony mitochondrialnej, do pomiaru użyto również 10 µM cytochromu c. Wskaźnik kontroli oddychania mitochondriów (*respiratory capacity rate*; RCR) został obliczony, jako stosunek stanu 3 oddychania do stanu 2, zgodnie z (Baris *i wsp.* 2016).

5.2.6 Pomiar aktywności syntazy cytrynianowej, oksydazy cytochromowej i katalazy

Aktywności enzymatyczne zostały zmierzone metodami spektrofotometrycznymi (spektrofotometr Cecil 9200 Super Aquarius) w homogenatach uzyskanych z mięśni ud mysz. Aktywność syntazy cytrynianowej (*citrate synthase*; CS) została zmierzona w temperaturze 37°C zgodnie z metodą (De Lisio *i wsp.* 2011). Aktywność oksydazy cytochromowej (*cytochrome c oxidase*; COX) została zmierzona w temperaturze 37°C zgodnie z metodą (Wharton D.C., A. 1967). Aktywność katalazy (*catalase*; CAT) została zmierzona w temperaturze 30°C zgodnie z metodą (Aebi 1984).

5.2.7 Pomiar poziomu markerów stresu oksydacyjnego

Stężenie grup sulfhydrylowych (SH) (obniżenie w wyniku peroksydacji białek) zostało zmierzone metodą kolorymetryczną według metody (Rice-Evans *i wsp.* 1991). Pomiar poziomu dienów- markera peroksydacji lipidów, został wykonany metodą spektrofotometryczną według (Misik *i wsp.* 1992). Pomiary zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru Cecil 9200 Super Aquarius.

5.2 8 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica (Statistica v. 13.0, StatSoft Inc.). Wyniki wyrażono, jako średnia \pm błąd standardowy. Różnice średnich wyników pomiędzy grupami zostały wyznaczone za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Jeżeli w wyniku analizy wariancji została wykryta różnica, istotność została określona za pomocą testu post hoc- Tukeya. W celu zweryfikowania zmian wynikających z zastosowanego treningu pływackiego (ALS TER vs. ALS SWIM) użyto testu post-hoc najmniejszych istotnych różnic lub testu t-studenta dla prób niezależnych. W celu określenia, czy trening pływacki wydłużył życie zwierząt (grupa ALS S SWIM) wykonano analizę przeżycia Kaplan-Meier'a. Istotność statystyczną określono dla $p < 0,05$.

6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy

Rozprawa doktorska została oparta o cykl trzech, powiązanych ze sobą prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Pierwsze dwie prace dotyczą wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego na stres oksydacyjny, funkcję mitochondriów oraz stężenie cholesterolu w mitochondriach i homogenatach różnych tkanek. Trzecia praca dotyczy wpływu treningu pływackiego na metabolizm energetyczny, stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł oraz modyfikację stężenia cholesterolu we frakcjach: mitochondrialnej i komórkowej, u mysz ze stwardnieniem zanikowym bocznym.

W 2013 roku, opublikowaliśmy pracę pt. Exercise-induced heart mitochondrial cholesterol depletion influences the inhibition of mitochondrial swelling (Ziolkowski *i wsp.* 2013), która jest tematycznie powiązana z cyklem prac ujętych w rozprawie doktorskiej. W publikacji tej, wykazano, że jednorazowy, długotrwały wysiłek pływacki obniża stężenie cholesterolu w mitochondriów izolowanych z serc szczurów. Co więcej, zwiększa stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł w sercach, a jednocześnie powoduje wzrost oporności mitochondriów na pęcznienie indukowane chlorkiem wapnia. Co ciekawe, powyższe zmiany nie wpłynęły na bioenergetykę mitochondriów.

W pracy tej został również przeprowadzony eksperyment *in vitro*, w wyniku, którego wykazano, że to właśnie obniżenie stężenia cholesterolu we frakcji mitochondrialnej determinuje protekcyjne zmiany - zmniejszenie otwierania mPTP w sercach.

