

Az állóképességi edzés hatása a mitokondriális
biogenezisre edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett
patkányoknál

Doktori értekezés

Marton Orsolya

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Váczi Márk, egyetemi docens, PhD

Dr. Szabó Tamás, egyetemi magántanár, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Pavlik Gábor, professor emeritus, DSc

Szigorlati bizottság tagjai: †Dr. Istvánfi Csaba, rector emeritus, CSc

Dr. Ihász Ferenc, egyetemi tanár, PhD

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

Ábrák és táblázatok jegyzéke	3
Rövidítések jegyzéke	5
1. Irodalmi áttekintés	8
1.1. A fizikai aktivitás/inaktivitás és a testedzés hatásai, valamint az edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkány populáció kitenyésztésének alapjai.....	8
1.2. A vázizomzat funkciója, a mitokondrium, mitokondriális biogenezis és a mitokondriális minőség kontroll szerepe a rendszeres testedzés során	13
1.3. Szabadgyökök, fehérje karboniláció, fehérje lebontó rendszerek	18
1.4. Sirtuinok (silent information regulator)	22
1.5. A sirtuinok és a NAD ⁺ /NADH kapcsolata.....	24
1.6. Az AMPK szerepe az energiaháztartásban és a mitokondriális biogenezisben...	25
2. Célkitűzések	27
2.1. A vizsgálat célja.....	27
3. Módszerek	28
3.1. Állatok és edzés protokoll.....	28
3.2. Western blot.....	31
3.3. Karbonilált fehérjék kimutatása.....	32
3.4. Citrát szintetáz aktivitás mérés	33
3.5. NAD ⁺ /NADH szint mérése.....	33

3.6. A reaktív oxigén gyökök meghatározása.....	34
3.7. Génexpressziós vizsgálat (real-time quantitative RT-PCR).....	34
3.8. Statisztikai elemzés.....	36
4. Eredmények	37
5. Megbeszélés	54
6. Következtetések	61
7. Összefoglalás	62
8. Summary	63
9. Irodalomjegyzék	64
10. Saját publikációk jegyzéke	90
10.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények	90
10.2. Független közlemények	90
11. Köszönetnyilvánítás.....	91

Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák

1. ábra A mitokondriális biogenezis.....	16
2. ábra Mitokondriális egyensúly fenntartása.....	18
3. ábra Maximális oxigénfelvétel	38
4. ábra Futási távolság	39
5. ábra A COX-4 fehérje mennyiségi változása	40
6. ábra Citrát szintetáz aktivitás a vázizomzatból	41
7. ábra A reaktív oxigén gyökök mennyiségének változása.....	42
8. ábra NAD ⁺ /NADH arány változása a vázizomzatban	43
9. ábra A karbonilált fehérjék mennyiségi változása.....	44
10. ábra A proteaszóma R2-es alegységének mennyiségi változása	45
11. ábra A Lon proteáz mennyiségi változása.....	46
12. ábra A HSP78 fehérje mennyiségi változása	47
13. ábra Az AMPK α aktivitása (pAMPK α /AMPK α arány).....	48
14. ábra Az AMPK α mRNS expressziója	48
15. ábra A SIRT1 fehérje mennyiségi változása	49
16. ábra A PGC1- α fehérje mennyiségi változása.....	50
17. ábra Az NRF-1 fehérje mennyiségi változása	51
18. ábra A TFAM fehérje mennyiségi változása.....	52
19. ábra A Fis1 fehérje mennyiségi változása	53
20. ábra A(z) Mfn1 fehérje mennyiségi változása	53
21. ábra A kutatás során kapott eredmények összefoglalása.....	60

Táblázatok

1. táblázat A vizsgálat során felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek**32**

2. táblázat A PCR reakció során használt primerek**35**

Rövidítések jegyzéke

ADP	Adenozin-difoszfát
AICAR	5-amino-4-imidazolecarboxamide 1- β -d-ribofuranoside
AMP	Adenozin-monofoszfát
AMPK	AMP-activated protein kinase – adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
COX-4	Cytochrome c oxidase subunit 4
Ct	Cycle treshold
CS	Citrate synthase – citrát szintetáz
DNP	Dinitrophenylhydrazone – dinitrofenilhidrazon
DNPH	Dinitrophenylhydrazine – dinitrofenilhidrazin
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fis1	Fission 1 - mitokondriális fission 1 fehérje
H₂DCFDA	2-dichloridihydrofluorescein diacetate – diklorodihidrofluoreszcein diacetát
HERITAGE Family Study	Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study
HIT	High-intensity interval training - nagy intenzitású interval edzés
HRP	Horseradish Peroxidase -
HRT	High response trainers - „edzhető”/„edzésre reagáló”

HRTC	Control HRT – kontroll „edzhető”/„edzésre reagáló” csoport
HRTE	Exercised HRT – edző „edzhető”/„edzésre reagáló” csoport
HSP78	Heat shock protein – hő sokk fehérje
LonP	Lon proteáz enzim
LRT	Low response trainers – „edzésnek ellenálló”
LRTC	Control LRT – kontroll „edzésnek ellenálló” csoport
LRTE	Exercised LRT – edző „edzésnek ellenálló” csoport
Mfn1/2	Mitofusin 1/2
mRNS	Messenger RNA – hírvivő RNS
mtDNS	Mitokondriális DNS
NAD⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NRF-1	Nuclear respiratory factor 1 – nukleáris respiratorikus faktor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline – Foszfát puffer
PGC1-α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reactive oxygen species - reaktív oxigén gyökök

RT-PCR	Real-time polimerase chain reaction
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate-polyacrilamide gel electroforesis
Sir2/sirtuin	Silent mating-type information regulation 2
SIRT1-7	Humán Sir2 (Silent mating-type information regulation 2) homológok 1-7
SNPs	Single nucleotide-polymorphisms
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
TBS-T	Triss Buffered Saline Tween 20
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
VO₂max	Maximális oxigénfelvétel
WHO	World Health Organization

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A fizikai aktivitás/inaktivitás és a testedzés hatásai, valamint az edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkány populáció kitenyésztésének alapjai

A doktori disszertációm egyik fontos kutatási témája az edzhetőség, amelynek kiemelt szerepe van az élsportolók edzésében, hisz csúcsteljesítmény elérésére törekszenek, de fontos a rekreációs sport tevékenységeknél is.

Az edzhetőség alapja a fizikai aktivitás, amely minden olyan testmozgást magába foglal, amely izomösszehúzóddással jár és energia szükséges hozzá (Caspersen és mtsai 1985). A World Health Organization (WHO) adatai alapján a fizikai inaktivitás a negyedik vezető halálok, amely ~3.2 millió ember haláláért felelős világszerte. A fizikai inaktivitás az összes halálozások 6%-ért felel, „csak” a magas vérnyomás (13%), dohányzás (9%) és a vele azonos értéket képviselő magas vércukorszint (6%) előzi meg (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs385/en/>), http://www.who.int/topics/physical_activity/en/).

A fizikai aktivitás és az aerob kapacitás összefüggenek egymással (Kishida és mtsai 1997). Az alacsony aerob kapacitás számos betegség kialakulásával, kockázati tényezőjének a megjelenésével van kapcsolatban (Andersen 1995, Sullivan és mtsai 2005). Ennek alátámasztására, a háttérben álló genetikai tényezők feltárására Lauren Gerard Koch és Steven L. Britton futási képességeik alapján szelektíven tenyésztett állatmodellt hozott létre (Koch és mtsai 2001), amelynek 22. generációjával a Sporttudományi Kutató Intézet is dolgozott (Sarga és mtsai 2013, Hart és mtsai 2014).

A fizikai inaktivitás mellett, hogy számos betegség előfordulásában szerepet játszik (21-25% mell- és vastagbél rák, 27% cukorbetegség, 30% isémiás szívbetegség) (WHO) hatalmas terhet ró az ország gazdaságára, egészségügyi rendszerére (Ishizaki és mtsai 1992, Colditz 1999, Scarborough és mtsai 2011).

A fizikai aktivitásnak ezzel szemben megelőző, egészségügyi szerepe van számos életmód-függő betegség kialakulásában. A rendszeres fizikai aktivitás jótékony hatással van az elhízásra (Jakicic 2002, Lakka és mtsai 2005), csontritkulásra (K. Zhu és mtsai 2015), szív- és keringési rendszer betegségeire (Shiroma és mtsai 2010,

Countryman és mtsai 2013), cukorbetegségre (LaMonte és mtsai 2005, Van Buren és mtsai 2014), mell- és vastagbél rákra (Friedenreich és mtsai 2002, Lynch és mtsai 2011), metabolikus szindrómára (Lakka és mtsai 2007), depresszióra (Strohle 2009) és demenciára (Ahlskog és mtsai 2011). A legtöbb civilizációs betegség esetében a rendszeres fizikai aktivitásnak nemcsak elsődleges, preventív szerepe van, hanem nagy mértékben hozzájárul a már kialakult betegség tüneteinek enyhítéséhez, kezeléséhez is (Fletcher és mtsai 1996, Warburton és mtsai 2006).

Rendszeres fizikai aktivitáson (physical activity) minden olyan mozgást értünk, amely a vázizomzat segítségével jön létre és többlet energiát igényel, mint a pihenés. A rendszeres fizikai aktivitás nem egyenlő a rendszeres testedzéssel (physical exercise), bár sokszor egymás szinonimájaként használják. A rendszeres testedzésnek sok közös vonása van a fizikai aktivitással (mindkettő izomösszehúzóddással és energia felhasználással jár), de különböznek abban, hogy a testedzés tervezett, szervezett/strukturált, ismétlődő/rendszeres és célja, hogy fenntartsa vagy fejlessze a fizikai fittség egy vagy több összetevőjét (kardiovaszkuláris állóképesség, izom ereje és állóképessége, testösszetétel és hajlékonyság) (Caspersen és mtsai 1985).

Természetesen így a rendszeres testedzésnek is – akárcsak a rendszeres fizikai aktivitásnak – számos pozitív hatása van az emberi szervezetre. A rendszeres testedzés szerepet játszik a vázizomzat mitokondriális biogenezisében (Holloszy és mtsai 1984), jótékony hatással van a kardiovaszkuláris- (Joyner és mtsai 2009), a hormonális- (Pool és mtsai 2001) és a vázizom rendszerre (Holloszy 1967), valamint befolyásolja a kedélyállapotot (Zoladz és mtsai 2010) és a kognitív funkciókat is (Radak és mtsai 2001).

A rendszeres testedzés során az edzhetőség, az, hogy ki és milyen mértékben képes alkalmazkodni az adott terhelésre, fontos szerepet tölt be nemcsak az élsportban, hanem a mindennapos, rendszeres fizikai aktivitásban is. Hiszen nemcsak egy élsportolóban, hanem egy rekreatív céllal adott sportágat, sporttevékenységet űző sportolóban is felmerülhet az az igény az egészségmegőrzés mellett, hogy minél jobb legyen. Ehhez viszont fontos szerepet tölt be az, ha tisztában vagyunk az edzhetőség molekuláris alapjaival is. Az ezzel kapcsolatos kutatások eredményeit felhasználva

képesek lehetünk személyre szabott edzéstervet készíteni, tanácsot adni a rekreatív céllal sportolóknak is.

Genetikai epidemiológiai vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a kardiorespiratórikus állóképesség fenotípusának örökölhetősége 25-40% közötti, ha korhoz, nemhez és egyéb jellemzőkhöz korrigáljuk. Köztudott, hogy állóképességi edzés hatására nő a maximális oxigénfelvétel (VO_2max) és, hogy a növekedés mértékében nagy egyéni különbségek figyelhetők meg (Bouchard és mtsai 1992). Az állóképességi edzhetőség, az adott terhelésre adott válasz nagyban függ a genetikától, ahogy azt számos ikerkutatás, ill. családon belüli kutatás is alátámasztja (Bouchard és mtsai 1986).

Az egyik legátfogóbb képet a Health, Risk Factors, Exercise Training and Genetics (HERITAGE) Family Study szolgáltatja az egyéni különbségekről az edzhetőségben. A kutatásba 742 egészséges, de ülő életmódot folytató vizsgálati személyt vontak be, amelynek során egy magasan standardizált, jól-kontrollált, laboratóriumi vizsgálatokon alapuló 20 hetes állóképességi edzés programot végeztek el. A vizsgálat végén szignifikáns változásokat mértek az átlagos VO_2max és más, a kardiorespiratórikus fittséget és teljesítményt jellemző mutatókban. Míg az átlagos VO_2max növekedés $400 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1} \pm 200 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1}$ volt, addig az egyéni válaszok széles határok között mozogtak; a nincs változástól egészen az $1000 \text{ ml O}_2 \text{ min}^{-1}$ változásig (Bouchard 2012).

