

Az alternatív hipertrófia módszerek molekuláris hatásai

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

A fizikai aktivitás fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni. Az ipari forradalom és a tudományos-, és technikai forradalom kirobbanása Janus-arcú világképet 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 egyéneknek 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. 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 erőkifejtésének 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 szemszögből nézve a dolgot, a nagy izomtömeg a magasabb tesztoszteron szintre engedett következtetni, ami az adott fajon belüli alfahímekekre 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 rezisztancia 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.

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.

Az okklúziós edzés, egyféle kombinációja a különböző edzéseknek a végtagok vérellátásának korlátozottságával. Ez a fajta terhelés lehet klasszikusan rezisztancia 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 edzés módszernek 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. 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 hipertrófiázó edzések élettana régóta kutattott terület, emiatt dolgozatomban a nem klasszikus hipertrófiás módszereknek a további megismerését tűztük ki célul.

2. 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 markerei 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 a kontroll lábhoz képest.

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

3. Anyag és módszer

3.1. Kompenzációs hipertrófia modell

3.1.1. 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.

3.1.2. Műtéti eljárás

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 (4. ábra). 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) szuspenziós oldatot alkalmaztunk 3 csepp/ttkg/nap, ahol cseppentés után fiziológiás sódattal felhígítottuk az oldatot 1ml-re cseppenként. A műtött állatokat folyamatos ellenőrzés alatt tartottuk a kezelés teljes 2 hetes időtartalma alatt.

3.1.3. 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 °C fokon tároltuk a további feldolgozásig.

3.1.4. 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 (2µg/ml), Leupeptin (5µg/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 hosszúig 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 érjük el a megfelelő mértékű szeparációt. A gélelektroforézis

befejeztével az előre méretre vágott PVDF membránt 1 percig 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 gélt 2 órára gélfestő oldatba helyeztük (50% metanol, 39,75% H₂O, 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 molekulásúlynál megjelenő csíkok reprezentálták a célfehérjénket. A megjelenő csíkokat ImageJ szoftver segítségével mértük, ahol a relatív denzitást a „house keeping” fehérjére kalkuláltuk.

Végső lépésként membránfestő oldattal 0,2% Coomassie Brilliant Blue, 45% metanol, 10% ecetsav, 44,8% H₂O) 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 α -tubulint alkalmaztuk.

3.1.5. H₂S meghatározás

Egy korábban publikált eljárást (Ditrói és mtsai 2019) alkalmaztunk a szöveti lizátumok H₂S 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 monobrom-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 bimán 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/H₂O (A) és 0,1% TFA/ acetonitril (ACN) (B) oldószerekkel végeztük. A detektálást fluorimetriás detektorral végeztük, Ex=390 nm, Em=475 nm hullámhosszokon. A kvantitáláshoz pontos koncentrációjú H₂S oldatból készült standardot használtunk, a fehérjemérés eredményeiből pedig fehérjetömegre vonatkoztatott H₂S mennyiséget számoltunk.

3.1.6. 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 (12.000 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 homociszteintiolaktonból) 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.

3.1.7. NADH/NAD⁺ aktivitás mérése

NADH/NAD⁺ aktivitás mérő kitet (ab176723) alkalmaztunk a plantaris minták NAD⁺ és NADH szintjének meghatározásához a gyártó leírása alapján. A plantaris izom mintákat (200 mg) NADH/NAD⁺ 200 µl 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 µl-t vittünk fel duplikátumban a NADH standard-ból, a blank-ből és a mintákból. A mintákat NADH és NAD⁺ duplikátumban is vizsgáltuk. 25 µl NADH Extraction solution-t adtunk a NADH mintákhoz és NAD⁺ Extraction solution-t a NAD⁺ mintákhoz. A standard és a blank lyukakba NADH/NAD Control Solution-t pipettáztunk. Ezek után a plate-t 15 percre 37 °C-on inkubáltuk a NAD/NADH emésztéshez. Következő lépésként 25 µl NADH Extraction Solution-t adtunk a NAD⁺ mintákhoz és 25 µl NAD⁺ Extraction Solution-t a NADH minták-hoz. A standard és blank lyukakba szintén NADH/NAD⁺ Control Solutiont pipettáztunk. Végül 75 µl Reaction Mix-et vittünk fel minden lyukba, majd 2 órán keresztül vizsgáltuk öt percenként ex485 és em538 nm hullámhosszon Multi Scan EX géppel.

3.2. Okklúziós vizsgálat

3.2.1. Vizsgálati személyek

A vizsgálatunkban 7 egészséges fiatal férfi (életkoruk: 24.5±4.69 év, testtömegük: 78.8±6.7 kg, magasságuk: 182.9±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.

3.2.2. 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.

3.2.3. 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 bandázzsal 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.

3.2.4. 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 végeztével (4. ábra) vizsgáltuk. A

nyugalmi diasztolés átmérőt (mm) 30 szív ciklus 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 szív ciklus átlagából lett számolva. A szinkronizált átmérő és sebesség adatokból számoltuk a vér áramlását.

3.2.5. 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.