Uzyskane wyniki nie odpowiedziały jednak na pytanie, w jaki sposób dochodzi do hamowania pęcznienia mitochondriów, w warunkach stresu oksydacyjnego. Podczas wysiłku w sercu dochodzi do generacji wolnych rodników, które poza uszkodzaniem składników komórek są również molekułami sygnalizacyjnymi. W związku z tym, chcieliśmy sprawdzić czy generacja wolnych rodników jest związana z aktywacją białek sygnałowych szlaku Akt/p66Shc (regulującego stres oksydacyjny w mitochondriach) oraz czy wolnorodnikowe uszkodzenie makromolekuł, obserwowane po wysiłku pływackim dotyczy frakcji mitochondrialnej czy frakcji komórkowej (homogenat).

Zagadnienia te stały się głównym celem pierwszej z przedstawionych publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej.

6.1 Publikacja 1

W pracy pt. „Prolonged swimming promotes cellular oxidative stress and p66Shc phosphorylation, but does not induce oxidative stress in mitochondria in the rat heart”, opublikowanej w czasopiśmie *Free Radical Research* w 2015 roku, przedstawiono wyniki dotyczące zmian w generacji wolnych rodników i stresie oksydacyjnym w sercu szczura indukowanych długotrwałym wysiłkiem pływackim. Ponadto, sprawdzono czy w wyniku tego wysiłku dochodzi do modyfikacji aktywności i ilości białek: p66Shc, Akt, ERK 1/2 oraz podjednostek L i H ferrytyny.

Protekcyjne działanie wysiłku fizycznego w zaburzeniach układu sercowo-naczyniowego jest powiązane z aktywacją szlaków sygnałowych wywołujących przeżycie komórek. Kluczowymi białkami w tych szlakach są: kinaza serynowo/treoninowa (Akt) oraz kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (ERK 1/2). Silnym regulatorem tych białek jest białko p66Shc, które bierze udział w sygnalizacji komórkowej, szczególnie w odpowiedzi związanej ze stresem oksydacyjnym. Jednakże, modyfikacja szlaków sygnałowych, związanych z tym białkiem, w wyniku wysiłku fizycznego, nie została do tej pory wyjaśniona. W związku z powyższym, **celem tej pracy było wykazanie, w jaki sposób jednorazowy, długotrwały wysiłek pływacki wpływa na aktywność białka p66Shc oraz indukcję stresu oksydacyjnego na poziomie frakcji komórkowej i mitochondrialnej w sercach szczurów**. Samce szczurów zostały podzielone na grupy: kontrolną i wysiłkową. Zwierzęta w grupie wysiłkowej pływały przez 3 godziny z dodatkowym obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała zwierząt. Od szczurów z grupy kontrolnej i wysiłkowej, bezpośrednio po zakończeniu wysiłku, zostały pobrane serca w celu izolacji mitochondriów i przeprowadzenia pomiarów.

Jednorazowy, długotrwały wysiłek pływacki, we frakcji komórkowej serc, spowodował wzrost stężenia markerów stresu oksydacyjnego, mierzonych za pomocą: uszkodzenia DNA, grup karbonylowych białek oraz indeksu peroksydacji lipidów - dienów. Poza wzrostem stężenia markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł, zaobserwowano również zwiększoną fosforylację białka p66Shc. Zmianie tej nie towarzyszyły modyfikacje aktywności białek Akt i ERK 1/2. W sercach pobranych od zwierząt pływających doszło również do zwiększenia: ilości ferrytyny L oraz stosunku ferrytyny L do H. Pomimo wzrostu ilości aktywnej formy p66Shc,

nie wykazano zwiększenia produkcji H_2O_2 przez mitochondria izolowane z serc zwierząt poddanych jednorazowemu wysiłkowi pływakiemu. Co więcej, nie zaobserwowano wzrostu stężenia markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł we frakcji mitochondrialnej. Wynika z tego, że p66Shc uznawany za regulator stresu oksydacyjnego w mitochondriach, ulegając aktywacji nie zawsze doprowadza do wzrostu generacji RFT w tych strukturach.

Przedstawione wyniki badań nasunęły kolejne pytania badawcze:

1. czy opisane zmiany związane ze stresem oksydacyjnym i modyfikacją stężenia cholesterolu w mitochondriach, są typowe tylko dla tej tkanki, czy również inne tkanki zareagują w sposób podobny;
2. co może odpowiadać za zmiany w stężeniach mitochondrialnego cholesterolu.

Odpowiedzi na te pytanie staraliśmy się znaleźć w badaniach ujętych w drugiej publikacji z cyklu prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej.