Szintén a HERITAGE Family Study-t felhasználva 324611 db egy pontos nukleotid-polimorfizmust (single nucleotide-polymorphisms – SNPs) tanulmányoztak, hogy beazonosíthassák azokat az a SNP-eket, amelyek összefüggésben állhatnak a VO_2max -szal. 21 SNP-ből álló panelt találtak, amelyek felelősek lehetnek a VO_2max értékek edzéshatásra bekövetkező változásában. 221 ml/min-el nőtt azon vizsgálati személyek VO_2max értéke, akik ≤ 9 kedvező allélt hordoztak, míg 604 ml/min-es növekedést értek el azok, akik ≥ 19 kedvező allélt hordoztak (Bouchard és mtsai 2011).

A maximális oxigénfelvétel –, melynek mértékét teljes kimerülésig végzett futószalagos terhelés során határozhatjuk meg – nemcsak az aerob teljesítmény növekedést jelzi, hanem szorosan összefügg a halálozással és a túléléssel is (Blair és mtsai 1989, Sandvik és mtsai 1993). Számos tanulmány számol be arról, hogy a rendszeres állóképességi edzés növeli a VO_2max értékét – ahogy azt az előzőekben

láthattuk –, és hozzájárul az átlag élettartam növekedéséhez állatok és emberek esetében egyaránt.

Goodrick tanulmányában (Goodrick 1980) 140 patkányt egész életükben ketrecekben tartottak. A ketrecek fele mókuserékkel volt szerelve, míg másik részében nem volt ilyen kerék. Az önkéntes mókuserék használata növelte mind a hím, mind a nőstény állatok átlag élettartamát a kontroll csoporthoz képest.

Egy másik vizsgálatban a mókuserék használata mellett a táplálék bevitel mennyiségét is vizsgálták nőstény patkányok esetében. Annak ellenére, hogy a mókuskereket használó állatok többet ettek, mint kontroll társaik, mindkét csoport tagjai hasonló csúcs testtömeg értéket értek el. A futó csoport átlag élettartama szignifikánsan nőtt, miközben az egyes állatok maximális életkora nem nőtt az inaktív csoporthoz képest. A kísérlet során bebizonyították, hogy a rendszeres testedzés növelte az átlagos élettartamot, és a nagyobb táplálék bevitel sem volt káros, ha az nagyobb energia leadással párosult (Hollooszy 1993).

Humán vizsgálatok során 221 egészséges felnőtt férfi bevonásával tanulmányozták, hogy a fizikai fittség, edzettség és a fiziológiai életkor milyen összefüggésben áll. Megfigyelték, hogy azok, akik jobban teljesítettek az élettani mutatókat vizsgáló, ill. a fizikai fittséget mérő tesztekben, azok fiziológiailag fiatalabbak voltak, mint kevésbé fitt, nem edzett társaik. A vizsgálat eredményei azt sugallják, hogy a jó fittségi állapot és jó fiziológiai kondíció, valamint a rendszeres testedzés késleltetni tudja az öregedéssel együtt járó élettani változásokat, és így következésképpen hozzájárulhat az élettartam növekedéséhez (Nakamura és mtsai 1996).

Egy másik tanulmányban élsportoló finn férfiak várható élettartamát és a krónikus betegségek előfordulását vizsgálták. A várható élettartam minden esetben magasabb volt az élsportolók csoportjaiban, mint a kontroll csoportban. Az átlagos élettartam növekedését főleg a kisebb mértékben előforduló kardiovaszkuláris halálozási számmal magyarázták (Sarna és mtsai 1993).

Yates és munkatársainak a vizsgálatában is szoros összefüggést találtak többek között a várható élettartam és a kisebb mértékben előforduló kardiovaszkuláris megbetegedések (pl.: magas vérnyomás) között. 1981 és 2006 között 2357 egészséges férfit (átlag életkor 72 év) vizsgáltak a Physicians' Health Study keretein belül, hogy

megállapíthatók azok a faktorok, amelyek hatással lehetnek az élettartamra. A dohányzás, cukorbetegség, magas vérnyomás vagy az ülő életmód hiánya 70 éves korban 54%-os valószínűséggel jelentette a 90 éves kor elérését. Az egészséges életmód faktorai azon kívül, hogy növelik az élettartamot, hozzájárulnak a jobb fizikai-szellemi egészséghez is (Yates és mtsai 2008).

A fizikai aktivitás egészségre kedvező hatásai, és ebből kifolyólag a fizikai aktivitás hiányából eredő betegségek kialakulása jól dokumentált, ahogy az ebből a rövid áttekintésből is látszik. Ellenben az edzhetőség mértéke és a betegségek kialakulása közti kapcsolat nem, amint azt a PubMed adatbázisban történt 2017. március 20-i keresés is tükrözi. A „*trainability and health*” kereső szavakat beírva 73 cikket kapunk. A közlemények rövid összefoglalóját elolvasva találhatunk vizsgálatokat a hormonháztartást figyelembe vevő erőedzésre (Sung és mtsai 2014) vagy egyes gén polimorfizmusokat, amelyek felelősek lehetnek az állóképességi edzés szívizomra tett hatásáról (Lin és mtsai 2017).

Az edzhetőség vizsgálata elit sportolók esetében még eléggé új területnek számít, amit a PubMed adatbázisban történő keresés is alátámaszt. A keresés 2017. március 20-án történt a következő kulcsszavak segítségével: „*trainability and top sport*”, „*trainability and elite sport*”, „*trainability and top athletes*” és „*trainability and elite athletes*”. A keresés eredményeként összesen 24 db cikket találtunk, de nagy volt az átfedés, mert egyes cikkek több kulcsszónál is megjelentek. Miután a többször is előforduló tanulmányokat kiszedtük, 16 db cikk maradt.

A cikkek átolvasása után megállapíthatjuk, hogy a publikációk egy része meghatározott gén polimorfizmussal kapcsolatban vizsgálta az edzhetőséget (Lucia és mtsai 2006, Wang és mtsai 2008, Kikuchi és mtsai 2015), míg mások egy kiválasztott paraméter értékeihez (Klusiewicz és mtsai 2014) vagy egy adott hormon szintjéhez (Haluzik és mtsai 1999) vonatkoztatva vonták le következtetéseiket az állóképességi edzettség meghatározására.

Ebből is láthatjuk, hogy az edzhetőség vizsgálata még igen csak új terület, amely így számos kérdés megválaszolását teszi lehetővé a jövőbeni kutatások által.

A rendszeres fizikai aktivitásnak számos jótékony hatása van, amit mi sem bizonyít jobban, hogy a témával kapcsolatban rengeteg tudományos kutatás készült. A

mindennapos fizikai aktivitás a legtöbb betegség és civilizációs ártalom ellen véd, de legalábbis csökkenti a kialakulásuknak a valószínűségét. Az edzhetőség kulcsszerepet játszik az élsportban, amelynek alapja a fizikai aktivitás. Ennek tanulmányozására edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkány populációt hoztak létre amerikai kutatók.

1.2. A vázizomzat funkciója, a mitokondrium, mitokondriális biogenezis és a mitokondriális minőség kontroll szerepe a rendszeres testedzés során

A maximális oxigénfelvétel – annak ellenére, hogy értéke javítható rendszeres állóképességi edzéssel, és hozzájárul az élettartam növekedéséhez – nem az egyetlen jelzője az állóképességi teljesítménynek (Timmons és mtsai 2010). A $VO_2\text{max}$ mellett a tejsav küszöb, a hatékonyság/gazdaságosság (Joyner és mtsai 2008) és a vázizomzat alkalmazkodása is fontos tényezője az állóképességi teljesítménynek (Keller és mtsai 2007). A vázizomzat mitokondriális biogenezise, mitokondriális hálózatának mennyisége és minősége szintén limitáló faktora lehet az állóképességi teljesítménynek (Baar 2004, Holloszy 2008).

A vázizomzat sok sejtmagot tartalmazó, energetikailag nagyon aktív szövet, amely jelentős hányadát (40-50%) teszi ki a teljes testtömegnek. Két különböző mitokondriumot tartalmaz. A szarkolemma alatt elhelyezkedő mitokondrium az izomban található mitokondriumok ~10-20%-át teszik ki, és főleg a membránkötések funkcióinak az energiaellátásáért felelősek, míg az intermiofibrilláris mitokondriumok (~80-90%) az adenzin-5'-trifoszfát (ATP) termelésben és az izomösszehúzódban játszanak kiemelt szerepet (Saleem és mtsai 2009, Romanello és mtsai 2010).

A mitokondrium egy kettős membránnal rendelkező fél automata sejtszervecske saját genommal, amely oxidatív módon termel energiát ATP formájában, miközben reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species – reaktív oxigén gyökök – ROS) szabadulnak fel. Számos sejtszintű folyamatban vesz részt: jelátviteli jelzőfolyamatok, sejtciklus szabályozás, oxidatív foszforiláció, termogenezis és apoptózis (Peterson és mtsai 2012).

Régóta tudjuk, hogy az állóképességi edzés növeli a vázizomban a mitokondriális biogenezist és az oxidatív kapacitást (Holloszy 1967, Gollnick és mtsai 1973, Constable és mtsai 1987, Holloszy 2004). Mitokondriális biogenezis során új mitokondriumok jönnek létre a sejtben (Jornayvaz és mtsai 2010), míg az előregedett és/vagy sérült mitokondriumok „eltűnnek”/lebontódnak (Vina és mtsai 2009), ezzel is fenntartva a szervezet homeosztázisát (Figueiredo és mtsai 2008).

A mitokondriális biogenezis fő szabályozó fehérjéje a peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1- α) (Austin és mtsai 2012). A PGC1- α transzkripciós koaktivátort 1998-ban fedezték fel a barna zsírszövetben, mint a proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) koaktivátora (Puigserver és mtsai 1998). Koaktivátorként a PPAR és a nukleáris respiratorikus faktorok (Baar 2004), estrogen-related receptor (L. L. Zhu és mtsai 2010) és forkhead box O1 (Puigserver és mtsai 2003) transzkripciós faktorokat szabályozza. A PGC1- α megtalálható a szívben (Sano és mtsai 2005), májban (Olesen és mtsai 2010), agyban (Tritos és mtsai 2003), zsírszövetben (Wan és mtsai 2014) és a vázizomban (Arany 2008) is. A mitokondriális biogenezis mellett részt vesz a zsír- és szénhidrát anyagcserében (Potthoff és mtsai 2009), angiogenezisben (Arany és mtsai 2008) és antioxidáns védekezésben (Valle és mtsai 2005), de szerepe van a gyulladáshoz vezető folyamatokban is (Handschin és mtsai 2008).

Safdar és munkatársai egerek segítségével vizsgálták az egyszeri állóképességi testedzés hatását a PGC1- α tartalomra, ill. a mitokondriális biogenezist. Megállapították, hogy edzés hatására akut növekedés figyelhető meg a PGC1- α fehérje mitokondriális szintjében, valamint a testedzés és/vagy izomösszehúzódás gyors növekedést eredményez a PGC1- α mRNS szintjében (Safdar és mtsai 2011).

Goto és munkatársai alacsony intenzitású, hosszantartó úszó edzést (2 óra úzás (4x30 perc 5 perc pihenővel) 3, ill. 7 napon keresztül) alkalmaztak patkányoknál. Az epitrochleáris izomban a PGC1- α mRNS szintjének növekedését figyelték meg a 3. (154%) és a 7. (163%) napon az edző csoportban a kontroll csoporthoz képest (Goto és mtsai 2000).

Szintén úsztatták a patkányokat abban a vizsgálatban, ahol az állatok egy csoportja 10 percet úszott 2 napon keresztül, majd 6 órával az edzés után lettek feldolgozva. Ennél a terhelésnél a PGC1- α mRNS szintjének gyors növekedését figyelték meg. Az állatok másik csoportja szintén napi 10 percet úszott, de 5 napon

keresztül. Az utolsó edzés után 18 órával távolították el az izmot, amiben a PGC1- α fehérje szintjének növekedését találták (Baar és mtsai 2002).

