

# Az alternatív hipertrófia módszerek molekuláris hatásai

Doktori értekezés

**Gombos Zoltán**

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem  
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Tihanyi József professor emeritus, DSc

Dr. Szász András főiskolai docens, PhD

Budapest

2023

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
Ábrajegyzék.....	7
Táblázatok jegyzéke.....	9
1. Bevezetés.....	10
2. Irodalmi áttekintés.....	14
2.1. Hipertrófia és egészség.....	14
2.2 Hipertrófia és sportteljesítmény.....	15
2.3. Vázizom hipertrófia élettana.....	16
2.4. Katabolikus folyamatok.....	20
2.5. Állóképességi edzés hatása a vázizomra.....	21
2.5.1. Edzés hatására bekövetkező mitokondriális változások.....	22
2.5.2 Oxidatív stressz és az antioxidáns hatás a vázizom keresztmetszetre.....	23
2.6. MikroRNS és az izomkeresztmetszet növekedés.....	24
2.7. SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött szerepe.....	25
2.8. Alternatív hipertrófia modellek.....	27
2.8.1. Kompenzációs hipertrófia.....	27
2.8.2. Okklúziós edzés.....	29
2.8.2.1. Az elszorítás nagysága.....	32
3. Célkitűzések.....	35
4. Anyag és módszer.....	36
4.1. Módszer választás szempontjai.....	36
4.2. Kompenzációs hipertrófia modell.....	37
4.2.1. Vizsgálati állatok.....	37
4.2.2. Műtéti eljárás.....	38

4.2.3. Az izomminták begyűjtése .....	39
4.3. Biokémiai változások detektálására használt módszerek kompenzációs modellnél .....	39
4.3.1. Western blot molekuláris biológiai eljárás.....	39
4.3.2. H <sub>2</sub> S meghatározás.....	42
4.3.3. Cisztationin béta-szintáz (CBS) aktivitás mérése .....	43
4.3.4. NADH/NAD <sup>+</sup> aktivitás mérése .....	44
4.4. Okklúziós vizsgálat.....	45
4.4.1. Vizsgálati személyek.....	45
4.4.2. Maximális erő felmérése .....	45
4.4.3. Terhelés protokoll .....	46
4.4.4. Véráram vizsgálat.....	46
4.4.5. Biopszia mintavétel.....	47
4.5. Biokémiai változások detektálására használt módszerek okklúziós modellnél...	47
4.5.1. RNS kitermelés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) az mRNS és mikroRNS átíratok vizsgálatához .....	48
4.6. Statisztikai analízis .....	49
5. Eredmények.....	51
5.1. Kompenzatórikus hipertrófia kísérlet .....	51
5.1.1 Antropometriai változások .....	51
5.1.2. A plantaris izomban mért biokémiai változások .....	52
5.1.3. A katabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék .....	54
5.1.4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó fehérjék .....	55
5.1.5. A mitofágiában szerepet játszó fehérjék .....	56
5.1.6. SIRT1 fehérje aktivitási és bioszintézisének markerei. ....	57
5.1.7. A redox folyamatokban szerepet játszó antioxidáns markerek.....	58

5.1.8. H <sub>2</sub> S és a CBS enzim aktivitásának mérése.....	59
5.2. A humán okklúziós edzés hatására bekövetkező változások.....	61
5.2.1. Véráram paraméterek eredményei.....	61
5.2.2. Okklúziós edzés hatására bekövetkező mRNS változások.....	63
5.2.3. miRNS változások az okklúziós edzés hatására.....	64
5.2.4. Western blot eljárással vizsgált fehérjék változása az okklúziós edzés hatására.....	66
6. Diszkusszió.....	69
6.1. Kompensációs hipertrófia modell során talált eredmények megbeszélése.....	69
6.2. A humán okklúziós edzés hatására bekövetkező változások megbeszélése.....	77
7. Következtetések.....	82
8. Összefoglalás.....	86
9. Summary.....	88
10. Irodalomjegyzék.....	89
11. Saját publikációk jegyzéke.....	107
Köszönetnyilvánítás.....	108

## Rövidítések jegyzéke

1RM	Egy ismétléses maximum
Akt	Protein kinase B
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
AOP	arterial occlusion pressure
CBS	Cisztationin béta-szintáz
COX4	Cytochrome c oxidase subunit 4
CRP	C-reactive protein
EMS	Electrical muscle stimuli
FOXO1	Forkhead Box protein O 1
FOXO3	Forkhead Box protein O 3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
H <sub>2</sub> S	kén hidrogén/ hidrogén-szulfid
HIF1a	hypoxia-inducible factor 1 subunit alpha
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGF-1	insulin-like growth factor 1
miRNS	mikroRNS
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
MuRF1	muscle RING-finger protein-1

NAD <sup>+</sup>	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NMNAT	nikotinamid mononukleotid adenyltransferase
NRF2	Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2
NSCA	National Strength and Conditioning Association
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
Pax3	Paired Box 3
Pax7	Paired Box 7
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
PCR	polimeráz láncreakció
PGC1A koaktivátor 1 alfa	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma
PGC1A4 koaktivátor 1 alfa 4	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma
PI3K	Foszfatidilinozitol 3-kináz
PINK1	PTEN-induced kinase 1
PPARα	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor alfa
PTF	prothrombin fragmentum
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
S6	Ribosomal protein S6
SIRT1 homolog 1	silent mating type information regulation 2

SIRT3	silent mating type information regulation 2
homolog 3	
SOD2	Szuperoxid-dizmutáz 2
TAT	trombin-antitrombin 3 komplex
TBST	Tris-pufferolt sóoldat-Tween 20
TFAM	Mitochondriális transzkripció faktor A
tPA	szöveti plazminogén aktivátor
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

## Ábrajegyzék

1. ábra: Egy specifikus inger hatására bekövetkező szatellita sejt aktiváció és annak lépései (Isesele és Mazurak 2021 ábrája alapján átdolgozva) .....	17
2. ábra: Az Akt/m-TOR útvonalban szerepet játszó fehérjék molekuláris jelátviteli útvonalának sémája (Gao és mtsai 2012 ábrája alapján átdolgozva) .....	19
3. ábra: A Sestrin fehérje interakciója és szerepe az AMPK általi mTOR útvonal gátlásában (Hay 2011 ábrája alapján átdolgozva) .....	21
4. ábra: Az ábrán az izmok eltávolításának egyes mozzanatai láthatóak .....	39
5. ábra: Terhelési protokoll: szériák, véráramlás mérés és biopszia mintavétel ideje.....	47
6. ábra: A 2 hetes kezelés után mért állatsúlyok, plantaris izmok tömege, plantaris izom és a testtömeg százalékos aránya.....	52
7. ábra: Az anabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit az Akt, mTOR, pmTOR, S6, pS6, SIRT1, NAMPT és GAPDH fehérjék esetében. ....	53
8. ábra: A p-mTOR/mTOR, p-S6/totál S6 fehérjék arányának szintje.....	54
9. ábra: A katabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a FOXO1, Sesetrin2, AMPK, pAMPK fehérjék esetében. ....	55
10. ábra: A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a Cytochrome C, COX4, NRF2, SOD2 fehérjék esetében. ....	56
11. ábra: A mitofágiában szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a SIRT3 és PINK1 fehérjék esetében.....	57
12. ábra: SIRT1 fehérje aktivitási és bioszintézisének markerei.....	58
13. ábra: A redox folyamatokban szerepet játszó antioxidáns markerek változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredménye az OGG1, Ac p53 fehérje esetében	59
14. ábra: A CBS és a H <sub>2</sub> S markerek változásai .....	60
15. ábra: A szisztolés véráram sebessége. ....	62
16. ábra: A diasztolés véráram sebessége.....	62
17. ábra: Véráramlási sebesség a különböző időpontokban. ....	63
18. ábra: Terhelés hatására bekövetkező változások az mRNS szintekben .....	64



19. ábra: Terhelés hatására bekövetkező változások az miRNS szintekben .....	65
20. ábra: A Pax7 mRNS és a miR-206 miRNS kapcsolata. ....	65
21. ábra: A Pax7, NRF1 és a PGC1A fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményei a fent említett fehérjék esetében.....	66
22. ábra: A kompenzációs hipertrófia modell hatása az anabolikus és katabolikus folyamatokra.....	72
23. ábra: A csökkent redox állapot kialakulásának mechanizmusa.....	75
24. ábra: A mitokondriális dinamika ábrája .....	76

## Táblázatok jegyzéke

1. táblázat: <i>A mérések során alkalmazott elsődleges antitestek</i> .....	41
2. táblázat: Monobróm-bimánnal végzett H <sub>2</sub> S mérés gradiens elúciós profilja. ....	43
3. táblázat: qRT-PCR eljárás során vizsgált mRNS-ek .....	49
4. táblázat: A kezelés hatására a plantaris izomban bekövetkező antropometria és biokémiai változások összefoglalása. ....	60
5. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása mRNS-ek esetében. ....	67
6. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása miRNS-ek esetében. ....	68
7. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása fehérjék esetében. ....	68

## **1. Bevezetés**

A fizikai aktivitás fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni. Az ipari forradalom és a tudományos-, és technikai forradalom kirobbanása Janus-arcú világgépet eredményezett, melyben az életmód megváltozása egyaránt járt mind pozitív, mind negatív változásokkal az emberek mindennapi életében. A közlekedési eszközök fejlődése megkönnyítette az emberek mindennapi életét, azonban emiatt a munkába járás során megtett, nem ritkán hosszú sétákat és a testre gyakorolt pozitív hatásait nem élvezhették tovább. Ennek hatására megjelentek különböző rekreációs irányzatok, melyek “visszahívták” az embereket a természetbe, mellyel a fizikai aktivitás csökkenését is sikerült mérsékelni. Az információs forradalom a távközlést és az információ áramlását nagymértékben megkönnyítette, mivel a kommunikáció olyan mértékben felgyorsult, hogy az emberek a mindennapi feladataikat is már szinte bárhol elvégezhetik. Főleg igaz ez a mai világban. Manapság egyre több munkahely állt át a “home office”-ra, ezzel is csökkentve a társadalom fizikai aktivitásának szintjét. Ez nem csupán az egyének probléma, hanem ebben az esetben már társadalmi szintű problémáról beszélünk.

A testedzés szisztematikus hatásait egyre több népszerű tanulmány támasztja alá egészséges és betegségben szenvedő személyeknél egyaránt (Ludyga és mtsai., 2020; Radak és mtsai., 2020). Amellett, hogy a fizikai teljesítőképességet emeli, nagymértékben hozzájárul a megfelelő egészség kialakításához, illetve megtartásához. A sport minden területén, legyen itt szó az élsportról vagy a szabadidősportról, nagyon fontos tényező a vázizomzat fejlettsége. Ehhez a fejlettséghez hozzájárul az izomtömeg nagysága is, mely edzéssel nagy mértékben változtatható. Az izomkeresztmetszet növekedése az egyik legszembetűnőbb edzés hatásra bekövetkező változás. Az izomtömeg nemcsak a sportoló esztétikai megjelenéséhez járul hozzá, hanem az erő kifejtésének a mértékéhez is. Rengeteg sportág alapja az erő, mely szoros kapcsolatban van az izom keresztmetszetének a nagyságával.

A vázizom mérete és annak a megfelelő állapota nem csupán a teljesítmény szempontjából jelentős, hanem rengeteg életmódbeli megbetegedés és mozgásszervi probléma kialakulását is megelőzheti, illetve kordában tarthatja azokat. Hiszen a vázizom az egyik legnagyobb tömegű szerv az emberi testben és ezáltal hatalmas befolyása van az

egész test anyagcseréjére és hormonális változásaira. Az életkor előrehaladtával az izomtömeg csökken, aminek hatására metabolikus és endokrinológiai megbetegedések következhetnek be. Emellett a mai ülő életmód miatt kialakult izomdiszbalanszok és tartáshibák hatásra létrejövő mozgásszervi panaszok korrigálásának alapvető eszköze az erős és funkcionálisan megfelelő tartóizomzat, melyet rendszeres fizikai aktivitással érhetünk el.

Az izomkeresztmetszet fejlesztése a rekreációs sportolók világában is igen nagy teret hódít magának. A kondicionálótermek világa tele van olyan szabadidős sportolóval, akiknek elsődleges célja a nagy izomzat kifejlesztése, nem pedig az egészséges életmód iránti vágyból végzett rendszeres testedzés. Az esztétikus megjelenést kölcsönző kidolgozott izomzat történelmünk során is jelentős volt. Gondoljunk csak bele, hogy a történelem nagy harcosait és hódítóit mind hatalmas izomtömeggel ábrázolták bizonyos kultúrák művészei, nem beszélve az ókori olümpiai játékok atlétáiról és a mitológiák szereplőiről. Mindezek mellett evolúciós szempontból nézve a dolgot, a nagy izomtömeg a magasabb tesztoszteron szintre engedett következtetni, ami az adott fajon belüli alfahímekre volt jellemző.

A kutatók régóta foglalkoznak az edzések során bekövetkező élettani változásokkal, köztük a hipertrófiával és annak az élet többféle szegmensére gyakorolt hatásaival. A hipertrófia molekuláris útvonalai és jelzőrendszerei nem újkeletű kutatási területe a sport-, és élettudományoknak, de a mai napig vannak még megfejtetlen területei. A kutatások során nemcsak a klasszikus rezisztencia edzésekre tértek ki a vizsgálatok, hanem különböző módszereket használtak az izomkeresztmetszet növekedés eléréséhez.

Jelen dolgozatban a hipertrófizációs módszerek két, szintén sokat kutatott fajtáját fogom kifejteni, melyeket alternatív hipertrófiás módszerekként említünk. Ezen módszerek egyike az úgynevezett “kompenzációs hipertrófia” modell vagy az angolban használt “overload-induced hypertrophy” modell, ami patkányon vagy egéren végzett eljárás. Műtéti beavatkozással a hátsó láb bizonyos izmának a szinergistái eltávolításra kerülnek, mellyel egy “kompenzációs” adaptációt lehet elérni a megmaradt izomnál. Ezt az eljárást a gyors és nagymértékű hipertrófia elérésére használják és számos kutatás módszertani alapját képezi (Hyatt és mtsai., 2008; J. D. Lee és mtsai., 2016).

A másik alternatív módszer a Japánban őshonos okklúziós vagy érelszorításos edzés, mely a hazájában és azóta a világ más tájain is kedvelt edzésmódszerré vált. Ez a fajta alternatív edzésmódszer a sport minden területén megjelenhet, de emellett a rehabilitációban is közkedvelt helyet tölt be. Mindkét esetben az alternatív kifejezést használtam, utalva arra, hogy nem a hétköznapi értelemben vett edzésmódszerekkel próbálunk elérni izomkeresztmetszeti növekedést.

A kompenzációs hipertrófia modellt nem egyfajta edzés módszerként tárgyaljuk. A modell során az állat folyamatos terhelésnek van kitéve, mivel a meglévő plantarflexor izom a testsúly megtartásáért felelős, ami a 2 hetes kezelés során folyamatos túlterhelés alatt van. Laboratóriumunk korábbi kutatásában felfedeztük ennek a módszernek a SIRT1 fehérjét aktiváló hatását, mely a hipertrófia molekuláris jelzőfolyamatainak egy egészen újszerű irányát tárta fel előttünk (Koltai és mtsai 2017).

Az okklúziós edzés, egyféle kombinációja a különböző edzéseknek a végtagok vérellátásának korlátozottságával. Ez a fajta terhelés lehet klasszikusan rezisztencia edzés vagy akár állóképességi edzés is. Dolgozatomban ki fogok térni az okklúziós terhelés egészségügyi kockázati tényezőire és a pozitív élettani hatásaira is. Ezt a módszert a terhelés során alkalmazzák a gyakorlatok végrehajtása közben. Kutatásunk során ezt a módszert nem a klasszikus okklúziós eljárások alapján alkalmaztuk, hanem ennek az edzésmódszernek egy újszerű használatát mutattuk be. Az általunk alkalmazott okklúziós elszorítást az edzés pihenőidejében végeztük, melynek indoklására és hatásaira alaposan kitérek.

Jelen dolgozatomban tárgyalom a különböző anabolikus és katabolikus útvonalak szerepét, illetve változásait a különböző módszerek hatására. Emellett a mitokondriális dinamikát és a redox állapotot és annak változásait is ismertetem.

A silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) fehérje hipertrófiában játszott szerepének megismerésére az elmúlt évtized során született néhány kutatás, melyek dolgozatom alapját képezik és ezeket (a komplexebb hatásmechanizmus és fontossága megértéséhez) alaposabban kifejtem (D. Lee és Goldberg 2013, Hong és mtsai 2014, Koltai és mtsai 2017). Ezen kutatások eredményeit továbbgondolva formálódott

meg a dolgozatom témája, melynek eredményei révén komplexebb képet kapunk a hipertrófiában szerepet játszó fehérjék és azok útvonalainak interakcióiról.

A dolgozatom alapját képező kutatások újszerűsége abban rejlik, hogy a kompenzációs hipertrófia modellel végzett vizsgálatok során a különböző molekuláris útvonalaknak és azok kapcsolatainak a felderítésében mutatunk be újdonságokat, míg az okklúziós edzés egy korábban még nem vizsgált módszerének alkalmazásával kaptunk teljesebb képet, annak élettani hatásairól.

A sporttudomány, mint interdiszciplináris tudomány, számos lehetőséget biztosít az új kutatások megszületésére. Témaválasztásom a hipertrófiára és annak alternatív lehetőségeire esett, mivel már az egyetemi képzés megkezdése óta foglalkoztat az izomkeresztmetszet növelésének a lehetősége. A klasszikus hipertrófizáló edzések élettana régóta kutattott terület, emiatt dolgozatomban a nem klasszikus hipertrófiás módszereknek a további megismerését tűztük ki célul.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Hipertrófia és egészség**

A fizikai aktivitás a mai rohanó világban sajnálatos módon háttérbe szorult, ami komoly egészségügyi problémákhoz vezethet, mint amilyenek a kardiovaszkuláris megbetegedés, cukorbetegség, rák vagy egyszerűen a mobilitás csökkenése (Blair, 2009; Sanchis-Gomar és mtsai., 2015). A vázizom, mint sok sejtmagvas sejt nagymértékben képes megváltoztatni a metabolizmusát és a tömegét a különböző ingerek hatására. Izom keresztmetszeti növekedést már az egy ismétléses maximum (1RM) 70%-val végzett edzés is képes kiváltani (Holm és mtsai., 2008)). Egyfajta hormetikus fordított U-alakú kapcsolati görbe van az izom keresztmetszet és az egészségügyi állapot között (Figueiredo, de Salles és Trajano 2018). Jól mutatja azt, hogy az ellenállásos edzés rendkívül hatékony bizonyos betegségek megelőzésében és kezelésében (Pescatello és mtsai 2004, Westcott 2012) és kiegészítő terápiaként is ajánlott bizonyos betegségek kezelése során, mint a diabétesz és a kardiovaszkuláris megbetegedések (Westcott, 2012), (Williams és mtsai., 2007).

A vázizom a szervezet legfőbb glikogénraktára, mely a tömegének a megnövekedésével nagyobb mennyiségű cukor felvételére képes. Egyhetes szigorú ágynyugalom hatására nagymértékben csökkent az izomtömeg és az inzulin szenzitivitás (Dirks és mtsai., 2016), azonban már egyszeri ellenállással végzett edzés hatására javulhat a vázizom inzulin érzékenysége (Kido és mtsai., 2020). Az ellenállással végzett edzés anyagcserében játszott fontos szerepére a későbbiekben még visszatérünk, de most említést kell tennünk egyéb más betegségek megelőzésében vagy kezelésében.

Régóta ismeretes tény, hogy az aerob állóképesség szintje nagymértékben befolyásolja a kardiovaszkuláris fittséget, azaz a szív-, és a keringési rendszer megfelelő állapotát. Az aerob állóképesség szintje fordítottan arányos a kardiovaszkuláris megbetegedések rizikójával és a mortalitással (Nauman és mtsai., 2017). Emellett az izom ereje és tömege szintén fordított arányosságot mutat a kardiovaszkuláris megbetegedésének rizikójával (Ruiz és mtsai., 2008). Egy Health Professional's study elnevezésű projekt alapján heti

minimum háromszori ellenállással végzett edzés hasonló preventív hatással bír a halálos és nem halálos kimenetelű kardiovaszkuláris infarktus rizikójával szemben, mint 2,5 óra sétálás (Tanasescu és mtsai., 2002). Érdeemes megemlíteni a világ halálozási okai közül az egyik legjelentősegteljesebbet a rákos megbetegedéseket és annak a ellenállással végzett edzéssel való kapcsolatát. Heti legalább két ellenállással végzett edzés több, mint 30%-kal csökkentette a rákos betegségekből fakadó elhalálozás esélyét (Stamatakis és mtsai., 2018).

## **2.2 Hipertrófia és sportteljesítmény**

Az erő az a kondicionális képesség, amely minden sportágban megjelenik még a hosszútávfutásban is. Hiszen gondoljunk csak bele, hogy a futás során megtett távolságok a propulzív fázisban is annak függvénye mekkora erőt fejtünk ki a talajra és valójában az az atléta nyeri a versenyt, aki ezt az erőszintet hosszabb ideig tudja fenntartani. Az erő kifejtés nagysága viszont nagymértékben függ az izom tömegétől és az életkortól (Newman és mtsai., 2003). Bizonyos sportágakban, mint a testépítés az izomkeresztmetszet mértéke kulcsfontosságú, ellenkező esetekben, mint a magasugrás, ahol a plusz tömeg nem feltétlenül előnyös a teljesítmény szempontjából, az izomhipertrófia kimondottan hátrányos egy bizonyos szint után. Emellett pedig bizonyos súlycsoportos sportágakban, amilyen a súlyemelés is a nagy maximális erőnek fontos szerepe van, mégis a súlycsoportok határai miatt a hipertrófia mértéke korlátok közé van szorítva.

A következőkben szemléltetem néhány példával a hipertrófia és/vagy az ellenállással végzett edzés fontosságát a különböző kondicionális képességekkel kapcsolatban. Ezen képességek megléte rendkívül fontos a megfelelő sportági teljesítményhez. Häkkinen és Keskinen 1989-es kutatásukban azt vizsgálták, hogy a különböző kondicionális képességeket igénylő sportágakban, milyen mértékű a maximális erő kifejtés nagysága és az izom keresztmetszet kapcsolata (Häkkinen & Keskinen, 1989). Nem meglepő módon azt találták, hogy az erősportolóknál a legnagyobb ezt követően a sprintereknél és végül



az állóképességi atlétáknál a legkisebb az erő kifejtés nagysága és az izom keresztmetszet kapcsolata.

Vikmoen és mtsai (2016), azt vizsgálták elit női kerékpárosoknál, hogy kombinált, ellenállásos és állóképességi edzés hatására, hogyan változik az izmok keresztmetszete, maximális ereje és egy 40 perces „all out” terhelés alatti átlag mechanikai teljesítményük (Vikmoen és mtsai., 2016). Kutatásukban azt találták, hogy mikor az ellenállással végzett edzést kombinálták az állóképességi edzéssel, szignifikáns különbség mutatkozott a maximális erő kifejtésben, izom keresztmetszetben és a 40 perces terhelés átlag teljesítményében a csak állóképességi edzést végző csoporthoz képest. Egy hasonlóan kerékpárosokon végzett vizsgálat során, ahol szintén kombinálták az ellenállással végzett edzést az állóképességi edzéssel, a kutatók azt mutatták ki, hogy a Wingate teszt során mért csúcsteljesítmény nagyobb mértékben növekedett, mint a csak állóképességi csoportnál (Rønnestad és mtsai., 2010).

### **2.3. Vázizom hipertrófia élettana**

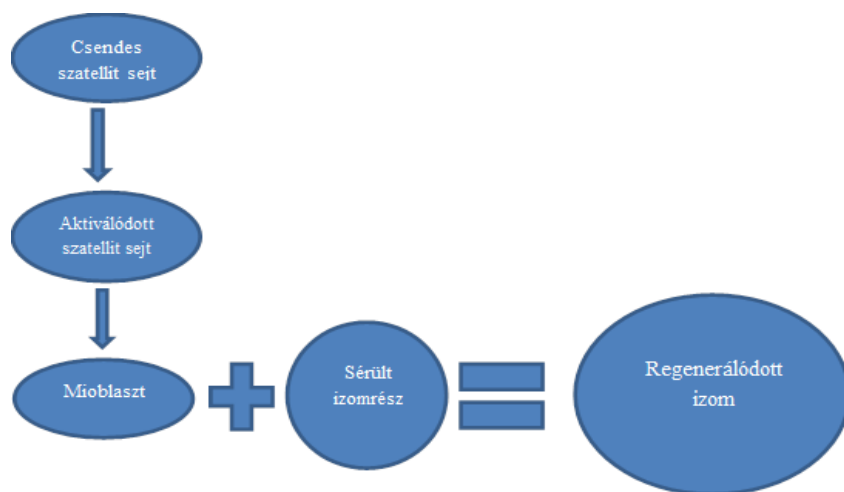
Az izom keresztmetszeti növekedéséhez szükség van az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyának megbomlására. Ez alaphelyzetben kiegyensúlyozott kapcsolatot jelent a két állapot között. A hipertrófia során ez a kapcsolati egyensúly megbillen, ami kétféle állapotot jelenthet. Az egyik, mikor az anabolikus azaz az építő folyamatok szintje megemelkedik a nyugalmi állapothoz képest, így érve el eltolódást a fehérje szintézis irányába. A másik eset, amikor is a katabolizmus mértéke csökken a nyugalmi szinthez képest, ezáltal nem az anabolizmus fokozódik, hanem a bontó folyamatok gátlásával csökkenti a katabolizmus mértékét. Ezzel nem a fehérje szintézis mértékét növelve, mégis izomgyarapodás felé billentve az izomsejtet.

Az érett vázizomsejtben akár 1000 sejtmag is megtalálható. Edzés hatására az izomban lévő sejtmagok száma megnövekedhet (Conceição és mtsai., 2018). Ennek a hipertrófia szempontjából az a kulcsfontosságú jelentősége, hogy egy sejtmagnak, csak egy kisebb területen kell ellátnia génexpressziós feladatokat. Ezt a területet mionukleáris

tartományként említjük (Radak és mtsai., 2020). Minél több a sejtmag az izomban, annál kisebbek az egyes mionukleáris tartományok, ezáltal a sejtmagok annál hatékonyabban tudnak működni, mert kisebb területre kell fókuszálniuk.

A nagy intenzitással végzett edzés a szarkomerek mikrosérüléséhez vezethet, ami aktiválja a szatellita sejteket. Ezek a sejtek a bazális laminában vannak, közel az izom sejtmagjaihoz. Az izomkeresztmetszet növekedésében fontos szerepe van a szatellita sejteknek, mivel ezek differenciálódásra képesek sejtek. Ezen sejtek adott inger hatására, mioblasztokká, miocitákká, majd kifejlett miotubulusokká alakulnak (Bentzinger és mtsai., 2012). Ameddig a szatellit sejtek nem kapnak megfelelő stimulust, addig az úgynevezett csendes állapotban vannak. A szatellit sejtek izom specifikus őssejtek, melyek kétféle módon fejtik ki hatásukat.

A szatellit sejtek proliferációjuk során, mikor szimmetrikusan osztódnak kettő aktivált szatellit sejt keletkezik vagy kettő szatellita sejt, ami a miogenezisben vesz részt, ellenben, mikor aszimmetrikusan osztódnak keresztül, egy aktivált és egy csendes szatellit sejt keletkezik (Rocheteau és mtsai., 2012). Az aktivált szatellita sejtek a sérült részhez vándorolnak, ahol mioblasztokká differenciálódnak és egymással vagy a sérült izomrészrel fúzionálódnak, ezzel segítve a regenerációt (1. ábra).