6.2 Publikacja 2

W pracy pt. „Exercise-induced changes in Caveolin-1, depletion of mitochondrial cholesterol, and the inhibition of mitochondrial swelling in rat skeletal muscle but not in the liver”, opublikowanej w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* w 2016 roku, przedstawiono wyniki dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego na: stres oksydacyjny, stężenie cholesterolu, ilość białka kaweoliny-1 we frakcjach komórkowej i mitochondrialnej, otrzymanych z mięśni szkieletowych i wątrób. W publikacji tej zaprezentowano również wyniki pomiaru pęcznienia mitochondriów izolowanych z tych tkanek.

Obniżenie stężenia cholesterolu w mitochondriach, które obserwowane jest po wysiłku, związane jest ze zwiększoną opornością mitochondriów na pęcznienie. Kaweolina-1, jako białko niezbędne w wielu szlakach sygnalizacyjnych, odgrywa również kluczową rolę w regulacji transportu cholesterolu między składnikami komórki. W związku z tym, **celem tej pracy było zbadanie wpływu długotrwałego wysiłku pływackiego na ilość białka – kaweoliny-1 w mitochondriach; dodatkowo, sprawdzono, czy zmiany te towarzyszą modyfikacjom pęcznienia mitochondriów i stężenia cholesterolu w szczurzym mięśni szkieletowym i wątrobie.**

Samce szczurów zostały podzielone na grupy: kontrolną i wysiłkową. Zwierzęta w grupie wysiłkowej pływały przez 3 godziny z dodatkowym obciążeniem wynoszącym 3% masy ciała zwierząt. Od szczurów z grupy kontrolnej i wysiłkowej, bezpośrednio po zakończeniu wysiłku, zostały pobrane mięśnie czworogłowe ud oraz wątroby, w celu izolacji mitochondriów i przeprowadzenia pomiarów.

Jednorazowy, długotrwały wysiłek pływacki spowodował zwiększenie ilości białka kaweoliny-1 w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych szczurów. Zmianie tej towarzyszyło obniżenie stężenia cholesterolu w tych strukturach oraz zwiększenie oporności na pęcznienie mitochondriów indukowane chlorkiem wapnia. Podobnych zmian nie obserwowano w mitochondriach izolowanych z wątrób zwierząt. Co więcej, w wyniku długotrwałego wysiłku pływackiego doszło do zwiększenia poziomu markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł, które co ciekawe, obserwowane były w mitochondriach izolowanych z wątrób, a nie w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych.

Wyniki opublikowane w powyższych pracach wykazują, że długotrwały wysiłek wywołuje modyfikację stężenia cholesterolu w obrębie mitochondriów, a zmiana

ta może wynikać z różnych odpowiedzi na generację wolnych rodników. Warto zauważyć, że protekcyjne zmiany indukowane wysiłkiem pływackim były obserwowane jedynie w tkankach kurczliwych (serce, mięśnie szkieletowe). Co więcej, wykazanie potencjalnej roli białka - kaweoliny-1 w tym procesie, może być podstawą dla zrozumienia mechanizmów mitoprotekcji w warunkach stresu.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz faktu, że w wyniku unieruchomienia kończyn (np. w wyniku postępującej choroby) dochodzi do stresu oksydacyjnego oraz wzrostu stężenia cholesterolu w mięśniach, postanowiliśmy sprawdzić, na ile wspomniany mechanizm będzie widoczny na mysim modelu ludzkiej choroby neurodegeneracyjnej stwardnienia zanikowego bocznego. Ponadto chcieliśmy zweryfikować, czy trening pływacki w tym modelu eksperymentalnym okaże się modyfikatorem powyższych zmian.

Wyniki tych badań zostały ujęte w trzeciej publikacji z cyklu prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej.

6.3 Publikacja 3

W pracy pt. „Swim training modulates skeletal muscle energy metabolism, oxidative stress and the mitochondrial cholesterol content in Amyotrophic Lateral Sclerosis mice”, opublikowanej w czasopiśmie *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* w 2018 roku, przedstawiono wyniki dotyczące rozwoju stwardnienia zanikowego bocznego oraz wpływu treningu pływackiego, w tej jednostce chorobowej na: stres oksydacyjny, stężenie cholesterolu, ilość białka kaweoliny-1 oraz metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych mysz.