Egy másik vizsgálatban a kutatók arra voltak kíváncsiak, hogy az állóképességi edzés vajon képes-e valamilyen módon befolyásolni a légzési deficittel rendelkező PGC1- α knock-out egereket. Az 5 hetes, heti 5x60 perces edzéseket követően arra a megállapításra jutottak, hogy a hosszantartó edzés képes alternatív szabályozó fehérjéket aktiválni, amelyek a PGC1- α hiányában is képesek fenntartani a mitokondriális légzési lánc normális működését (Adhihetty és mtsai 2009).

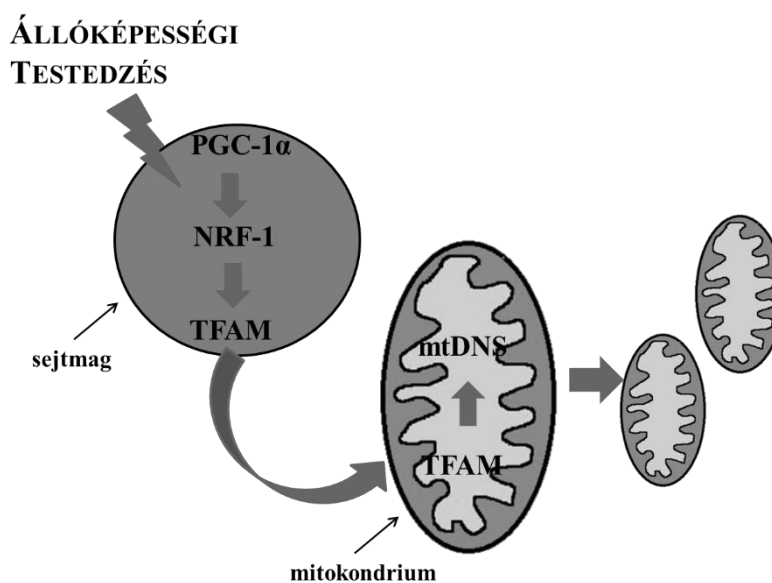
A mitokondriális biogenezis a PGC1- α – nuclear respiratory factor 1 (nukleáris respiratorikus faktor – NRF-1) – mitochondrial transcription factor A (TFAM) tengely mentén megy végbe, amelynek elindításában az előzőekben tárgyalt PGC1- α az elsődleges stimulátor (1. ábra). Az NRF-1 egy közbülső transzkripciós faktor, amely fokozza a TFAM-ot, ami a mitokondriális DNS (mtDNS) megduplázódásáért felel (Vina és mtsai 2009).

Az emlősökben található NRF-1 a sejtmagi légzésért felelős gének transzkripciójának a pozitív szabályozásáért felel. Leginkább az NRF-1 az, ami a humán mtDNS-t kódoló géneket, fehérjéket, mint a TFAM-ot is, szabályozza. Ezen kívül az NRF-1 kapcsolatban van a vas bioszintézisében közreműködő mitokondriális és citoszolikus enzimek expressziójával is. Ez a fehérje integráló szerepet játszik a sejtmagi-mitokondriális kölcsönhatásokban (Scarpulla 2006, Scarpulla 2008).

Eukarióta sejtekben a mitokondriális biogenezis folyamatához két különböző helyen (mitokondriumon, ill. a sejttagon belül) található genomra van szükség (Virbasius és mtsai 1994). Mivel a PGC1- α képes szabályozni a sejt oxidatív stresszre adott válaszát, ezért a testedzés során termelődő ROS elindíthatja a mitokondriális biogenezist azáltal, hogy aktiválja a sejttagon belül található PGC1- α -t (Vina és mtsai 2009), (Puigserver és mtsai 1998). A PGC1- α így elindítja az NRF-1 gén expresszióját, amely kapcsolatba kerül a TFAM-mal (Jornayvaz és mtsai 2010), mivel az NRF-1 rendelkezik TFAM kötő hellyel, ill. fontos szabályozója a Tfam gén expressziójának *in vitro* körülmények között (Bengtsson és mtsai 2001). A TFAM egy létfontosságú fehérje, amelyet kezdetben a(z) mtDNS nehéz és könnyű láncának transzkripciós faktoraként fedeztek fel. A TFAM – mint sejtmagi kódolású DNS-kötő fehérje – képes átkerülni a mitokondriumba (Vina és mtsai 2009), ahol a(z) mtDNS D-hurkába kötődve

felelős a replikáció és a transzkripció folyamatáért (Wu és mtsai 1999), mivel képes a DNS-t meghajlítani és legombolyítani (Kaufman és mtsai 2007).

Korábban már említettük, hogy számos tanulmány kimutatta, hogy az állóképességi testedzés növeli a PGC1- α szintjét (Wright és mtsai 2007, Safdar és mtsai 2011). Emellett a testedzés növeli az NRF-1 szintjét is (Murakami és mtsai 1998, Baar 2004), így nem meglepő módon a TFAM szintje is nő edzés hatására (Bengtsson és mtsai 2001, Irrcher és mtsai 2003).



1. ábra A mitokondriális biogenezis

Mitokondriális biogenezis során új mitokondriumok jönnek létre a sejtben, míg az előregedett és/vagy sérült mitokondriumok „eltűnnek”/lebontódnak, ezzel is fenntartva a szervezet homeosztázisát. A mitokondriális biogenezis a PGC-1 α – NRF-1 – TFAM tengely mentén megy végbe, melynek fő kiváltó tényezője az állóképességi mozgás!

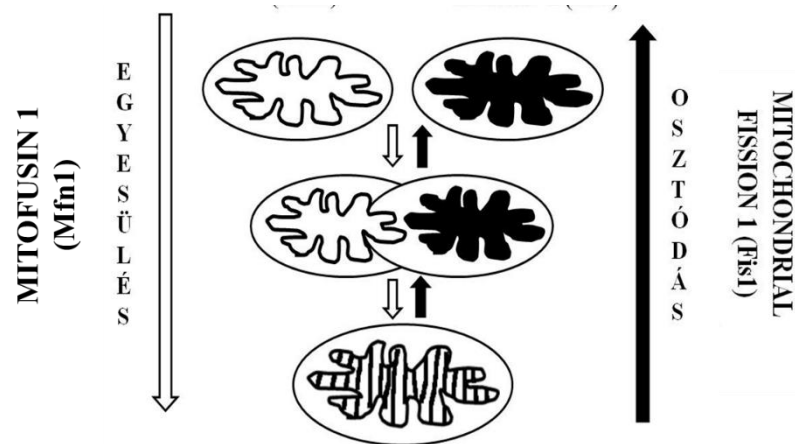
A mitokondrium egy dinamikus változó sejtsejtszervecske, amely így egy dinamikus hálózatot alkot (Romanello és mtsai 2013), melynek egyensúlyban tartásáért két ellentétes folyamat – a mitokondriális fúzió és fízió – a felelős. A fúziós folyamatokért a mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2) és az optic-atrophy-1, míg a fíziós folyamatokért a mitochondrial fission factor, a dynamine related protein és a mitokondriális fission 1 (Fis1) felel (Zungu és mtsai 2011).

A mitokondriális fúzióknak fontos szerepe van a sérült/depolarizált mitokondriális membránaktivitás javításában azáltal, hogy hozzájárul a metabolitok és a(z) mtDNS összekeveredéséhez (Zungu és mtsai 2011), így védve a sejtet a sejthaláltól (Santin és mtsai 2013). Két mitokondrium közötti fúzió képes lehet megmenteni a különböző génektől mutálódott mitokondriumokat azáltal, hogy kiegészítik egymást, és így pl. a toxikus stresszre adott válaszreakciójukban maximalizálni tudják az oxidatív kapacitásukat (Youle és mtsai 2012).

A mitokondriális fúzió a(z) mtDNS megfelelő számának a fenntartásához szükséges (Philp és mtsai 2011), és ahhoz, hogy a növekedéssel és osztódással megfelelő számú mitokondriummal népesítsék be a sejtet. A fúzió gyakran proapoptotikus szerepet játszik (Santin és mtsai 2013) azáltal, hogy elkülöníti a leginkább sérült mitokondriumokat annak érdekében, hogy megőrizze a mitokondriális hálózat egészségét/épségét (Youle és mtsai 2012) (2. ábra)

Ding és munkatársai az egyszeri terhelés hatását vizsgálták néhány, a mitokondriális funkcióval kapcsolatos gén és fehérje esetében. Azt találták, hogy az Mfn1/2 hírvivő RNS-ek (messenger RNA – mRNS), valamint az Mfn1 fehérje szintje is csökkent. A Fis1 mRNS és fehérje szintjében viszont szignifikáns növekedést tapasztaltak testedzés után (Ding és mtsai 2010).

Bo és kollégái is csökkenő Mfn1/2, míg növekvő Fis1 expressziót találtak testedzés alatt. Ezen változások nagysága a vizsgálat szerint függ a testedzés időtartamától (Bo és mtsai 2010).



2. ábra Mitokondriális egyensúly fenntartása

A mitokondrium egy dinamikus változó sejtstruktúra, melynek egyensúlyban tartásáért két ellentétes folyamat – a mitokondriális fúzió és fízió – a felelős. A fúziós folyamatokért az Mfn1, míg a fíziós folyamatokért a Fis1 felel részben.

A maximális oxigénfelvétel nemcsak az aerob teljesítményt jelzi, hanem szoros összefüggésben van a halálózással és a túléléssel is. Az állóképességi teljesítményt a maximális oxigénfelvétel, a vázizomzat mitokondriális biogeneze és mitokondriális hálózat, minősége egyaránt befolyásolja. A mitokondriális biogeneze (új mitokondriumok létrejötte) a PGC-1 α – NRF-1 – TFAM tengely mentén megy végbe, míg a dinamikus hálózat egyensúlyának fenntartásáért a Fis1 és Mfn1 nevű fehérjék a felelősek részben.

1.3. Szabadgyökök, fehérje karboniláció, fehérje lebontó rendszerek

Ahogy azt már korábban is említettük a vázizomzat sok sejtmagot tartalmazó, energetikailag nagyon aktív szövet, amely ~80-90%-ban intermiofibrilláris mitokondriumokat tartalmaz (Saleem és mtsai 2009). A mitokondrium oxidatív módon termel energiát ATP formájában (Peterson és mtsai 2012), ami az izomösszehúzódáshoz is elengedhetetlen (Huxley 1957), de a folyamat során szabadgyökök is képződnek.

A szabadgyökök olyan atomok vagy molekulák, melyek külső elektronhéján egy vagy több párosítatlan elektron található (Marzatico és mtsai 1997). A szabadgyökök

így igen instabilak és reaktívak, könnyen tudnak felvenni elektront más molekuláktól. A keletkező reaktív oxigén gyökök (ROS) képesek módosítani a sejt alkotóelemeit, a DNS-t, a fehérjéket, szénhidrátokat és lipideket (Lobo és mtsai 2010), de akár a sejt halálát is okozhatják (Orrenius 2007).

Szervezetünk antioxidáns rendszerrel rendelkezik, melynek feladata a károsodások minimalizálása, illetve megelőzése (Halliwell 1995). A sejt egy belső, enzimatis, és egy külső, a táplálkozás által bevihető antioxidáns rendszerrel rendelkezik (Sies 1997). A fő enzimatis antioxidánsok a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a kataláz és a glutation peroxidáz (Birben és mtsai 2012), melyek semlegesítik, vízzé alakítják a keletkező szabadgyököket (Ji és mtsai 2000) A SOD-nak három fajtáját különböztethetjük meg; a réz-cink-SOD a sejtplazmában, a mangán-SOD a mitokondriumban, míg az extracelluláris SOD a sejten kívül található (Zelko és mtsai 2002). A kataláz és a glutation peroxidáz a sejtplazmában és a mitokondriumban egyaránt megtalálható (Matsuo M. és mtsai 2000). A külső, nem-enzimatis antioxidánsok közé tartozik például a C-vitamin, E-vitamin, karotinoidok, hűgysav (Birben és mtsai 2012).

A szabadgyökökről egészen az 1990-es évekig azt gondolták, hogy nagy mennyiségben csak negatív hatásuk van a szervezetre, amely felelős az oxidatív stressz (amikor is a reaktív oxigén gyökök (szabadgyökök) és az antioxidáns rendszer közötti egyensúlyban zavar keletkezik (Betteridge 2000)), és az öregedés folyamatáért. Ma már tudjuk, hogy megfelelő mennyiségben szükséges bizonyos jelátviteli folyamatokhoz. A ROS indít el többek között egy olyan folyamatot, amely a mitokondriális biogenezisben kulcsszerepet játszó PGC-1 α növekedéséhez vezet. Ezenkívül szerepe van a fiziológiás és patológias körülmények között létrejövő autófágiában is. Továbbá egyre több bizonyíték van arra, hogy a ROS képes – a legtöbb esetben csökkenteni – a miogenikus differenciálódás hatékonyságát. (Barbieri és mtsai 2012).