1. ábra: Egy specifikus inger hatására bekövetkező szatellita sejt aktiváció és annak lépései (Isesele és Mazurak 2021 ábrája alapján átdolgozva)

Ezen folyamatok fontos szabályozói a szatellita sejtekben képződő Paired box protein 3 (Pax3) és Paired box protein 7 (Pax7) melyek szatellita sejt aktivációs markerek és a fehérjeszintézisben szerepet játszó fehérjék. Kompenzációs hipertrófia modell alkalmazása során kimutatták, hogy a Pax7 által szatellit sejt „self-renewal” fontos tényezője az adaptáció korai fázisának (Ishido és mtsai., 2009). Laboratóriumunk korábbi kutatásában korrelációt találtunk a SIRT1 és a Pax7 fehérje emelkedésében kompenzációs hipertrófia modellnél (Koltai és mtsai., 2017). Murach és mtsai. kutatásukban azt találták, hogy egereken végzett kompenzációs hipertrófia modell során az állatok szatellita sejtjeinek a sűrűsége (Pax7+/rost) trendszerűen növekedett a kontroll csoportéhoz képest (Murach és mtsai., 2017). Ellenben abban az esetben, amikor tamoxifen kezelésben részesítették az egereket, aminek hatására 90%-kal csökkent a szatellita sejtek sűrűsége, már a műtéti eljárás sem tudta megemelni a lecsökkent szintet. Hyatt és mtsai. kutatásai alapján a műtéti kezelés hatására a Pax3 és Pax7 mRNS és fehérje szintje egyaránt emelkedést mutatott a kontroll csoportéhoz képest (Hyatt és mtsai., 2008). Krónikus okklúziós edzés hatására növekedést találtak a szatellit sejt sűrűségében (Nielsen és mtsai., 2012). Ez az eredmény megegyezett egy másik kutatással (Wernbom és mtsai., 2013) azonban ebben a vizsgálatban akut okklúziót alkalmaztak és csak az egyik lábon, de a növekedés mindkét lábban szignifikáns volt a kiinduló értékhez képest.

A hipertrófia több molekuláris jelzőfolyamaton keresztül is képes kifejteni hatását, mely független a szatellita sejttől. Ilyen útvonal például az AKT-mammalian target of rapamycin (mTOR) útvonal (2. ábra), a foszfatidilinozitol 3-kinase (PI3K) útvonal egy komponense, mely a mitogén aktivitásra, elérhető tápanyagokra, energiaállapotra, és az jelenlevő oxigénszintre érzékeny és felelős a sejt növekedéséért és a proliferációjáért (Mori és mtsai., 2014). Az mTOR az Akt regulátoraként funkcionál. Az mTOR két multiprotein komplexet tud kialakítani az mTOR complex1-et (mTORC1) és az mTOR complex 2-t (mTORC2), ami a fehérjeszintézisben játszik fontos szerepet (Bhaskar & Hay, 2007). A receptor-ligand kötődés után a PI3K aktiválódik, ami foszforilálja az Akt fehérjét, mely egy több lépcsős folyamatban aktiválja az mTOR-t. Növekedési faktorok és hormonok a fent említett módon hatnak az Akt-ra, ami aktiválja az mTORC1-et (Dan és mtsai., 2014), ami riboszómális biogenezist, autofágia és mitofágia gátlást eredményez (Iadevaia és mtsai., 2014), (Bartolomé és mtsai., 2017). Az mTORC2 szintén fontos szerepet játszik az Akt útvonalban (Yang és mtsai., 2015).

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az mTOR útvonal, főként a pihenő fázisban aktiválódik (Bolster és mtsai., 2003), (Dreyer és mtsai., 2006). Valójában az mTOR útvonalban megjelenő riboszómális S6 kinase 1 (S6K1) játszik fontos szerepet az mRNS transláció megindításában (2. ábra), emellett úgy tűnik, hogy fontos szabályozója az edzés hatására bekövetkező fehérjeszintézisnek és a hipertrófiának (Baar & Esser, 1999), (Bodine, Stitt, és mtsai., 2001).



2. ábra: Az Akt/m-TOR útvonalban szerepet játszó fehérjék molekuláris jelátviteli útvonalának sémája (Gao és mtsai 2012 ábrája alapján átdolgozva)

Fujita és mtsai kutatásukban az akut okklúziós terhelés hatását vizsgálták az Akt/mTOR útvonalban szerepet játszó Akt, mTOR és S6k1 fehérjék foszforilációs állapotára (Fujita és mtsai., 2007). Egyedül az S6K1 foszforilált állapota mutatott növekedést a kontroll

értékhez képest. Egy másik vizsgálatában sétálás során okklúziós kezelést alkalmaztak az egyik lábon, míg a másik láb kontrollként funkcionált (Ozaki és mtsai., 2014). A terhelés utáni biopszia minták alapján nem történt szignifikáns változás a csoportok között, sem pedig a kiinduló értékhez képest az mTOR, Akt és riboszomális S6 kináz1 (S6K1) foszforilációs szintjében. Idős személyeken vizsgálták az akut okklúziós terhelés hatását az mTOR, riboszomális S6 (S6) és S6K1 foszforilált/totál fehérje arányára terhelés előtt és 2 alkalommal utána. Szignifikáns emelkedést találtak mindhárom paraméterben a terhelés előtti értékhez képest az okklúziós csoportban, emellett a foszforilált/totál mTOR arányban emelkedést találtak a kontroll csoportban is a kiinduló értékhez képest (Fry és mtsai., 2010).

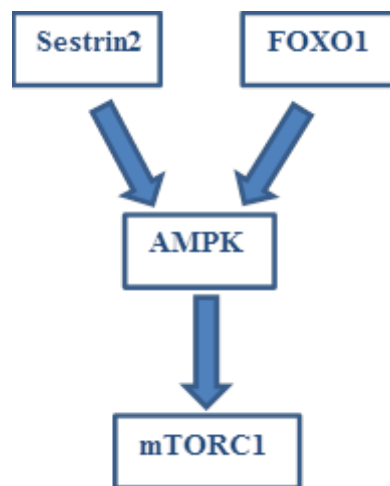
#### **2.4. Katabolikus folyamatok**

A hipertrófia másik kulcstényezője az anabolizmus fokozásán túl, a katabolikus folyamatok csökkenése, azaz az atrófia gátlása. A hosszantartó ágynyugalom, immobilizáció, sérülés, öregedés és sok betegség, mint a rák, cachexia következményében a vázizom atrófiázódhat. Az izomtömeg csökkenése következtében a kardiovaszkuláris és metabolikus megbetegedések esélye megnövekszik. Két fő útvonal van ezen folyamatban, amelyet érdemes megemlíteni. Az egyik az ubiquitin-proteaszóma rendszer, a másik az autofágiás-lizoszomális útvonal, melyek közül az első a sejt több régiójában is lezajló folyamat, a második kizárólag a citoplazmában (Nandi és mtsai., 2006; Sandri, 2008).

A Forkhead box protein O1 (FOXO1) transzkripciós faktor, mely gátló hatást fejt ki az Akt fehérjé (Léger és mtsai., 2006), fontos szerepet játszik a katabolizmusban. A FOXO1 transzkripciós faktor a DNS megfelelő promotor régiójához kötődve fejt ki hatásait. Abban az esetben, ha ez a fehérje kikerül a citoszolba, elveszti katabolikus hatásait. Emellett pedig magának az Akt fehérjének is FOXO1 gátló hatása van (Zhang és mtsai., 2011).

A FOXO1-et az 5' AMP-aktivált protein kináz (AMPK) fehérje képes aktiválni (Greer és mtsai., 2009), ami egy energiaállapotra szenzitív molekula, mely az adenilát-kináz

reakcióban aktiválódik. A Sestrin család fehérjéi stressz hatására aktiválódó fehérjék, melyek fokozzák az AMPK szintet Budanov és Karin 2008-ban megjelenő kutatásukban azt találták, hogy az AMPK-nak m-TOR gátló hatása van (Budanov & Karin, 2008). Emellett pedig Jornayvaz és Shulman 2010-ben megjelenő kutatásukban a mitokondriális biogenezisről írnak és az AMPK abban betöltött szerepéről (Jornayvaz & Shulman, 2010). Ezáltal az AMPK a FOXO1 mellett tovább blokkolja az anabolikus útvonalak aktivitását. A p53 tumorszupresszor fehérje egy apoptózis marker, ami DNS sérülés hatására aktiválódik és a Sestrin2 szintjét képes emelni, mely a fent említett AMPK fehérjét aktiválja, ami csökkenti az mTORC1-et. A FOXO1 megemeli az AMPK aktiváció szintjét a Sestrin3-on keresztül, ami mTORC1 inaktivációt okoz (Hay, 2011). (3. ábra)



3. ábra: A Sestrin fehérje interakciója és szerepe az AMPK általi mTOR útvonal gátlásában (Hay 2011 ábrája alapján átdolgozva)

## 2.5. Állóképességi edzés hatása a vázizomra

A fizika aktivitás fontos tényezője az állóképesség milyenségére. Az állóképesség megléte a sportélet minden területén elengedhetetlen, nemcsak az állóképesség profilú sportágakban, de az edzések közötti regeneráció időtartama és minősége is nagyban

összefügg vele. Az állóképességi állapotot vagy kardiovaszkuláris fitnesszt a  $VO_2\text{max}$  értékével szoktuk meghatározni, ami nemcsak a várható sportteljesítmény mutatója, hanem a szív és keringési rendszer állapotára is kiválóan reflektáló marker. A  $VO_2$  szintnek centrális és perifériás összetevői vannak. Centrális a kardiovaszkuláris faktor, a perifériás pedig az izom  $O_2$  diffúzió (Wagner, 1996).

### **2.5.1. Edzés hatására bekövetkező mitokondriális változások**

Az állóképességi edzés hatására megnövekedhet a mitokondriumok mennyisége, a hajszálérhálózat sűrűsége és az aerob enzimek mennyisége (Holloszy, 1967). A mitokondriális biogenezis mester regulátorként számoltató Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor 1 alfa (PGC1A) többféle izoformmal rendelkezik. A PGC1A aktivitása izoforma specifikus (Yoshioka és mtsai., 2009), melyek különböző funkcióval rendelkeznek. A PGC1A4 mTOR aktivációt eredményezhet, ami emelkedett fehérje szintézishez vezetett (White és mtsai., 2014).

A mitokondrium belső membránjában található elektron transzportlánc egyik eleme a Cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4), ami az oxidatív foszforilációban is szerepet játszik. COX4 fehérje szintbeli növekedése emelkedett aerob kapacitást mutatott (Lira és mtsai., 2013). Az elektron transzport lánc szintén fontos szereplője a mitokondrium belső membránjában megtalálható Cytochrome c a sejt apoptózisában is fontos szerepet játszik (Garrido és mtsai., 2006). Mindkét fehérje szintjének megnövekedése mitokondriális biogenezist mutathat.

A silent mating type information regulation 2 homolog 3 (SIRT3) deacetiláz fehérje egy mitokondriális fehérje, ami deacetilálni képes a Forkhead box protein O3 (FOXO3) transzkripciós faktort, ezáltal megvédve a mitokondriumot az oxidatív stressztől (Tseng és mtsai., 2013). A PTEN-induced kinase 1 (PINK1) fehérje pedig a mitofágiában fontos marker, mely állóképességi edzés utáni mitokondriumok degradációjában játszik szerepet (Zhao és mtsai., 2023).

Mindemellett fontos megemlíteni az edzés hatására indukálódó angiogenezist is. A hajszálérhálózat fejlődése rendkívül fontos tényező mind az állóképességi sportágak

terhelési fázisban, mind bármely sport regenerációs szakaszának javításában. Edzés hatására megemelkedik a szabadgyök termelés, melyre antioxidánsokkal reagál a szervezet.

## **2.5.2 Oxidatív stressz és az antioxidáns hatás a vázizom keresztmetszetre**

Az oxidatív stressz és az ellene dolgozó antioxidáns hatás régóta kutatott területe az edzésélettani vizsgálatoknak. Ezen terület irodalma rendkívül széleskörű, mely bemutatása túlmutat a dolgozatom keretein, ezért a következőkben csak az általunk legrelevánsabb eredményeket fogom ismertetni.

Az oxidatív stressz károsíthatja az egyes sejtalkotókat és magát a DNS-t. Az antioxidáns rendszernek rendkívüli szerepe van ezen sérülések kivédésében. A szabadgyökök a sejten belül különböző helyeken termelődnek, de a legnagyobb mennyiségben a mitokondriumban keletkeznek, ami fizikai aktivitás hatására emelkedett termeléssel jár (Davies és mtsai., 1982). Normál körülmények között a felvett oxigén körülbelül 2%-ból lesz szabadgyök, ami edzés hatására akár 10%-ra is emelkedhet. Ezen oxidációs folyamatok egyaránt támadják a fehérjéket, zsírokat és a DNS-t, ami által redukálódott miliót teremtenek. Egyik gyakorta vizsgált antioxidáns az 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1), melynek a termelődése lassú rostokban magasabb, mint a gyors rostokban (Radak és mtsai., 2007), feltételezhetően a lassú rostokban meglévő emelkedett mitokondrium mennyisége miatt.

A nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) egyik master regulátora az oxidatív stressz elleni védelemnek, emellett szerepe van a mitokondriális Superoxide dismutase 2-nek (SOD2), mely az oxidatív foszforiláció során keletkezett szabadgyököt alakítja tovább  $H_2O_2$ -vé. A szabadgyökök szerepe nemcsak kártékony, de bizonyos mértékben hasznos is. A keletkezett szabadgyökök és annak melléktermékei molekuláris jelzőfolyamatokat indítanak meg, melyek szerepet játszanak több élettani folyamatban, mint a mitokondriális biogenezis (Radak és mtsai., 2013). Edzés során fogyasztott antioxidánsok csökkentették a szabadgyökök által katalizált adaptációs folyamatokat (Radak és mtsai., 2017).



A hidrogén-szulfid (H<sub>2</sub>S) egy gáztranszmitter, melynek számos élettani hatása van köztük szinaptikus transzmisszió, vaszkuláris tónus és gyulladás szabályozás (Kimura, 2014), de szempontunkból legfontosabb a SIRT1 fehérjével közös tulajdonságok, például az angiogenezisben betöltött szerepe (Arumugam & Kennedy, 2018). Idős egereknél azt mutatták ki, hogy a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) és a H<sub>2</sub>S szabályozza az angiogenezist és az állóképességet (Das és mtsai., 2018). Ezen kutatás alapján a SIRT1 és a H<sub>2</sub>S feltételezhetően hasonló molekuláris jelzőfolyamatokat indukál.

## **2.6. MikroRNS és az izomkeresztmetszet növekedés**

A miRNS-ek olyan nem kódoló RNS-ek, melyek géncsökkentő funkcióval rendelkeznek. Feladatuk a különböző génexpressziós változásoknak a szabályozásában van. Ezen molekulák felfedezése az elmúlt évtized egy fontos kutatási eredménye tudományos szempontból. A miRNS-ek vizsgálata számtalan új lehetőséget biztosított a tudományos közösség számára, mivel a hatását a transzkripció és a transláció között fejtik ki (Torma és mtsai., 2020). Ezen ellenőrző funkciójának vizsgálatával közelebbi képet kaphatunk a génexpresszió működéséről.

A miRNS-ek vagy más néven „silencing RNS” a transzkripció során képződő mRNS-ek degradációját végzik. A miRNS-ek szintén a DNS-ről íródnak le és a citoszolban az mRNS-hez kötődve degradálja azt, azaz egyfajta csendesítést végez. Ezáltal meggátolva, hogy az mRNS eljusson a riboszómához és ezzel gátolva translációt.

A mikroRNS-ek egy speciális csoportja a myomiR-ek, azaz a vázizom specifikus miRNS-ek, melyek vázizom specifikusan termelődnek, de nem csak ott fejtik ki hatásukat (Murphy és mtsai., 2020). A miRNS-ek speciális vezikulákba csomagolódnak az izomsejten belül, amik a véráramon keresztül eljutnak más szövetekhez is (Murphy és mtsai., 2020). Jelen esetben a miRNS-ek autogén funkciójáról lesz szó. Ezen molekuláknak a géncsökkentésben igen sokrétű szerepe van, de a mai tudományos álláspont szerint némely miRNS az anabolikus vagy éppen a katabolikus útvonalak csendesítésében fejtik ki hatásukat.

Korábbi kutatások eredményei alapján a miR-1, miR-133a, miR133b, miR206 jelentős funkciót töltenek be a mioblasztok differenciálódásában sejt kultúrában és az embrionális mioblaszt differenciálódásban (Koutsoulidou és mtsai., 2011). Egy másik kutatás alapján (Neves és mtsai., 2014) a miR-1 és miR-206 általi csendesítésnek a Pax3 és Pax7 egyaránt célpontja.

## **2.7. SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött szerepe**

A SIRT1 fehérje egy  $\text{NAD}^+$  dependens deacetyláz, ami acetyl csoportokat vesz el hiszton és nem hiszton fehérjéktől egyaránt. Számos élettani funkcióval rendelkezik, többek között az öregedési folyamatokban, metabolizmusban és génexpressziós regulációban is részt vesz (Michan & Sinclair, 2007) (Yamamoto és mtsai., 2007).

A SIRT1 fontos szabályozója a zsírsavanyagcserének a Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor alfán keresztül (PPAR $\alpha$ ), ami egy nukleáris receptor fehérje és az éhezés során fejti ki hatásait. A SIRT1 negatív regulátora a p53 apoptózis fehérjének, mely DNS sérülés során aktiválódik és apoptózishoz vezet. Emellett oxidatív stressz elleni védelemben, tumor szuppresszióban, genom stabilizálásban és DNS javításban is szerepet játszik, sok más hatásával együtt. A korábban említett  $\text{NAD}^+$  dependencia azért fontos, mert a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  arány a szervezetben energiahányos állapotban billen el a  $\text{NAD}^+$  irányába (Cantó és mtsai., 2015). Ebből adódóan a SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött hatása ezért érdekes kérdés, mert a keresztmetszeti növekedéshez energiatöbbletre van szüksége a szervezetnek a különböző izomfehérjék szintéziséhez.

A következőkben alaposabban kifejtek két korábban megjelent publikációt, melyek a dolgozatom kiinduló alapját képezik.

Hong és mtsai 2014-ben (Hong és mtsai., 2014) a SIRT1 fehérje S6K1 fehérjével való kommunikáció szerepére világítottak rá cikkükben, melyben a következőket találták. A szerzők sejt kultúrát vizsgáltak, melyben gátolták a SIRT1 és fehérjét nikotinamid-adenin dinukleotiddal (ami a  $\text{NAD}^+$  elő anyaga, de nagymértékben SIRT gátló), ezzel elérve az S6K1 acetylált állapotát, melynek hatására az S6K1 fehérje foszforilációja csökkent.

Ezután, megvizsgálták, hogy a SIRT1 túlexpressziója milyen mértékben befolyásolja a deacetilációt. Ebben az esetben a deacetiláció hatására az S6K1 foszforilálódhat az mTORC1 fehérje által.

Emlősök szervezetében a protein katabolizmus fokozása és a szintézis csökkentése fontos védelmi mechanizmus bizonyos esetekben, mint az éhezés, sérülés, rákos megbetegedések. Ezek az adaptációs útvonalak egy általános fehérjebontó aktivitáshoz vezetnek a ubiquitin proteozóma útvonalon (Sandri, 2008) és a megnövekedett autofágián keresztül (Mammucari és mtsai., 2007). A FOXO3 fehérje aktivációja izomban fontos szerepet játszik ezen atrogének transzkripciójában (ubiquitin ligázok, atrogin 1, muscle RING-finger protein-1 (MuRF1)) (Bodine, Latres, és mtsai., 2001), (Gomes és mtsai., 2001), ami fokozott atrófiához vezet.

A SIRT1 fehérje fehérjeszintézisben, illetve atrófia gátlásában betöltött szerepét Lee és Goldberg vizsgálta, melyben azt találták, hogy éhezés során csökkent a SIRT1 tartalom az izomban, miközben az atrogének szintje megnövekedett (D. Lee & Goldberg, 2013). A SIRT1 szintben nem történt változás 12 és 24 óra elteltével, de 48 óránál drasztikus csökkenés volt megfigyelhető. Ez a csökkenés együtt járt a két említett atrogén megnövekedésével és az izomtömeg csökkenésével, ami eddig az időpontig nem volt szignifikáns.

SIRT1 túlexpresszálas megakadályozta az atrogén felszabadulást és a proteolízist éhezés közben a deacetilációs aktivitásának köszönhetően és csökkentette az izomvesztést. Mivel a fent említett atrogének aktivációja FOXO3-hoz köthető, ezen eredmények is a SIRT1 általi FOXO3 aktivitás gátlását mutatják éhezés során.

Annak érdekében, hogy bebizonyítsák, hogy a fent említett hatások a SIRT1 fehérje deacetiláz aktivációjának a következményei voltak táplált állatoknál SIRT1 túlexpressziót végeztek. Ennek hatására, nagymértékű izomkeresztmetszet növekedést és deacetilációs aktivitást találtak.

A kutatás során arra a következtetésre jutottak, hogy a SIRT1 fehérje képes csökkenteni az éhezés során bekövetkező izomtömeg csökkenést a deacetiláz aktivitása által. Emellett pedig a SIRT1 fehérje túlexpressziója általi FOXO1 szintcsökkenés fontos szabályozója

az izomtömeg regulációjának. A II. típusú izmrostok nagyobb mértékben atrofizálódnak, mint a I. típusú izmok, kalória csökkentés hatására (J. B. Li & Goldberg, 1976).

## **2.8. Alternatív hipertrófia modellek**

Alternatív hipertrófia modellek alatt azokat az eljárásokat és módszereket értjük, melyek a „klasszikus” ellenállással végzett edzésen kívüli más módokon vagy egyéb módszerekkel együtt kiegészítve játszanak szerepet a hipertrófia elérésében. Ezen módszerek lehetnek az egésztest vibrációs edzések, az elektro miostimulációs (EMS) edzések, az okklúziós edzés, a kompenzációs hipertrófia modell. A különböző alternatív módszerek használata nem csak a kutatások során alkalmazott eljárások egy fajtája, hanem bizonyos esetekben egészségügyi szempontból is indokolt használati eszközök. Az okklúziós edzést nemcsak különböző ortopédiai beavatkozások után, hanem azt megelőzően is alkalmazzák, mint prekondicionális eljárás (Franz és mtsai., 2018). Ezen módszereket a fent említetteken kívül az élsportban és a szabadidősportban is lehet alkalmazni (Scott és mtsai., 2016), (Tai és mtsai., 2019).

### **2.8.1. Kompenzációs hipertrófia**

Mint, ahogy korábban említettük, a módszert gyakorta alkalmazzák olyan kutatások során, ahol a cél a gyors és nagymértékű hipertrófia. Ezzel az eljárással az egész testre ható terhelés nélkül is el lehet érni keresztmetszeti növekedést. Korábbi kutatások során patkány és egér modelleken végezték a vizsgálatokat (J. D. Lee és mtsai., 2016), (Gumucio és mtsai., 2014). Az állatok kora patkányok esetében fiatal, középkorú és idős volt (Murach és mtsai., 2017). Legtöbb esetben középkorú és fiatal patkányokon végezték a kísérleteket, öreg állatok voltak a legritkábban bevonva. A vizsgálatok legnagyobb részét hím patkányokon végezték, de nőstény állatokon is végeztek kutatásokat (Hamilton és mtsai., 2014).

A modellel legtöbbet vizsgált izom a plantaris, de gyakori vizsgált izom a soleus (Pearson & Sickles, 1987) is. A gastrocnemius izmot nem minden esetben távolították el, voltak olyan esetek, ahol csak a distalis végét, illetve annak egy bizonyos hányadát műtötték ki (Murach és mtsai., 2017). Bizonyos esetekben csak a gastrocnemius izmot távolították el és a soleus izmot nem (Hyatt és mtsai., 2008). Ezekben az esetekben a hipertrófia mértéke különbözött. Ezek betudhatóak az egyes izmok közötti rosttípus különbségeknek is.

Laboratóriumunk korábbi kutatásában Koltai és mtsai 2017-ben 13 középkorú (15 hónap) patkányon végeztek kísérletet kompenzációs hipertrófia modellel (Koltai és mtsai., 2017a). Az állatokat 2 csoportra osztották: kontroll (C, n=6) és operált (O, n=7). A műtéti eljárás során eltávolították a soleus izmot és a gastrocnemius izmot teljes egészében, mind a két hátsó lábból. A kontroll csoporton „ál” operácót hajtottak végre, melyben a gastrocnemius és soleus izmok inát elszeparálták a plantaris inától. A kísérlet időtartama 2 hét volt, melyben az állatok nem végeztek semmilyen edzésprogramot egyik csoportban sem.

A minták feldolgozása után Western Blot, polimeráz láncreakció (PCR), Immunohisztokémia, microRNS (miRNS) mérés mellett különböző Kit-ek alkalmazásával mérték aktivitásokat. Eredményeik közül megemlítem, azokat, melyek a kutatásomhoz legrelevánsabban kapcsolódnak.

A plantaris izom tömegében 14 nap alatt a vizsgálati csoportban 40%-os növekedés volt megfigyelhető a kontroll csoportéhoz képest. Az izomsejtek számában nem történt változás a két csoport között. A Pax7 fehérje, ami a szatellit sejtek expressziója során keletkező transzkripciós faktor, mely fontos szerepet játszik a vázizmok fehérjeszintézisében, nagymértékű növekedést mutatott az operált csoportban a kontrollhoz viszonyítva.

A megnövekedett hipertrófia erősen korrelált a SIRT1 mRNS, fehérje és aktivációs szintjével. Mindezek mellett a SIRT1 fehérje növekedése együtt járt a p53 fehérje szignifikáns csökkenésével a vizsgálati csoportban.

A nikotinamid-foszforibozil-transzferáz (NAMPT), ami a NAD<sup>+</sup> bioszintézis fontos elő anyaga, megemelkedett az operált csoportban. Érdekes módon a NAD<sup>+</sup> szintje nem

emelkedett szignifikánsan, miközben a NADH szintje és a sejt becsült oxidációs állapota csökkent a vizsgálati csoportban.

Az Akt1 fehérje szintén szignifikánsan növekedett a vizsgálati csoportban a kontroll csoporthoz képest, emellett pedig a FOXO1 fehérje szintje csökkent. Ezekből az eredményekből úgy tűnt, hogy a SIRT1 fontos szerepet tölt be a fehérjeszintézisben az anabolikus és katabolikus markerek alapján.

Az Akt fehérje, melyet a SIRT1 fehérje deacetylálni képes, és szerepet játszik a fehérjeszintézisben (Mattagajasingh és mtsai., 2007). A SIRT1 aktiválja az Akt fehérjét, aminek úgy látszik fontos antiapoptotikus hatása van (D. Wang és mtsai., 2013). Emellett a SIRT1 olyan génekre is hatással van, melyek fokozzák a sejt növekedéséért felelős jelátviteli útvonalakat, mint amilyen az Akt (Rafalski és mtsai., 2013).

Mindezek mellett korábbi kompenzációs hipertrófia modellekben vizsgálták a hipertrófia és az atrófia útvonalban szereplő fehérjéket. Egy kutatásban az mTORC1 korai aktivációját vizsgálták, ahol már néhány nap alatt emelkedést találtak mind az Akt és a p-Akt szintjében a hipertrófia modellnél. (Miyazaki és mtsai., 2011). Szintén kompenzációs hipertrófia modellnél 1 hét után szignifikáns csökkenést találtak az AMPK szintjében (Thomson & Gordon, 2005), ami a fent említett mTOR útvonalat szabályozhatja. Egereken végzett műtéti eljárás hatására az S6K1 foszforilációja megnövekedett (Pérez-Schindler és mtsai., 2013), ami szintén az mTOR útvonal egyik kulcsfehérjéje.