Stwardnienie zanikowe boczne jest nieuleczalną, chroniczną chorobą neurodegeneracyjną, która charakteryzuje się selektywną śmiercią motoneuronów w korze ruchowej, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. Jednakże przyczyn neurodegeneracji w ALS należy poszukiwać także poza układem nerwowym. Jedną z przyczyn tej choroby jest mutacja w genie dysmutazy nadadtlenkowej (SOD1), gdzie dochodzi do zamiany glicyny na alaninę w pozycji 93 (SOD1^{G93A}). Nadekspresja SOD1^{G93A} w mięśniach szkieletowych nie tylko inicjuje śmierć motoneuronów, ale również jest przyczyną atrofii mięśni. Ponadto, zniszczenie połączeń nerwowo-mięśniowych powiązane jest ze stresem oksydacyjnym, wywołanym specyficznym tkankowo rozpadem mitochondriów mięśni. Najnowsze badania dotyczące patogenezy ALS poświęcają wiele uwagi struktutom utworzonym przez mitochondria i błony retikulum endoplazmatycznego (MAMs). Struktury te zaangażowane są w regulację: sygnalizacji jonów wapnia, bioenergetyki mitochondriów, apoptozy i stresu oksydacyjnego. Należy przypuszczać, że podtrzymanie funkcji tych struktur będzie towarzyszyć wydłużeniu oraz poprawie jakości życia osób z ALS. W związku z tym, **celem tej pracy było zbadanie wpływu progresji ALS na zmiany w stężeniach mitochondrialnego cholesterolu, a także bioenergetykę i stres oksydacyjny w mięśniach szkieletowych mysz ALS (SOD1^{G93A}). Celem tych eksperymentów było także zweryfikowanie czy trening pływacki u mysz ALS będzie modyfikatorem powyższych zmian w mięśniach szkieletowych.**

Myszy ALS zostały podzielone na grupy według stopnia zaawansowania choroby (zwierzęta przed pojawieniem się pierwszych objawów oraz w terminalnym stadium choroby) i obecności lub braku treningu pływackiego. W homogenatach, otrzymanych z mięśni szkieletowych tych zwierząt, zmierzono aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm energetyczny (syntaza cytrynianowa, oksydaza

cytochromowa, dehydrogenaza mleczanowa, kinaza kreatynowa), parametry stresu oksydacyjnego i markery MAMs (ilość białka kaweoliny-1 i stężenie cholesterolu we frakcji mitochondrialnej).

Progresja choroby u mysz z ALS była związana z obniżeniem ilości kaweoliny-1 i akumulacją cholesterolu we frakcji mitochondrialnej. Zmianom tym towarzyszyło pogorszenie metabolizmu tlenowego i beztlenowego oraz wyższy poziom markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł. Wyniki badań potwierdziły, że trening pływacki wydłuża życie myszy ALS, czemu, co jest głównym odkryciem naszych badań, towarzyszyła zmiana w komponentach MAMs (podwyższenie ilości kaweoliny-1 oraz obniżenie stężenia cholesterolu we frakcji mitochondrialnej). Co więcej, trening pływacki podtrzymywał również funkcję energetyczną mitochondriów i obniżał poziom markerów peroksydacji białek i lipidów.

Wyniki tych badań sugerują, że modyfikacja komponentów MAMs, spowodowana treningiem, może odgrywać kluczową rolę w spowolnieniu rozwoju choroby - ALS. Wyjaśnienie tego mechanizmu może stworzyć nowe możliwości terapeutyczne zarówno w ALS jak i innych chorobach związanych z dysfunkcją mitochondriów, co poza wartością naukową, przyniesie również korzyść praktyczną.