Ahogy azt már említettük a szabadgyökök károsíthatják a fehérjéket (Lobo és mtsai 2010), amely a fehérjék karbonil kötéseinek felszaporodásával jár (Suzuki és mtsai 2010). A felszaporodott karbonil kötéseket 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) segítségével (Suzuki és mtsai 2010) könnyen ki lehet mutatni. A DNPH-ból stabil dinitrofenilhidrazon (DNP) keletkezik, amelyet spektrofotométerrel, ELISA-val

(enzyme-linked immunosorbent assay) vagy Western-blot technikával detektálhatunk (Dalle-Donne és mtsai 2003).

Karbonilált fehérjék szintjét mérték plazmában nem dohányzó, edzett férfiaknál kerékpáros ergométeren a maximális oxigénfelvételük 70, 75 és 80%-án. A karbonilált fehérjék koncentrációja a teszt után egyből, ill. 30 perccel a 75 és 80%-os VO_2 max teljesítmény mellett nőtt (de Gonzalo-Calvo és mtsai 2013).

Egy másik tanulmányban szintén az oxidatív stressz markerek növekedését figyelték meg. Itt kimerítő aerob és nem-aerob izometriás terhelés után mérték többek között a karbonilált fehérjék koncentrációját vérből. Aerob terhelés után 67%-os, míg izometriás terhelés után 12%-os növekedést figyeltek meg a karbonilált fehérje szintjében a teszt előtti állapothoz képest (Alessio és mtsai 2000).

Wadley és munkatársainak (Wadley és mtsai 2016) összefoglaló tanulmányából átfogó képet kaphatunk arra vonatkozólag, hogy melyek azok az edzésterhelési összetevők (intenzitás, időtartam, terjedelem), amelyekre a karbonilált fehérjék felhalmozódása érzékeny. Tanulmányuk alapján láthatjuk, hogy számos vizsgálat szerint magas intenzitású edzés (a VO_2 max 80%-nak megfelelő intenzitás) hatására nő a karbonilált fehérjék szintje a plazmában terhelés után. De ennek ellenkezőjére is hoznak fel példát a szakirodalomból. Magas intenzitású, szubmaximális terhelés során nem találtak változást, vagy épp csökkenő értékeket mértek a plazmában található karbonilált fehérjék szintjében. Azonban az intenzitás mellett az időtartam is fontos faktor lehet a karbonilált fehérjék felhalmozódásában. Példaként említenek egy olyan vizsgálatot, ahol a 120 percig tartó kerékpározás a VO_2 max 70%-án nagyobb növekedést eredményezett a női és férfi résztvevők plazmájában mért karbonilált fehérje szintjében, mint az ugyanekkora intenzitáson végzett 30 és 60 perces terhelés. Összefoglalásként megemlítik, hogy az edzés intenzitás ($> VO_2$ max 70%) és az időtartam (> 60 perc) tűnik a legfőbb faktoroknak, amelyeknek hatására nő a karbonilált fehérjék koncentrációja.

A felszaporodott, károsodott fehérjék számos jelátviteli folyamatra hatással lehetnek, melyek különböző rendellenességek, betegségek kialakulásért felelhetnek. A károsodott fehérjék száma függ a keletkezésük és a lebontási folyamatuk közti egyensúlytól (Chondrogianni és mtsai 2014). A sérült fehérjék lebontása két fő útvonalon történhet: az autófágiás-lizoszómás útvonalon, és a(z) ubiquitin-proteaszóma rendszeren keresztül (Pan és mtsai 2008, Chondrogianni és mtsai 2014). A proteaszóma

egy multikatalitikus rendszer, amely fontos szerepet játszik a nemkívánatos fehérjék – az ép fehérjék, a károsodott, a mutálódott vagy a feltekeredett fehérjék – lebontásában (Costa és mtsai 2007). Jelen vizsgálatunkban a proteaszóma fehérjét a PSMA6 segítségével mértük.

A(z) ubiquitin-proteaszóma rendszer az elsődleges fehérjelebontó az eukarióta sejtekben, ahol a 26S proteaszóma játssza a legfontosabb szerepet (Forster és mtsai 2013). A 26S proteaszóma egy 2,5 megadalton súlyú protein komplex, amely több mint 30 különböző fehérje alegységből épül fel. Ezek közül a legjelentősebb a központi részt képező 20S alegység, és a szabályozásért felelős 19S alegység (Voges és mtsai 1999, Kim és mtsai 2011). A(z) ubiquitináció egy ATP-függő folyamat, amely egy háromlépéses kaszkád segítségével megy végbe. Első lépésként a(z) ubiquitin-aktiváló enzim (E1) aktiválódik, amely a(z) ubiquitin-konjugáló enzim (E2) segítségével a(z) ubiquitin protein ligázhoz (E3) szállítódik, ahol a(z) ubiquitin izopeptid kötéssel a fehérje lizin oldalláncához kötődik. Az így poliubiquitinálódott fehérjét már felismeri a 26S proteaszóma, és igen rövid idő alatt rövid fehérjékké bontja le (Kim és mtsai 2011, Amm és mtsai 2014).

Egerek esetében vizsgálták az aerob edzés hatását a calpainra és a(z) ubiquitin-proteaszóma rendszerre. 8 hetes aerob edzés hatására a 26S proteaszóma aktivitás emelkedését figyelték meg (Cunha és mtsai 2012). Idős és fiatal patkányok esetében a fizikai aktivitás szintén növelte a proteaszóma aktivitást (Radak és mtsai 1999).

A(z) ubiquitin-proteaszóma rendszer mellett a mitokondriális mátrixban található Lon proteáz (LonP) is fontos szerepet játszik a proteolízis folyamata során a károsodott fehérjék eltávolításában (I. Lee és mtsai 2008), amely az autofágiáz-lizoszómás rendszer része.. A LonP egy ATP-függő proteáz, amely segít fenntartani a sejt homeosztázisát, szerepet játszik a DNS sérülések túlélésében, valamint a stressz által okozott változások káros hatásainak kiküszöbölésében (I. Lee és mtsai 2006). A LonP ezen kívül közreműködik a(z) mtDNS fenntartásában és a génexpresszió szabályozásában (Liu és mtsai 2004), részt vesz a TFAM lebontásában is, amikor a szubsztrát pl. foszforilálódik, továbbá fenntartja a TFAM/mtDNS arányt (Lu és mtsai 2013) a TFAM szelektív lebontása révén (Matsushima és mtsai 2010).

A mitokondrium oxidatív módon termel energiát, melynek során szabadgyökök képződnek. A szabadgyökök külső elektronhéján egy vagy több párosítatlan elektron található, így igen instabilak és reaktívak, károsíthatják a fehérjéket. A sérült fehérjék lebontása az autófágiasz-lizozómás, valamint a(z) ubiquitin-proteaszóma útvonalon történhet. A mitokondriális mátrixban a Lon proteáz nevű enzim vesz részt a károsodott fehérjék eltávolításában.

1.4. Sirtuinok (silent information regulator)

A vázizom működése energiaigényes folyamat (Baker és mtsai 2010, Westerblad és mtsai 2010), melynek során szabadgyökök képződnek (Powers és mtsai 2011), ill. ennek következményeként károsodhatnak a fehérjék is (Fedorova és mtsai 2009). Az anyagcsere folyamatok és a szabadgyök képződés között a kapcsolatot a sirtuin enzim család biztosítja (Li és mtsai 2011).

A sirtuinok a hiszton deacetilázok harmadik osztályát képezik, amelyek minden egyes deacetilációs ciklus során egy molekula nikotinamid adenine dinucleotide-ot (NAD⁺) igényelnek (Imai és mtsai 2000). A sirtuin fehérjék közül elsőként a silent information regulator 2-t (SIR2) fedezték fel az élesztőben (Wierman és mtsai 2014), amelynek emlősök esetében hét homológját (SIRT1-7) azonosították (Vaquero 2009). A SIRT1, SIRT6 és SIRT7 fehérjék a sejtmagban, míg a SIRT3, SIRT4 és SIRT5 a mitokondriumban találhatóak. A SIRT2-t kezdetben, mint citoszólikus fehérje írták le, de a legfrissebb kutatások alapján tudjuk, hogy a sejtmagban is megtalálható (Chang és mtsai 2014). A sirtuinok a sejt különböző részeiben találhatóak, ezért többek között az öregedési folyamatokban (Koltai és mtsai 2010, Marton és mtsai 2010), zsír- és cukor anyagcserében (Fiorino és mtsai 2014, Guclu és mtsai 2016), DNS javításban (Choi és mtsai 2014), mitokondriális biogenezisben (Sack és mtsai 2012), gyulladási folyamatokban (Hwang és mtsai 2013), daganatok kialakulásában (Ohanna és mtsai 2014), apoptózisban (Verdin és mtsai 2010), agyi funkciókban (Libert és mtsai 2013), valamint az izomrostok differenciálódásában is fontos szerepet játszanak (Fulco és mtsai 2003). Emellett feltételezzük, hogy a sirtuinok kulcsszerepet játszanak a szervezet stressz ellenállásában (Alcendor és mtsai 2007), és felelősek a kalória megszorításos diéta élettartam növelő hatásaiban (Park és mtsai 2013).

A SIRT1 már több mint egy évtizede a kutatók érdeklődésének a középpontjában áll. Azóta tudjuk róla, hogy NAD⁺-függő fehérje deacetiláz, amely a különböző anyagcsere folyamatokért felelős szövetekben kulcsszerepet játszik. Továbbá a SIRT1 szabályozza a gén expressziót, amely így számos folyamatot (pl.: energia metabolizmus, stressz válasz) szabályoz. De ezen kívül szabályozza a glükóz és lipid anyagcserét, az inzulin kiválasztást a hasnyálmirigyben, érzékeli a tápanyag elérhetőséget a hipotalamuszban, befolyásolja az elhízás kiváltotta gyulladást a makrofágokban és módosítja az anyagcserében résztvevő szövetek cirkadián ritmusát (Li 2013).

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a SIRT1 közvetítő szereppel bír az oxidatív stresszel szemben azáltal, hogy sok, az antioxidáns gének szabályozásáért felelős transzkripciós faktort közvetlenül deacetilál. Nevezetesen, a SIRT1 a forkhead box transzkripciós családdhoz tartozó számos faktort aktiválja, amelyek elősegítik a SOD2 gén expresszóját. A SIRT1 egy önszabályzó hurokban a korai növekedésért felelős early growth response fehérjével működik együtt, amely szabályozza a SOD2-t, hogy az összehúzó izomsejteket megvédje az oxidatív stressztől (Brunet és mtsai 2004, Pardo és mtsai 2012, Merksamer és mtsai 2013).

A SIRT1 mellett a sirtuin enzim család többi tagja is hozzájárul a sejtekben az oxidatív stresszre adott válaszhoz. A SIRT3 védelmet biztosíthat a tumorgenezis ellen az oxidatív stressz mechanizmusán keresztül, míg a SIRT2 deacetilálja a forkhead box O3a-t és elősegíti a sejt ellenállását a hidrogén-peroxide-dal szemben. A SIRT6 a poly (ADP-ribose) polymerase 1 mono-ADP ribozilációja során stimulálja a duplaszálú DNS törés javítását az oxidatív stresszre adott válaszban, de a SIRT7 is növeli az oxidatív stresszel szembeni ellenállást (Merksamer és mtsai 2013).

A SIRT1 fehérje szintje állóképességi testedzés hatására nő az agyban (Sarga és mtsai 2013), a vázizomban (Huang és mtsai 2016), mint ahogy az irodalmi adatok alapján ismeretes. Mint azt tudjuk a PGC1-1 α fontos szerepet játszik a testedzés által kiváltott metabolikus adaptációban vázizom esetében, amit a SIRT1 befolyásol. Suwa és munkatársai patkányok vázizomzatát vizsgálták akut edzés hatására (futópálya: 20 m/min, 18.5% meredekség, 45 perc). Az edzés után 2 órával a SIRT1, 18 órával a PGC1- α növekedését figyelték meg. Továbbá intenzitás alapján is mérték a fehérjék szintjét. 14 nappal az alacsony (futópálya: 20 m/min, 18.5% meredekség, 90 perc/nap) és

a magas (futópad: 30 m/min, 18.5% meredekség, 60 perc/nap) intenzitású edzés után is nőtt a SIRT1 szintje (Suwa és mtsai 2008).