### **2.8.2. Okklúziós edzés**

Bizonyos esetekben, amikor az alany nem tud részt venni magas intenzitású edzésben valamilyen hátráltató tényező miatt, előszeretettel alkalmazott eljárás az okklúziós edzés. Okklúziós edzés során akadályozzuk az adott végtag vérrellátását és annak visszaáramlását, mellyel rengeteg pozitív élettani hatást érhetünk el. Érekszorítással végzett edzés megnövekedett izom keresztmetszeti növekedést eredményez (Farup és mtsai., 2015), mindezt alacsony intenzitás, azaz az egy ismétléses maximum 40%-a mellett. Ebben a kutatásban nem tértek ki arra, hogy melyik izomrost típus

hipertrofizálódott, ellenben korábbi kutatásokban azt találták, hogy a gyors rostok azok, amelyek elsődlegesen aktiválódnak (Loenneke, Fahs, és mtsai., 2012).

Az irodalom szerint az okklúziós edzésnek 3 fő fajtája van, mikor az érelszorítás fennáll mind a pihenőidőben, mind a gyakorlat során (Centner, Lauber, és mtsai., 2019). Bizonyos esetekben csak a munkafázisban (Yasuda és mtsai., 2013), végül pedig, mikor edzésterhelés nélkül nyugalomban alkalmazzák az elszorítást (Takarada és mtsai., 2000). Okklúziós edzést leggyakrabban ellenállással végzett edzéssel kombinálva (Wilson és mtsai., 2013), vagy aerob állóképességi terhelés mellett alkalmazzák (Abe és mtsai., 2010). Bizonyos esetekben pedig EMS vagy vibrációs edzés mellett (Item és mtsai., 2011).

Ez a fajta edzésterhelés rendszeresen alkalmazott módszer mind a rekreációs sportban, mind a rehabilitációban. Loenneke és mtsai ajánlása alapján az elszorítás során az artériás keringés részben, a vénás keringés viszont teljesen gátlás alá kell kerülnie a megfelelő fiziológiás válaszok kiváltásához (Loenneke és mtsai., 2014). Ezalatt az artériára megnövekedett külső nyomás és belülről fakadó nyíróerő (da Cunha Nascimento és mtsai., 2020) hat. A csökkent artériás beáramlás miatt a vázizom nem kap megfelelő mennyiségű oxigént, ami tejsavsztint emelkedést eredményez (Loenneke és mtsai., 2011). A csökkent pH szint emeli a növekedési hormon szekréciót (West & Phillips, 2012).

Emellett az oxigénhiány miatt az oxidatív anyagcserével dolgozó lassú rostok nem kapnak megfelelő mennyiségű oxigént a működésükhöz, emiatt a gyors rostok vesznek részt dominánsan az izomkontrakcióban. Az elszorítás hatására a gyors izomrostok aktivációja megnövekedik (Loenneke, Fahs, és mtsai., 2012). Az okklúziós edzésnek is vannak bizonyos biztonsági szabályai, amit mindenképpen be kell tartani. A következőkben kitérek a 2 fő „kockázati” területre, melyet az okklúziós edzés leginkább érint:

-kardiovaszkuláris változások

-vénás tromboembólia

Kardiovaszkuláris változások közül elsősorban kiemelném a vérnyomásra, a pulzusra és az ütőtérfogatra való hatását az okklúzióknak. Rossow és mtsai kimutatták, hogy a

különböző méretű okklúziós bandázs különböző mértékben okoz változásokat a pulzusértékben (Rossow és mtsai., 2012). Emellett pedig mind a vékony mind a vastag bandázs emeli a brachiális és a centrális vérnyomásértéket. Libardi és mtsai 2017-es publikációjukban leírták, hogy alacsony intenzitással végzett elszorításos edzés kisebb mértékben emelte a szisztolés és a diasztolés vérnyomást és a pulzusértéket, mint az 1RM 60%-val végzett edzés kifáradásig (Libardi és mtsai., 2017). Egy szintén kifáradásig végzett alacsony intenzitású (1RM 20%) edzésterhelés okklúziós elszorítással magasabb maximális pulzus és vérnyomás értéket mutatott a kontroll csoporthoz képest. Viszont az elszorítás hatására csökkent az ütőtérfogat értéke a vizsgálati csoportban (Takano és mtsai., 2005).

Fontos vizsgálati területe az okklúziós edzésnek a vér alvadási faktoraira és a trombus képződésre irányuló kockázati tényezők megismerése. Azon kutatásokban, melyekben a trombus-, vagy a rögzképződést vizsgálták a leggyakrabban mért faktorok a D-dimer, protrombin fragmentum (PTF), trombin-antitrombin 3 komplex (TAT) és a C-reaktív protein (CRP). Hozzá kell tenni, hogy ezek a kutatások főként az egészséges populációt vizsgálták és alacsony számú klinikai kutatás készült a témában. Madarame és mtsai (2010) azt találták, hogy alacsony intenzitású okklúziós edzés hatására a TAT, D-dimer, PTF szintje nem emelkedett az okklúzió nélküli csoporthoz képest más faktorokkal együtt (Madarame és mtsai., 2010). Krónikus okklúziós edzést hasonlítottak össze nagy intenzitású okklúzió nélküli ellenállással végzett edzéssel, ahol szintén nem találtak emelkedést a fibrinogén, D-dimer és a CRP szintjében, ellenben emelkedett a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) szintje, ami fibrinolízisben játszik szerepet (Clark és mtsai., 2011).

Mint korábban említettem az alacsony intenzitással végzett edzésmódszer főként a lassú rostokat aktiválja, mivel a gyors rostok magasabb ingerküszöbvel rendelkeznek. Ennek ellenére azt találták, hogy az érelszorításos kezelés, emelkedett gyors rost aktivációt eredményezett (Loenneke, Fahs, és mtsai., 2012).

Okklúziós edzés hatására emelkedett S6K1 foszforilációs szintet találtak, ami az mTOR fehérje egyik célpontja (Fujita és mtsai., 2007), emellett pedig ez a fajta edzésmódszer intramuszkuláris pH szint csökkenést eredményezett (Suga és mtsai., 2009). Kutatási



eredmények alapján úgy tűnik, hogy a klasszikus ellenállással végzett edzés hatásosabb erőfejlesztés szempontjából (Lixandrão és mtsai., 2015) és magasabb felszíni elektromos aktivitást mutat (Fatela és mtsai., 2018), mint az alacsony intenzitású okklúziós edzés.

Korábbi eredményekből az is kiderült, hogy az érelszorítással kombinált terhelés az állóképességi atléták számára nagyobb előnyökkel jár, mint a sprinterek számára (Takada és mtsai., 2012). Az elszorításos edzés ritkán alkalmazott módszer elit sportolók körében az izomaktivációs mintázat milyensége és a kezelés során fellépő fájdalom miatt (Fitschen és mtsai., 2014). Az alacsony intenzitású edzés okklúziós elszorítással kombinálva gyakorta alkalmazott eljárás idősök körében (Iida és mtsai., 2011), (Centner, Wiegel, és mtsai., 2019).

Kutatások nagyobb mértékben mutatják meg a gyors rostok aktivációját, alapvetően inkább az erő és gyorsaság dominánsabb sportágakban lehet hasznosabb ez a fajta módszer. De a különböző kutatások, ahogy a fent említettek is eltérő eredményekről számoltak be. Korábbi vizsgálták a szisztémás hatását az érelszorításos edzésnek, ahol az alsó végtag elszorításával végzett terhelés hatásait vizsgálták a törzs izmaira (Ampomah és mtsai., 2019). Ebben a vizsgálatban a kutatók nem találtak szignifikáns különbséget a két csoport törzs feszítő izmainak méreteiben és erő kifejtésének a nagyságában.

#### **2.8.2.1. Az elszorítás nagysága**

A módszer alkalmazás során nagyon fontos a megfelelő elszorítás mértékének kiválasztása. Korábban az irodalomban az 50 mmHg-tól egészen a 300 mmHg-ig (Kubota és mtsai., 2011), (Loenneke és mtsai., 2015) is terjedt az elszorítás mértéke, a részlegestől a teljes elszorításig. Sok esetben az alkalmazott elszorítási értéket az artériás okklúziós nyomáshoz (AOP) viszonyítjuk, Az ajánlások alapján a nem teljes okklúziónál az AOP 40-80% közötti tartomány a legideálisabb edzés során (Jessee és mtsai., 2016). Ahogy már korábban említettem az alkalmazott intenzitásnak bizonyos tartományok közé kell esnie. Ehhez ismernünk kell az alany 1RM-ét és ennek az értéknek a százalékos arányához kell viszonyítani a megválasztott intenzitást. Az 1RM 20-40%-át ajánlja a szakirodalom (Scott és mtsai., 2015). A szériaszám és az ismétlésszám sok esetben eltérő.

A pihenő idő pedig klasszikus esetekben 30-60 másodperc közé esik (Jessee és mtsai., 2018), (Loenneke, Wilson, és mtsai., 2012). Az okklúziós edzések terén egyre több kutatás foglalkozik a mikroRNS-ekkel, melyek vizsgálata az elmúlt évek frekventált témája.

Dolgozatomban két frekventáltan alkalmazott alternatív hipertrófia módszert vizsgáltam, melyek reprezentatívak, mind a humán mind az állatmodellek szempontjából.

A humán modell az okklúziós edzés volt, az állatkísérlet pedig a kompenzációs hipertrófia modell. Mindkét módszernek megvannak az előnyei és a hátrányai, melyeket a későbbiekben még részletesen kifejtek. Ezen előnyök és hátrányok lefedése miatt alkalmaztuk mindkét eljárást, hogy pontosabb képet kaphassunk a lezajló molekuláris változásokról.

Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy a hipertrófia már meglévő gazdag irodalmát még mélyebben felderítsük. Kíváncsiak voltunk, hogy a különböző alternatív hipertrófiás módszerek miként hatnak a vázizomra és annak élettani karakterisztikájára. Mindkét esetben vizsgáltuk az anabolikus és katabolikus útvonalakat, emellett a mitokondriális dinamikát és a redox állapotot. Szerettük volna megtudni, hogy a különböző terhelési metódusok, milyen élettani és biokémiai változást indukálnak a vázizomban akut terhelés vagy krónikus edzés következtében.

A fejezet során alaposabban bemutatott kutatások a SIRT1 fehérjeszintézisben vagy a katabolizmus gátlásában megmutató szerepét mutatták be. Legjobb tudásunk szerint laboratóriumunk kutatása az egyetlen publikált forrás, ami a SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött szerepére mutat rá (Koltai és mtsai., 2017a). Dolgozatom egyik fő irányvonala a SIRT1 hipertrófiában betöltött szerepének a mélyebb megértése volt, az anabolikus és katabolikus folyamatok változásai alapján.

Az okklúziós edzés során az érelszorítás ideje és nagysága különbözik. Ahogy a korábbi alfejezetekben beszámoltam róla, az okklúziós edzésnek igen komplex irodalma van és a hipertrófiában betöltött szerepe is alaposan kutatott téma. Ennek ellenére legjobb tudásunk szerint a mi vizsgálatunk az első, ami az érelszorítást a pihenőidőben alkalmazza és annak hatásait vizsgálja.



### **3. Célkitűzések**

Legfőbb célkitűzésünk a hipertrófia hatására bekövetkező élettani hatásoknak a további felderítése, mely nemcsak a fehérjeszintézisre és degradációra terjedt ki, hanem az izom energetikai állapotára ható változások felderítése is.

Vizsgálatainkat 2 fő irányban határoztuk meg: humán és állat modellen végzett kutatással. Kutatásunk az alternatív hipertrófiás vizsgálatokra terjedt ki, melyek közül az egyik a kompenzációs hipertrófia modell, a másik pedig az okklúziós edzés.

Hipotéziseinket a következőképpen fogalmaztuk meg.

#### **1. Az állatmodelles vizsgálatnál feltételeztük, hogy:**

1.1. A kompenzációs hipertrófia modell alkalmazásának hatására a fehérjeszintézis markerei emelkednek és a katabolikus útvonal markerei csökkennek a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest.

1.2. A mitokondriális biogenezis markerei emelkednek és a mitofágia markerek csökkennek a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest a kezelés hatására.

1.3. A kezelés hatására az antioxidáns markerek szintje megemelkedik a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest.

#### **2. A humán vizsgálatnál feltételeztük, hogy:**

2.1. A terhelések közötti pihenő időben végzett okklúziós terheléssel kombinált akut ellenállással végzett edzés után az izom anabolikus markereinek a szintje megemelkedik a katabolikus markerek pedig csökkennek az okklúziós lábban a kontroll lábhoz képest.

2.2. A mitokondriális biogenezis és a kapillarizáció markerei megemelkednek az okklúziós lábban kontroll lábhoz képest.

2.3. Az antioxidánsok szintje emelkedik az edzés hatására az okklúziós lábban a kontroll lábhoz képest.

## **4. Anyag és módszer**

### **4.1. Módszer választás szempontjai**

Az okklúziós edzés régóta kutatott területe a sport-, és egyéb élettudományoknak, melynek hatásmechanizmusait alaposan feltárták, de ennek ellenére maradtak még kiaknázatlan területei. Jelen dolgozatban egy az okklúziós edzés egy új fajtáját vizsgáltuk, mely során az érelszorítást csak a pihenő idejében alkalmaztuk. Erre azért volt szükség, mivel szerettük volna ezt a fajta edzés módszert átültetni az élsportba, ahol az intenzitás sokkal magasabb, mint a klasszikus okklúzió során.

Mint korábban említettem nem végezhető nagy intenzitású terhelés az érelszorítás alatt, ezért a vizsgálatunkban maga az edzőmunka magas intenzitású volt és a pihenő időben alkalmazott okklúzió totális keringési elzárást eredményezett. Feltételeztük, hogy ez a fajta kombinációja az okklúzióknak és a nagy intenzitású ellenállással végzett edzésnek nagyobb mértékű adaptációs válaszokat ad, mint a klasszikus ellenállással végzett edzés önmagában. Ezen módszer előnyei, hogy humán vizsgálat, ami az emberi testedzés során adott élettani változásait sokkal jobban mutatja, mintha állatkísérletes modellt alkalmaztunk volna.

Ellenben a hátránya ennek a módszernek az, hogy a mintavételezés lehetősége sokkal korlátozottabb, mint az állatkísérletek során. Emiatt a korlátozottság miatt választottuk másik módszerként az állatkísérletet. Itt az állatok nem vettek részt semmilyen edzésben, ehelyett műtéti eljárással eltávolítottuk a plantarflexorok egy részét és a megmaradt izomnak kellett átvennie a kieső izmok helyét, mely nagymértékű „kompenzációs” hipertrófiát eredményezett. A fent említett módszert rendszeresen használják nagymértékű és gyors hipertrófia elérésére.

Vizsgálatainkban a terhelés hatására bekövetkező változásokat különböző molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk meg, hogy komplexebb képet kapjunk az adott gének szerepére illetve azok karakterisztikájára a különböző módszerek hatására. Mindkét vizsgálat során a vázizom szöveteit gyűjtöttük be és vizsgáltuk meg.

Kutatásunk során a génexpresszió több kulcselemét célkeresztbe helyeztük, melyek egészen a transzkripciótól a translációig terjedtek.

1) A kompenzációs hipertrófia modellel vizsgáltuk a krónikus terhelés hatásait a vázizomban a különböző metabolikus útvonalak, redox potenciálok és mitokondriális dinamika szempontjából állatmodellen.

2) Az egyszeri okklúziós edzésterhelésre adott akut élettani válaszokat vizsgáltuk a különböző metabolikus útvonalak, redox potenciálok, kapillarizáció és a mitokondriális dinamika szempontjából vázizomban humán önkontrollos modellen.

## **4.2. Kompenzációs hipertrófia modell**

Vizsgálatunk során műtéti eljárásnak vetettük alá az állatokat, ahol a hátsó láb plantaris izmát „hipertrófizáltuk”, azáltal, hogy a szinergista izmokat eltávolítottuk. A vizsgálatot a TÜKEB etikai engedélyével végeztük (63/2/2017 and PE/EA/62-2/2021).

### **4.2.1. Vizsgálati állatok**

A kompenzációs modell során 18 hím Wistar patkánnyal dolgoztunk. Az állatok életkora 8 hónap volt. A vizsgálat során 2 csoportot alakítottunk ki a kompenzációs csoportot (O) (az angol „overload” szóból, ami a kutatások során leggyakrabban használt megnevezés) és a kontroll csoportot (C). Az állatok testtömege (C:  $399 \pm 16,98\text{g}$ ; O:  $381 \pm 34,12\text{g}$ ) hasonló volt a két csoportban. 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 libum volt.

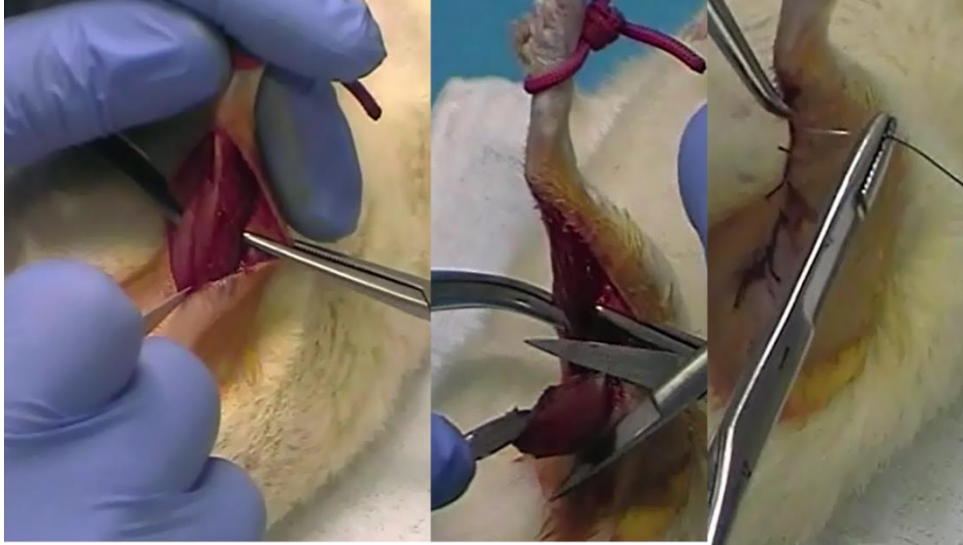
#### 4.2.2. Műtéti eljárás

Az állatok műtéti eljárását a 4. ábrán mutatjuk be. Az állatok testtömegének megfelelő mennyiségű pentobarbital anesztetikum (32mg/ttkg) intraperitoneális alkalmazásával elaltattuk az állatokat a beavatkozás előtt. Miután meggyőződünk, hogy az állatok alszanak és nem éreznek fájdalmat (hátsó láb csipesszel való megnyomása) leborotváltuk a hátsó láb lábszárának a posterior oldalát.

Ezek után bemetszést ejtettünk a plantarflexorok lefutásával párhuzamosan a térdhajlattól a sarokcsontig, figyelve, hogy csak a bőrt vágjuk meg. A bemetszés után lefejtettük a bőrt az alatta fekvő izompólyáról, amit utána szintén óvatos metszéssel feltártunk. Következő lépésként az izompólyát fejtettük le az alatta fekvő plantarflexorokról ügyelve, hogy ne okozzunk sérülést az izmokban. Eddig a lépésig mindkét csoportnál eljutottunk, ezáltal a C csoportunkat is alávetettük egy műtéti eljárásnak az izmok eltávolítása, illetve azokon okozott sérülések nélkül.

A további lépéseket az O csoporton végeztük, kivéve a keletkezett metszéseknek az összevarrását és fertőtlenítését. Az O csoportnál folytatásként átvágtuk az Achilles-ínt, amivel a soleus és gastrocnemius izmokat eltávolítottuk a tapadási helyéről, ezek után átvágtuk mindkét izmot a lehető legközelebb az eredési pontjukhoz, anélkül, hogy a plantaris izmot megsértenénk. A következő lépéseket mindkét csoportban alkalmaztuk. Elsőként a felnyitott izompólyát varrtuk össze felszívódó cérnával, majd utána a felnyitott bőrt zártuk le szintén felszívódó cérnával. Utolsó lépésként Betadin fertőtlenítő oldattal kezeltük a sebeket.

A állatok miután felébredtek az altatás után fájdalomcsillapításban és gyulladáscsökkentésben részesültek 12 óránként a következő 3 napon. A fájdalom és gyulladáscsökkentőt szintén intraperitoneálisan alkalmaztunk. Cataflan (43,7 mg diklofenák-rezinát (15 mg diklofenák-nátriumnak felel meg) /ml; 0,5 mg diklofenák-nátrium/csepp) szuszpenziós oldatot alkalmaztunk 3 csepp/ttkg/nap, ahol cseppentés után fiziológiás sóoldattal felhígítottuk az oldatot 1ml-re cseppenként. A műtött állatokat folyamatos ellenőrzés alatt tartottuk a kezelés teljes 2 hetes időtartama alatt.



4. ábra: Az ábrán az izmok eltávolításának egyes mozzanatai láthatóak

#### **4.2.3. Az izomminták begyűjtése**

A kéthetes kezelés után az állatokat a korábban említett anesztikum alkalmazásával elaltattuk, majd utána dekapitáltuk. A plantaris izmokat mindkét csoportból begyűjtöttük majd folyékony nitrogénnel fagyasztottuk, ezután  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fokon tároltuk a további feldolgozásig.

### **4.3. Biokémiai változások detektálására használt módszerek kompenzációs modellnél**

#### **4.3.1. Western blot molekuláris biológiai eljárás**

A mintákat homogenizáltuk Turrax homogenizátorral (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX DISPERSER 50/60Hz Németország) jégen lízispuffer hozzáadásával (137mM NaCl, 1% NP 40, 10% glicerol, 20mM Tris 8,0 pH), proteáz/foszfataz inhibitorokat adtunk hozzá (Aprotinin ( $2\mu\text{g/ml}$ ), Leupeptin ( $5\mu\text{g/ml}$ ), PMSF (1mM), Na orthovanadát (1mM)). Utána 40 percig jégen rázattuk. Ezután centrifugáltuk 15000g-n, majd a felülúszót lepipettáztuk.



A mintákat fehérje mérésnek vetettük alá Bradford (BioRad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate) és Lowry metódussal. A mintákat triplikátumban vittük fel majd Multi Scan EX (Thermo Labsystem) géppel vizsgáltuk 595 nm hullámhosszon, majd egységes koncentrációra hígítottuk. A mintákat 2X-es Laemmli pufferrel hígítottuk, majd 5 percen keresztül 90 °C fokon melegítettük. Ezek után a keletkezett vizsgálatra kész mintákat -80 °C fokon tároltuk.

A feldolgozás során a mintákat 6-12%-os Sodium Dodecil Sulfate-poliakrilamide gélelektroforézis (SDS-PAGE) gélekben vizsgáltuk, ahol az időtartam átlagosan 1-1,5 óra hosszáig tartott és konstans 150 V feszültséget alkalmaztunk. Az elektroforézis során Biorad markert (Biorad 1610374) alkalmaztunk. A zsebek feltöltése során a markernél 6 µl-t, míg a mintáknál 3 µl-t vittünk fel.

Az alkalmazott gélek százalékos értékeit a célfehérje molekulásúlyának megfelelően választottuk ki, hogy a célsúlynál ériük el a megfelelő mértékű szeparációt. A gélelektroforézis befejeztével az előre méretre vágott PVDF membránt 1 percre aktiváltuk metanolban majd a blot papírral együtt 5 percre 20%-os metanos transzfer pufferbe áztattuk billegtetéssel kombinálva. A következő lépésként elvégeztük a fehérjék transzferálását a gélről a membránra, amely során egy a membránból, gélből és a blot papírból álló „szendvics”-et helyeztünk a transzfer egységbe. A transzfert 1,5 órán keresztül végeztük konstans 30 V feszültségen. A szendvics készítése során minden összetevőt 20% metanos transzfer pufferrel nedvesítettünk, elkerülve az egyes komponensek kiszáradását.

A transzfer végeztével a membránt 1 percre Tris-Buffered Saline-Tween 20, Tris-pufferolt sóoldat-Tween 20-be (TBST) áztattuk, míg a gél 2 órára gélfestő oldatba helyeztük (50% metanol, 39,75% H<sub>2</sub>O, 10% ecetsav, 0,25% Coomassie Brilliant Blue) billegtetve. 1 perc után a membránt 2 órára 5%-os tejjporral vagy 5%-os BSA-val kombinált TBST-ben blokkoltuk 4°C fokon szintén billegtetve.

A blokkolást követően a membránt a blokkolás során alkalmazott fehérjének megfelelően beoldott elsődleges antitesttel kezeltük egy éjszakán át 4°C fokon billegtetve (1. táblázat). Az elsődleges antitest hígítását a célfehérjének megfelelő antitestet gyártó cég utasításai alapján határoztuk meg. Másnap reggel 3-szor 20 percen keresztül TBST-vel mostuk a

membránt rázatással kombinálva szobahőn, a nem specifikus kötődések kiküszöbölése miatt.

Következő lépésként a másodlagos antitesttel kezeltük a membránt 4°C fokon 2 órán keresztül billegtetve. Az inkubálás során konjugált tormaperoxidáz-konjugált nyúl, kecske és egér másodlagos antitesteket alkalmaztunk (Jackson 1:10000). Ezek után 3-szor 20 percig mostuk a membránt TBST-vel szobahőmérsékleten rázatással. A mosások után tormaperoxidázzal inkubáltuk a membránt 1 percig szobahőmérsékleten fénytől védve.

Az inkubált membránt röntgenfilmen előhívtuk és a megfelelő molekulaszúlynál megjelenő csíkok reprezentálták a célfehérjénket. A megjelenő csíkokat ImageJ szoftver segítségével mértük, ahol a relatív denzitást a „house keeping” fehérjére kalkuláltuk.

Végző lépésként membránfestő oldattal (0,2% Coomassie Brilliant Blue, 45% metanol, 10% ecetsav, 44,8% H<sub>2</sub>O) festettük meg a membránt, amit utána a filmmel együtt egy ImageJ nevezetű program segítségével értékeltünk ki. A house keeping fehérjeként a Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-t (GAPDH) és  $\alpha$ -tubulint alkalmaztuk. A vizsgálat során alkalmazott elsődleges antitestek az 1. táblázatban láthatóak.

1. táblázat: A mérések során alkalmazott elsődleges antitestek

Antitest	Gyártó	Molekula tömeg	Koncentráció
SIRT1	AB ab110304	60 kDa	1:1000
S6	CS 2217S	32 kDa	1:5000
phospho-S6	CS 5364S	32 kDa	1:5000
AKT	CS 46915	60 kDa	1:3000
mTOR	CS 29835	289 kDa	1:1000
phospho-mTOR	CS 5536	289 kDa	1:1500
FOXO1	CS 9454	78 kDa	1:1000
Sestrin2	AB ab2535	54 kDa	1:1500
AMPK	CS 2532	62 kDa	1:1000
phospho-AMPK	CS 2535	62 kDa	1:1500

NAMPT	AB ab45890	55 kDa	1:500
Ac p53	Millipore 06-758	53 kDa	1:1000
OGG1	Proteintech 15125-1AP	39 kDa	1:1000
Cytochrome C	SC sc-7159	15 kDa	1:1000
COX4	SC sc-69359	17 kDa	1:2500
NRF2	AB ab31163	68 kDa	1:1000
SOD2	Invitrogen PA5-80048	24 kDa	1:3000
SIRT3	Proteintech 10099-1-AP	28 kDa	1:10000
PINK1	Affinity Bioscience DF7742	66 kDa	1:1000
GAPDH	G8795	37 kDa	1:3000
Pax7	Sc-81648	57 kDa	1:500
NRF-1	Sc-33771	68 kDa	1:1000
PGC1A	KP9803	113 kDa	1:3000
alfa-tubulin	T6199	50 kDa	1:5000

#### 4.3.2. H<sub>2</sub>S meghatározás

Egy korábban publikált eljárást (Ditrói és mtsai., 2019) alkalmaztunk a szöveti lizátumok H<sub>2</sub>S szintjének meghatározásához. Első lépésként 10-20 mg szövetet feldaraboltunk diszmembrátor (B. Braun, 853162) használatával. Alkilezés/lízis kivitelezését fénytől védve 500 µl PBS (pH=8.0) hozzáadásával végeztük, ami 1 mM monobróm-bimánt (Sigma-Aldrich) tartalmazott. Jégen történő rövid szonikálás után az oldatot 37 °C-on inkubáltuk sötétben, 1 órán keresztül. A reakciót 50 µl 50%-os triklórecetsav (TCA) hozzáadásával állítottuk le, majd a kicsapódott fehérjéket lecentrifugáltuk (10 perc, 12.000 g, 4 °C). Következő lépésben 100 µl felülúszót átpipettáztuk High Performance Liquid Chromatography (HPLC) csőbe - a maradék felülúszót leszívtuk) - és a visszamaradó pelletet újra feloldottuk 300 µl 4% SDS/100 mM NaOH pufferben BCA

kit-tel (Thermo-Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kt) történő fehérjekoncentráció méréshez 96 lyukú plate reader-rel (Bio Tek).