7. Wnioski

1. Długotrwały wysiłek pływacki wywołuje obniżenie stężenia cholesterolu w obrębie mitochondriów izolowanych z mięśni szkieletowych szczurów, a zmiana ta jest skorelowana ze wzrostem ilości kaweoliny-1 w tych strukturach.
2. W wyniku powyższych zmian dochodzi do zwiększenia oporności mitochondriów na pęcznienie wywołane jonami wapnia.
3. W wyniku generacji wolnych rodników w czasie wysiłku pływackiego dochodzi do wzrostu poziomu markerów peroksydacji białek i lipidów w mitochondriach izolowanych z wątrób, przy jednoczesnym braku zmian w mitochondriach izolowanych z serc i mięśni szkieletowych.
4. Zmiany, do jakich dochodzi w czasie długotrwałego wysiłku pływackiego, nie wpływają na bioenergetykę mitochondriów.
5. W zaawansowanym stadium choroby u myszy z ALS dochodzi do obniżenia ilości kaweoliny-1 w obrębie MAMs, z jednoczesnym nagromadzeniem cholesterolu w tych strukturach.
6. U myszy z ALS zaobserwowano również pogorszenie metabolizmu energetycznego zarówno tlenowego jak i beztlenowego oraz wzrost poziomu markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł.
7. Trening pływacki u zwierząt z ALS doprowadza do zwiększenia ilości kaweoliny-1 oraz zmniejszenia stężenia cholesterolu. Zmianom tym towarzyszyła poprawa metabolizmu mitochondrialnego oraz zmniejszenie peroksydacji makromolekuł.
8. Wydłużenie życia zwierząt z ALS jest związane z modyfikacją struktury MAMs.

8. Piśmiennictwo

- Aebi H. 1984. *Catalase in vitro*. Methods Enzymol 105, 121-126.
- Baris T.Z., Crawford D.L., Oleksiak M.F. 2016. *Acclimation and acute temperature effects on population differences in oxidative phosphorylation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 310, R185-196.
- Bello-Haas V.D., Florence J.M., Kloos A.D., Scheirbecker J., Lopate G., Hayes S.M., Pioro E.P., Mitsumoto H. 2007. *A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS*. Neurology 68, 2003-2007.
- Booth F.W., Roberts C.K., Laye M.J. 2012. *Lack of exercise is a major cause of chronic diseases*. Compr Physiol 2, 1143-1211.
- Bosch M., Mari M., Herms A., Fernandez A., Fajardo A., Kassan A., Giralt A., Colell A., Balgoma D., Barbero E., Gonzalez-Moreno E., Matias N., Tebar F., Balsinde J., Camps M., Enrich C., Gross S.P., Garcia-Ruiz C., Perez-Navarro E., Fernandez-Checa J.C., Pol A. 2011. *Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility*. Curr Biol 21, 681-686.
- Broekemeier K.M., Schmid P.C., Schmid H.H., Pfeiffer D.R. 1985. *Effects of phospholipase A2 inhibitors on ruthenium red-induced Ca²⁺ release from mitochondria*. J Biol Chem 260, 105-113.
- Clarke S.J., Khaliulin I., Das M., Parker J.E., Heesom K.J., Halestrap A.P. 2008. *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation*. Circ Res 102, 1082-1090.
- Crouser E.D., Gadd M.E., Julian M.W., Huff J.E., Broekemeier K.M., Robbins K.A., Pfeiffer D.R. 2003. *Quantitation of cytochrome c release from rat liver mitochondria*. Anal Biochem 317, 67-75.
- Csukly K., Ascah A., Matas J., Gardiner P.F., Fontaine E., Burelle Y. 2006. *Muscle denervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D*. J Physiol 574, 319-327.
- De Lisio M., Kaczor J.J., Phan N., Tarnopolsky M.A., Boreham D.R., Parise G. 2011. *Exercise training enhances the skeletal muscle response to radiation-induced oxidative stress*. Muscle Nerve 43, 58-64.
- Deforges S., Branchu J., Biondi O., Grondard C., Pariset C., Lecolle S., Lopes P., Vidal P.P., Chanoine C., Charbonnier F. 2009. *Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Physiol 587, 3561-3572.
- Di Lisa F., Canton M., Menabo R., Dodoni G., Bernardi P. 2003. *Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition*. Basic Res Cardiol 98, 235-241.