Egy másik tanulmányban a SIRT1 szintjét edzés hatására fiatal és öreg patkányokban mérték. Itt öregedésre nőtt a SIRT1 szintje, míg a testedzés szignifikánsan növelte a SIRT1 aktivitást (Koltai és mtsai 2010).

Humán kísérletben is vizsgálták a SIRT1 változását az edzés hatására. 6 hetes nagy intenzitású interval edzés (high-intensity interval training – HIT) után az izom SIRT1 aktivitása (31%) és az aktivitás SIRT1 fehérje szintjére vonatkoztatott érték (58%) nőtt, annak ellenére, hogy a SIRT1 fehérje szintje (20%) csökkent (Gurd és mtsai 2010).

Egy másik, szintén HIT módszert alkalmazó kutatásban a külső vaskosizomban a teljes SIRT1 tartalom ~56%-kal nőtt edzés után (Little és mtsai 2010).

A sirtuinok NAD^+ -függő fehérjék, amelyek közül elsőként a SIRT2-t fedezték fel az élesztőben. Később hét homológját azonosították emlősök esetében. A sejt különböző részeiben találhatóak, számos folyamatban (öregedési folyamatok, DNS javítás, mitokondriális biogenezis, stb.) kiemelkedő szereppel bírnak. A SIRT1 szintje edzés hatására nő, ahogy azt sok tanulmány is megerősíti. Hatással van a PGC-1 α -ra, így befolyásolja a mitokondriális biogenezist.

1.5. A sirtuinok és a NAD^+ / NADH kapcsolata

Mivel a SIRT1 egy NAD^+ -függő fehérje (Pardo és mtsai 2011) ezért nem meglepő, hogy a SIRT1 aktivitása szorosan függ a környezeti változásoktól, amelyek a sejtben található NAD^+ elérhetőséget befolyásolhatják. Az alacsony energia állapot, amely létrejöhet éhezés, kalória visszafogás, testedzés során, növeli a sejt NAD^+ szintjét, amely stimulálja a SIRT1 aktivitást. Másrészt a magas energia állapot, mint a magas zsírtartalmú diéta és az akut gyulladásos folyamatok csökkentik a NAD^+ szintet, amely így csökkenti a SIRT1 aktivitást (Canto és mtsai 2012, Li 2013).

A sejtben található NAD^+ mennyisége nagyban függ a nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/Visfatin) szintjétől, hiszen NAMPT hatására lesz a nikotinamidból NAD^+ . Az emberi szervezetben, beleértve a vázizomzatot is

mindenhol jelen van a NAMPT, amely hozzásegíti a NAD^+ -ot, mint koenzimet a metabolikus-/energia folyamatokban való részvételhez, ill. a SIRT1 számára „kötelező” szubsztrátot jelent (Costford és mtsai 2010).

A NAD^+ a citoszólban, mitokondriumban és a sejtmagban található. Nyugalomban lévő ember vázizomzatában a NAD^+/NADH arány magasabb a citoszólban, mint a mitokondriumban. Állatkísérletek során edzés hatására a NADH szint csökkenését, ezáltal a NAD^+ szint és a NAD^+/NADH arány növekedését mérték. De találhatunk olyan irodalmi adatokat is, ahol a NADH nőtt és a NAD^+/NADH arány csökkent edzés során (White és mtsai 2012).

A sirtuin NAD^+ -függő fehérje, hiszen minden egyes deacetilációs ciklushoz egy NAD^+ molekula szükséges, amely így nagy mértékben függ minden olyan környezeti változástól, amelyek a sejten belül található NAD^+ mennyiségét befolyásolják.

1.6. Az AMPK szerepe az energiaháztartásban és a mitokondriális biogenezisben

Szervezetünkben az AMP-aktiválta protein kinase (AMPK) többek között a sejt és az egész szervezet energia egyensúlyának a fenntartásáért felel, de szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben is (Hardie 2008, Hardie 2011). Az izomösszehúzódnás energiaigényes folyamat, amelynek során megnő az izom ATP igénye (Romanello és mtsai 2010). Az élő szervezetek sejtjeiben az ATP és az ADP feltölthető elemhez hasonlóan működnek, ahol a feltöltés során az ATP-ből hidrolízis során ADP és foszfát keletkezik. A mitokondrium megjelenésével egy időben szükség volt egy olyan rendszer kialakulására, amely érzékeli az energia állapot változását. Ezt a szerepet az AMPK tölti be, amely nemcsak az AMP-t és ATP-t, de az ADP-t is szabályozza. Az AMPK metabolikus stressz hatására aktiválódik, amely létrejöhet az ATP lebontásából (pl.: hypoxia, ischémia) vagy megnövekedett ATP fogyasztásból (pl.: izomösszehúzódnás), valamint növekvő sejten belüli ADP:ATP és AMP:ATP arányból. Az energia homeosztázis fenntartásához az AMPK bekapcsolja a lebontó folyamatokat, amelyek ATP-t termelnek, és lekapcsolja azokat, amelyek ATP-t fogyasztanak (Hardie 2008, Richter és mtsai 2009, Hardie 2011, O'Neill 2013).

Az AMPK szabályozza a PGC1- α -t, amely mint tudjuk az NRF-1 – TFAM tengelyen keresztül felelős a mitokondriális biogeneziséért. Az AMPK közvetlenül foszforilálja a PGC1- α -t, ezzel is elősegítve a transzkripcióját (Hardie 2011).

Az AMPK a mitokondriális biogenezis fő szabályozója, amely szabályozza az intracelluláris energia metabolizmust akut energia válság esetén. Transzgenikus egerek izomzatában overexpresszálták a dominant-negative mutált AMPK-t, amelyet β -guanadinopropionic acid-dal kezeltek. Ez a kezelés nem volt hatással az AMPK aktivitásra vagy a mitokondrium tartalomra a dominant-negative mutált AMPK egerekben, de a vad típusban elősegítette az izomzat AMPK és mitokondriális biogenezis aktiválását. Más AMPK antagonistáknak, mint az 5-amino-4-imidazolecarboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR), megerősítette az AMPK aktivitást és a fő mitokondriális enzimek regulációját. (Jornayvaz és mtsai 2010).

A testedzés a legerőteljesebb fiziológiás aktivátora az AMPK-nak, amely emberek esetében növeli az AMPK aktivitását vázizomban, és rágcsálók esetében az intraabdominális zsírszövetben, májban és valószínűleg más szervekben is. Az AMPK mennyisége a vázizomban állóképességi edzés hatására változik. Edzett emberek esetében az $\alpha 1$ AMPK magasabb, mint edzetleneknél. Továbbá 3 hetes intenzív állóképességi edzés növelte az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ AMPK expresszióját fiatal, egészséges egyének esetében. (Richter és mtsai 2009).

Szervezetünkben az AMPK többek között a sejt és az egész szervezet energia egyensúlyának a fenntartásáért felel, de szerepet játszik a mitokondriális biogenezisben is. Az AMPK közvetlenül foszforilálja a PGC-1 α -t, amely az NRF-1 – TFAM tengely mentén keresztül felel a mitokondriális biogeneziséért. Az AMPK szintje testedzés hatására nő.

2. Célkitűzések

2.1. A vizsgálat célja

A doktori disszertációmban tárgyalt vizsgálat célja az volt, hogy választ kapjunk az eltérő edzhetőséggel rendelkező patkányok esetében állóképességi edzés hatására a mitokondriális biogenezisben bekövetkező különbségekre vázizomban.

Az edzhetőség nemcsak az élsportban, hanem a rekreációs tevékenységek során is kiemelt jelentőséggel bír, melynek háttérében a genetika meghatározó szerepet tölt be, ezért fontos annak tanulmányozása, hogy az eltérő genetikával rendelkező egyének esetében melyek lehetnek azok a mitokondriális biogenezissel is összefüggő faktorok, amelyek az edzhetőséget befolyásolhatják.

Jelen vizsgálatot a következő feltételezések tesztelésre terveztük:

1. Az általunk alkalmazott 12 hetes futószalagos terhelés után az LRT és HRT csoportokat vizsgálva jelentős eltérés lesz mérhető az állatok maximális oxigén felvétele és futási teljesítménye között a kontroll és az edző csoportokat illetően.
2. Az edzés által bekövetkezett változások a redox egyensúlyban szerepet játszanak az edzésre adott eltérő válaszokban.
3. Az adenosin-monofoszfát-aktiválta protein kináz (AMPK) jelentős hatással bír a vázizomzatban az edzésre.
4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó faktorok magyarázzák az LRT és HRT állatok eltérő edzhetőségét.

3. Módszerek

3.1. Állatok és edzés protokoll

Genetikailag heterogén patkány populációból (N/NIH törzs, n=152) származó, edzhetőségük alapján szelektíven tenyésztett hím patkányok 11. generációjával (n=27) végeztük vizsgálatainkat. Az „edzésnek ellenálló” (low response trainers – LRT, n=13) és „edzhető”/„edzésre reagáló” (high response trainers – HRT, n=14) vonalat a korábban már említett amerikai kutatócsoport, Lauren Gerard Koch és Steven L Britton dolgozta ki (Koch és mtsai 2013). 2001-ben egy második állatmodell kidolgozásába kezdtek azért, hogy az aerob edzéshez való alkalmazkodásról minél több információhoz jussanak. Három különböző patkány populációt elemeztek az edzhetőséghez való alkalmazkodás vizsgálata során. Az 1. populáció (n=120) 10 általában használt patkány törzsből, a 2. populáció (n=152) genetikailag heterogén N/NIH patkányokból állt. A 2. populáció állatai alkotják az alap populációt a szelektív tenyésztéshez, a 3. populáció (n=3114) létrehozásához.

Minden állatot 10 hetes korától kezdve egy 11 hetes edzés protokollnak vettetek alá, amelynek során hozzászoktatták őket a 1) futószalaghoz, 2) edzetlen állapotban megmérték a maximális futási távolságukat ($DIST^1$), 3) 8 hetes aerob edzést végeztek velük és 4) edzett állapotban is megmérték a maximális futási távolságukat ($DIST^2$).

Az edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkányok létrehozásához a N/NIH populációból (2. populáció) 10 nőstény és 10 hím patkányt választottak ki a legfelső 10, és a legalsó 10 percentilis értékből, amit az edzésre adott válasz alapján számoltak ki ($\Delta DIST = DIST^2 - DIST^1$). Így a fenotipikusan „legjobb” nőstény és hím állatok lettek a 3. populáció alapító szülői, akiből aztán kitenyésztették az általunk is vizsgált „edzésnek ellenálló” (low response trainers – LRT) és „edzhető”/„edzésre reagáló” (high response trainers – HRT) patkányok 11. generációját (Koch és mtsai 2013).

Az LRT és HRT állatok 12 hónaposak voltak a kísérlet megkezdésekor, amikor is mindegyik csoporton belül véletlenszerű módon kontroll és edző alcsoportot

alakítottunk ki: kontroll LRT (control LRT – LRTC, n=6), edző LRT (exercised LRT – LRTE, n=7), kontroll HRT (control HRT – HRTC, n=6) és edző HRT (exercised HRT – HRTE, n=8).

Az állatoknak 12 – 12 órás világos – sötét megvilágítási periódust biztosítottunk szobahőmérséklet mellett (22 ± 1 °C), amelynek során normál méretű ketrecben tartottuk őket, ketrecenként két állattal, ahol *ad libitum* fértek hozzá a táplálékhoz és vízhez. A kísérletet a helyi etikai bizottság jóváhagyásával végeztük, és betartottuk az állatkísérletekre vonatkozó előírásokat (The Guiding Principles for Care and Use of Animals, EU), melyek a Helsinkai Egyezményen (1964) alapulnak.

A 12 hétig tartó edzés első hetében a kontroll és edző csoport állatait megismertettük, hozzászoktattuk egy hat, különálló sávval rendelkező motor hajtotta futószalaghoz, amelyet a *Tektronik Kft.* egyedi megrendelés alapján készített a Sporttudományi Kutató Intézet számára. A futószalaghoz való adaptálódás első 5 napja során az állatok 10 percet futottak a futószalag 5°-os meredeksége mellett, miközben az egyes alkalmak során a sebességet fokozatosan növeltük 8 m/percről 23 m/percre.