A felülúszóban található biman jelölt vegyületek elválasztásához 3 µl felülúszót injektáltunk Phenomenex Luna C18(2) 250 x 2,0 mm 3 µm oszlopra (Thermo Ultimate 3000 bináris pumpás HPLC fluoreszcens detektorral), majd gradiens módszerrel mértük. A gradiens elúciót 0,1% trifluor-ecetsav TFA/H<sub>2</sub>O (A) és 0,1% TFA/ acetonitril (ACN) (B) oldószerekkel végeztük a 2. táblázatban leírtak szerint. A detektálást fluorimetriás detektorral végeztük, Ex=390 nm, Em=475 nm hullámhosszokon. A kvantitáláshoz pontos koncentrációjú H<sub>2</sub>S oldatból készült standardot használtunk, a fehérjemérés eredményeiből pedig fehérjetömegre vonatkoztatott H<sub>2</sub>S mennyiséget számoltunk.

2. táblázat: Monobróm-bimánnal végzett H<sub>2</sub>S mérés gradiens elúciós profilja.

<b>Idő (perc)</b>	<b>B%</b>
0	15
4,762	35
14,178	35
17,328	90
18,904	90
20,479	15
23,629	15

#### 4.3.3. Cisztationin béta-szintáz (CBS) aktivitás mérése

10-20 mg fagyasztott szövetmintát feldaraboltunk a fent említett diszmembrátorral, utána hozzáadtunk 400 µl lízis puffert (150 mM KCl, 50 mM HEPES, pH = 7,4, 0,1% CHAPS, 2% proteáz inhibitor koktél). Jégen történő rövid szonikálást követően a csöveket rotációs keverőbe helyeztük (4 °C, 30 perc). Ezután a mintákat lecentrifugáltuk (12000 g, 4 °C, 10 perc), majd a felülúszóból fehérjét mértünk BCA-módszerrel plate reader-en. Fehérjemérés után minden mintát 1mg/ml fehérje koncentrációra hígítottunk lízis puffer

hozzáadásával. Az előkészített mintákból CBS aktivitást mértünk egy korábbi protokoll alapján (Krijt és mtsai., 2011). Ehhez a mintákat összekevertük kofaktorokkal (SAM: S-adenozil-metionin 0.5 mmol/L, PLP: 1 mmol/L piridoxál 5-foszfát) és szubsztrát homociszteinnel (frissen készítve homocisztein-tiolaktonból) és stabil izotóppal jelölt szerinnel (2,3,3-D-szerin, Cambridge Isotope Laboratories, Inc), majd 4 órán át inkubáltuk 37 °C-on. A reakcióelegyet az EZ: faast kit (Phenomenex) „Reagens 1” összetevőjével leállítottuk, belső standardként ismert mennyiségű stabil izotóppal jelzett cisztationin (3,3,4,4-D cystathionine, Cambridge Isotope Laboratories, Inc) hozzáadásával. A minták előkészítése és az EZ:faast kittel történő mérés a gyártói kézikönyv alapján történt. A HPLC-MS / MS mérésekhez egy Thermo Q Exactive Focus MS-hez kapcsolt Thermo Vanquish (Thermo Scientific) UHPLC-t alkalmaztunk, és 481,3 → 421 (termék) és 483,3 → 423 (belső standard) SRM átmeneteit figyeltük meg. A specifikus aktivitásokat a keletkezett cisztationin mennyiség és a minták fehérjetartalma alapján számoltuk.

#### **4.3.4. NADH/NAD<sup>+</sup> aktivitás mérése**

NADH/NAD<sup>+</sup> aktivitás mérő kitet (ab176723) alkalmaztunk a plantaris minták NAD<sup>+</sup> és NADH szintjének meghatározásához a gyártó leírása alapján. A plantaris izom mintákat (200 mg) NADH/NAD<sup>+</sup> 200  $\mu$ l lízis pufferrel homogenizáltuk 1 percig Turrax homogenizátorral. Ezután a pre-homogenátumokat szonikáltuk 1 percig. A homogenátumokat 4 °C-on centrifugáltuk 2500 rpm-en 10 percig. A felülúszót begyűjtöttük majd 96 lyukú plate-re vittük fel a következő módon. 25  $\mu$ l-t vittünk fel duplikátumban a NADH standard-ból, a blank-ből és a mintákból. A mintákat NADH és NAD<sup>+</sup> duplikátumban is vizsgáltuk. 25  $\mu$ l NADH Extraction solution-t adtunk a NADH mintákhoz és NAD<sup>+</sup> Extraction solution-t a NAD<sup>+</sup> mintákhoz. A standard és a blank lyukakba NADH/NAD<sup>+</sup> Control Solution-t pipettáztunk. Ezek után a plate-t 15 percre 37 °C-on inkubáltuk a NAD<sup>+</sup>/NADH emésztéshez. Következő lépésként 25  $\mu$ l NADH Extraction Solution-t adtunk a NAD<sup>+</sup> mintákhoz és 25  $\mu$ l NAD<sup>+</sup> Extraction Solution-t a NADH mintákhoz. A standard és blank lyukakba szintén NADH/NAD<sup>+</sup> Control Solutiont pipettáztunk. Végül 75  $\mu$ l Reaction Mix-et vittünk fel minden lyukba, majd 2 órán

keresztül vizsgáltuk öt percenként ex485 és em538 nm hullámhosszon Multi Scan EX géppel.

#### **4.4. Okklúziós vizsgálat**

##### **4.4.1. Vizsgálati személyek**

A vizsgálatunkban 7 egészséges fiatal férfi (életkoruk:  $24,5 \pm 4,69$  év, testtömegük:  $78,8 \pm 6,7$  kg, magasságuk:  $182,9 \pm 7,7$  cm) vett részt, akik nem szenvedtek semmilyen krónikus betegségben. A résztvevők a vizsgálat kezdete előtt írásbeli és szóbeli tájékoztatást kaptak a kutatás menetéről, beleegyező nyilatkozatokat aláírásukkal ellátták. A kutatást a Helsinkii egyezmény alapján és a helyi Tudományos kutatásetikai bizottság beleegyezésével végeztük.

##### **4.4.2. Maximális erő felmérése**

A vizsgálati személyek az okklúziós edzést megelőzően egy héttel, maximális erőfelmérésen vettek részt, melyben megvizsgáltuk az 1RM-et. Ez a felmérés a guggolás gyakorlat volt függőlegesen vezetett keretben. Minden résztvevő számára ismert volt a megfelelő végrehajtási technika és korábban vettek már részt ellenállással végzett edzésen, ahol a guggolást gyakorolták. A mozgásterjedelem a guggolás végrehajtása során a teljes térdízületi extenziós kiinduló helyzettől a csípőlapát térd vonala alá süllyedéséig tartott. Megkértük a résztvevőket, hogy a felmérés előtti 10 órában ne fogyasszanak semmilyen ételt.

A felmérés előtt 10 perces kerékpár ergométeres bemelegítésben vettek részt, majd 10 guggolást hajtottak végre a testtömegük felének megfelelő súllyal. Ezután a testtömegükkel megegyező plusz súllyal végeztek 4-6 ismétlést. A bemelegítés befejeztével a National Strength and Conditioning Association (NSCA) által a maximális erő felmérésére kialakított protokollt alkalmaztuk. A résztvevők maximum 4 próbálkozás

alatt elérték az 1RM értéküket, miközben minden körben emeltünk a súlyon. A szériák közötti pihenő idő 2 perc volt.

#### **4.4.3. Terhelés protokoll**

Egy héttel később minden résztvevő elvégezte az edzésprotokollt, ami az 1RM 70%-val végzett guggolás volt 7x10 ismétléssel. A szériák közötti pihenőidő 2 perc volt, ahol a jobb lábon okklúziós elszorítást alkalmaztunk (okklúziós láb) 1 percig, míg a bal láb szolgált a kontrollként (kontroll láb). Az okklúziót egy 11 cm szélességű speciális bandázssal végeztük (Mizuho, Japán). Az elszorítás mértéke 230 mmHg volt. Legjobb tudomásunk szerint ez az első pihenő időben alkalmazott okklúziós vizsgálat, ahol a gyakorlatot magas intenzitással végezték el a vizsgálati személyek.

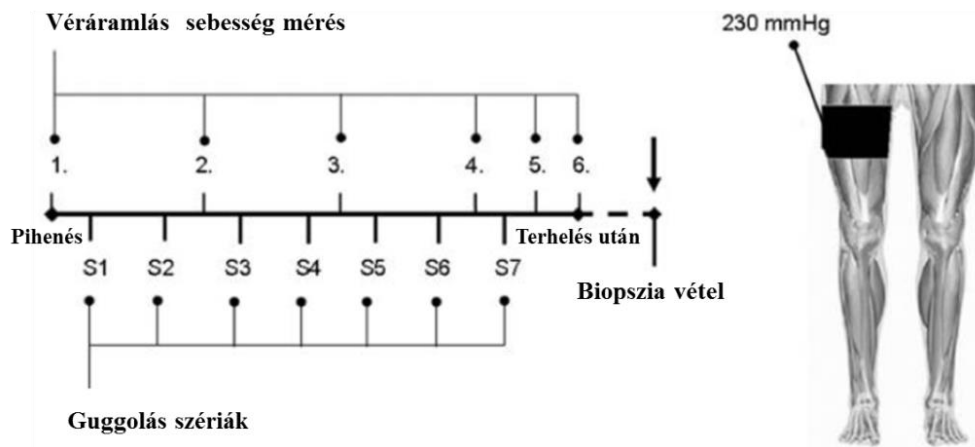
#### **4.4.4. Véráram vizsgálat**

Az általunk alkalmazott okklúziós elszorítás mértéke 230 mmHg volt, amit előzetes pilot kutatás során teszteltünk a résztvevőkön, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy az elszorítás nagysága nem jár elviselhetetlen érzéssel. A véráramlást a kezelt lábon vizsgáltuk Doppler 2-dimensional real-time ultrasound examination (General Electric, Boston, MA, USA) eszköz segítségével.

A véráramlás sebességét közvetlenül az okklúziós bandázs leeresztése előtt, közben és utána is vizsgáltuk 7,5-10 MHz frekvenciával lineár transzduktor segítségével, amit a poplitealis artériára helyeztünk 60°-os szögben. A véráramlást a terhelés megkezdése előtt, minden 2. széria után, az utolsó széria után és 5 perccel a terhelés végétével (4. ábra) vizsgáltuk. A nyugalmi diasztolés átmérőt (mm) 30 szívciklus átlagából számoltuk. A véráramot (ml/perc) a  $(\text{időátlagos átlagsebesség} \times \pi r^2) \times 60$  egyenletből kaptuk meg, ahol  $r$  a radiusza az artéria lumenének. A nyugalmi véráramot 20 szívciklus átlagából lett számolva. A szinkronizált átmérő és sebességadatokból számoltuk a vér áramlását.

#### 4.4.5. Biopszia mintavétel

Az edzés után 2 órával mikrobiopszia mintákat gyűjtöttünk a vizsgálati személyek mindkét lábából az mRNA, miRNA és fehérje mérésekhez. Korábbi okklúziós kutatás alapján alkalmaztuk ezt az időtartamot (Petrick és mtsai., 2019). Vizsgálatunkban résztvevő alanyok mindannyian jobb lábasok voltak. Ennek következtében választottuk ki egységesen a jobb lábat, mint vizsgálati láb. A vastus lateralis izmot helyileg érzéstelenítettük (Lidocain) és ezt követően fél-automata mikrobiopszia tűvel kb. 10 mg szövetet vételeztünk a résztvevőktől. A mintákat elfeleztük, és azonnal folyékony nitrogénnel fagyasztottuk. A további mérésekig  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fokon tároltuk. A következő ábrán az edzésprotokollt és a biopszia mintavételezés idejét szemléltetem (5. ábra).



5. ábra: Terhelési protokoll: szériák, véráramlás mérés és biopszia mintavétel ideje

#### 4.5. Biokémiai változások detektálására használt módszerek okklúziós modellnél



#### **4.5.1. RNS kitermelés kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) az mRNS és mikroRNS átíratok vizsgálatához**

A minták mRNS és miRNS méréséhez és a cél gének expressziós szintjének meghatározásához qRT-PCR-t alkalmaztunk. Nanodrop spektrofotométerrel megvizsgáltuk különböző hullámhosszokon a mintákat, hogy ellenőrizni tudjuk a mintákban lévő RNS mennyiségét és tisztaságát, hogy nem történt nagy mennyiségű fehérje szennyezés. A mintákat triplikátumban vittük fel. A ciklus küszöbértékeket minden PCR reakciónál elmentettük. A referencia gént a RefFinder elnevezésű online alkalmazás segítségével választottuk ki. Az 5 lehetséges gén közül a 28S rRNS mutatta a legnagyobb expressziós stabilitást (átlag=20 Ct, SD=0,38 Ct, variancia együttható=1,9). Az RNS extrakciót (NucleoSpin RNA mini; Macherey-Nagel, Düren, Németország) és a cDNS szintézist (SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit; Biorline, London, UK) a gyártó előírásai szerint végeztük. A speciális gén amplikont qRT-PCR primer párokkal erősítettük fel. A következő primereket szintén alkalmaztuk a próbák során: Pax7, Pax3, mTOR, SIRT1, NRF1, vaszkuláris endoteliális növekedési (VEGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), PGC1a, FOXO1, 28S rRNS, mitokondriális transzkripció faktor A (TFAM), hypoxia-inducible factor 1 subunit a (HIF1a), lupus Ku autoantigen protein p70 (KU70), AKT1, AKT2, SOD1, SOD2, és U6 nukleáris RNS (3. táblázat). A Best Keeper alkalmazás segítségével kiválasztottuk a 28S rRNS-t referencia génként. Az mRNS minták vizsgálatához SYBR Green alapú protokollt alkalmaztunk (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) alapú protokollt alkalmaztunk. Emellett pedig Agaroz gélen elektroforézissel ellenőriztük a mintákat, hogy az integritásáról meggyőződünk.

A miRNS-ek vizsgálatához 10 µl mintát vittünk fel és mindegyik 10 µl reakciós mixben 2.4 µl 10-szeresen hígított reverz transzkriptáz volt. A reakciókat PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System-en (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) végeztük 95°C-on 10 percig, majd 40 ciklust futtattunk 95°C-on 15 mp-ig és 60°C-on 1 percig. Kétszeres hígítási sort alkalmaztunk minden miRNS-nél, hogy igazolni tudjuk a linearitást. A kezdeti RNS szint miatti esetleges különbségek kiküszöbölésére az összes mintát az U6 nukleáris RNS-re normalizáltuk, ami a legnagyobb stabilitást mutatta (átlag= 23,1 Ct,

SD = 0,44 Ct, variancia együttható = 1,88). Minden reakciót külön futtattunk és a kvantifikációhoz Ct ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) módszert alkalmaztunk.

3. táblázat: qRT-PCR eljárás során vizsgált mRNS-ek

<b>mRNA</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
28S	AGCCGATCCATCATCCGCAA	CAGCCAAGCTCAGCGCAAC
Akt1	TCTATGGCGCTGAGATTGTG	CTTAATGTGCCCGTTCCTTGT
Akt2	TGAAAACCTTCTGTGGGACC	TGGTCCTGGTTGTAGAAGGG
FOXO1	AAGAGCGTGCCCTACTTCAA	CATCCCCTTCTCCAAGATCA
HIF-1a	TTCCAGTTACGTTTCCTTCGATCA	TTTGAGGACTTGCGCTTTCA
IGF1	CGAAGTCTCAGAGAAGGAAAGG	ACAGGTAACCTCGTGCAAGAC
Ku70	CTGTCCAAGTTGGTCGCTTC	CTGCCCTTAAACTGGTCAA
mTOR	TCGCTGAAGTCACACAGACC	CTTTGGCATATGCTCGGCAC
NRF-1	CGCTCTGAGAACTTCATGGAGGAACAC	GCCACATGGACCTGCTGCACTT
Pax3	CTCACCTCAGGTAATGGGACT	CGTGGTGGTAGGTTCCAGAC
Pax7	CCCCCGCACGGGATT	TATCTTGTGGCGGATGTGGTT
PGC-1 $\alpha$	GTGAAGACCAGCCTCTTTGC	CACGTCTCCATCTGTCAGC
Rpl11-Pan	AACTTCGCATCCGCAAATC	CTCCGGATGCCAAAGGATCT
Rpl11-V1	ATCATGGCGCAGGATCAAGGT	CTCCGGATGCCAAAGGATCT
Rpl11-V2	GCTCTCCATCATGGCGGATCA	TGGAAAACACAGGGGTCTGC
SIRT1	TGCGGGAATCCAAAGGATAATTCAGTGTC	CTTCATCTTTGTCATACTTCATGGCTC TATG
SOD2	GCAGAAGCACAGCCTCCCCG	CCTTGGCCAACGCCTCCTGG
TFAM	TGCCTCATCCACCGGAGCGA	CACAAAACCTGAAGGGGGAGCGCA
VEGF	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT

#### 4.6. Statisztikai analízis

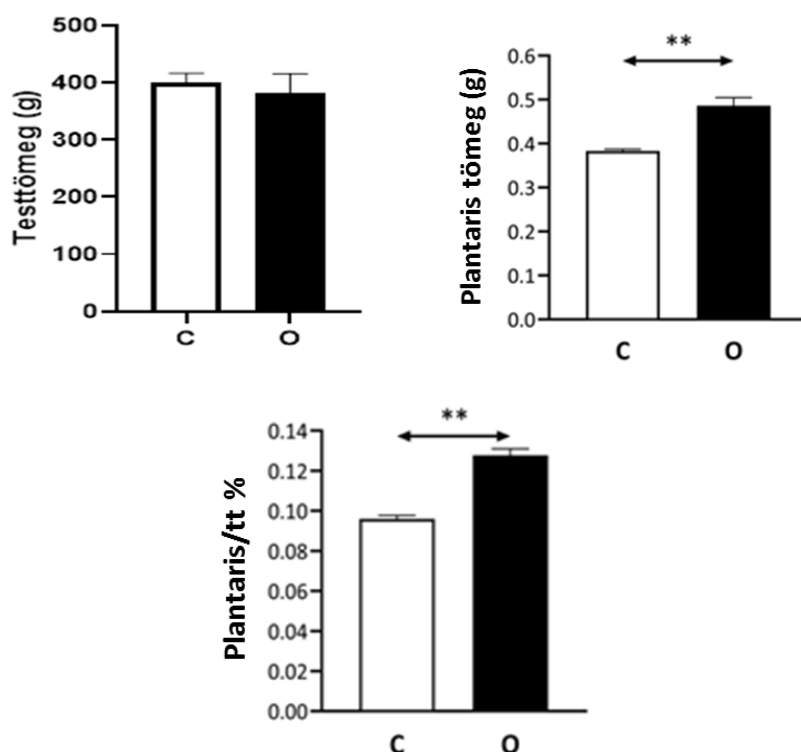
A statisztikai analízisekhez Statistica 13 programot alkalmaztunk. Az eredményeket Shapiro-Wilk normalitás vizsgálatnak vetettük alá.. Abban az esetben, ha a minták normális eloszlást mutattak, akkor 2 mintás t-próbát alkalmaztunk. Abban az esetben, ha nem normális volt az eloszlás, akkor Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Variancia analízis meghatározásához pedig Repeated ANOVA-t alkalmaztunk Tukey HSD post hoc analízissel. A változók közötti kapcsolat megállapításához pedig Pearson féle korrelációt használtunk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$  értékben határoztuk meg.

## **5. Eredmények**

### **5.1. Kompenzatórikus hipertrófia kísérlet**

#### **5.1.1 Antropometriai változások**

A 6. ábrán az állatok antropometriai változásait láthatjuk a kezelés hatására. Az állatok testtömegében (C=399±16,98g; O=381±34,12g) a 2 hetes kezelés után nem mutattunk ki szignifikáns különbséget az O és a C csoport között. A plantaris izom tömegében (C=0,383±0,01g; O=0,486±0,05g) nagymértékű emelkedést találtunk az O csoportban a C csoporthoz képest a kezelés hatására (p<0.01). A plantaris tömeg/testtömeg %-os arányaiban (C=0,096%±0,005; O=0,127%±0,01) szintén kimagasló különbséget fedeztünk fel az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0.01). Ezen eredményekből látható, hogy a plantaris izomban nagymértékű változás történt az eljárás hatására.



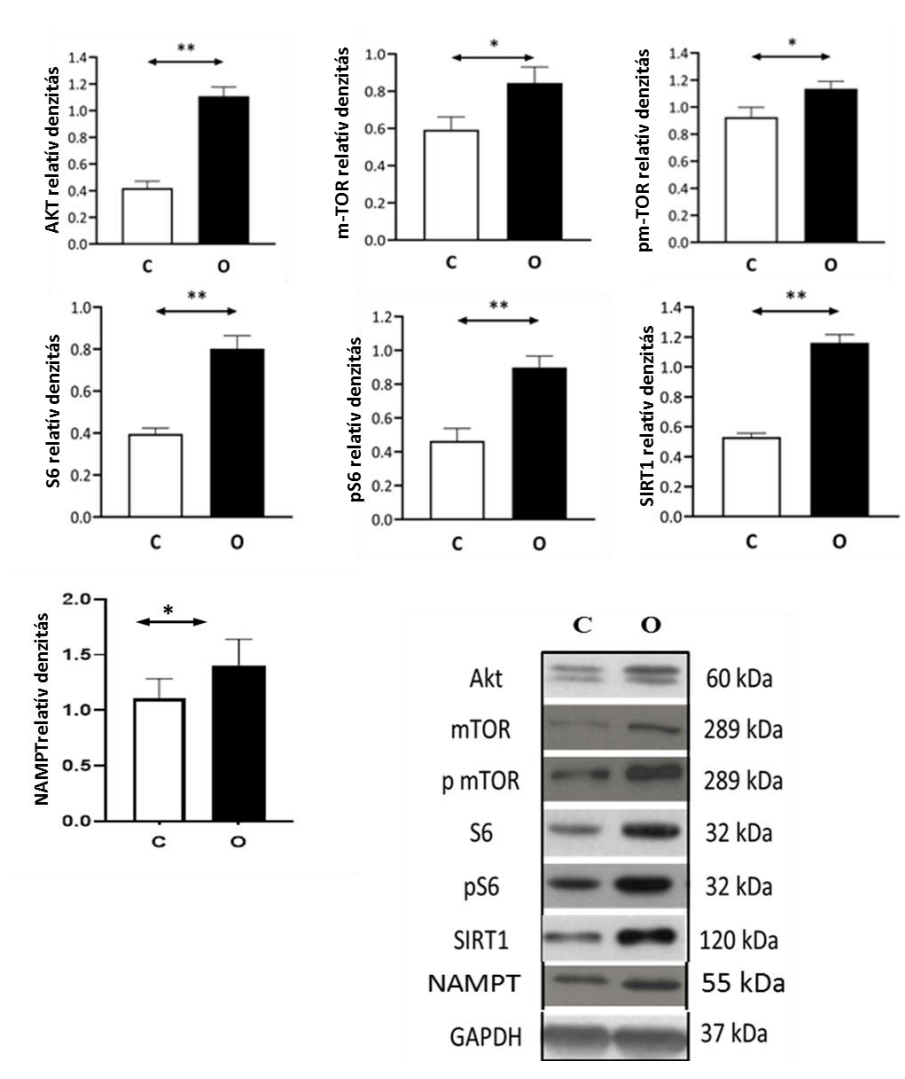
6. ábra: A 2 hetes kezelés után mért állatsúlyok, plantaris izmok tömege, plantaris izom és a testtömeg százalékos aránya

Jelölt értékek: átlag±SE, \*:p<0,05; \*\*:p<0,01.

### 5.1.2. A plantaris izomban mért biokémiai változások

A következő ábrán (7. ábra) a kezelés hatására bekövetkező anabolikus markerek változásait látjuk. A kezelés hatására az Akt fehérje szintje szignifikáns növekedést mutatott az állatok plantaris izmában az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0,01). Az mTOR fehérje szintje szintén szignifikánsan emelkedett az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0,05). Az mTOR fehérje foszforilációs állapota úgyszintén szignifikánsan emelkedett az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0,05). A riboszómális S6 fehérjének a szintje szignifikánsan megemelkedett az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0,01). A riboszómális S6 fehérje foszforilációs állapotának a szintje szintén megemelkedett az O csoportban a C csoportéhoz képest (p<0,01). A SIRT1

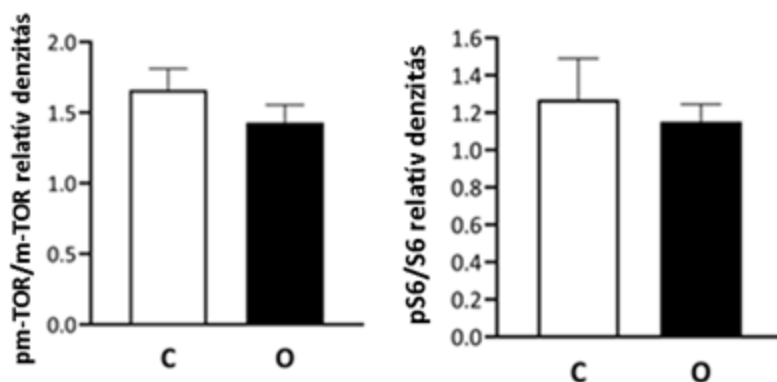
fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett a kezelés hatására az O csoportban a C csoportéhoz képest ( $p < 0,01$ ). Az általunk vizsgált anabolikus útvonal minden markerében emelkedést detektáltunk a 2 hetes eljárás hatására. A NAMPT fehérje emelkedett szintet mutatott a vizsgálati csoportban a C csoporthoz képest ( $p < 0,05$ ). Ezt a fehérjét a  $\text{NAD}^+$ -on keresztüli SIRT1 aktiváció miatt jelenítjük meg az anabolikus fehérjék ábráján.



7. ábra: Az anabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit az Akt, mTOR, pmTOR, S6, pS6, SIRT1, NAMPT és GAPDH fehérjék esetében.

Jelölt eredmények: átlag $\pm$ SE, a nyíl a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest, \*\*:  $p < 0,01$ , \*:  $p < 0,05$ .

A 8. ábrán az mTOR és az S6 fehérje foszforilált és totál értékeinek arányát mutatjuk meg. A foszforilált mTOR és a totál mTOR fehérjének az aránya nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között. A riboszómális S6 foszforilációs és totál S6 fehérje állapotának a szintje szintén nem emelkedett meg az O csoportban a C csoportéhoz képest.