3.2.6. RNS kitermelés kvantitatív valós idejű polimeráz lánc reakció (qRT-PCR) az mRNA és mikroRNA átíratok vizsgálatához

A minták mRNA és miRNA 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 mennyiséget 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 rRNA 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 cDNA szintézist (SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit; Bioline, London, UK) a gyártó előírásai szerint végeztük. A speciális gén amplicont 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 rRNA, mitokondriális transzkripció faktor A (TFAM), hypoxia-inducible factor 1 subunita a (HIF1a), lupus Ku autoantigen protein p70 (KU70), AKT1, AKT2, SOD1, SOD2, és U6 nukleáris RNS. 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.

3.3. 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.

4. Eredmények

4.1.1 Antropometriai változások

Az állatok testtömegében (C=399±17g; 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=9.6%±0.005; O=12.7%±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.

4.1.2. A plantaris izomban mért biokémiai változások

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).

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.

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.

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.

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.

A NAD^+/NADH arány a sejt energia-, illetve redox állapotát mutatja be. A NADH mennyiségében nem találtunk különbséget a két csoport között a kezelés hatására. A NAD^+ mennyisége szignifikánsan csökkent az O csoportban a C csoportéhoz képest a kezelés hatására ($p < 0.05$). A NAMPT fehérje, mint a NAD^+ bioszintézisében szerepet játszó előanyag szintje szignifikánsan megemelkedett az O csoportban a C csoportéhoz képest ($p < 0.05$).

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.

A CBS egy kulcsfontosságú enzim, ami a H_2S szintézisben játszik szerepet. A 2 hetes kezelés hatására a CBS enzim mennyisége nem mutatott szignifikáns változást a két csoport között. A H_2S mennyisége nem mutatott szignifikáns különbséget a két csoport között a kezelés hatására.

4.2. A humán okklúziós edzés hatására bekövetkező változások

4.2.1. 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 ($p < 0.05$).

A diasztolés véráram szignifikáns emelkedést mutatott a 6. időpontban az 5. időpontban mért értékhez képest ($p < 0.05$). 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.

4.2.2. Okklúziós edzés hatására bekövetkező biokémiai változások

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.

A terhelés után 2 órával szignifikáns csökkenést találtunk a miR-206 szintjében a vizsgálati lábban a kontroll lábhoz képest ($p < 0.05$).

A Pax7 gén mRNS szintjének a változása és a miR-206 miRNS-nek a szintje korrelációt mutattak egymással ($r^2 = 0.33$, $r = 0.577$, $p = 0.031$).

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. 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.

5. Következtetések

A vázizom hipertrófia fontossága nem megkérdőjezhető, 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 fehérje szintézisben 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 fiziológiás hatásain kívül a hipertrófiában játszott szerepére. Kutatásunkban az emelkedett SIRT1 fehérje mennyiség a megnövekedett fehérje szintézissel 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⁺ bioszintézisének előanyaga szintén emelkedést mutatott, ami alátámasztja a folyamatos NAD⁺ igényt, ezáltal a SIRT1 aktivációt a kezelés hatására. A H₂S 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⁺ 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⁺ csökkenést mutatott.

Az okklúziós terhelést a 20. század 2. felében már gyakori edzés módszerként tartották számon a világ különböző pontjain. Jelen vizsgálatunkban a klasszikus ellenállással végzettedzést kombináltuk az okklúziós kezeléssel. Vizsgálati eredményeinkből kiderült, hogy bizonyos gének mRNS átíródása fokozódott a kezelt lábban az akut terhelés hatására. A fehérje szintézis 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 fehérje szintézis 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 rövidegéből feltételezhetünk. Hipotézis vizsgálat alapján: 2.1. Okklúziós terheléssel kombinált

akut rezisztancia edzés után az izom anabolikus markereinek a szintje megemelkedik a katabolikus markerek pedig csökkennek az oklúziós 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 számon tartott 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 oklúziós 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.

11. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

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

Torma, Ferenc, Zoltan Gombos, Marcell Fridvalszki, Gergely Langmar, Zsafia Tarcza, Bela Merkely, Hisashi Naito, és mtsai 2021. „Blood Flow Restriction in Human Skeletal Muscle during Rest Periods after High-Load Resistance Training down-Regulates MiR-206 and Induces Pax7”. *Journal of Sport and Health Science* 10 (4): 470–77. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2019.08.004>.

Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Babszky, Gergely, Ferenc Torma, Dora Aczel, Peter Bakonyi, Zoltan Gombos, Janos Feher, Dóra Szabó, és mtsai. 2021. „COVID-19 Infection Alters the Microbiome: Elite Athletes and Sedentary Patients Have Similar Bacterial Flora”. *Genes* 12 (10): 1577. <https://doi.org/10.3390/genes12101577>.

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

Torma, Ferenc, Zoltan Gombos, Matyas Jokai, Istvan Berkes, Masaki Takeda, Tatsuya Mimura, Zsolt Radak, és Ferenc Gyori. 2020. „The Roles of MicroRNA in Redox Metabolism and Exercise-Mediated Adaptation”. *Journal of Sport and Health Science* 9 (5): 405–14. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.03.004>.

Torma, Ferenc, Zoltan Gombos, Matyas Jokai, Masaki Takeda, Tatsuya Mimura, és Zsolt Radak. 2019. „High Intensity Interval Training and Molecular Adaptive Response of Skeletal Muscle”. *Sports Medicine and Health Science* 1 (1): 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.smhs.2019.08.003>.