A szoktatás, és a későbbiek során is, másokhoz hasonlóan (Koch és mtsai 2013) jártunk el azokkal az állatokkal, amelyek nem voltak hajlandóak futni, ill. lecsúsztak a szalagról. Először kézzel ösztönöztük őket, hogy továbbfussanak. Ha ez nem működött, akkor a szalag végén található elektromos árammal (áramerősség: 1.2 mA, frekvencia: 3 Hz, időtartam: 1.5 másodperc) ellátott rács használatával készítettük az állatokat a feladat elvégzésére. Természetesen ennek az utóbbi lehetőségnek az alkalmazását próbáltuk minimálisra csökkenteni, annak érdekében, hogy az állatokat minél kevesebb stressz hatásnak tegyük ki, amelyek esetleg befolyással lehetnek a későbbi eredményeinkre.

A teljes edzés 12 hétig tartott az edző állatok számára. Heti öt alkalommal 30 percet futottak 12 héten keresztül. A sebességet a csoport átlag maximális oxigénfelvételéhez (VO_2max) tartozó 70%-nak megfelelően állítottuk be, és így fokozatosan emeltük 15 m/percről 25 m/percre. Mindkét csoport VO_2max -át kéthetente mértük egy speciálisan a patkányok számára kifejlesztett, zárt rendszerű spiroergometriás készülék segítségével (*Columbus Instruments, Columbus, OH*). A maximális oxigénfelvétel mérésének napján az állatok egyéb futószalagos terhelésben már nem részesültek.

Célunk az állóképességi edzés hatásainak a vizsgálata volt, amihez a 70%-os maximális oxigénfelvételhez tartozó intenzitást irodalmi adatok (Gaesser és mtsai 1984) és saját vizsgálataink alapján választottuk (Radak és mtsai 2002, Sarga és mtsai 2013, Hart és mtsai 2014, Marton és mtsai 2015, Marton és mtsai 2016). Köztudott, hogy az aerob kapacitás fejlesztése az edzés intenzitásával, időtartamával és az edzések számával összefüggésben van. Felnőttek esetében a fittségi szint fenntartásához, ill. fejlesztéséhez a $VO_2\text{max}$ 50 – 85%-os intenzitásának megfelelő, legalább 15 – 60 perc folyamatos fizikai aktivitás ajánlott hetente 3 – 5 alkalommal (Gaesser és mtsai 1984). Ezenkívül a patkányok és az emberek $VO_2\text{max}$ értékei nagyon hasonlóak egymáshoz, amely szintén a 70%-os intenzitás mellett szólt (Kemi és mtsai 2005).

A $VO_2\text{max}$ mérése a korábbi kutatásaink során alkalmazott protokollt követte (Hart 2012, Hart és mtsai 2013, Sarga és mtsai 2013). Az első 10 perc során a futószalag nem ment, annak érdekében, hogy az állat megnyugodjon, és így meghatározhassuk a nyugalmi VO_2 értékét. A 10. perctől 10 m/perces sebességgel indítottuk a futószalagot, amit 3 percenként további 5 m/perccel emeltünk egészen az állat kifulladásáig.

A mérés során három szempontot vettünk figyelembe a $VO_2\text{max}$ meghatározásánál: 1) nem történt változás a VO_2 -ben, amikor növeltük a sebességet, 2) az állat nem tudott fennmaradni a futószalagon, és 3) a respirációs kvóciens ($RQ=VC_2/VO_2$) >1 . A $VO_2\text{max}$ mérést befejezettnek tekintettük, a vizsgálatot leállítottuk és nem ismételtük meg, ha a felsorolt szempontok közül legalább egy megvalósult. A teszt előtt mértük az állatok testsúlyát és közben a futási távolságot is.

Az állatokat az edzés protokoll befejezése után két nappal dekapitáltuk, hogy elkerüljük az utolsó edzésből eredő akut metabolikus hatásokat. A gastrocnemius izmot körültekintően eltávolítottuk az állatból, lemértük a tömegét, folyékony nitrogénbe helyeztük, majd további felhasználásig – 80 °C-on tároltuk. A szövetek egy részét lízis pufferben homogenizáltuk, ill. a $NAD^+/NADH$ arány meghatározáshoz szükséges speciális sejtalkotók szeparálásának módja a későbbiekben részletes ismertetésre kerül.

3.2. Western blot

A Western blot egy szemi-kvantitatív eljárás, amelynek segítségével meghatározható a szövetben lévő fehérjék különböző hatásokra történő lehetséges mennyiségi változása (Mahmood és mtsai 2012). Az előzőleg – 80 °C-on tárolt, fagyott gastrocnemius izomszövet homogenizálása politronnal történt. A homogenizáláshoz 10-szeres mennyiségű, enzim gátlókat (fenilmetilszulfonil fluorid, aprotinin, leupeptin hemiszulfát, sodium orthovanadát) is tartalmazó lízis puffert (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% Nonidet P-40, 10% glycerol) használtunk. A homogenizálást követően a mintákat 30 percig jégen rázattuk, majd 4 °C-on és 15300xg-n centrifugáltuk. Ezután a felülúszót átpipettázva egy új eppendorf csőbe, a mintákat további felhasználásig – 80 °C-on tároltuk.

A homogenát fehérjetartalmát a homogenizáló pufferben felhasznált detergensnek megfelelően Bradford (Bradford és mtsai 1976) módszeren alapuló Bio-Rad Protein Assay Kittel (*Bio-Rad #600-005*) végeztük. Az azonos fehérje koncentrációra hígított mintákból (5,4 mg/ml) 10 – 30 µl mennyiséget 8 – 12% töménységű (v/v) poliakrilamid gélen (Sodium Dodecil Sulfate-polyacrilamide gel electroforesis – SDS-PAGE) futtattunk, amelynek során a fehérjék az elektromos áram hatására molekulásúlyuknak megfelelően szeparálódtak. Ezután a fehérjéket – szintén elektromos áram segítségével – PVDF (Polyvinylidene Fluoride) membránra (*Immobilon-P^{SO} Membrane, Merck Millipore*) transzferáltuk. A transzfer után a membránt 5%-os zsírmentes tejporos TBS-T (Triss Buffered Saline Tween 20) vagy 1%-os Bovine Serum Albumin oldatban blokkoltuk 4 °C-on. Blokkolás után egy egész éjszakán át 4 °C-on, a kimutatni kívánt fehérje ellen termeltetett speciális antitestet tartalmazó oldattal kezeltük a membránt (1. táblázat). Az elsődleges antitesttel inkubált membránt 3x10 percig TBS-T-vel mostuk, majd blokkoló oldatban hígított HRP-konjugált (Horseradish Peroxidase) másodlagos antitesttel (1. táblázat) kezeltük további 1 órán keresztül 4 °C-on. A másodlagos antitestekkel való inkubálás után ismételt 3x10 percig TBS-T-vel mostuk a membránt. Ezt követően a membránt HRP-vel reagáló szubsztrát oldatba helyeztük 5 percre (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific #34080*). A kemilumineszcenciás reagens hatására

keletkező fényreakciót röntgen filmen rögzítettük. A fehérje csíkok intenzitását imageJ szoftverrel végeztük és α -tubulinhoz normalizáltuk, ami belső kontrollként szolgál.

1. táblázat A vizsgálat során felhasznált elsődleges és másodlagos antitestek

Elsődleges antitest/antigén			
	Hígítási arány	Gyártó	Katalógusszám
COX-4	1:1000	Santa Cruz	sc-69359
DNP	1:150	Chemicon	S7150
PSMA6	1:1000	Cell Signaling	2459
LonP1	1:500	saját készítés	
HSP78	1:5000	Abcam	ab87253
AMPKα	1:1400	Cell Signaling	2532S
pAMPKα	1:500	Cell Signaling	2535S
SIRT1	1:500	Millipore, Upstate	07-131
PGC1-α	1:500	Santa Cruz	sc-13067
TFAM	1:1000	Santa Cruz	sc-30963
NRF-1	1:1000	Santa Cruz	sc-33771
Fis1	1:500	Santa Cruz	sc-98900
Mfn1	1:3000	Santa Cruz	50330
α-tubulin	1:15000	Sigma	T6199
Másodlagos antitest/antigén			
anti goat IgG	1:3000	Sigma	A5420
anti rabbit IgG	1:3000	Sigma	A9169

3.3. Karbonilált fehérjék kimutatása

Az oxidált fehérjék mennyiségi változásának meghatározásához Oxyblot Kített (*Chemicon/Millipore, S7150*) használtunk a gyári leírásnak megfelelően. A mintákat 4-dinitrofenilhidrazinnal (DNPH) kezeltük, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk neutralizáló pufferrel (*Chemicon/Millipore*). Az így módosított fehérjéket

10%-os SDS-PA gélen megfutattuk, majd PVDF membránra blottoltuk. A transzferálás után a membránt 5%-os zsírintes tejporos Dulbecco-PBS-T-ben (Phosphate Buffered Saline+0.5% Tween 20) blokkoltuk 3 óráig és anti-DNP elsődleges antitesttel kezeltük egy éjszakán keresztül 4 °C-on. 3x10 perces PBS-T-s mosást követően a membránt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az immun komplexet kemilumineszcens szubsztrát hozzáadásával röntgenfilmen való előhívással jelenítettük meg.

3.4. Citrát szintetáz aktivitás mérés

A citrát szintetáz (CS) a citromsav-ciklus első reakcióját katalizáló folyamatszabályozó enzim. Az enzim az acetyl-koenzim-A és az oxalacetát közötti reakciót katalizálja a citromsavból. Ezt az enzimet a sértetlen mitokondrium szám becsléséhez használjuk.

A mérést Shepherd és Garland (Shepherd és mtsai 1969) leírása alapján végeztük el. Az azonos fehérje koncentrációjú mintákat triplikátumban vittük fel a 96 lyukú átlátszó mikrolemezre. A méréshez a következő reagenseket használtuk: 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 50 mM kálium-oxalacetát pH 7.5, 5 mM acetyl-CoA. Miután összemértük a reagenseket a mintával, az optikai denzitást ELISA leolvasóval (*Thermo Labsystems Multiskan EX*) 405 nm-en olvastuk le a 0., 1., 2. és 3. percben, majd az aktivitást $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ fehérje mennyiségben határoztuk meg.

3.5. NAD⁺/NADH szint mérése

Az izomszövet NAD⁺/NADH arányának meghatározásakor a NAD⁺/NADH Quantification Kit (*Bio Vision, K337-100*) gyári protokollját követtük. 20 mg szövetet NADH/NAD extrakciós pufferben homogenizáltunk, majd 10 kDa-os Microcon cut-off szűrőn átszűrtük a homogenátot. Elsőként a minta NADH mennyiségét határoztuk meg,

majd a mintában lévő NAD^+ -ot $60\text{ }^\circ\text{C}$ -ra történő felmelegítéssel (30 perc) majd lehűtéssel NADH -vá redukáltuk és a 96 lyukú átlátszó mikrolemezre mértük. Ezután a megnövekedett, teljes NADH mennyiséget (NADt) $10\text{ }\mu\text{l}$ NADH előhívó folyadék hozzáadása után 450 nm -es hullámhosszon ELISA leolvasóval (*Thermo Labsystems Multiskan EX*) detektáltunk az 5 órás folyamat során 30 percenként. A NAD^+ mennyiséget a NADt - NADH különbségéből becsültük.

3.6. A reaktív oxigén gyökök meghatározása

A teljes reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species – ROS) mennyiségének meghatározására a diklorodihidrofluoreszcein diacetátot (H_2DCFDA) használtuk (Radak és mtsai 2004). A H_2DCFDA (*Invitrogen-Molecular Probes #D399*) festékanyagot 12.5 mM -ra hígítva etanolban oldottuk fel és $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on, sötétben tároltuk. A tárolt törzsoldatot mérés előtt kálium-foszfát pufferrel $125\text{ }\mu\text{M}$ -os koncentrációra hígítottuk. A fluoreszcens reakcióban $152\text{ }\mu\text{l}$ /lyuk kálium-foszfát puffert ($\text{pH } 7.4$) vittünk fel a 96 lyukú fekete mikrolemezre, amihez $8\text{ }\mu\text{l}$ hígított izomszövet mintát mértünk és $40\text{ }\mu\text{l}$ $125\text{ }\mu\text{M}$ -os H_2DCFDA festéket adtunk, hogy elérjük a $25\text{ }\mu\text{M}$ -os végső koncentrációt. A fluoreszcens intenzitás változást 30 percen keresztül 5 percenként mértük 485 nm -es excitációs és 538 nm -es emissziós hullámhossz használatával (*Fluoroskan Ascent FL*). A fluoreszcens intenzitást a fehérjetartalommal normalizáltuk és relatív unit / mg fehérjében fejeztük ki.