- Drory V.E., Goltsman E., Reznik J.G., Mosek A., Korczyn A.D. 2001. *The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci 191, 133-137.
- Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. 1998. *Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i*. J Biol Chem 273, 12662-12668.
- Fujimoto M., Hayashi T., Su T.P. 2012. *The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun 417, 635-639.
- Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., Paolucci D., Moroni M., Contursi C., Pelliccia G., Luzi L., Minucci S., Marcaccio M., Pinton P., Rizzuto R., Bernardi P., Paolucci F., Pelicci P.G. 2005. *Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis*. Cell 122, 221-233.
- Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. 2004. *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res 61, 372-385.
- Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S., Woodfield K.Y. 1998. *Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart*. Biochim Biophys Acta 1366, 79-94.
- Hausenloy D.J., Yellon D.M. 2003. *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol 35, 339-341.
- Hayashi T., Fujimoto M. 2010. *Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction*. Mol Pharmacol 77, 517-528.
- Keatisuwan W., Kinjo M., Koyama T. 1991. *Changes in phospholipid constituents in mitochondrial membranes after long lasting exercise in rat heart*. Life Sci 48, 2173-2181.
- Khaliulin I., Clarke S.J., Lin H., Parker J., Suleiman M.S., Halestrap A.P. 2007. *Temperature preconditioning of isolated rat hearts--a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore*. J Physiol 581, 1147-1161.
- Kristensen J.M., Larsen S., Helge J.W., Dela F., Wojtaszewski J.F. 2013. *Two weeks of metformin treatment enhances mitochondrial respiration in skeletal muscle of AMPK kinase dead but not wild type mice*. PLoS One 8, e53533.
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. 1990. *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol 186, 464-478.

- Makinen M.W., Lee C.P. 1968. *Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria. I. Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria.* Arch Biochem Biophys 126, 75-82.
- Manfredi G., Kawamata H. 2016. *Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis.* Neurobiol Dis 90, 35-42.
- Marcil M., Bourduas K., Ascah A., Burelle Y. 2006. *Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 290, H1549-1557.
- Misik V., Ondrias K., Balgavy P. 1992. *Effect of lipid peroxidation on molecular arrangement of phospholipids in liposomes prepared from egg yolk phosphatidylcholine or total rat brain lipids. A 31P NMR study.* Gen Physiol Biophys 11, 317-325.
- Oakes J.A., Davies M.C., Collins M.O. 2017. *TBKI: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation.* Mol Brain 10, 5.
- Paillasson S., Stoica R., Gomez-Suaga P., Lau D.H., Mueller S., Miller T., Miller C.C. 2016. *There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases.* Trends Neurosci 39, 146-157.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Symons M.C.R. (1991). *Techniques in Free Radical Research*, vol. 22, Amsterdam.
- Sala-Vila A., Navarro-Lerida I., Sanchez-Alvarez M., Bosch M., Calvo C., Lopez J.A., Calvo E., Ferguson C., Giacomello M., Serafini A., Scorrano L., Enriquez J.A., Balsinde J., Parton R.G., Vazquez J., Pol A., Del Pozo M.A. 2016. *Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice.* Sci Rep 6, 27351.
- Sorice M., Mattei V., Matarrese P., Garofalo T., Tinari A., Gambardella L., Ciarlo L., Manganelli V., Tasciotti V., Misasi R., Malorni W. 2012. *Dynamics of mitochondrial raft-like microdomains in cell life and death.* Commun Integr Biol 5, 217-219.
- Szymanski J., Janikiewicz J., Michalska B., Patalas-Krawczyk P., Perrone M., Ziolkowski W., Duszynski J., Pinton P., Dobrzyn A., Wieckowski M.R. 2017. *Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure.* Int J Mol Sci 18.
- Vadhana M.S., Carloni M., Nasuti C., Fedeli D., Gabbianelli R. 2011. *Early life permethrin insecticide treatment leads to heart damage in adult rats.* Exp Gerontol 46, 731-738.
- Watanabe S., Ilieva H., Tamada H., Nomura H., Komine O., Endo F., Jin S., Mancias P., Kiyama H., Yamanaka K. 2016. *Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR1- and SOD1-linked ALS.* EMBO Mol Med 8, 1421-1437.

Weiss J.N., Korge P., Honda H.M., Ping P. 2003. *Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease*. Circ Res 93, 292-301.

Wharton D.C., A. T. (1967). Cytochrome C oxidase from beef heart mitochondria. In *Methods Enzymol*, vol. 10. ed. Estabrook R.W. & M.E. P, pp. 245-250. Academic Press, NY.

Ziolkowski W., Szkatula M., Nurczyk A., Wakabayashi T., Kaczor J.J., Olek R.A., Knap N., Antosiewicz J., Wieckowski M.R., Wozniak M. 2010. *Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics*. FEBS Lett 584, 4606-4610.

Ziolkowski W., Vadhana Ms D., Kaczor J.J., Olek R.A., Flis D.J., Halon M., Wozniak M., Fedeli D., Carloni M., Antosiewicz J., Gabbianelli R. 2013. *Exercise-induced heart mitochondrial cholesterol depletion influences the inhibition of mitochondrial swelling*. Exp Physiol 98, 1457-1468.