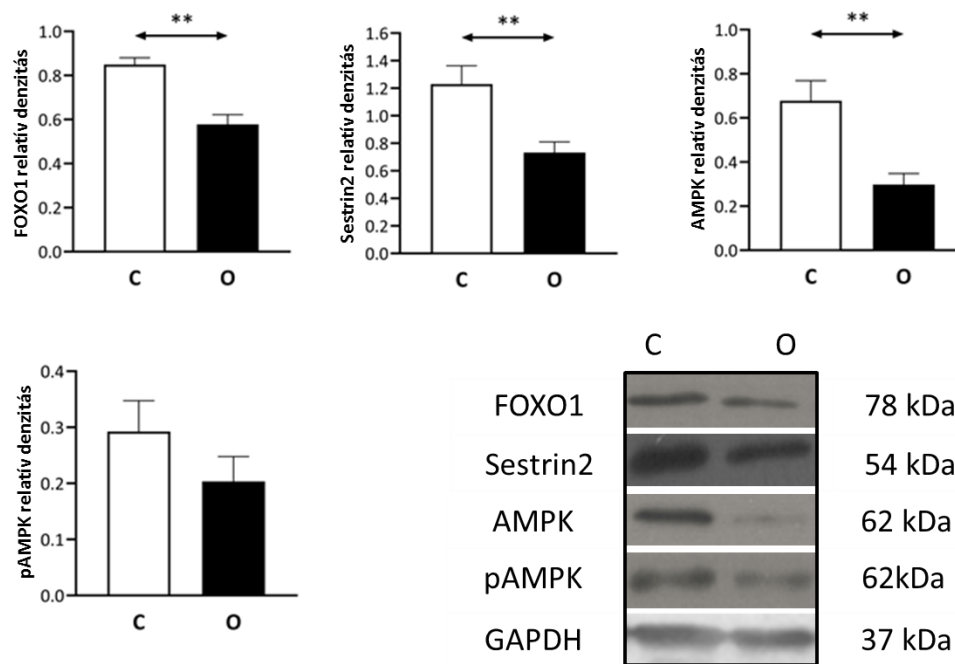


8 ábra: A p-mTOR/mTOR, p-S6/totál S6 fehérjék arányának szintje

Jelölt eredmények: átlag±SE, \*:  $p < 0,05$ .

### 5.1.3. A katabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék

A 9. ábrán a plantaris izomban a kezelés hatására végbemenő katabolikus változásokat mutatjuk. A FOXO1 fehérjének a szintje a kezelés hatására szignifikánsan csökkent az O csoportban a C csoportéhoz képest ( $p < 0,01$ ). A Sestrin2 fehérjének a szintje szignifikáns csökkenést mutatott az O csoportban a C csoportéhoz képest ( $p < 0,01$ ). Az AMPK fehérjének a szintje szignifikánsan csökkent az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására ( $p < 0,01$ ). Az AMPK fehérje foszforilált állapotának a szintje nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között a kezelés hatására.



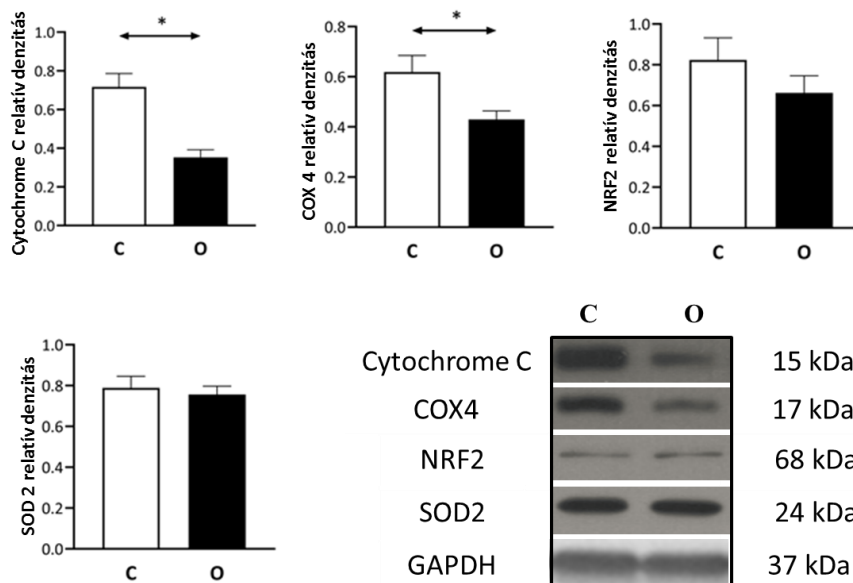
9. ábra: A katabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a FOXO1, Sestrin2, AMPK, pAMPK fehérjék esetében.

Jelölt eredmények: átlag±SE, \*: p<0,05.

#### 5.1.4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó fehérjék

A 10. ábrán a mitokondriális biogenezisben szerepet játszó fehérjékben bekövetkező változásokat mutatjuk be. A Cytochrome C fehérje szintje szignifikáns csökkenést mutatott az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására (p<0,05). A COX4 fehérje szintje szignifikáns csökkenést mutatott az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására (p<0,05). Az NRF2 fehérje szintje nem mutatott ki szignifikáns különbséget a két csoport között a kezelés hatására. A SOD2 fehérje szintje nem mutatott ki szignifikáns különbséget a két csoport között a kezelés hatására.



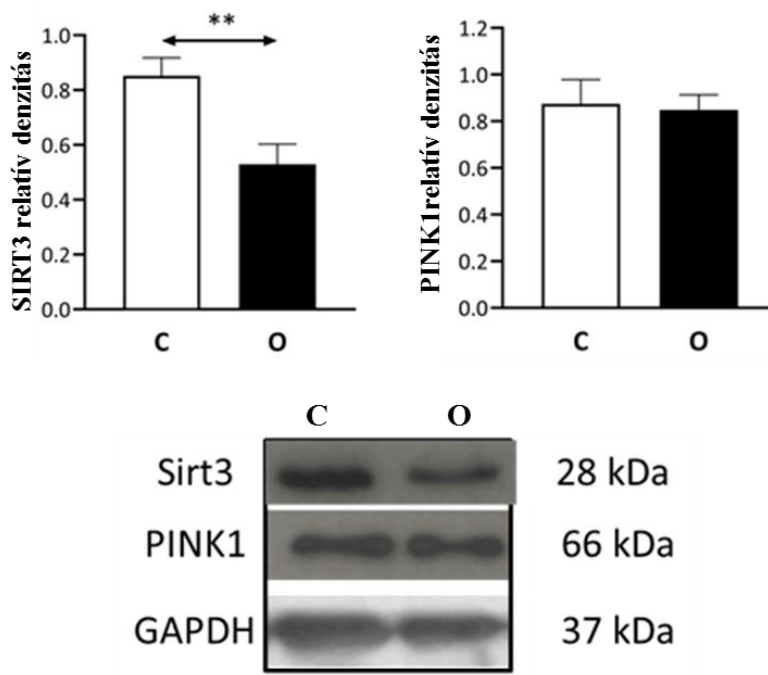


10. ábra: A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a Cytochrome C, COX4, NRF2, SOD2 fehérjék esetében.

Jelölt eredmények: átlag±SE, \*:  $p < 0,05$ .

### 5.1.5. A mitofágiában szerepet játszó fehérjék

A mitofágiában szerepet játszó markerekben bekövetkező változásokat a 11. ábrán mutatjuk. A SIRT3 fehérje szintje szignifikáns csökkenést mutatott az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására ( $p < 0,01$ ). A PINK1 fehérje szintje nem változott szignifikánsan a két csoport között a kezelés hatására.

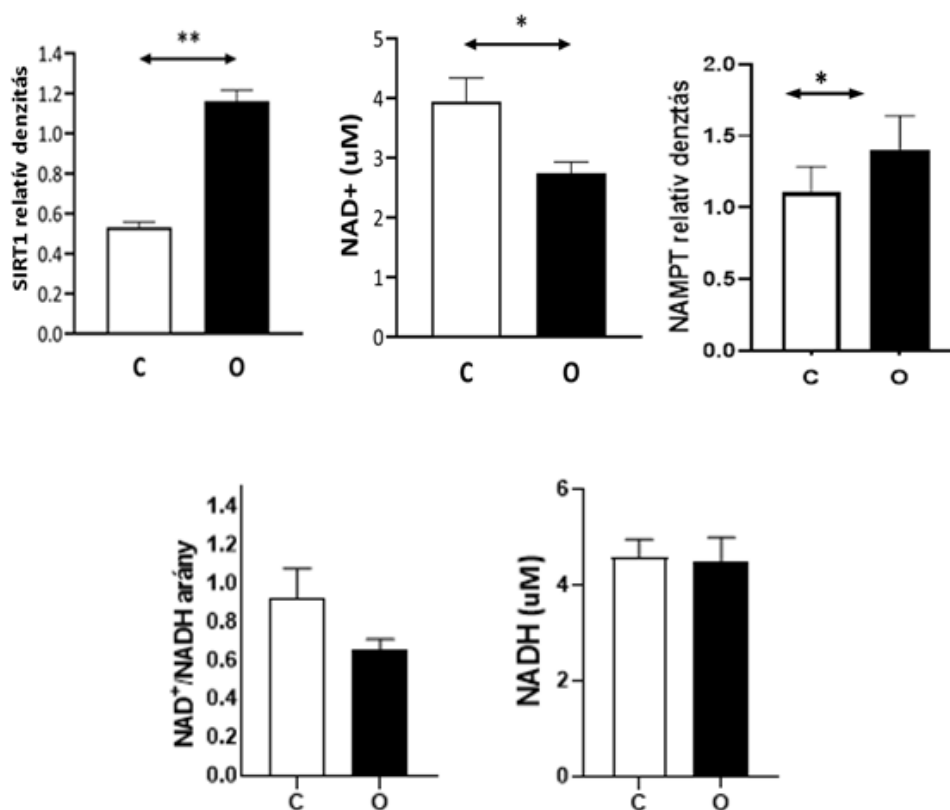


11. ábra: A mitofágiában szerepet játszó fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményeit a SIRT3 és PINK1 fehérjék esetében.

Jelölt eredmények: átlag±SE, \*\*:  $p < 0,01$ .

### 5.1.6. SIRT1 fehérje aktivitási és bioszintézisének markerei.

A következő ábrán a SIRT1 fehérje és annak bioszintézisében és aktivitásában szerepet játszó markereket mutatjuk be (12. ábra). A  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  arány a sejt energia-, illetve redox állapotát mutatja be. A NADH mennyiségében nem találtunk különbséget a két csoport között a kezelés hatására. A  $\text{NAD}^+$  mennyisége szignifikánsan csökkent az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására ( $p < 0,05$ ). A NAMPT fehérje, mint a  $\text{NAD}^+$  bioszintézisében szerepet játszó előanyag szintje szignifikánsan megemelkedett az O csoportban a C csoporthoz képest ( $p < 0,05$ ).

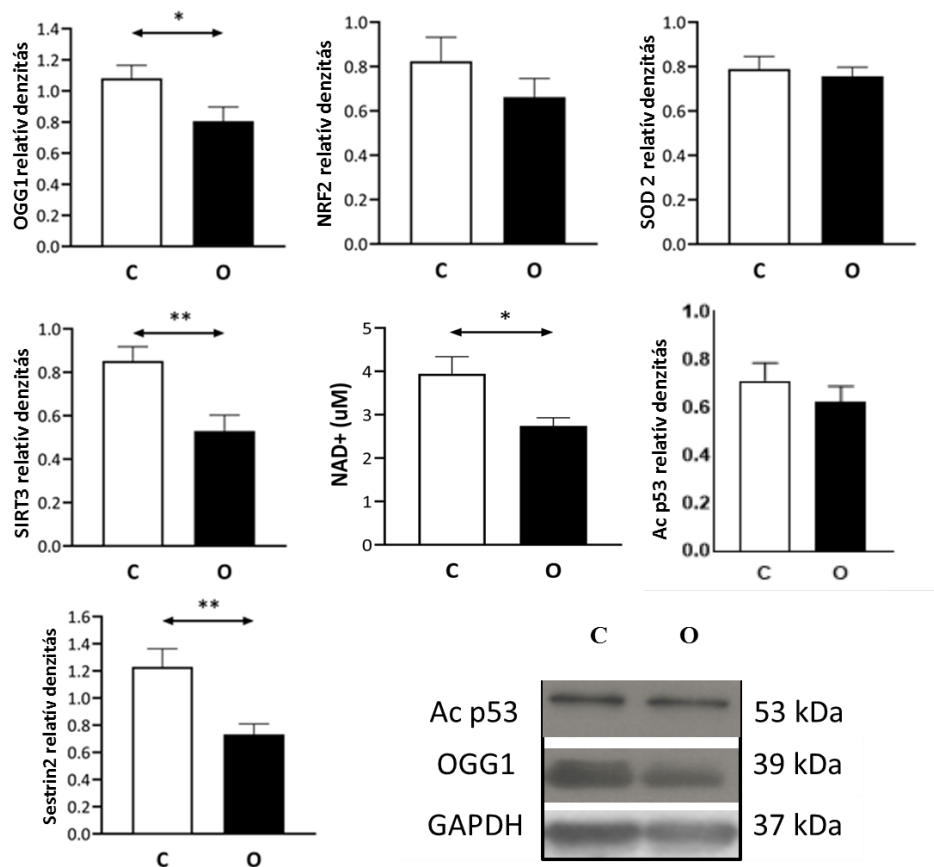


12. ábra: SIRT1 fehérje aktivitási és bioszintézisének markerei.

Jelölt eredmények: átlag±SE, a nyíl a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest, \*:  $p < 0,05$ .

### 5.1.7. A redox folyamatokban szerepet játszó antioxidáns markerek

A redox folyamatokban szerepet játszó markerek változásait a 13. ábra mutatja be. Az OGG1 fehérjének, mely a DNS sérülés és a sejt redox állapotára enged következtetni, a szintje szignifikánsan csökkent a kezelés hatására az O csoportban a C csoportéhoz képest ( $p < 0,05$ ). Az Ac p53 fehérje, ami a sejt redox állapotát mutatja, nem mutatott különbséget a két csoport között a kezelés hatására. Az ábrán szerepel még az NRF2, SOD2, SIRT3, NAD<sup>+</sup> és a Sestrin2 is, melyek fontos redox markerek.

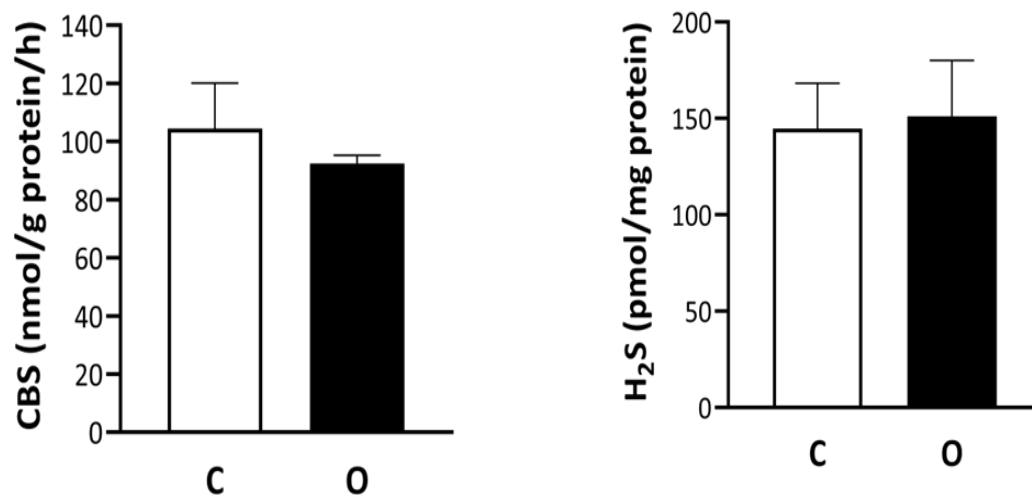


13. ábra: A redox folyamatokban szerepet játszó antioxidáns markerek változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredménye az OGG1, Ac p53 fehérje esetében

Jelölt eredmények: átlag±SE, a nyíl a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

### 5.1.8. H<sub>2</sub>S és a CBS enzim aktivitásának mérése

A CBS egy kulcsfontosságú enzim, ami a H<sub>2</sub>S szintézisben játszik szerepet. A 2 hetes kezelés hatására a CBS enzim mennyisége nem mutatott szignifikáns változást a két csoport között. A H<sub>2</sub>S mennyisége nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között a kezelés hatására (14. ábra).



14. ábra: A CBS és a H<sub>2</sub>S markerek változásai

Jelölt eredmények: átlag±SE, p<0,05.

4. táblázat: A kezelés hatására a plantaris izomban bekövetkező antropometria és biokémiai változások összefoglalása.

Jelölések: ↑: növekedés a C csoporthoz viszonyítva, ↓: csökkenés a C csoporthoz képest, X: nem történt változás a C csoporthoz képest az O lábban. p<0,05: ↑, ↓; p<0,01: ↑↑, ↓↓.

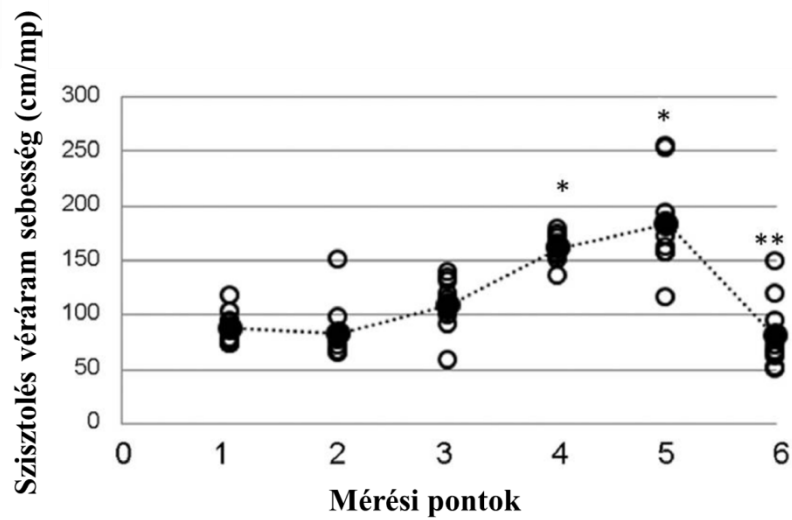
Testtömeg	X
Plantaris izom tömeg	↑↑
Plantaris izom/testtömeg%	↑↑
AKT	↑↑
mTOR	↑
p-mTOR	↑
p-mTOR/mTOR	X
S6	↑↑
p-S6	↑↑
p-S6/S6	X

FOXO1	↓↓
Sestrin2	↓↓
AMPK	↓↓
p-AMPK	X
SIRT1	↑↑
NAMPT	↑
Cytochrome C	↓
COX4	↓
NRF2	X
SOD2	X
SIRT3	↓↓
PINK1	X
NAD <sup>+</sup> /NADH	X
NADH	X
NAD <sup>+</sup>	↓
CBS	X
H <sub>2</sub> S	X

## 5.2. A humán okklúziós edzés hatására bekövetkező változások

### 5.2.1. Véráram paraméterek eredményei

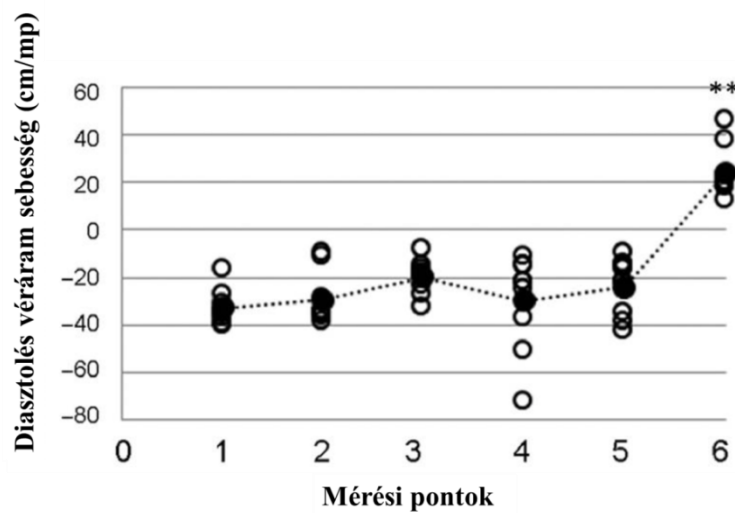
A szisztolés és diasztolés véráram sebességét Doppler ultrahangos képalkotóval vizsgáltuk. A szisztolés véráram sebessége szignifikánsan emelkedett a 4. és az 5. időpontban a 3. időpontban mért értékhez képest ( $p < 0,05$ ) és szignifikáns csökkentést mutatott a 6. időpontban az 5. időpontban mért értékhez képest ( $p < 0,05$ ) (15. ábra).



15. ábra: A szisztolés véráram sebessége.

Jelölt eredmények: átlag±SE, a csillag a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

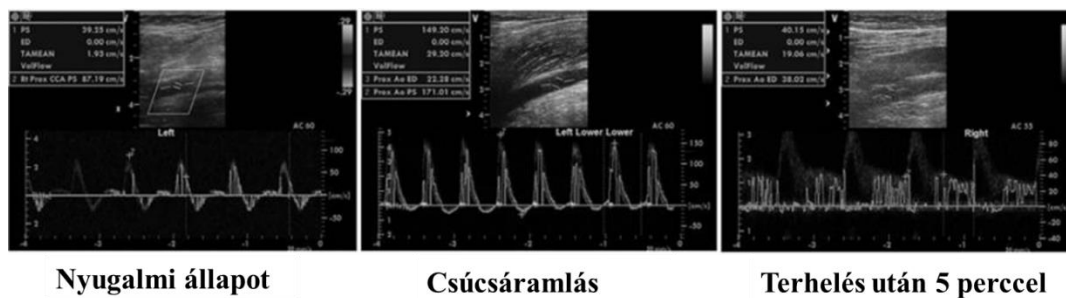
A diasztolés véráram szignifikáns emelkedést mutatott a 6. időpontban az 5. időpontban mért értékhez képest ( $p < 0,05$ ) (16. ábra).



16. ábra: A diasztolés véráram sebessége.

Jelölt eredmények: átlag±SE, a csillag a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest: \*\*:  $p < 0,01$ .

A reprezentatív Doppler képek eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy a 3 időpontban (nyugalomban, csúcsáramlás és a terhelés után 5 perccel) mért értékek növekvő véráramlási sebességet és csökkenő perifériás ellenállást mutattak (17. ábra).



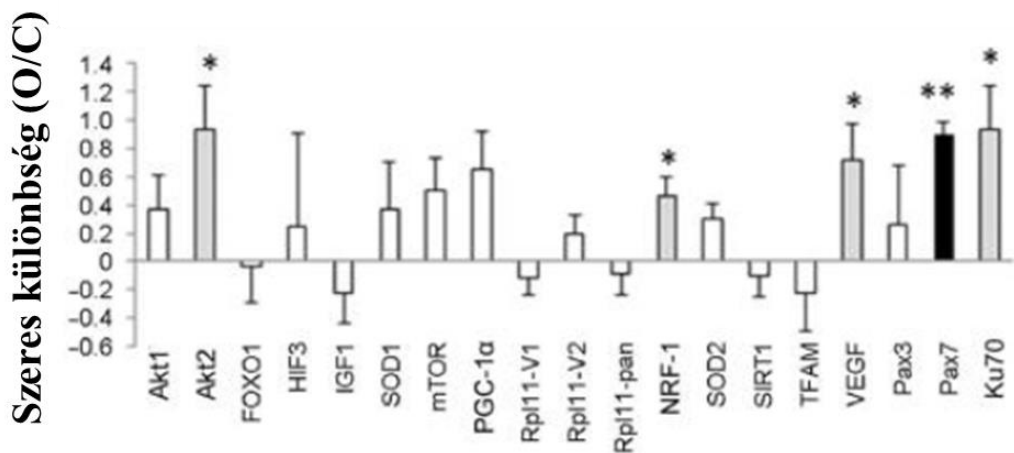
17. ábra: Véráramlási sebesség a különböző időpontokban.

Jelölések: számok a zárójelben jelölik a mintavételezés időpontját.

### 5.2.2. Okklúziós edzés hatására bekövetkező mRNS változások

Az edzés hatására bekövetkező biokémiai változásokat az mRNS-ek szintjének a változásával követtük nyomon. Kiemelten vizsgáltuk az anabolikus, katabolikus, redox, mitokondriális biogenezis és a kapillarizációért felelős gének mRNS szintjét (18. ábra). Szignifikáns emelkedést találtunk az Akt2 ( $p < 0,05$ ), NRF-1 ( $p < 0,05$ ), VEGF ( $p < 0,05$ ), Pax7 ( $p < 0,01$ ) és a Ku70 ( $p < 0,05$ ) szintjében.



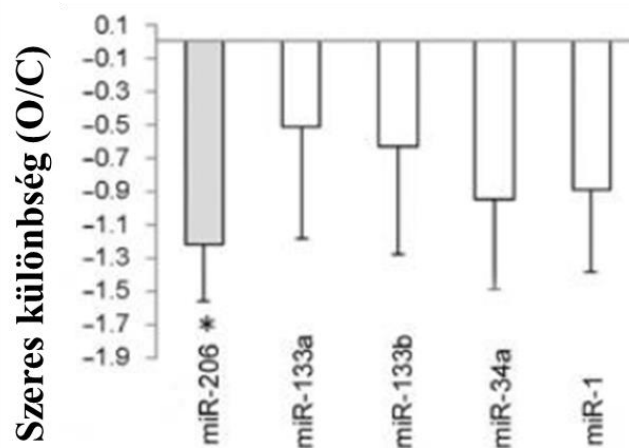


18. ábra: Terhelés hatására bekövetkező változások az mRNA szintekben

Jelölések: A változást a kontroll lábhoz képest jelöltük. Pozitív irányú változás emelkedést mutat az adott mRNA szintjében a vizsgálati lábnál a kontroll lábhoz képest, míg a negatív irányú elmozdulás a csökkenést jelöli. Átlag $\pm$ SE, a csillag a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest: \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ .

### 5.2.3. miRNS változások az okklúziós edzés hatására

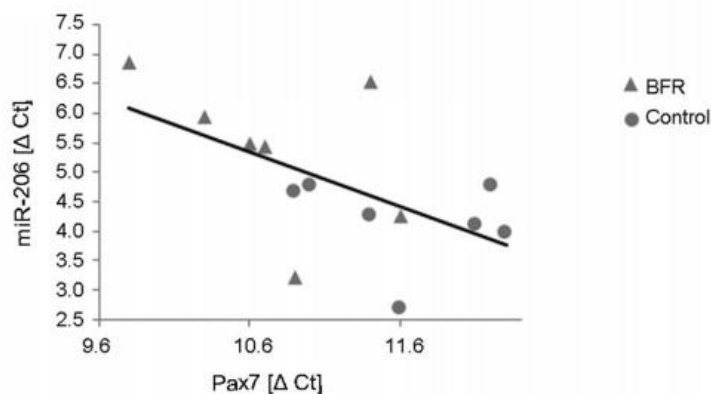
A következőkben, hogy komplexebb képet kapjunk az edzés hatására bekövetkező változásokról, megvizsgáltuk a miRNS-ek változásait (19. ábra). A terhelés után 2 órával szignifikáns csökkenést találtunk a miR-206 szintjében a vizsgálati lábban a kontroll lábhoz képest ( $p < 0,05$ ).



19. ábra: Terhelés hatására bekövetkező változások az miRNS szintekben

Jelölések: A változást a kontroll lábhoz képest jelöltük. Negatív irányú változás csökkenést mutat az adott miRNS szintjében a vizsgálati lábánál a kontroll lábhoz képest. Átlag±SE, a csillag a szignifikáns különbséget mutatja a kontroll csoportéhoz képest: \*:  $p < 0,05$ .

A Pax7 gén mRNS szintjének a változása és a miR-206 miRNS-nek a szintje korrelációt mutattak egymással ( $r^2 = 0,33$ ,  $r = 0,577$ ,  $p = 0,031$ ) (20. ábra).