3.7. Génexpressziós vizsgálat (real-time quantitative RT-PCR)

Az AMPK α (*PRKAA1*) hírvivő RNS (messenger RNS – mRNS) szintjének mérését a korábban leírtak szerint végeztük (Radak és mtsai 2011, Marosi 2012). Az RNS-t $\sim 30\text{ mg}$ izomszövetből a NucleoSpin[®] RNA/Protein kit segítségével (*Macherey-Nagel, Düren, Germany*) izoláltuk a gyári leírást követve. Az izolálás során nyert RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk a megfelelő kit felhasználásával

(*cDNA Synthesis kit, Bioline, #Biol-65026*). A real-time polimeráz láncreakciókat (real-time polymerase chain reaction – real-time PCR) Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research, Australia*) készüléssel végeztük. A mérés során SYBR Green (*EVA-Green, Biotium, #31000*) és ImmoMix (*#IMX-110C, Bioline*) reagenseket használtunk. A SYBR Green interkalálódó festék a duplaszálú DNS-hez kötődik, foton formájában leadott többletenergiaja 530 nm-en kimutatható. A bekötődött SYBR Green I mennyisége, és így a detektált jel nagysága arányos a kettős szálú DNS hosszával és mennyiségével. Mivel a SYBR Green I minden duplaszálú DNS-hez képes kötődni, a hibás koncentráció érték elkerülése érdekében a kapott PCR termékeket az olvadási görbe analízisen kívül még minden esetben agaróz gél-elektroforézissel is ellenőriztük. A következő PCR körülményeket alkalmaztuk: 95 °C 10 perc; 95 °C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (40 cikluson keresztül).

A minták „cycle threshold” (Ct) értékei a PCR reakció során minden gén esetében a 20-40 ciklusok közötti tartományba estek. Az egyes gének expresszióját relatív kvantifikálással határoztuk meg az Applied Biosystem (*User Bulletin #2*) útmutatását követve az úgynevezett $\Delta\Delta C_t$ formulát használva. A kezelt minták endogén kontrollal való normalizált (ΔC_t) expressziós értékéből kivontuk a kezelt minták értékeit ($\Delta\Delta C_t$), majd a relatív expressziót a PCR hatékonyságának figyelembe vételével határoztuk meg ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). A PCR reakció során használt primereket a 2. táblázat foglalja össze. Az AMPK α mRNS gén expresszióját β -actinhez normalizáltuk.

2. táblázat A PCR reakció során használt primerek

Primer szekvencia	
Referencia gén	
β -actin	Forward 5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3'
β -actin	Reverse 5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCT-3'
Cél (target) gén	
AMPK α	Forward 5'-GACTGGACATAAAGTTGCTGTGA-3' 23
AMPK α	Reverse 5'-GGATTTTCCCGACCACGTC-3' 19

3.8. Statisztikai elemzés

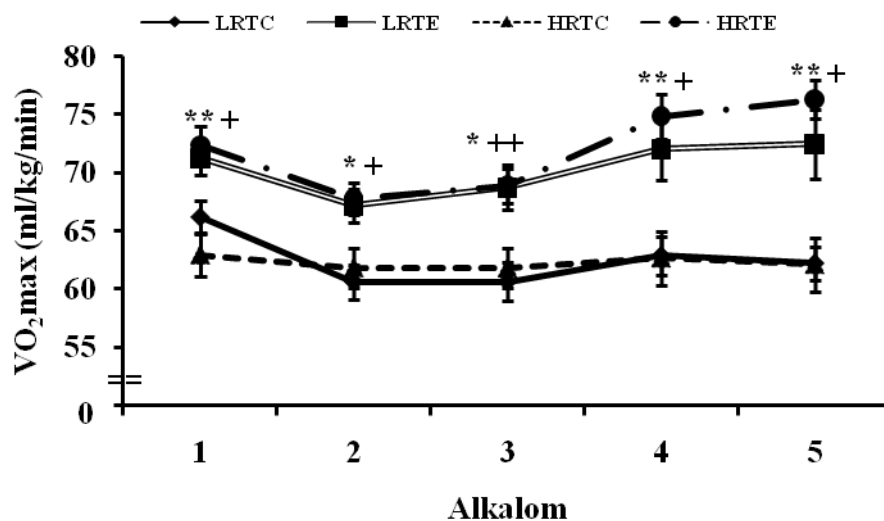
Az adatok kiértékelését, a szignifikáns különbségek megállapítását STATISTICA 11.0 programban normalitás vizsgálatot követően vizsgáltuk. Mivel a változók jelentős része nem mutatott normál eloszlást, így az összes változó elemzésénél nem paraméteres, Kruskal-Wallis ANOVA-t használtunk. Ezt követően post-hoc analízist végeztünk, melynek alapja a 2 mintás t-próba nem paraméteres vizsgálata (Mann-Whitney próba). Egyes adatok esetében nem paraméteres kétmintás t-próbát is alkalmaztunk. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ és $p < 0,01$ -nél határoztuk meg.

4. Eredmények

Az Eredmények fejezetben a szignifikáns különbségek minden esetben a csoportok közti különbségeket jelentik.

Az állatok testsúlyát a 12 hetes edzés során hetente mértük. Az „edzésnek ellenálló” és az „edzhető” állatok kiindulási testsúlya azonos volt. A harmadik mérési alkalomtól kezdve az „edzésnek ellenálló” állatok és az „edzhető” állatok edző csoportjának testsúlya folyamatosan csökkent. A(z) LRTE állatok testsúlya a kiindulási értékekhez képest szignifikánsan csökkent az edzés periódus végére ($p < 0,05$) a(z) LRTE csoporthoz képest ($422,14 \pm 15,19$ vs. $474,00 \pm 14,10$ g), valamint hasonló változást figyeltünk meg a HRTE és HRTC csoportoknál is ($410,63 \pm 9,52$ vs. $471,00 \pm 12,88$ g).

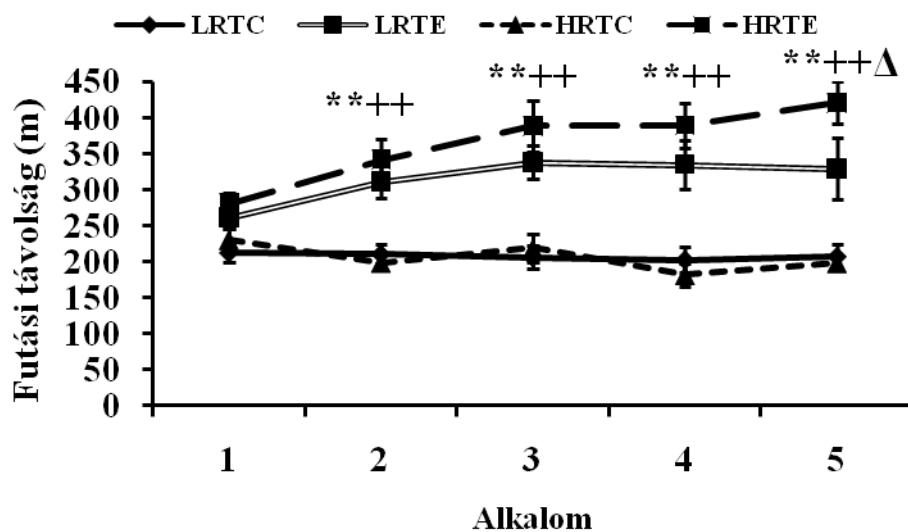
Az edzés program elkezdése előtt a maximális oxigénfelvétel ($VO_2\max$) hasonló volt a négy kísérleti csoport között – LRTE, LRTE, HRTC és HRTE –, átlagban $\sim 65 \pm 7,5$ ml/kg/min. Az állóképességi edzés szignifikánsan növelte a $VO_2\max$ szintjét a(z) LRTE és HRTE csoportokban ($p < 0,05$) a kontroll állatokhoz képest. Ez a különbség a harmadik mérési alkalomtól kezdve élesen elkülönül az edző és a kontroll csoportok között, amely a növekedés az edzés protokoll utolsó hetében sokkal erőteljesebb volt a HRTE állatok esetében ($p < 0,01$), mint a(z) LRTE állatok esetében ($p < 0,05$) (3. ábra), amit nem paraméteres kétmintás t-próbával elemeztünk.



3. ábra Maximális oxigénfelvétel

A maximális oxigénfelvétel (VO_{2max}) változása a 12 hetes edzés periódus alatt, amelyet kéthetente mértünk. Az ábrán: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, ($n=6$); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, ($n=7$); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, ($n=6$), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, ($n=8$). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * $p<0,05$ HRTC vs. HRTE, ** $p<0,01$ HRTC vs. HRTE, + $p<0,05$ LRTC vs. LRTE, ++ $p<0,01$ LRTC vs. LRTE.

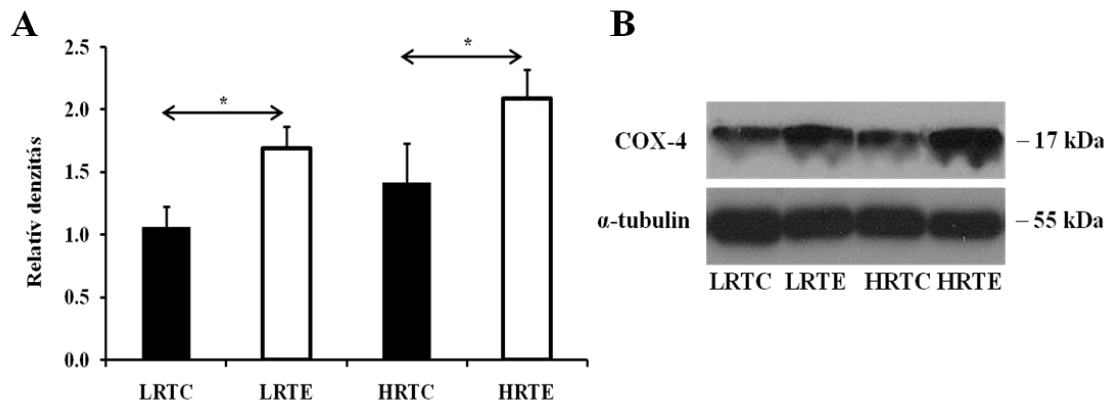
Ahogy az már a Módszerek fejezetben említésre került, a VO_{2max} teszt során az állatok futási képességét is mértük úgy, hogy rögzítettük az állatok által megtett távolságot. Hasonlóan az aerob kapacitás eredményeihez, az állóképességi edzés megkezdése előtt itt sem volt különbség a csoportok között, és a futási távolság folyamatosan és szignifikánsan nőtt az edző állatok körében a kontroll csoport tagjaihoz képest. Ezen felül szignifikáns különbséget figyelhettünk meg a(z) LRTE és HRTE csoportok között. A HRTE állatok több mint 20 %-kal nagyobb futási távolságot tettek meg az utolsó mérési alkalom során, mint a(z) LRTE csoport állatai (4. ábra).



4. ábra Futási távolság

A maximális futási távolság változása a 12 hetes edzés periódus alatt, amelyet kéthetente mértünk a VO_2max méréssel egy időben. Az ábrán: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, ($n=6$); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, ($n=7$); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, ($n=6$), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, ($n=8$). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, ** $p<0,01$ HRTC vs. HRTE, ++ $p<0,01$ LRTC vs. LRTE; $\Delta p<0,05$ LRTE vs. HRTE.

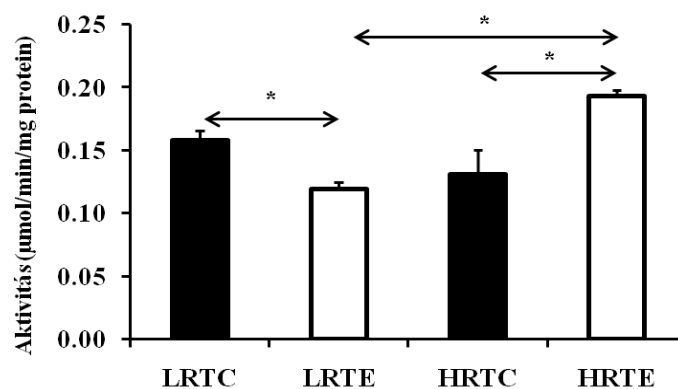
A vázizomzat mitokondrium számát a COX-4 fehérje szintjével mértük, amely során szignifikánsan különbséget mértünk a(z) LRTE és a(z) LRTE, valamint a HRTE és HRTE csoportok között (5. ábra).