9. Streszczenie pracy w języku polskim

Wprowadzenie

Brak systematycznej aktywności fizycznej jest jedną z głównych przyczyn wielu chorób. Z drugiej strony regularna aktywność fizyczna zapobiega takim schorzeniom jak: nowotwory, cukrzyca, choroby układu krążenia, udary i inne. Dane z piśmiennictwa dowodzą również, że trening pływacki łagodzi objawy, poprawia jakość, a nawet może doprowadzić do wydłużenia życia w chorobie neurodegeneracyjnej, jaką jest Stwardnienie Zanikowe Boczne (ALS). Wielu z wymienionych wyżej chorób towarzyszą dysfunkcję mitochondriów, związane z zaburzeniami w obrębie struktur komórkowych utworzonych przez mitochondria i błony retikulum endoplazmatycznego (MAMs) w tym procesie.

Cel pracy

Celem pracy było wykazanie czy długotrwały wysiłek pływacki, w tkankach zdrowych szczurów oraz trening pływacki w mięśniach szkieletowych mysz z ALS, wpłyną na: modyfikacje stężenia cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej, poprawę funkcji mitochondriów oraz stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł.

Materiały i metody

Badania zostały wykonane z wykorzystaniem dwóch modeli eksperymentalnych. Badania dotyczące wpływu jednorazowego, długotrwałego wysiłku pływackiego na stres oksydacyjny, modyfikację stężeń cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej oraz funkcję mitochondriów zostały przeprowadzone na szczurach rasy Wistar. Z kolei, badania dotyczące wpływu treningu pływackiego na stres oksydacyjny, metabolizm energetyczny oraz stężenie cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej w atroficznych mięśniach szkieletowych, zostały przeprowadzone na myszach transgenicznym B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J, które są mysim modelem ludzkiej choroby ALS.

W zebranych materiale, od zwierząt poddawanych wysiłkowi i niepływającym, zostały oznaczone: stężenie cholesterolu we frakcji komórkowej i mitochondrialnej, ilość białka kaweoliny-1, stężenie markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł,

pęcznienie mitochondriów, aktywności enzymów (syntazy cytrynianowej, oksydazy cytochromowej, katalazy).

Wyniki

Jednorazowy, długotrwały wysiłek pływacki, we frakcji komórkowej serc, spowodował wzrost stężenia markerów stresu oksydacyjnego, mierzonych za pomocą: grup karbonylowych białek oraz indeksu peroksydacji lipidów - dienów. Ten sam wysiłek spowodował również zwiększenie ilości białka kaweoliny-1 w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych szczurów. Zmianie tej towarzyszyło obniżenie stężenia cholesterolu w tych strukturach oraz zwiększenie oporności na pęcznienie mitochondriów indukowane chlorkiem wapnia. Podobnych zmian nie obserwowano w mitochondriach izolowanych z wątrób zwierząt. Co więcej, w wyniku długotrwałego wysiłku pływackiego doszło do zwiększenia poziomu markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł, które co ciekawe, obserwowane były w mitochondriach izolowanych z wątrób, a nie w mitochondriach izolowanych z mięśni szkieletowych.

Progresja choroby u mysz z ALS była związana z obniżeniem ilości kaweoliny-1 i akumulacją cholesterolu we frakcji mitochondrialnej. Zmianom tym towarzyszyło pogorszenie metabolizmu tlenowego oraz wyższy poziom markerów wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł. Wyniki badań potwierdziły, że trening pływacki wydłuża życie mysz ALS, czemu towarzyszy zmiana w komponentach MAMs (podwyższenie ilości kaweoliny-1 oraz obniżenie stężenia cholesterolu we frakcji mitochondrialnej). Co więcej, trening pływacki podtrzymywał również funkcję energetyczną mitochondriów i obniżał poziom markerów peroksydacji białek i lipidów.

Wnioski

Uzyskane wyniki wykazują, że protekcyjne zmiany wywołane jednorazowym, długotrwałym wysiłkiem pływackim są związane z obniżeniem stężenia cholesterolu w obrębie mitochondriów izolowanych z mięśni szkieletowych szczurów, a zmiana ta jest skorelowana ze wzrostem ilości kaweoliny-1 w tych strukturach. W wyniku powyższych zmian dochodzi do zwiększenia oporności mitochondriów na pęcznienie wywołane jonami wapnia. Warto zauważyć, że zmiany te były obserwowane jedynie w tkankach kurczliwych (serce, mięśnie szkieletowe).