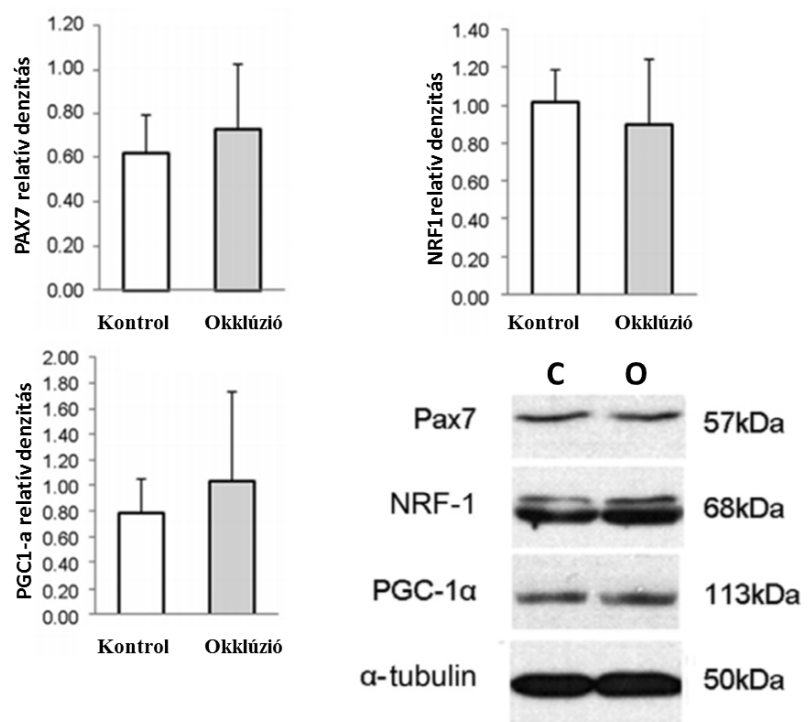
20. ábra: A Pax7 mRNS és a miR-206 miRNS kapcsolata.

Jelölések: ▲: okklúziós láb, kör: kontroll láb, delta Ct: normalizálva a megfelelő génre.

#### 5.2.4. Western blot eljárással vizsgált fehérjék változása az okklúziós edzés hatására

A biopszia mintavételezés során a kinyert izomszövet kis mennyiségéből adódóan kevés vizsgálatot tudtunk végezni. Ezért kutatásunk következő lépéseként kiválasztottunk 3 különböző élettani folyamatban résztvevő fehérjét a Pax7, NRF1 és a PGC1A fehérjéket, melyeket Western blot eljárással vizsgáltunk (21. ábra).

A Pax7 fehérjének a szintjében nem történt szignifikáns változás az okklúziós lábban a kontroll lábhoz viszonyítva. Az NRF1 fehérjének a szintjében nem volt szignifikáns különbség a két láb között az edzés hatására. Szintén nem találtunk szignifikáns különbséget az okklúziós lábban a kontroll lábhoz képest a PGC1A fehérje szintjében az edzés hatására.



21. ábra: A Pax7, NRF1 és a PGC1A fehérjék változásai és az immunoblot vizsgálatok reprezentatív eredményei a fent említett fehérjék esetében.

Jelölt eredmények: átlag±SE,  $p < 0,05$ .

5. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása mRNS-ek esetében.

Jelölések: ↑: növekedés a kontroll lábhoz viszonyítva, X: nem történt változás a kontroll lábhoz képest az okklúziós csoportban.  $p < 0,05$ : ↑;  $p < 0,01$ : ↑↑.

mRNS	Változás a kontroll lábhoz képest
AKT1	X
AKT2	↑
FOXO1	X
HIF-3	X
IGF1	X
SOD1	X
mTOR	X
PGC1A	X
Rpl11-V1	X
Rpl11-V2	X
Rpl11-pan	X
NRF-1	↑
SOD2	X
SIRT1	X
TFAM	X
VEGF	↑
Pax3	X
Pax7	↑↑
KU70	↑

6. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása miRNS-ek esetében.

Jelölések: ↓: csökkenés a kontroll lábhoz viszonyítva, X: nem történt változás a kontroll lábhoz képest az okklúziós csoportban.

miRNS	Változás a kontroll lábhoz képest
miR-206	↓
miR-133a	X
miR-133b	X
miR-34a	X
miR-1	X

7. táblázat: Az okklúziós edzés hatására a vastus lateralis izomban bekövetkező biokémiai változások összefoglalása fehérjék esetében.

Jelölések: X: nem történt változás a kontroll lábhoz képest az okklúziós csoportban.

Fehérje	Változás a kontroll lábhoz képest
Pax7	X
NRF1	X
PGC1A	X

## **6. Diszkusszió**

### **6.1. Kompenzációs hipertrófia modell során talált eredmények megbeszélése**

Az általunk alkalmazott modell, mint már említettem gyakran használt módszer a nagy mértékű és gyors hipertrófia elérésében. Jelen kutatásunk során a plantaris izom tömegében szignifikáns emelkedést találtunk a kezelés hatására, ami összhangban van laboratóriumunk korábbi eredményeivel (Koltai és mtsai., 2017a). A nagymértékű hipertrófia az állatok plantarflexor izmának a folyamatos mechanikai terhelésével függhet össze, melyek az állat mozgása és egyhelyben állása során is folyamatos feszülésben vannak. A hipertrófia mellett a plantaris tömeg/tt%-ban is szignifikáns különbséget találtunk, ami összefügg a testtömeg azonos szintjével a két csoportban. Ez azt mutatja, hogy a több mint 40%-os hipertrófia nem járt együtt a testtömeg megnövekedésével. Jelen eredményekből kiderült, hogy a kompenzáció megtörtént, mivel a plantaris izom tömege megnövekedett a másik két plantar flexor hiányát ellensúlyozandó.

A vázizom keresztmetszeti növekedéséhez kettő dologra van szükség. Az anabolikus útvonalak aktivációjára, ami a hipertrófia egyik fő indukációja. A másik pedig a katabolikus útvonalak gátlása. Nem feltétlenül szükséges mindkét élettani változás megléte, de a kettő együtt erősebb hatást válthat ki. Egyik legfontosabb anabolikus útvonal az AKT-mTOR molekuláris jelző útvonal. Ezen útvonal fontos lépcsőit vizsgáltuk, melyek mindegyikében szignifikáns emelkedést találtunk a kompenzációs csoportban a kontroll csoporthoz képest.

A fent említett útvonal egyik kezdő lépése az Akt fehérje aktivációja, melynek fontos feladata a többlépéses mTOR fehérje foszforilációja (Dan és mtsai., 2014). Az emelkedett Akt szint után megvizsgáltuk a fent említett útvonal következő markerét, az mTOR fehérjét és annak foszforilált változatát, ahol szintén emelkedett szintet detektáltunk. Ez az eredmény összhangban van korábbi vizsgálatokkal (Chalé-Rush és mtsai., 2009).

Az mTOR fehérjét aktiváló 3 útvonal közül az egyik a mechanikai terhelés (Da és mtsai., 2020). Jelen módszer pedig a folyamatos mechanikai terhelés segítségével képes lehet az

aktiváció kiváltására, mivel, a plantaris izom folyamatos kontrakcióban van az állat járása és állása során.

A következőkben az mTOR által foszforilálódó S6 fehérjével foglalkoztunk. Az S6 fehérje a riboszómális fehérjeszintézis, és ezáltal a hipertrófia egy fontos szabályozója. Hasonlóa az mTOR/p-mTOR arányhoz, nem találtunk szignifikáns emelkedést az S6/p-S6 fehérjék arányában. Az S6 fehérje, mint már korábban említettük a riboszómák mennyiségére enged következtetni. Az emelkedett foszforilációs állapottal pedig az S6 fehérje által aktivált emelkedett mRNS translációra (Kimball és mtsai., 2002), és ezáltal hipertrófiára tudunk következtetni. Eredményünk összhangban van korábbi kutatás eredményével, ahol szintén növekedést találtak a vizsgált fehérjében, ennek a módszernek az alkalmazása során (Kawano és mtsai., 2007).

A SIRT1 fehérje élettani hatása sokrétű. Az elmúlt évek kutatásai alapján kimutatták, hogy a hipertrófiában betöltött szerepe nem elhanyagolható. Több kutatás is kitért ezen szerepkörökre, melyek egy része az anabolikus útvonalak aktivációjára (Hong és mtsai., 2014), más részük pedig a katabolikus folyamatok gátlására mutat rá (D. Lee & Goldberg, 2013). Jelen kutatásunk során a SIRT1 fehérje szintje megemelkedett, mely szintén összefüggésben van laboratóriumunk korábbi kutatásával (Koltai és mtsai 2017). Emellett pedig a NAMPT fehérje, mint a NAD<sup>+</sup> bioszintézis előanyaga szintén megemelkedett, ami összhangban van korábbi kutatásaink eredményével (Koltai és mtsai 2017). Mivel a NAD<sup>+</sup> aktiváció alacsonyabb szinten volt a kompenzációs csoportban, mint a kontroll csoportban, abból azt feltételezhetjük, hogy a NAD<sup>+</sup> hiányát a fokozott SIRT1 aktivációhoz köthetjük, ami NAD<sup>+</sup>-hoz kötött és, amit az emelkedett NAMPT szint beigazolni látszik.

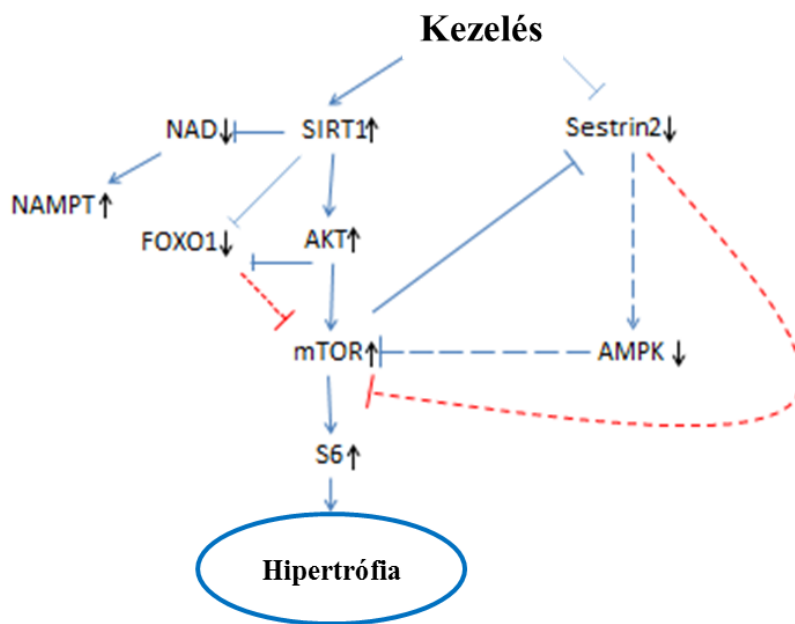
Mindamellet, hogy a kalória visszafogás mTOR gátlást okoz (Weichhart, 2018), a kompenzációs hipertrófia aktiválja azt. Ennek ellenére mind a kettő eljárás SIRT1 aktivációt eredményez. Az izomhipertrófia megemelkedésében szerepet játszó anabolikus folyamatok emelkedése mellett másik fontos tényező, a katabolikus folyamatok gátlása. Kutatásunk során csökkent FOXO1 szintet találtunk a kompenzációs csoportban, mely összefüggésben van korábbi kutatásokkal, ahol a FOXO1 mRNS szintjében találtak csökkenést kompenzációs hipertrófia modellt során (Choi és mtsai., 2009). A FOXO1 transzkripció faktor a DNS megfelelő promóter régiójához kötődve

fejti ki hatásait. Abban az esetben, ha ez a fehérje kikerül a citoszólba, elveszti katabolikus hatásait. Az Akt és a SIRT1 fehérje gátlás alá tudja vonni a FOXO1 transzkripciós faktort, ezáltal a katabolikus aktivációját csökkenteni. Kutatásunkban a FOXO1 szint csökkenése összefüggést mutatott az emelkedett mTOR és SIRT1 szinttel.

Az AMPK fehérje, melynek mTOR fehérjét gátló hatása van, szintén csökkenést mutatott a vizsgálati csoportban a kontroll csoporthoz képest. Mivel az AMPK fehérje nem emelkedett meg az állatok plantaris izmában ezért az mTOR-t sem tudta gátolni, így az anti-anabolikus hatása nem érvényesülhetett. A Sestrin2 fehérje, ami aktiváló hatással van az AMPK fehérjére (H. Li és mtsai., 2017) szintén csökkenést mutatott a vizsgálati csoportban. Kutatásunkban feltételezzük, hogy az mTOR fehérjének direkt gátló hatása van a Sestrin2 fehérjére. A Sestrin2 szerepet játszik a COX4, SIRT3 és a Citochrome C aktivációban.

Összegezve az általunk talált eredményeket: a folyamatos mechanikai terhelés hatására megnövekedett SIRT1, Akt, mTOR és S6 szinteket találtunk, amelyek a Sestrin2 és az AMPK csökkent fehérjeszintjéhez kapcsolódnak. az AKT-mTOR útvonal aktiválódott, ami fehérjeszintézishez vezetett. Emellett az emelkedett mTOR és SIRT1 szint hatására a FOXO1 gátlás alá került, ami együttesen történt az AMPK aktivátor Sestrin2 gátlásával. Mivel ezek az útvonalak gátlás alá kerültek ezért az AMPK sem tudott mTOR gátlást eredményezni. Az AMPK foszforilációs aránya nem változott szignifikánsan, de a csökkent fehérjeszintek arra utalnak, hogy az adaptáció vagy csökkentette a szintézist, vagy növelte az AMPK lebomlását a hipertrófia modellben. Jelen eredményekből azt mondhatjuk, hogy a hipertófiáért felelős két folyamat: az anabolikus útvonalak aktivációja és a katabolikus útvonalak gátlása megtörtént, melyet a 22. ábrán mutatunk be.





22. ábra: A kompenzációs hipertrófia modell hatása az anabolikus és katabolikus folyamatokra

*Jelölések: vonal, ami megtörtént, szaggatott vonal, az irodalom alapján bekövetkezhető, de meg nem történt mechanizmusok. Nyíl: aktiváció, tompa végű vonal: gátlás. Kék jelölés anabolikus, míg a piros jelölés a katabolikus útvonalak.*

A két különböző élettani folyamatot azért tárgyaljuk egybe, mert néhány változónak a szerepe mind a két folyamatban jelentős. Az NRF2, SOD2, SIRT3 mindkét folyamatban szerepet játszik. A vizsgálatunk során a redox állapotokat az Ac p53 és az OGG1 fehérjékben bekövetkezett változásokkal teszteltük. Emellett a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  arányból, a SIRT3 és a Sestrin2 fehérjékből is következtethetünk a redox potenciálra, de azt majd a későbbiekben említjük.

A korábban említett AMPK mTOR fehérjét gátló, ezáltal anabolizmust blokkoló hatása nem érvényesült, emellett fontos itt is kiemelni ezt a fehérjét, mert a fent említett hatáson kívül mitokondriális biogenezist is indukál. Kutatásunk során a COX4, SIRT3,

Cytochrome C fehérjék szintjében csökkenést találtunk a kezelés hatására a vizsgálati csoportban a kontroll csoporthoz képest. Mindhárom fehérje a mitokondriális mennyiségre enged következtetni. A Sestrin2-ben szintén csökkenést találtunk és itt fontos megjegyeznünk, hogy a Sestrin3 aktiválni képes az NRF2-t, és a COX4-et, mint mitokondriális markereket (Gong és mtsai., 2021), (Liu és mtsai., 2021) és szerepet játszik az oxidatív foszforilációban, melynek fontos enzime a Cytochrome C (Guerra-Castellano és mtsai., 2018; Ren és mtsai., 2021). Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a mitokondriumok száma nem növekedett a kezelés hatására.

Ugyanakkor ezen változás nem jelenti egyértelműen azt, hogy a mitokondriumok számbeli csökkenéséről kell beszélnünk, mivel a PINK1 mitofágiális marker szintjében nem történt szignifikáns változás a csoportok között. A Sestrin2 fehérje az AMPK aktiváció mellett mitokondriális biogenezisben is szerepet játszik, mint a COX4 aktivációja (Liu és mtsai., 2021). Jelen kutatásunkban mind a fent említett 3 mitokondriális biogenezis fehérje szintje mind az ezeket aktiváló Sestrin2 mind az AMPK szintje csökkenést mutatott a vizsgálati csoportban, mely az mTOR fehérje gátló hatásán keresztül érvényesülhet.

Az ac-p53 fehérje egy tumorszupresszor, ami a sejtek proliferációját is gátolja, mikor is a sejt növekedését az mTOR pozitívan befolyásolja (Fingar és mtsai., 2004). Az ac-p53 fehérje egy target molekulája a Sestrin2. A Sestrin2 mellett még az OGG1 szintje is csökkent, ami szintén antioxidáns hatású. Emellett a Sestrin2 pozitív regulátora az NRF2-nek, valószínűleg a Sestrin2 antioxidáns hatása miatt (Bae és mtsai., 2013). Sejttenyészetben megfigyelték, hogy a Sestrin2 csendesítése csökkentette az AMPK és a SOD2 szintet (Hwang és mtsai 2018), ami a mi kutatásunk során részben beteljesült. A SIRT3 deacetilálja a SOD2 fehérjét, ami ROS csökkenést eredményez a mitokondriumban (Koltai és mtsai 2018). Ennek ellenére a jelen kutatásban azt találtuk, hogy a SIRT3 fehérje csökkent, de a SOD2 fehérje szintjében nem volt különbség.

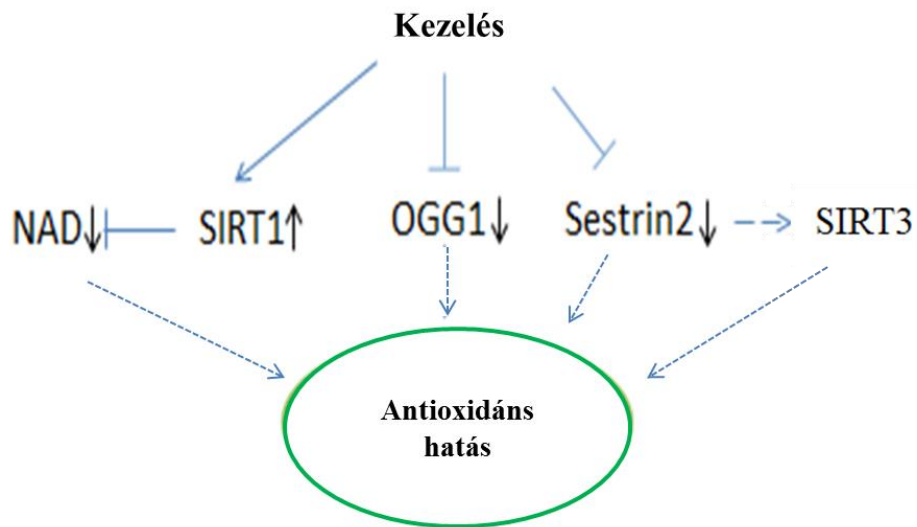
A NAD<sup>+</sup> aktivitás a vizsgálati csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Ez a csökkent NAD<sup>+</sup> aktivitás és a csökkent OGG1 szint, a csökkent SIRT3 szinttel együtt egy redukálódott miliót feltételez. A SIRT1 fehérje megemelkedése, ami működése NAD<sup>+</sup> dependens, azt feltételeztük, hogy a csökkenő NAD<sup>+</sup> aktivitás a magas mértékű SIRT1 aktivitás hatására következett be. Ezt a feltételezést a megemelkedett NAMPT szinttel tudjuk alátámasztani, mivel az izom emelkedett NAD<sup>+</sup> igényét a

bioszintéziséhez szükséges NAMPT fehérje emelkedésével próbálja kielégíteni. Elképzelésünk szerint az 23. ábrán történő redox folyamatok következnek be az izomkeresztmetszet növekedés alatt.

Összefoglalva, Az mTOR hosszan tartó aktiválása ROS-t generálhat és sestrineket aktiválhat (J. H. Lee és mtsai., 2010). Kutatásunkban azonban ez nem így történt, mivel a Sestrin2 és OGG1 szintje csökkent a túlterhelés által kiváltott hipertrófiában a kontroll izomhoz képest.

Vizsgálatunkban a Sestrin2 szint az Nrf2-vel párhuzamosan csökkent, bár az Nrf2 csökkenése csak tendencia volt. Korábban arról is beszámoltak, hogy sejtenyészetben a Sestrin2 gátlása csökkentette az AMPK és SOD2 szintet (Hwang és mtsai 2018), saját kutatásunkban hasonló hatást figyeltünk meg a túlterhelés által kiváltott hipertrófia során. Ezen kívül csökkenést találtunk a SIRT3 fehérjében, ami a SOD2 dezacetilációjára szolgáló enzim és elősegíti annak antioxidáns aktivitását, és csökkenti a ROS szintjét a mitokondriumokban (Koltai és mtsai 2018). Mivel a túlterhelt izom NAD szintje alacsonyabb volt, mint a kontrolloké, feltételezhető, hogy a hipertrófiás izomban a mintavétel időpontjában redukálódott állapotban volt.

Ezen kívül kimutatták, hogy a sestrinek kritikus szerepet töltenek be a testmozgás által kiváltott alkalmazkodásban, mivel az állóképesség, az inzulinérzékenység és a mitokondriális biogenezis növeléséhez szükségesek a PGC1 alfa révén (Kim és mtsai., 2020). Érdekes módon a túlterhelés által kiváltott hipertrófiánkban a csökkent Sestrin2 szint a mitokondriális markerek, például a Cytochrome C, COX4, NRF2, SIRT3 csökkent szintjével társult. Egy friss tanulmány arról számol be, hogy a 14 napos túlterhelés megnövelte a mitokondriális fúziót szabályozó fehérjék szintjét és csökkentette a hasadást szabályozó fehérjék mennyiségét, és ez magyarázhatja a mitokondriális fehérjék relatív csökkenését (Uemichi és mtsai., 2021).

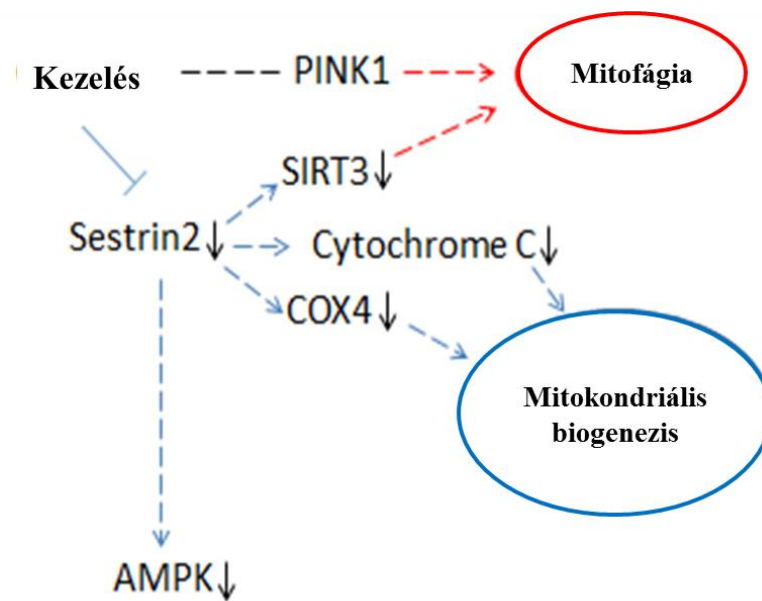


23. ábra: A csökkent redox állapot kialakulásának mechanizmusa

*Jelölések: nyíl: aktivációs mechanizmusok; szaggatott nyíl: irodalom alapján megtörténő, de jelen esetben nem bekövetkező aktiváció; tompa végű vonal: gátlás.*

A korábban említett PINK1 fehérje, mitokondriális fissionát és ubiquitinációt eredményez a mitofágián keresztül (Seabright & Lai, 2020). Amikor a mitokondriális membránpotenciál megszűnik, vagy nagymértékű reaktív oxigén gyök (ROS) keletkezik a PINK1 aktiválódik és mitokondriális degradációt eredményez a Parkin foszforilációján keresztül. Azonban a mi kutatásunkban a PINK1 szintje nem mutatott különbséget a csoportok között, ami arra utalhat, hogy a túlterhelés okozta hipertrófia nem okoz mitokondriális diszfunkciót. A SIRT3 fehérje szintén szerepet játszik a mitofágiában, ugyanis a humán glióma sejtekben a SIRT3 csendesítés hatására csökkent a mitokondrium degradációja (Qiao és mtsai., 2018). Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a mitokondriális fehérjék csökkent szintje nem a mitofágia miatt következett be, hanem inkább a kezelés hatására bekövetkező mitokondriális biogenezis gátlása miatt. Mivel a mitokondriális biogenezis elsősorban állóképességi edzés hatására fokozódik (MacInnis & Gibala, 2017), ezt a fajta terhelést pedig inkább az ellenállással végzett edzéshez lehet hasonlítani, érthető a mitokondriumok számbeli növekedésének a hiánya.

Emellett pedig a plantaris izom jellemzően gyors glikolitikus izom, energetikájából adódóan oxigén independens. Ebből feltételezhetjük, hogy ez a növekedés ezért nem történt meg, és nem pedig csökkenésről beszélünk, amit a fent említett PINK1 mitofágiális marker növekedésének a hiányából következtetünk, emellett pedig a csökkent SIRT3 szintből. Úgy gondoljuk, hogy az 24. ábrán feltételezett interakciók következtek be a keresztmetszetenövekedésen átesett plantáris izomban.



24. ábra: A mitokondriális dinamika ábrája

*Jelölések: vonal, ami megtörtént, szaggatott vonal, az irodalom alapján bekövetkező, de meg nem történt mechanizmusok. Nyíl: aktiváció, tompa végű vonal: gátlás. Kék jelölés anabolikus, míg a piros jelölés a katabolikus útvonalak.*

A kalória visszafogás SIRT1 aktivációt eredményez, ami a H<sub>2</sub>S molekula emelkedett szintézisével járt együtt (Hine és mtsai., 2015). A jelenlegi vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns különbséget a CBS szintben, ami egy kulcsfontosságú enzim a H<sub>2</sub>S szintézisében (Szabo & Papapetropoulos, 2017). Egy korábbi kutatás szerint a külsőleg adagolt nátrium H<sub>2</sub>S (Na H<sub>2</sub>S) megnövelte a gyors rostok keresztmetszetét az mTOR útvonalon keresztül (R. Wang és mtsai., 2019). A H<sub>2</sub>S a SIRT1 szulfhidrációját okozhatja,

ami megnövekedett deacetylációs aktivitást eredményez (Du és mtsai., 2019). Ennek ellenére a mi kutatásunkban nem találtunk emelkedett H<sub>2</sub>S szintet vagy CBS aktivitást, ami arra enged következtetni bennünket, hogy a SIRT1 aktiváció más-más jelzőútvonalon keresztül működik, kalória visszafogás és hipertrófia során.

Összességében kijelenthetjük, hogy az általunk alkalmazott modell megfelelően lefedte az Akt/mTOR útvonal általunk alkalmazott markereinek az elvárt változásait, ezzel összefüggésben pedig gátolta a katabolikus útvonalak által kifejtett hatásokat. Eredményeinkből pedig egyértelműen következtethető egy redukálódott környezet.

A kompenzációs modell képes volt aktiválni az mTOR és S6 fehérjét a SIRT1 fehérje által. A fent említett irodalmi adatok és saját kutatási eredmények értelmében valamivel mélyebb képet kaptunk a SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött szerepéről (Gombos és mtsai 2021).

## **6.2. A humán okklúziós edzés hatására bekövetkező változások megbeszélése**

Vizsgálatunk során a vér áramlási paramétereit, annak érdekében mértük, hogy meggyőződjünk arról, hogy a vénás keringés a nagy erekben teljesen gátlás alá került. Feltüntetett eredményeink alapján kimutattuk, hogy a teljes okklúziós állapotot sikerült elérnünk, mellyel a vénás visszaáramlást időlegesen megszüntettük.

A vizsgálatunk során kitértünk az anabolikus, katabolikus, redox, mitokondriális biogenezis és a kapillarizációban szerepet játszó útvonalakra egyaránt, melyeknek megbeszélését ezen felosztás szerint végezzük. Az egyszerűség kedvéért a génexpressziós változásokat, annak biológiai sorrendisége alapján tárgyaljuk. Mivel kutatásunk során a minták ugyanazon személyek kezelt és nem kezelt lábaiból származtak az edzésprogram után, a következtetéseinket nem feltétlenül az okklúziós behatásnak, hanem magának az edzésprogramnak is köszönhetjük. Hangsúlyozni szükséges, hogy a biopsziás mintavételezés 2 órával az edzés után történt, ami bizonyos gének aktivációjához elegendő volt bizonyos géneknél pedig nem, feltételezéseink szerint.

Kutatásunkban mindösszesen 5 mRNS-ben találtunk szignifikáns különbséget a kezelés hatására a 19 vizsgált mRNS-ből. Korábbi kutatási eredmények alapján, ahol szintén akut okklúziós terhelést alkalmaztak, szintén nem találtak szignifikáns különbséget a p-Akt és a p-mTOR fehérjék szintjében az okklúzió nélküli csoporthoz képest (Fujita és mtsai., 2007), amik a fehérje szintézis egyik legfőbb útvonalának markerei. Emellett pedig a szérumban IGF-1 szintben sem találtak szignifikáns különbséget. Ezek az eredmények megegyeznek az általunk talált eredményekkel. Fontos megemlíteni, hogy saját vizsgálatunkból arra következtetünk, hogy feltételezhetően a 2 órás időtartam nem volt elegendő ezen transzkripciós változások megjelenéséhez. A Pax7 szatellita sejt proliferációs marker emelkedett szintjéből a megnövekedett fehérjeszintézisre lehetett volna következtetni, de vizsgálatunkban semelyik fehérje szintje sem emelkedett meg. A fent említett kutatásban terhelés után 3 órával történt a biopszia mintavételezése. Mindezek ellenére a szerzők a pS6K1-ben emelkedést találtak (Fujita és mtsai., 2007). Emellett pedig az alkalmazott protokollban is különbségek voltak.

Krónikus okklúziós edzés hatására emelkedést találtak a Pax7 szintben, mely a szatellita sejt számbeli mutatója (Nielsen és mtsai., 2012). Ezen eredmények összhangban vannak az általunk talált emelkedett Pax7 mRNS szinttel. Kompenzációs hipertrófia modellnél Pax3 és Pax7 mRNS szint emelkedést találtak a plantaris izomban 1 hetes kezelés hatására (Hyatt és mtsai., 2008).

KU70 az egyik kulcs molekula a kettős kötés sérülés javításában. A vizsgálatunkban talált KU70 mRNS szintemelkedés feltételezésünk szerint az okklúziós kezelés okozta DNS sérülés hatására következik be, mint védelmi mechanizmus. Rpl11-Pan, Rpl11-V1, Rpl11-V2, amik szerepet játszanak a 60S riboszomális alegység kialakításában, nem mutattak szignifikáns különbséget az mRNS szintben.

A FOXO1 katabolikus transzkripciós faktor mRNS szintjében szintén nem találtunk különbséget a csoportok között, ami összhangban van az Akt/mTOR mRNS szintnél talált stagnálással. Az Akt a foszforiláció által transzlokálni képes a FOXO1 fehérjét a nukleuszba, majd utána citoszólba vagy degradálja azt (Sanchez és mtsai., 2014).

A kapillarizációban szerepet játszó VEGF mRNS szintben szignifikáns emelkedést mutattunk ki a kezelés hatására, mely nem járt együtt a HIF-3 mRNS szintbeli

emelkedésével. VEGF mRNS szint emelkedést találtak korábbi akut okklúziós kezelés hatására (Ferguson és mtsai., 2018), ami egyezést mutat az általunk találtakkal.

A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó PGC1A és TFAM gének mRNS szintjének vizsgálata során egyik mRNS szintjében sem találtunk különbséget a kezelés hatására. A korábban említett kutatás (Ferguson és mtsai., 2018), emelkedett PGC1A mRNS szintet eredményezett az akut okklúziós kezelés hatására, ami a mi vizsgálatunkban nem valósult meg. Az antioxidáns funkcióval rendelkező SOD1 és SOD2 mRNS szintjében nem találtunk, míg az NRF1 mRNS szintjében találtunk szignifikáns különbséget.

Kutatásunk során egyedül a miR-206-ban találtunk szignifikáns csökkenést az okklúziós edzés hatására. Szemben a mi kutatási eredményünkkel D'Souza és mtsai (2017) miR-206 szignifikáns emelkedést mutatott magas intenzitású ellenállással végzett edzés után (D'Souza és mtsai., 2017), ugyanakkor Winbanks és mtsai (2013) vizsgálatában a miR-206 represszió emelkedett fehérje szintézist eredményezett sejt kultúrában, de a vázizomban nem (Winbanks és mtsai., 2013). A transzformáló növekedési faktor-béta gátolni tudja a miogénikus differenciációt azáltal, hogy a miR-206 szintjét csökkenti (Winbanks és mtsai., 2011). A miR-206 szintjében emelkedést találtak szatellita sejt differenciáció során, emellett pedig csökkenő szintet az izomsérülés után (Chen és mtsai., 2010). Abban az esetben, amikor csendesítésnek vetették alá a miR-206-ot szatellita sejt proliferációt és emelkedett Pax7 szintet találtak (Chen és mtsai., 2010).

A miR-34a csendesíteni képes a SIRT1 fehérjét kódoló mRNS-t, ami az acetilált p53 fehérje expressziójának az emelkedéséhez vezetett (Yamakuchi & Lowenstein, 2009). A SIRT1 fehérje, mRNS és aktivitási szint növekedése csökkent acetilált p53 szintet mutatott kompenzációs hipertrófia modellben (Koltai és mtsai 2017) laboratóriumunk korábbi kutatási eredményei alapján. Szintén ebben a kísérletben vizsgáltuk a fent említett 4 miRNS-t, ahol mind a miR-1, miR-133a-ban szignifikáns csökkenést találtunk, emellett pedig emelkedést a miR-34a-ban a hipertrófiás csoportban a kontroll csoporthoz képest. Mindemellett nem találtunk különbséget a miR-206-ban a csoportok között.

Kutatásunk következő lépéseként az okklúziós kezelés hatására bekövetkező hipertrófia, antioxidáns hatás és a mitokondriális biogenezis egy-egy kulcs fehérjéinek a változásának



a vizsgálatával folytattuk. Feltételeztük, hogy a terhelés utáni 2 óra elegendő lesz a génextpressziós változások detektálásához fehérje szinten.

Kutatásunk során nem találtunk szintbeli különbséget a Pax7 fehérjében a kezelés hatására, mely eredmények nincsenek összhangban a korábban említett kompenzációs hipertrófia modellnél Pax3 és Pax7 szint emelkedésével a plantaris izomban 1 hetes kezelés hatására (Hyatt és mtsai., 2008). A Pax7 mRNS szintbeli növekedése miatt feltételeztük, hogy a fehérje szintben is találunk különbséget a csoportok között, de ez nem valósult meg. Feltételezhetően ez is a terhelés és a mintavételezés közötti rövid időre vezethető vissza.

Szintén nem találtunk különbséget a PGC1A szintjében, ami egy korábban említett akut kezeléshez hasonlóan nem változott a kontroll csoporthoz képest (Ferguson és mtsai., 2018). A PGC1A fehérje szintbeli stagnálása a két láb között hasonló volt az mRNS szintbeli stagnáláshoz. Végül az NRF1 szintben sem találtunk különbséget a két láb között, annak ellenére, hogy az mRNS szintben különbséget találtunk a két láb között.

Összességében azt a megállapítást tehetjük, hogy a korai szatelita sejt aktiváció és DNS sérülést javító mechanizmusok transzláció szinten elkezdődtek, mely a későbbi transzláció szintjén még nem jelent meg. Emellett a fehérjeszintézis egyik legfőbb útvonalán sem találtunk változást sem transzkripciós sem pedig transzlációs szinten.

Ugyanez mondható el a mitokondriális biogenesis markerekről is. Mindemellett egy-egy antioxidáns és kapillarizációért felelős gén transzkripcióját detektáltuk, mely antioxidáns fehérje szintű megjelenését pedig nem tapasztaltuk. Mindezekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a fent említett edzésélettani folyamatokban igen fontos szerepet játszó gének aktivációja megtörtént az expresszió egy korai szintjén.

Összefoglalásként, az Akt2, NRF1, VEGF és Pax7 mRNS szintek megemelkedtek, ami a sejtszintű adaptáció széles skálájára utalhat. A mért fehérjékben nem találtunk szignifikáns különbséget. Feltételezésünk szerint ez részben a mintavétel idejére vezethető vissza, ami 2 órával a terhelés után volt. A Ku70 és mRNS szintjének emelkedése azt jelentheti, hogy az alkalmazott terhelés DNS károsodást indukált és ennek eredményeként a sejtek a Ku70 gyors indukciójával reagáltak. Ennek a vizsgálatnak az egyik új eredménye a magas intenzitású edzés pihenő idejében a Pax7 emelkedésével

kapcsolatos. Ebből az következhet, hogy az edzés pihenőidejében végzett okklúziós kezelés szatellita sejt proliferációhoz okozhat, ami izomhipertrófiához és a regeneráció fokozásához vezethet. Összességében azt mondhatjuk, hogy a nagy intenzitású edzés pihenő idejében végzett okklúziós kezelés fokozza az angiogenezis, mitokondriális biogenezis, az izom regeneráció és hipertrófia génexpresszióját.

Továbbá ezen újfajta módszer alkalmazásának mélyebb megértéséhez fontosnak tartottuk a módszer hosszú távú vizsgálatát.

## **7. Következtetések**

A vázizom hipertrófia fontossága nem megkérdőjelezhető, hiszen, ha megvizsgáljuk gazdag irodalmát, hamar rájöhethetünk, hogy nem csak a sporttudomány, hanem az élettudományok egyéb területein is rendkívül fontos kutatási terület. Kutatásunk célja volt az alternatív hipertrófia módszerek élettanának mélyebb megértése. Vizsgálataink 2 irányvonalát, melyet egymás kiegészítéseként egy egészként értelmezhetünk, közelebb juttatott minket a hipertrófia széles ismeretkörének bővítéséhez. Ennek ellenére mégis külön tárgyaljuk a két módszer hatására bekövetkező változások következményeit.

Az állat modell, amit alkalmaztunk nagymértékű hipertrófiát eredményezett a kezelt csoportban. Ennek a magyarázatát megtaláljuk mind az anabolikus útvonalban szerepet játszó fehérjék szintjének emelkedéséből, mind a katabolikus útvonal fehérjéinek mennyiségi csökkenéséből. Az Akt fehérje, ami az AKT-mTOR molekuláris jelzőrendszer alapköve nagymértékű emelkedése nemcsak a fent említett útvonal további aktivációját, de a katabolikus útvonalak gátlását is eredményezte a Sestrin2 FOXO1 fehérjét aktiváló csökkentésén keresztül. Az Akt mTOR fehérjét foszforilálva nemcsak az mTOR fehérjeszintézisben játszott szerepét fokozta, hanem közvetlen gátlását tudta kifejteni az AMPK-ra és a FOXO1 anti-anabolikus és katabolikus fehérjékre. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy a nagymértékű és folytonos mechanikai terhelés hatására a fent említett folyamatok aktiválásának és gátlásának a hatására a fehérje szintézis vagyis a hipertrófia emelkedett, amit a megnövekedett plantaris izom súlya és az S6 riboszómális fehérje totál és foszforilált változata is alátámasztott.

Az utóbbi időben egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek a kutatások a SIRT1 fehérje amúgy is szerteágazó fiziológiai hatásain kívül a hipertrófiában játszott szerepére. Kutatásunkban az emelkedett SIRT1 fehérje mennyiség a megnövekedett fehérjeszintézissel és annak markereinek emelkedésével járt együtt, amit a FOXO1 katabolikus fehérje csökkent szintjére való közvetlen hatása is jól mutat. Ennek megfelelően, miszerint: 1.1. A kompenzációs hipertrófia modell alkalmazásának hatására a fehérjeszintézis markerei emelkednek és a katabolikus útvonal markerei csökkennek a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest.

ELFOGADJUK

A SIRT1 fehérje mellett a NAMPT, ami a NAD<sup>+</sup> bioszintézisének előanyaga szintén emelkedést mutatott, ami alátámasztja a folyamatos NAD<sup>+</sup> igényt, ezáltal a SIRT1 aktivációt a kezelés hatására. A H<sub>2</sub>S gáztranszmitter melynek SIRT1 aktivációs hatása van külsőleg adagolva és a kezelés hatására nem emelkedett meg a vizsgálati csoportban. Ebből következtetünk a SIRT1 fehérje kezelés függő aktivációjára.

A mitokondriális fehérjék, mint a COX4 és a Cytochrome C csökkenése elsősre a mitokondriumok számbeli csökkenésére engedne következtetni, de a PINK1 és a SIRT3 mitofágiális fehérjében detektált statisztikai különbség hiánya arra enged minket következtetni, hogy az izomban nem csökkent a mitokondriumok mennyisége. Egyszerűen csak nem növekedett meg a meglévő mitokondriumok mennyisége, ami a nagymértékű hipertrófiával és az izom amúgy is gyors glikolitikus típusával függhet össze. Ezek alapján a hipotézisünket, miszerint: 1.2. a mitokondriális biogenezis markerei emelkednek és a mitofágia markerek csökkennek a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest a kezelés hatására. NEM FOGADJUK EL, mivel a mitokondriális markerek csökkent, míg a mitofágiás marker stagnáló állapotot mutatott.

Köztudottan az oxidatív sérülések elleni védekezésül szolgáló antioxidánsok szintje magasabb a lassú rostokban, mint a gyorsban. Ez feltételezhetően az emelkedett mitokondrium számnak és az abból keletkező magasabb szabadgyök mennyiségnek köszönhető. A plantaris izomban, ami gyors rost típusú izom alacsonyabb NAD<sup>+</sup> aktivitást, OGG1 és Sestrin2 szintet találtunk a kezelés hatására. Mindhárom molekula a sejt redox potenciáljára enged következtetni, amiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az izomban a modell hatására egy redukálódott környezeti állapot állt fent. Ebből kifolyólag 1.3. hipotézisünket: a kezelés hatására az antioxidáns markerek szintje megemelkedik a kompenzációs csoportban a kontroll csoportéhoz képest, NEM FOGADJUK EL, mivel a Sestrin2, SIRT3, OGG1, NAD<sup>+</sup> csökkenést mutatott.

Az okklúziós terhelést a 20. század 2. felében már gyakori edzésmódszerként tartották számon a világ különböző pontjain. Jelen vizsgálatunkban a klasszikus ellenállással végzett edzést kombináltuk az okklúziós kezeléssel. Vizsgálati eredményeinkből kiderült,

hogy bizonyos gének mRNS átíródása fokozódott a kezelt lábban az akut terhelés hatására. A fehérjeszintézis és ezáltal a hipertrófia folyamataiban szerepet játszó gének, mint az AKT2, Pax3, Pax7 és KU70 gének átíródása már két órával a terhelést követően megemelkedtek. Ezekből az eredményekből következtethetünk, hogy a fehérjeszintézis szatellita sejttől függő és attól független útvonala is aktiválódott.

Az elszorítás hatására bekövetkező NO szint emelkedés szatellita sejt aktivációt eredményezhet, amit jelen vizsgálatunkban is bemutattunk. Ennek ellenére a Pax7 fehérjének a szintje nem emelkedett meg a kezelés hatására, amit a terhelés és biopszia közötti időtartam rövidségéből feltételezhetünk. Hipotézis vizsgálat alapján: 2.1. Okklúziós terheléssel kombinált akut rezisztencia edzés után az izom anabolikus markereinek a szintje megemelkedik a katabolikus markerek pedig csökkennek az okklúziós lábban a kontroll lábhoz képest. Részben ELFOGADJUK, mivel az AKT2, Pax7, Pax3, KU70 anabolikus markereknek a szintje megemelkedett, de ez nem mondható el a többi vizsgált anabolikus markerről. A FOXO1 génnek az expressziója nem mutatott csökkenést a kezelés hatására.

A VEGF gén expressziója szintén emelkedést mutatott a kezelés hatására, amivel a nagymértékű elszorításból oxigénhiányt szeretné a szervezet a hajszálérhálózat megnövelésével kompenzálni. Az emelkedett VEGF és NRF1 szint mellett nem találtunk emelkedést a mitokondriális biogenezis master regulátoraként számontartott PGC1A mRNS szintben. Feltételezésünk szerint ez a nagy intenzitású és emellett oxigén hiányos állapotból adódó anaerob energia igény hatására nem változott a kezelés hatására. Következő hipotézisünk szerint: 2.2.A mitokondriális biogenezis és a kapillarizáció markerei megemelkednek az okklúziós lábban kontroll lábhoz képest. Részben ELFOGADJUK, mivel a VEGF, mint kapillarizációs marker emelkedést mutatott, míg a mitokondriális biogenesis markerekben nem történt szignifikáns különbség a kezelés hatására.

Az antioxidáns hatású NRF1 gén átíródása is megemelkedett, ami a nagy intenzitás hatására keletkező szabadgyökök elleni védekezés megindítására enged következtetni. Ami alapján hipotézisünk: 2.3. Az antioxidánsok szintje emelkedik az edzés hatására az okkluzált lábban a kontroll lábhoz képest. Részben ELFOGADJUK, mivel csak az mRNS markernél találtunk különbséget.

Eredményeink talán legmeglepőbb pontja a csökkent miR-206 miRNS csökkenése és annak korrelációja az emelkedett Pax7 szinttel. Ezen mikroRNS szerepet játszik az anabolikus folyamatok gátlásában, amit jelen kutatásunkban az okklúziós kezelés jól láthatóan meggátolt. Ezt az eredményt krónikus okklúziós kezelésünkkel nem tudtunk reprodukálni, azonban a miR-1 és miR133a szignifikáns csökkenést mutattak a kezelés hatására (Torma és mtsai., 2021).

Jelen dolgozathoz azért választottuk a két különböző modell típust, hogy azok előnyeivel a másik hátrányait kiküszöböljük. A hipertrófia útvonala rendkívül komplex és annak hatásai az egész szervezetre még komplexebb. Kutatásunkkal szeretnénk volna a sporttudomány ezen speciális területének a mélyebb megértését elősegíteni, amely véleményem szerint sikerült, de úgy érzem újabb kérdéseket vetettek föl. Korábban említettem, hogy akut okklúziós vizsgálatunkat tovább folytattuk, immáron krónikus okklúziós edzésprogramként, melyek eredményei meglepőek voltak. Az olvasó fejében megfordulhat a gondolat, hogy a még pontosabb eredmények eléréséhez többszöri mintavételezésre lett volna szükség, de ennek az alkalmazása már etikailag sem előnyös.

A fent említett alternatív hipertrófiás módszerek kivételes lehetőségeket nyújtanak mind a szélsőséges és általános alkalmazkodási megnyilvánulások vizsgálatához. A PCR vizsgálatokkal a gének „szándékát”, míg a Western blot eljárással a gének akaratának „beteljesülését” vizsgáltuk. Az elmúlt évtized során felfedezett miRNS-ek vizsgálata, pedig még teljesebb képet mutat nekünk a szervezetben zajló folyamatokról.

## **8. Összefoglalás**

Az izom keresztmetszet nagysága nem csak a sport területén hasznos, de az élet egyéb területein is, mint például a megfelelő egészség kialakítása és fent tartása. Kutatásunkat a hipertrófia illetve annak két alternatív formájának a jobb megértésének szenteltük. A két módszer előnyei kiegészítették a másik hátrányait, melynek célja a teljesebb kép elérése volt.

Állatkísérletünkben patkányokon végeztünk műtéti eljárást, melynek során a hátsó láb boka ízületében feszítő szerepet játszó 3 izomból kettőt eltávolítottunk, amivel a fennmaradó izom „kompenzációját” váltottuk ki. Kutatásunk során több, mint 40%-os izomtömeg növekedést értünk el, melyeket különböző biokémiai és molekuláris biológiai eljárásokkal támasztottunk alá. A nagymértékű hipertrófia alátámasztására az anabolikus útvonalak és katabolikus útvonalak markereit vizsgáltuk. Az anabolikus markerekben emelkedést találtunk, míg ezzel összhangban a katabolikus markerek szintbeli csökkenését detektáltuk.

A mitokondriális biogenezis markereiben csökkenést találtunk, míg a mitofágiáért felelős fehérjének a szintjében nem találtunk szignifikáns eltérést. Az antioxidáns enzimek csökkenéséből pedig redukálódott környezetet figyelhettünk meg. Vizsgálatunk során kitüntetett szerepet szenteltünk a SIRT1 fehérje hipertrófiában betöltött szerepére, amit eredményeink alapján további alátámasztásként értelmezhetünk. Ezen kívül új mozaikokat fedeztünk fel az izomhipertrófia komplex sejtes szabályozásáról.

Kutatásunk másik része a humán modellen végzett ellenállással végzett edzés kombinálása okklúziós modellel. Emelkedett fehérjeszintézis markereinket már 2 órával a terhelés után detektálhattuk, a kapillarizáció és antioxidáns aktivitásért felelős gének leíródásának emelkedésével egyetemben. Vizsgálatunkban kitértünk a különböző funkciójú miRNS-ekre és azok változásaira. A katabolizmusban szerepet játszó egyik miRNS szintjében szignifikáns csökkenést találtunk. A vizsgált fehérjék szintbeli változásait nem tudtuk detektálni feltételezhetően a terhelés utáni mintavételig eltelt időnek a rövidege indokolhat. Kutatásaink során komplexebb képet kaptunk a hipertrófiát célzó alternatív módszerek élettani hatásairól és annak bonyolult jelzőrendszeri kapcsolatairól és szabályozási mechanizmusairól.





## **9. Summary**

The size of the skeletal muscle's benefit is not limited only to the sport activities but it is also beneficial to the other aspects of the life like the normal health and its maintenance. Our aim of this study was to understand better that of the hypertrophy especially its 2 alternative modes. The advantages of one method can cover the disadvantage of the other method because we want to get a more completed picture of it.

In our study we used animal model and we removed 2 of the three plantarflexors of the hind-limb by a surgical method. After that the only remaining plantarflexor "compensated" the deficit of the other muscles. It caused more than 40% enrichment in the mass of the remaining muscle that we supported with molecular biological and biochemical experiments. To support this result we examined the markers of the anabolic and the catabolic pathways. We found elevation in the anabolic markers and depression in the catabolic markers.

In our results we found significant decrease in the mitochondrial biogenesis markers and we did not find any differences in the mitophagy markers. The decreased levels of the antioxidant markers we suppose a reduced cellular milieu. In our study we pay special attention to the SIRT1's role in the hypertrophy that we proved in our results.

The other part of our research was a human model. We combined the effects of the blood flow restriction with high intensity resistance training. We found elevated mRNA levels of the markers of protein synthesis, vascularization and antioxidant protection after 2 hour of the training. In our study we examined the alteration of the different miRNAs. We found significant decrease in one miRNA that play role in catabolism. We did not found any changes in the level of the measured proteins we suppose that because the short time that spent between the training and the sample collection.

After those two study we have a better understanding about the physiology of the alternative hypertrophy models and its complex molecular signalling pathways and its regulation processes.

## **10. Irodalomjegyzék**

Abe T, Fujita S, Nakajima T, Sakamaki M, Ozaki H, Ogasawara R, Sugaya M, Kudo M, Kurano M, Yasuda T, Sato Y, Ohshima H, Mukai C, Ishii N. (2010) Effects of Low-Intensity Cycle Training with Restricted Leg Blood Flow on Thigh Muscle Volume and VO<sub>2</sub>MAX in Young Men. *J Sports Sci Med*, 1;9(3):452-8.

Ampomah K, Amano S, Wages NP, Volz L, Clift R, Ludin AFM, Nakazawa M, Law TD, Manini TM, Thomas JS, Russ DW, Clark BC. (2019) Blood Flow-restricted Exercise Does Not Induce a Cross-Transfer of Effect: A Randomized Controlled Trial. *Med Sci Sports Exerc*, 51(9):1817-1827.

Arumugam TV, Kennedy BK. (2018) H<sub>2</sub>S to Mitigate Vascular Aging: A SIRT1 Connection. *Cell*, 22;173(1):8-10.

Baar K, Esser K. (1999) Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, 276(1):C120-7.

Bae SH, Sung SH, Oh SY, Lim JM, Lee SK, Park YN, Lee HE, Kang D, Rhee SG. (2013) Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metab*, 8;17(1):73-84.

Bartolomé A, García-Aguilar A, Asahara SI, Kido Y, Guillén C, Pajvani UB, Benito M. (2017) MTORC1 Regulates both General Autophagy and Mitophagy Induction after Oxidative Phosphorylation Uncoupling. *Mol Cell Biol*, 13;37(23):e00441-17.

Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. (2012) Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1;4(2):a008342.

Bhaskar PT, Hay N. (2007) The two TORCs and Akt. *Dev Cell*, 12(4):487-502.

Blair SN. (2009) Physical inactivity: the biggest public health problem of the 21st century. *Br J Sports Med*, 43(1):1-2.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN,

Yancopoulos GD, Glass DJ. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294(5547):1704-8.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*, 3(11):1014-9.

Bolster DR, Kubica N, Crozier SJ, Williamson DL, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. (2003) Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signalling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. *J Physiol*, 15;553(Pt 1):213-20.

Budanov AV, Karin M. (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signalling. *Cell*, 134(3):451-460.

Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. (2015) NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab*, 22(1):31-53.

Centner C, Lauber B, Seynnes OR, Jerger S, Sohnius T, Gollhofer A, König D. (2018) Low-load blood flow restriction training induces similar morphological and mechanical Achilles tendon adaptations compared with high-load resistance training. *J Appl Physiol*, 1;127(6):1660-1667.

Centner C, Wiegel P, Gollhofer A, König D. (2018) Effects of Blood Flow Restriction Training on Muscular Strength and Hypertrophy in Older Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med*, 49(1):95-108.

Chalé-Rush A, Morris EP, Kendall TL, Brooks NE, Fielding RA. (2009) Effects of chronic overload on muscle hypertrophy and mTOR signaling in young adult and aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sc*, 64(12):1232-1239.

Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, Wang DZ. (2010) microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol*, 6;190(5):867-79.

Choi H, Selpides PJ, Nowell MM, Rourke BC. (2009) Functional overload in ground squirrel plantaris muscle fails to induce myosin isoform shifts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297(3):R578-R586.

Clark BC, Manini TM, Hoffman RL, Williams PS, Guiler MK, Knutson MJ, McGlynn ML, Kushnick MR. (2011) Relative safety of 4 weeks of blood flow-restricted resistance exercise in young, healthy adults. *Scand J Med Sci Sports*, 21(5):653-62.

Conceição MS, Vechin FC, Lixandrão M, Damas F, Libardi CA, Tricoli V, Roschel H, Camera D, Ugrinowitsch C. (2018) Muscle Fiber Hypertrophy and Myonuclei Addition: A Systematic Review and Meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc*, 50(7):1385-1393.

da Cunha Nascimento D, Schoenfeld BJ, Prestes J. (2020) Potential Implications of Blood Flow Restriction Exercise on Vascular Health: A Brief Review. *Sports Med*, 50(1):73-81.

Da Y, Mou Y, Wang M, Yuan X, Yan F, Lan W, Zhang F. (2020) Mechanical stress promotes biological functions of C2C12 myoblasts by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*, 21(1):470-477.

Dan HC, Ebbs A, Pasparakis M, Van Dyke T, Basseres DS, Baldwin AS. (2014) Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ). *J Biol Chem*, 289(36):25227-25240.

Das A, Huang GX, Bonkowski MS, Longchamp A, Li C, Schultz MB, Kim LJ, Osborne B, Joshi S, Lu Y, Treviño-Villarreal JH, Kang MJ, Hung TT, Lee B, Williams EO, Igarashi M, Mitchell JR, Wu LE, Turner N, Arany Z, Guarente L, Sinclair DA. (2018) Impairment of an Endothelial NAD<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>S Signaling Network Is a Reversible Cause of Vascular Aging. *Cell*, 173(1):74-89.e20.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107(4):1198-1205.

Dirks ML, Wall BT, van de Valk B, Holloway TM, Holloway GP, Chabowski A, Goossens GH, van Loon LJ. (2016) One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle

Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes*, 65(10):2862-75.

Ditrói T, Nagy A, Martinelli D, Rosta A, Kožich V, Nagy P. (2019) Comprehensive analysis of how experimental parameters affect H<sub>2</sub>S measurements by the monobromobimane method. *Free Radic Biol Med*, 136:146-158.

Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. (2006) Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physio*, 576(Pt 2):613-624.