Z kolei badania z użyciem mysiego modelu ludzkiej choroby ALS wykazują, że w tej jednostce chorobowej, dochodzi do modyfikacji komponentów MAMs. Odwrócenie zmian w obrębie tych struktur poprzez trening pływacki towarzyszyło wydłużeniu życia tych zwierząt. Wyniki te sugerują, że modyfikacja komponentów MAMs, spowodowana treningiem, może odgrywać kluczową rolę w spowolnieniu rozwoju choroby - ALS.

10. Streszczenie pracy w języku angielskim

Introduction

A lack of systematic physical activity is one of the main causes of many diseases. On the other hand, regular physical activity prevents such diseases as: cancer, diabetes, cardiovascular diseases, strokes and others. Data from the literature also prove that swim training alleviates symptoms, improves quality of life, and may even extend the lifespan in neurodegenerative disease - Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Many of the diseases mentioned above are accompanied with mitochondrial dysfunction, which are related to disorders within the cell structures formed by the mitochondria and the endoplasmic reticulum membranes (MAMs).

Aim of the study

The aim of this study was to investigate the effects of a long-lasting acute swimming, in tissues of healthy rats, and swim training in skeletal muscle of ALS mice on: modification of cholesterol concentration in the cellular and mitochondrial fraction, mitochondrial function and the level of lipid and protein peroxidation markers.

Materials and Methods

The studies were performed using two experimental models. Firstly, studies on the effect of long-lasting acute swimming on oxidative stress, modification of cholesterol concentrations in the cellular and mitochondrial fraction, and mitochondrial function were performed on Wistar rats. Secondly, studies on the effect of swim training on oxidative stress, energy metabolism and cholesterol concentration in the cellular and mitochondrial fraction in atrophic skeletal muscles were carried out on B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J transgenic mice, which are a mouse model of human ALS disease. In the collected material, from the animals assigned to swim and non-swim groups was measured: cholesterol concentration in the cellular and mitochondrial fraction, the Caveolin-1 protein content, the concentration of free radical macromolecules damage, mitochondrial swelling and enzyme activities (citrate synthase, cytochrome c oxidase, catalase).

Results

A long-lasting acute swimming caused an increase markers of oxidative stress, measured by: proteins carbonyl groups and the index of lipid peroxidation - dienes in the cellular fraction of the hearts. Moreover, after acute exercise the elevated amount of caveolin-1 in the mitochondria isolated from rats' skeletal muscle was observed. This modification was accompanied with lower cholesterol levels in these structures and increased resistance to calcium-induced swelling of mitochondria. However, similar changes were not observed in mitochondria isolated from livers. Additionally, as the result of prolonged swimming, there was an increase in the level of lipid and protein peroxidation markers, which, interestingly, were observed in mitochondria isolated from the liver but not in the mitochondria isolated from skeletal muscles.

Progression of ALS was associated with a decrease in the level of caveolin-1 and the accumulation of cholesterol in the mitochondrial fraction. These changes were accompanied with deterioration of aerobic metabolism and higher level of free radical macromolecules damage. Our results confirmed that swim training extends the lifespan of ALS mice, which was associated with an alteration in the components of MAMs (increase in the caveolin-1 level and lower cholesterol level in the mitochondrial fraction). What is more, swim training also maintained the energy function of mitochondria and reduced the level of markers of protein and lipid peroxidation.

Conclusion

The obtained results show that protective modifications induced by a long-lasting swimming are associated with a decrease in cholesterol concentration in the mitochondria isolated from the skeletal muscles of rats. This change correlates with the increase in the caveolin-1 level in these structures. As the result of these changes, an inhibition of mitochondrial swelling was observed. It is worth noting that these modifications were observed only in contractile tissues (heart, skeletal muscles).

Studies using the mouse model of human disease - ALS show that in the development of this disease, the components of MAMs are modified. Reversal of changes within these structures through swim training was accompanied with the prolongation of lifespan in ALS mice. These data suggest that modification of MAMs may play a crucial role in the exercise-induced deceleration of ALS development.