D'Souza RF, Markworth JF, Aasen KMM, Zeng N, Cameron-Smith D, Mitchell CJ. (2017) Acute resistance exercise modulates microRNA expression profiles: Combined tissue and circulatory targeted analyses. *PLoS One*, 12(7):e0181594.

Du C, Lin X, Xu W, Zheng F, Cai J, Yang J, Cui Q, Tang C, Cai J, Xu G, Geng B. (2019) Sulfhydrated Sirtuin-1 Increasing Its Deacetylation Activity Is an Essential Epigenetics Mechanism of Anti-Atherogenesis by Hydrogen Sulfide. *Antioxid Redox Signal*, 30(2):184-197.

Farup J, de Paoli F, Bjerg K, Riis S, Ringgard S, Vissing K. (2015) Blood flow restricted and traditional resistance training performed to fatigue produce equal muscle hypertrophy. *Scand J Med Sci Sports*, 25(6):754-763.

Fatela P, Reis JF, Mendonca GV, Freitas T, Valamatos MJ, Avela J, Mil-Homens P. (2018) Acute Neuromuscular Adaptations in Response to Low-Intensity Blood-Flow Restricted Exercise and High-Intensity Resistance Exercise: Are There Any Differences? *J Strength Cond Res*, 32(4):902-910.

Ferguson RA, Hunt JEA, Lewis MP, Martin NRW, Player DJ, Stangier C, Taylor CW, Turner MC. (2018) The acute angiogenic signalling response to low-load resistance exercise with blood flow restriction. *Eur J Sport Sci*, 18(3):397-406.

Figueiredo VC, de Salles BF, Trajano GS. (2018) Volume for Muscle Hypertrophy and Health Outcomes: The Most Effective Variable in Resistance Training. *Sports Med*, 48(3):499-505.

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. (2004) mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 24(1):200-216.

Fitschen PJ, Kistler BM, Jeong JH, Chung HR, Wu PT, Walsh MJ, Wilund KR. (2014) Perceptual effects and efficacy of intermittent or continuous blood flow restriction resistance training. *Clin Physiol Funct Imaging*, 34(5):356-63.

Franz A, Queitsch FP, Behringer M, Mayer C, Krauspe R, Zilkens C. (2018) Blood flow restriction training as a prehabilitation concept in total knee arthroplasty: A narrative review about current preoperative interventions and the potential impact of BFR. *Med Hypotheses*, 110:53-59.

Fry CS, Glynn EL, Drummond MJ, Timmerman KL, Fujita S, Abe T, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB. (2010) Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. *J Appl Physiol* (1985), 108(5):1199-209.

Fujita S, Abe T, Drummond MJ, Cadenas JG, Dreyer HC, Sato Y, Volpi E, Rasmussen BB. (2007) Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* (1985), 103(3):903-10.

Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 13(9):1423-1433.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25):14440-14445.

Gombos Z, Koltai E, Torma F, Bakonyi P, Kolonics A, Aczel D, Ditroi T, Nagy P, Kawamura T, Radak Z. (2021) Hypertrophy of Rat Skeletal Muscle Is Associated with Increased SIRT1/Akt/mTOR/S6 and Suppressed Sestrin2/SIRT3/FOXO1 Levels. *Int J Mol Sci*, 22(14):7588.

Gong L, Wang Z, Wang Z, Zhang Z. (2021) Sestrin2 as a Potential Target for Regulating Metabolic-Related Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12:751020.

Greer EL, Banko MR, Brunet A. (2009) AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Ann N Y Acad Sci*, 1170:688-692.

Guerra-Castellano A, Díaz-Quintana A, Pérez-Mejías G, Elena-Real CA, González-Arzola K, García-Mauriño SM, De la Rosa MA, Díaz-Moreno I. (2018) Oxidative stress is tightly regulated by cytochrome c phosphorylation and respirasome factors in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(31):7955-7960.

Gumucio JP, Phan AC, Ruehlmann DG, Noah AC, Mendias CL. (2014) Synergist ablation induces rapid tendon growth through the synthesis of a neotendon matrix. *J Appl Physiol* (1985), 117(11):1287-1291.

Häkkinen K, Keskinen KL. (1989) Muscle cross-sectional area and voluntary force production characteristics in elite strength- and endurance-trained athletes and sprinters. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 59(3):215-220.

Hamilton DL, Philp A, MacKenzie MG, Patton A, Towler MC, Gallagher IJ, Bodine SC, Baar K. (2014) Molecular brakes regulating mTORC1 activation in skeletal muscle following synergist ablation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 307(4):E365-73.

Hay N. (2011) Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochim Biophys Acta*, 1813(11):1965-1970.

Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckstuhl C, Lee BC, Brace L, Longchamp A, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Ozaki CK, Wang R, Gladyshev VN, Madeo F, Mair WB, Mitchell JR. (2015) Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell*, 160(1-2):132-44.

Holloszy JO. (1967) Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 242(9):2278-2282.

Holm L, Reitelseder S, Pedersen TG, Doessing S, Petersen SG, Flyvbjerg A, Andersen JL, Aagaard P, Kjaer M. (2008) Changes in muscle size and MHC composition in

response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. *J Appl Physiol* (1985), 105(5):1454-61.

Hong S, Zhao B, Lombard DB, Fingar DC, Inoki K. (2014) Cross-talk between sirtuin and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the regulation of S6 kinase 1 (S6K1) phosphorylation. *J Biol Chem*, 289(19):13132-13141.

Hwang HJ, Kim JW, Chung HS, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Baik SH, Yoo HJ. (2018) Knockdown of Sestrin2 Increases Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Fibrotic Reactions in H9c2 Cells and Heart Tissues of Mice via an AMPK-Dependent Mechanism. *Mediators Inflamm*, 2018:6209140.

Hyatt JP, McCall GE, Kander EM, Zhong H, Roy RR, Huey KA. (2008) PAX3/7 expression coincides with MyoD during chronic skeletal muscle overload. *Muscle Nerve*, 38(1):861-866.

Iadevaia V, Liu R, Proud CG. (2014) mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 36:113-120.

Iida H, Nakajima T, Kurano M, Yasuda T, Sakamaki M, Sato Y, Yamasoba T, Abe T. (2011) Effects of walking with blood flow restriction on limb venous compliance in elderly subjects. *Clin Physiol Funct Imaging*, 31(6):472-6.

Ishido M, Uda M, Kasuga N, Masuhara M. (2009) The expression patterns of Pax7 in satellite cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol (Oxf)*, 195(4):459-469.

Item F, Denking J, Fontana P, Weber M, Boutellier U, Toigo M. (2011) Combined effects of whole-body vibration, resistance exercise, and vascular occlusion on skeletal muscle and performance. *Int J Sports Med*, 32(10):781-787.

Jessee MB, Buckner SL, Dankel SJ, Counts BR, Abe T, Loenneke JP. (2016) The Influence of Cuff Width, Sex, and Race on Arterial Occlusion: Implications for Blood Flow Restriction Research. *Sports Med*, 46(6):913-921.



Jessee MB, Buckner SL, Mouser JG, Mattocks KT, Dankel SJ, Abe T, Bell ZW, Bentley JP, Loenneke JP. (2018) Muscle Adaptations to High-Load Training and Very Low-Load Training With and Without Blood Flow Restriction. *Front Physiol*, 9:1448.

Jornayvaz FR, Shulman GI. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47:69-84.

Kawano F, Matsuoka Y, Oke Y, Higo Y, Terada M, Wang XD, Nakai N, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Ohira Y. (2007) Role(s) of nucleoli and phosphorylation of ribosomal protein S6 and/or HSP27 in the regulation of muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol*, 293(1):C35-44.

Kido K, Sase K, Yokokawa T, Fujita S. (2020) Enhanced skeletal muscle insulin sensitivity after acute resistance-type exercise is upregulated by rapamycin-sensitive mTOR complex 1 inhibition. *Sci Rep*, 10(1):8509.

Kim M, Sujkowski A, Namkoong S, Gu B, Cobb T, Kim B, Kowalsky AH, Cho CS, Semple I, Ro SH, Davis C, Brooks SV, Karin M, Wessells RJ, Lee JH. (2020) Sestrins are evolutionarily conserved mediators of exercise benefits. *Nat Commun*, 11(1):190.

Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. (2002) Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* (1985), 93(3):1168-1180.

Kimura H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*, 20(5):783-793.

Koltai E, Bori Z, Chabert C, Dubouchaud H, Naito H, Machida S, Davies KJ, Murlasits Z, Fry AC, Boldogh I, Radak Z. (2017) SIRT1 may play a crucial role in overload-induced hypertrophy of skeletal muscle. *J Physiol*, 595(11):3361-3376.

Koltai E, Bori Z, Osvath P, Ihasz F, Peter S, Toth G, Degens H, Rittweger J, Boldogh I, Radak Z. (2018) Master athletes have higher miR-7, SIRT3 and SOD2 expression in skeletal muscle than age-matched sedentary controls. *Redox Biol*, 19:46-51.

- Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA. (2011) Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol*, 11:34.
- Krijt J, Kopecká J, Hnízda A, Moat S, Kluijtmans LA, Mayne P, Kožich V. (2011) Determination of cystathionine beta-synthase activity in human plasma by LC-MS/MS: potential use in diagnosis of CBS deficiency. *J Inher Metab Dis*, 34(1):49-55.
- Kubota A, Sakuraba K, Koh S, Ogura Y, Tamura Y. (2011) Blood flow restriction by low compressive force prevents disuse muscular weakness. *J Sci Med Sport*, 14(2):95-99.
- Lee D, Goldberg AL. (2013) SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *J Biol Chem*, 288(42):30515-30526.
- Lee JD, Fry CS, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. (2016) Aged Muscle Demonstrates Fiber-Type Adaptations in Response to Mechanical Overload, in the Absence of Myofiber Hypertrophy, Independent of Satellite Cell Abundance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 71(4):461-7.
- Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, Ocorr K, Ellisman MH, Bodmer R, Bier E, Karin M. (2010) Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science*, 327(5970):1223-8.
- Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, Russell AP. (2006) Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol*, 576(Pt 3):923-33.
- Li H, Liu S, Yuan H, Niu Y, Fu L. (2017) Sestrin 2 induces autophagy and attenuates insulin resistance by regulating AMPK signaling in C2C12 myotubes. *Exp Cell Res*, 354(1):18-24.
- Li JB, Goldberg AL. (1976) Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am J Physiol*, 231(2):441-448.

Libardi CA, Catai AM, Miquelini M, Borghi-Silva A, Minatel V, Alvarez IF, Milan-Mattos JC, Roschel H, Tricoli V, Ugrinowitsch C. (2017) Hemodynamic Responses to Blood Flow Restriction and Resistance Exercise to Muscular Failure. *Int J Sports Med*, 38(2):134-140.

Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z. (2013) Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J*, 27(10):4184-93.

Liu S, Yu C, Xie L, Niu Y, Fu L. (2021) Aerobic Exercise Improves Mitochondrial Function in Sarcopenia Mice Through Sestrin2 in an AMPK $\alpha$ 2-Dependent Manner. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 76(7):1161-1168.

Lixandrão ME, Ugrinowitsch C, Laurentino G, Libardi CA, Aihara AY, Cardoso FN, Tricoli V, Roschel H. (2015) Effects of exercise intensity and occlusion pressure after 12 weeks of resistance training with blood-flow restriction. *Eur J Appl Physiol*, 115(12):2471-80.

Loenneke JP, Allen KM, Mouser JG, Thiebaud RS, Kim D, Abe T, Bembem MG. (2015) Blood flow restriction in the upper and lower limbs is predicted by limb circumference and systolic blood pressure. *Eur J Appl Physiol*, 115(2):397-405.

Loenneke JP, Fahs CA, Rossow LM, Abe T, Bembem MG. (2012) The anabolic benefits of venous blood flow restriction training may be induced by muscle cell swelling. *Med Hypotheses*, 78(1):151-154.

Loenneke JP, Fahs CA, Wilson JM, Bembem MG. (2011) Blood flow restriction: the metabolite/volume threshold theory. *Med Hypotheses*, 77(5):748-752.

Loenneke JP, Thiebaud RS, Abe T, Bembem MG. (2014) Blood flow restriction pressure recommendations: the hormesis hypothesis. *Med Hypotheses*, 82(5):623-626.

Loenneke JP, Wilson JM, Marín PJ, Zourdos MC, Bembem MG. (2012) Low intensity blood flow restriction training: a meta-analysis. *Eur J Appl Physiol*, 112(5):1849-1859.

- Ludyga S, Gerber M, Pühse U, Looser VN, Kamijo K. (2020) Systematic review and meta-analysis investigating moderators of long-term effects of exercise on cognition in healthy individuals. *Nat Hum Behav*, 4(6):603-612.
- MacInnis MJ, Gibala MJ. (2017) Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol*, 595(9):2915-2930.
- Madarame H, Kurano M, Takano H, Iida H, Sato Y, Ohshima H, Abe T, Ishii N, Morita T, Nakajima T. (2010) Effects of low-intensity resistance exercise with blood flow restriction on coagulation system in healthy subjects. *Clin Physiol Funct Imaging*, 30(3):210-3.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, 6(6):458-71.
- Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. (2007) SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37):14855-60.
- Michan S, Sinclair D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404(1):1-13.
- Miyazaki M, McCarthy JJ, Fedele MJ, Esser KA. (2001) Early activation of mTORC1 signalling in response to mechanical overload is independent of phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling. *J Physiol*, 589(Pt 7):1831-1846.
- Mori S, Nada S, Kimura H, Tajima S, Takahashi Y, Kitamura A, Oneyama C, Okada M. (2014) The mTOR pathway controls cell proliferation by regulating the FoxO3a transcription factor via SGK1 kinase. *PLoS One*, 9(2):e88891.
- Murach KA, White SH, Wen Y, Ho A, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. (2017) Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. *Skelet Muscle*, 7(1):14.

Murphy RM, Watt MJ, Febbraio MA. (2020) Metabolic communication during exercise. *Nat Metab*, 2(9):805-816.

Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. (2006) The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci*, 31(1):137-155.

Nauman J, Nes BM, Lavie CJ, Jackson AS, Sui X, Coombes JS, Blair SN, Wisløff U. (2017) Prediction of Cardiovascular Mortality by Estimated Cardiorespiratory Fitness Independent of Traditional Risk Factors: The HUNT Study. *Mayo Clin Proc*, 92(2):218-227.

Neves VJ, Fernandes T, Roque FR, Soci UP, Melo SF, de Oliveira EM. (2014) Exercise training in hypertension: Role of microRNAs. *World J Cardiol*, 6(8):713-727.

Newman AB, Haggerty CL, Goodpaster B, Harris T, Kritchevsky S, Nevitt M, Miles TP, Visser M. (2003) Strength and muscle quality in a well-functioning cohort of older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc*, 51(3):323-30.

Nielsen JL, Aagaard P, Bech RD, Nygaard T, Hvid LG, Wernbom M, Suetta C, Frandsen U. (2012) Proliferation of myogenic stem cells in human skeletal muscle in response to low-load resistance training with blood flow restriction. *J Physiol*, 590(17):4351-61.

Ozaki H, Kakigi R, Kobayashi H, Loenneke JP, Abe T, Naito H. (2014) Effects of walking combined with restricted leg blood flow on mTOR and MAPK signalling in young men. *Acta Physiol (Oxf)*, 211(1):97-106.

Pearson JK, Sickles DW. (1987) Enzyme activity changes in rat soleus motoneurons and muscle after synergist ablation. *J Appl Physiol* (1985), 63(6):2301-2308.

Pérez-Schindler J, Summermatter S, Santos G, Zorzato F, Handschin C. (2013) The transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  is dispensable for chronic overload-induced skeletal muscle hypertrophy and metabolic remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50):20314-20319.

Petrick HL, Pignanelli C, Barbeau PA, Churchward-Venne TA, Dennis KMJH, van Loon LJC, Burr JF, Goossens GH, Holloway GP. (2019) Blood flow restricted resistance

exercise and reductions in oxygen tension attenuate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission rates in human skeletal muscle. *J Physiol*, 597(15):3985-3997.

Qiao A, Wang K, Yuan Y, Guan Y, Ren X, Li L, Chen X, Li F, Chen AF, Zhou J, Yang JM, Cheng Y. (2016) Sirt3-mediated mitophagy protects tumor cells against apoptosis under hypoxia. *Oncotarget*, 7(28):43390-43400.

Radak Z, Ishihara K, Tekus E, Varga C, Posa A, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. (2017) Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biol*, 12:285-290.

Radak Z, Kumagai S, Nakamoto H, Goto S. (2007) 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats. *J Appl Physiol* (1985), 102(4):1696-1701.

Radak Z, Suzuki K, Posa A, Petrovszky Z, Koltai E, Boldogh I. (2020) The systemic role of SIRT1 in exercise mediated adaptation. *Redox Biol*, 35:101467.

Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. (2013) Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*, 18(10):1208-1246.

Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, Ucar D, Dugas JC, Pollina EA, Chow LM, Ibrahim A, Baker SJ, Barres BA, Steinman L, Brunet A. (2013) Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol*, 15(6):614-24.

Ren D, He Z, Fedorova J, Zhang J, Wood E, Zhang X, Kang DE, Li J. (2021) Sestrin2 maintains OXPHOS integrity to modulate cardiac substrate metabolism during ischemia and reperfusion. *Redox Biol*, 38:101824.

Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S. (2012) A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell*, 148(1-2):112-125.

Rønnestad BR, Hansen EA, Raastad T. (2010) Effect of heavy strength training on thigh muscle cross-sectional area, performance determinants, and performance in well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol*, 108(5):965-975.

Rossow LM, Fahs CA, Loenneke JP, Thiebaud RS, Sherk VD, Abe T, Bemben MG. (2012) Cardiovascular and perceptual responses to blood-flow-restricted resistance exercise with differing restrictive cuffs. *Clin Physiol Funct Imaging*, 32(5):331-7.

Ruiz JR, Sui X, Lobelo F, Morrow JR Jr, Jackson AW, Sjöström M, Blair SN. (2008) Association between muscular strength and mortality in men: prospective cohort study. *BMJ*, 337(7661):a439.

Sanchez AM, Candau RB, Bernardi H. (2014) FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, 71(9):1657-1671.

Sanchis-Gomar F, Lucia A, Yvert T, Ruiz-Casado A, Pareja-Galeano H, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Garatachea N, Lippi G, Bouchard C, Berger NA. (2015) Physical inactivity and low fitness deserve more attention to alter cancer risk and prognosis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8(2):105-10.

Sandri M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*, 23:160-170.

Scott BR, Loenneke JP, Slattery KM, Dascombe BJ. (2015) Exercise with blood flow restriction: an updated evidence-based approach for enhanced muscular development. *Sports Med*, 45(3):313-325.

Scott BR, Loenneke JP, Slattery KM, Dascombe BJ. (2016) Blood flow restricted exercise for athletes: A review of available evidence. *J Sci Med Sport*, 19(5):360-367.

Seabright AP, Lai YC. (2020) Regulatory Roles of PINK1-Parkin and AMPK in Ubiquitin-Dependent Skeletal Muscle Mitophagy. *Front Physiol*, 11:608474.

Stamatakis E, Lee IM, Bennie J, Freeston J, Hamer M, O'Donovan G, Ding D, Bauman A, Mavros Y. (2018) Does Strength-Promoting Exercise Confer Unique Health Benefits? A Pooled Analysis of Data on 11 Population Cohorts With All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Mortality Endpoints. *Am J Epidemiol*, 187(5):1102-1112.

Suga T, Okita K, Morita N, Yokota T, Hirabayashi K, Horiuchi M, Takada S, Takahashi T, Omokawa M, Kinugawa S, Tsutsui H. (2009) Intramuscular metabolism during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *J Appl Physiol* (1985), 106(4):1119-24.

Szabo C, Papapetropoulos A. (2017) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev*, 69(4):497-564.

Tai YL, Marshall EM, Glasgow A, Parks JC, Sensibello L, Kingsley JD. (2019) Autonomic modulation following an acute bout of bench press with and without blood flow restriction. *Eur J Appl Physiol*, 119(10):2177-2183.

Takada S, Okita K, Suga T, Omokawa M, Morita N, Horiuchi M, Kadoguchi T, Takahashi M, Hirabayashi K, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H. (2012) Blood flow restriction exercise in sprinters and endurance runners. *Med Sci Sports Exerc*, 44(3):413-9.

Takano H, Morita T, Iida H, Asada K, Kato M, Uno K, Hirose K, Matsumoto A, Takenaka K, Hirata Y, Eto F, Nagai R, Sato Y, Nakajima T. (2005) Hemodynamic and hormonal responses to a short-term low-intensity resistance exercise with the reduction of muscle blood flow. *Eur J Appl Physiol*, 95(1):65-73.

Takarada Y, Takazawa H, Ishii N. (2000) Applications of vascular occlusion diminish disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc*, 32(12):2035-2039.

Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. (2002) Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA*, 288(16):1994-2000.

Thomson DM, Gordon SE. (2005) Diminished overload-induced hypertrophy in aged fast-twitch skeletal muscle is associated with AMPK hyperphosphorylation. *J Appl Physiol* (1985), 98(2):557-564.

Torma F, Bakonyi P, Regdon Z, Gombos Z, Jokai M, Babszki G, Fridvalszki M, Virág L, Naito H, Iftikhar Bukhari SR, Radak Z. (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 Med Health Sci*, 3(1):40-45.

Torma F, Gombos Z, Fridvalszki M, Langmar G, Tarcza Z, Merkely B, Naito H, Ichinoseki-Sekine N, Takeda M, Murlasits Z, Osvath P, Radak Z. (2021) Blood flow restriction in human skeletal muscle during rest periods after high-load resistance training down-regulates miR-206 and induces Pax7. *J Sport Health Sci*, 10(4):470-477.

Torma F, Gombos Z, Jokai M, Berkes I, Takeda M, Mimura T, Radak Z, Gyori F. (2020) The roles of microRNA in redox metabolism and exercise-mediated adaptation. *J Sport Health Sci*, 9(5):405-414.

Tseng AH, Shieh SS, Wang DL. (2013) SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radic Biol Med*, 63:222-34.

Uemichi K, Shirai T, Hanakita H, Takemasa T. (2021) Effect of mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 on mitochondrial dynamics during skeletal muscle hypertrophy. *Physiol Rep*, 9(5):e14789.

Vikmoen O, Ellefsen S, Trøen Ø, Hollan I, Hanestadhaugen M, Raastad T, Rønnestad BR. (2016) Strength training improves cycling performance, fractional utilization of VO<sub>2</sub>max and cycling economy in female cyclists. *Scand J Med Sci Sports*, 26(4):384-96.

Wagner PD. (1996) Determinants of maximal oxygen transport and utilization. *Annu Rev Physiol*, 58:21-50.

Wang D, Hu Z, Hao J, He B, Gan Q, Zhong X, Zhang X, Shen J, Fang J, Jiang W. (2013) SIRT1 inhibits apoptosis of degenerative human disc nucleus pulposus cells through activation of Akt pathway. *Age (Dordr)*, 35(5):1741-53.

Wang R, Li K, Wang H, Jiao H, Wang X, Zhao J, Lin H. (2019) Endogenous CSE/Hydrogen Sulfide System Regulates the Effects of Glucocorticoids and Insulin on Muscle Protein Synthesis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019:9752698.

Weichhart T. (2018) mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(2):127-134.

Wernbom M, Apro W, Paulsen G, Nilsen TS, Blomstrand E, Raastad T. (2013) Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 113(12):2953-65.

Wernbom M, Apro W, Paulsen G, Nilsen TS, Blomstrand E, Raastad T. (2013) Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 113(12):2953-65.

Westcott WL. (2012) Resistance training is medicine: effects of strength training on health. *Curr Sports Med Rep*, 11(4):209-16.

White JP, Wrann CD, Rao RR, Nair SK, Jedrychowski MP, You JS, Martínez-Redondo V, Gygi SP, Ruas JL, Hornberger TA, Wu Z, Glass DJ, Piao X, Spiegelman BM. (2014) G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(44):15756-61.

Williams MA, Haskell WL, Ades PA, Amsterdam EA, Bittner V, Franklin BA, Gulanick M, Laing ST, Stewart KJ. (2007) Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, 116(5):572-84.

Wilson JM, Lowery RP, Joy JM, Loenneke JP, Naimo MA. (2013) Practical blood flow restriction training increases acute determinants of hypertrophy without increasing indices of muscle damage. *J Strength Cond Res*, 27(11):3068-75.

Winbanks CE, Beyer C, Hagg A, Qian H, Sepulveda PV, Gregorevic P. (2013) miR-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of HDAC4. *PLoS One*, 8(9):e73589.

Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P, Gregorevic P. (2011) TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *J Biol Chem*, 286(16):13805-14.

Yamakuchi M, Lowenstein CJ. (2009) MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*, 8(5):712-5.

Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, 21(8):1745-55.

Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. (2015) A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*, 12(6):937-43.

Yasuda T, Loenneke JP, Ogasawara R, Abe T. (2013) Influence of continuous or intermittent blood flow restriction on muscle activation during low-intensity multiple sets of resistance exercise. *Acta Physiol Hung*, 100(4):419-26.

Yoshioka T, Inagaki K, Noguchi T, Sakai M, Ogawa W, Hosooka T, Iguchi H, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Kasuga M. (2009) Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1alpha gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(4):537-43.

Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. (2011) Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1813(11):1978-86.

Zhao N, Zhang X, Li B, Wang J, Zhang C, Xu B. (2023) Treadmill Exercise Improves PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy Activity Against Alzheimer's Disease Pathologies by Upregulated SIRT1-FOXO1/3 Axis in APP/PS1 Mice. *Mol Neurobiol*, 60(1):277-291.

## **11. Saját publikációk jegyzéke**

### ***Disszertációhoz kapcsolódó közlemények***

Gombos Z, Koltai E, Torma F, Bakonyi P, Kolonics A, Aczel D, Ditroi T, Nagy P, Kawamura T, Radak Z. (2021) Hypertrophy of Rat Skeletal Muscle Is Associated with Increased SIRT1/Akt/mTOR/S6 and Suppressed Sestrin2/SIRT3/FOXO1 Levels. *Int J Mol Sci*, 22(14):7588.

Torma F, Gombos Z, Fridvalszki M, Langmar G, Tarcza Z, Merkely B, Naito H, Ichinoseki-Sekine N, Takeda M, Murlasits Z, Osvath P, Radak Z. (2021) Blood flow restriction in human skeletal muscle during rest periods after high-load resistance training down-regulates miR-206 and induces Pax7. *J Sport Health Sci*, 10(4):470-477.

### ***Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények***

Babszky G, Torma F, Aczel D, Bakonyi P, Gombos Z, Feher J, Szabó D, Ligeti B, Pongor S, Balogh L, Pósa A, Radak Z. (2021) COVID-19 Infection Alters the Microbiome: Elite Athletes and Sedentary Patients Have Similar Bacterial Flora. *Genes (Basel)*, 12(10):1577.

Torma F, Bakonyi P, Regdon Z, Gombos Z, Jokai M, Babszki G, Fridvalszki M, Virág L, Naito H, Iftikhar Bukhari SR, Radak Z. (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 Med Health Sci*, 3(1):40-45.

Torma F, Gombos Z, Jokai M, Berkes I, Takeda M, Mimura T, Radak Z, Gyori F. (2020) The roles of microRNA in redox metabolism and exercise-mediated adaptation. *J Sport Health Sci*, 9(5):405-414.

Torma F, Gombos Z, Jokai M, Takeda M, Mimura T, Radak Z. (2019) High intensity interval training and molecular adaptive response of skeletal muscle. *Sports Med Health Sci*, 1(1):24-32.

## **Köszönetnyilvánítás**

Végezetül szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Radák Zsolt témavezetőmnek, aki tudásával és támogatásával lehetővé tette számomra a PhD munkám létrejöttét.

Szeretnék köszönetet mondani minden dolgozónak és PhD hallgatónak a Molekuláris Edzésélettani Kutatóközpontban, akik segítettek a kutatómunkámat.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném külön kifejezni hálámat Dr. Torma Ferencnek, aki mentoromként folyamatosan segített és tanított a kutató munkám során.