5. ábra A COX-4 fehérje mennyiségi változása

A COX-4 fehérjével a vázizomzat mitokondrium számát mértük. A COX-4 fehérje mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A COX-4 fehérje mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTE – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTE – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * p <0,05.

A citrát szintetáz (CS) enzim aktivitását, ahogy azt már korábban említettük, a sértetlen mitokondrium szám megméréséhez használtuk. A CS aktivitáshoz hasonlóan a COX-4 esetében is szignifikáns különbséget mértünk az „edzésnek ellenálló” és az „edzhető” állatok kontroll és edző csoportja között. Annyi különbséget itt felfedezhetünk, hogy az „edzésnek ellenálló” kontroll és edző csoport között itt ellentétes irányú a folyamat, hiszen szignifikáns csökkenés történt. Ezenkívül a(z) LRTE és HRTE csoportok között is szignifikáns különbséget mértünk, az edző „edzhető” állatok nagyobb mértékben reagáltak az edzésre, mint az „edzésnek ellenálló” edző állatok. Ellentétben a COX-4-gyel, a CS esetében csak a HRTE állatoknál mértünk szignifikáns különbséget a HRTC vs. HRTE és LRTE vs. HRTE ($p < 0,05$) összehasonlításban. Érdekesség, hogy a CS aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt az edző LRT, mint a kontroll LRT állatokban (6. ábra).

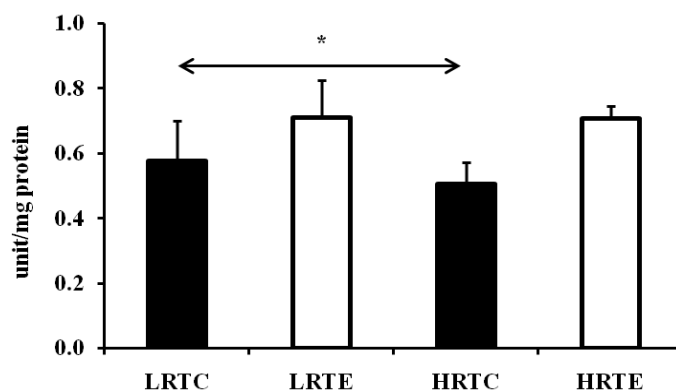


6. ábra Citrát szintetáz aktivitás a vázizomzatból

*A citrát szintetáz (CS) aktivitással a vázizomzat sértetlen mitokondrium számát mértük. Az ábrán: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag±SE, * $p < 0,05$.*

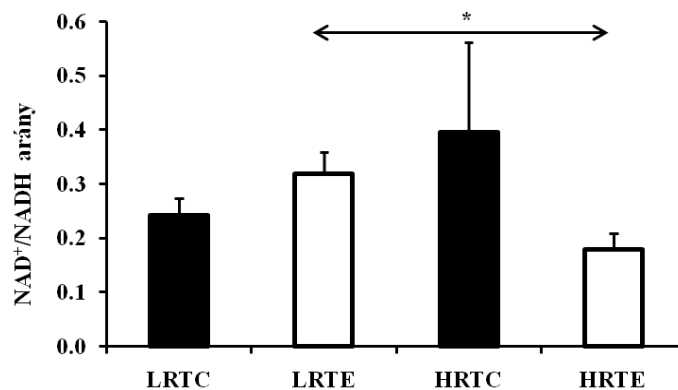
A reaktív oxigén gyökök legnagyobb része a mitokondriális légzési folyamat mellékterméke (Austin és mtsai 2011), amelynek szintjét a H₂DCFDA eljárás segítségével mértük. Szignifikánsan alacsonyabb szintet mértünk a HRT állatok kontroll csoportjában a(z) LRT állatok kontroll csoportjához képest (14 % volt a különbség a HRTC és LRTE csoportok között). Az edzés hatására növekvő tendenciát figyelhetünk meg a ROS szintjében a(z) LRT és HRT csoportoknál (7. ábra).

A ROS szint változásával ellentétes kapcsolatot találtunk a NAD^+/NADH aránynál, – amely a redox egyensúly meghatározására szolgál – mert itt csak a HRTE és LRTE csoportok között tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. A HRTC csoportban a NAD^+/NADH arány magasabb volt, mint a(z) LRTE csoportban (8. ábra).



7. ábra A reaktív oxigén gyökök mennyiségének változása

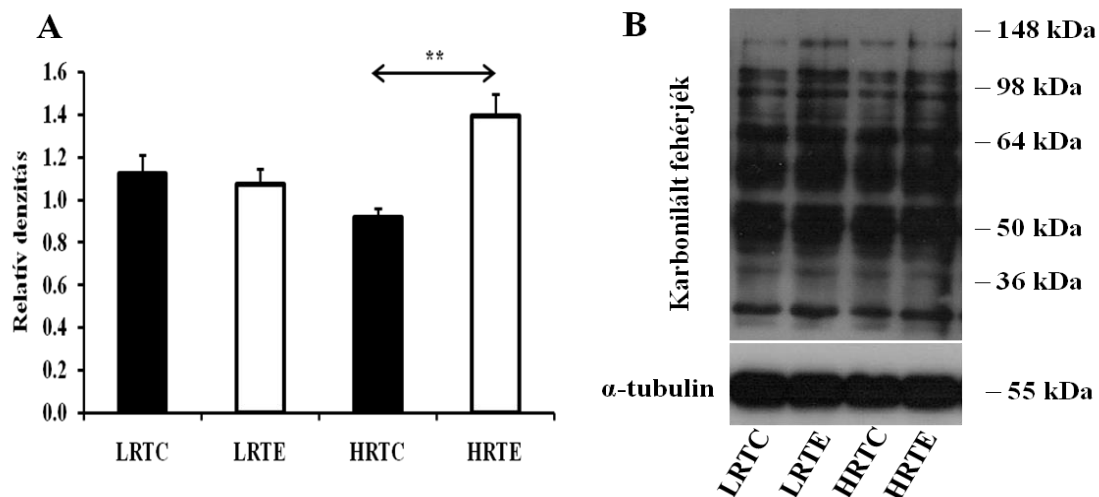
A reaktív oxigén gyökök (ROS) szintjének változását a H_2DCFDA -t felhasználva fluoreszcens eljárás során határoztuk meg. Az ábrán: LRTE – „edzésnek ellenálló”, kontroll, ($n=6$); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, ($n=7$); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, ($n=6$), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, ($n=8$). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * $p<0,05$.



8. ábra NAD⁺/NADH arány változása a vázizomzatban

A NAD⁺/NADH arány segítségével a redox folyamatok egyensúlyát mértük. Az ábrán: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag±SE, *p<0,05.

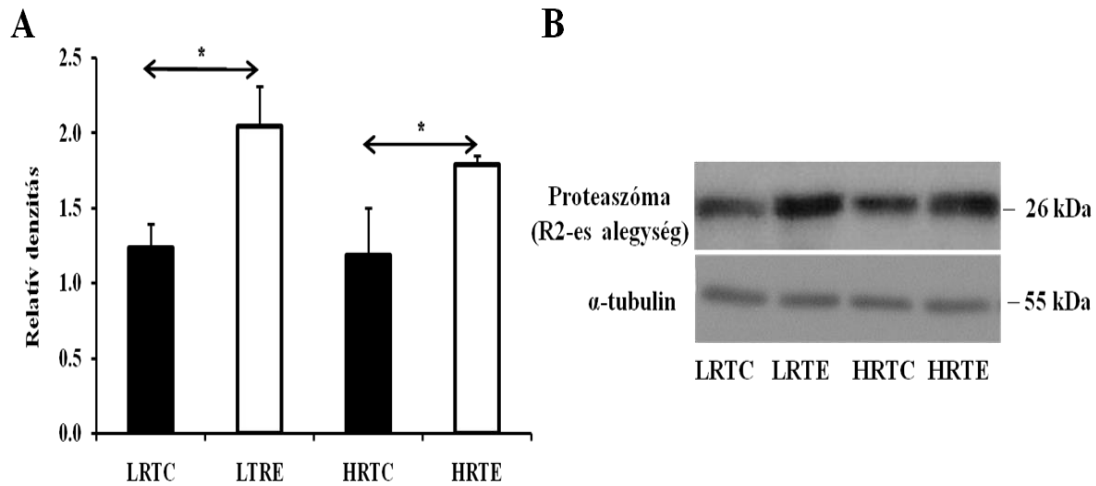
A sejtekben és szövetekben lévő fehérjéket ért oxidatív stresszt, amelyet edzés is kiválthat (Finaud és mtsai 2006), általában a reaktív karbonil származékok mennyiségével becsülhetjük (Radak és mtsai 2000). A karbonilált fehérjék érzékenyek lehetnek az intenzitásra és az időtartamra is (Wadley és mtsai 2016), ahogy az az 1.3. Szabadgyökök, fehérje karboniláció, fehérje lebontó rendszerek című fejezetben is említésre került. A karbonilálódott fehérjék felhalmozódhatnak, amelyek így számos betegség kialakulásának a forrásai lehetnek (Koltai 2011, Hart 2012). Adataink alapján szignifikáns különbséget mértünk a HRTE és a HRTC állatok között, míg a(z) LRTE csoportban nem tapasztaltunk semmiféle változást az „edzésnek ellenálló” kontroll csoporthoz képest. (9. ábra).



9. ábra A karbonilált fehérjék mennyiségi változása

*A karbonilált fehérjék szintje az oxidatív módon módosult fehérjéket jelzi. A karbonilált fehérjék mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A karbonilált fehérjék mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, **p<0,01.*

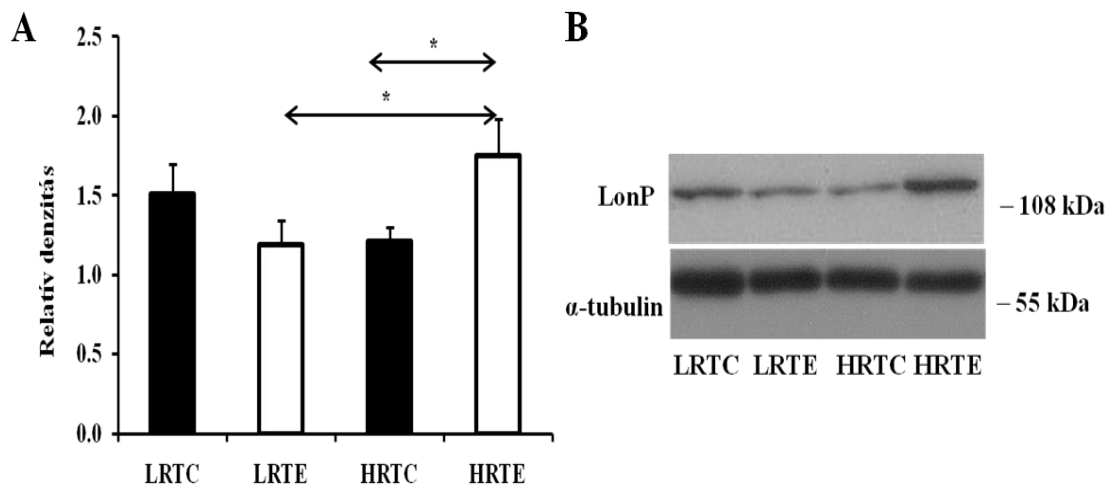
A sérült fehérjék lebontásában közreműködő enzimek közül a proteaszóma az egyik fő fehérje bontó enzim (Sorokin és mtsai 2009, Koltai 2011, Hart 2012). Edzés hatására a proteaszóma (PSMA6) általunk mért R2-es alegységének mennyisége edzés hatására mind a(z) LRT, mind a HRT csoportokban is szignifikánsan nőtt (10. ábra).



10. ábra A proteaszóma R2-es alegységének mennyiségi változása

A proteaszóma fehérje bontó enzim, amely így hozzájárul a fehérjék minőségi kontrolljához. A proteaszóma mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A proteaszóma mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * $p < 0,05$.

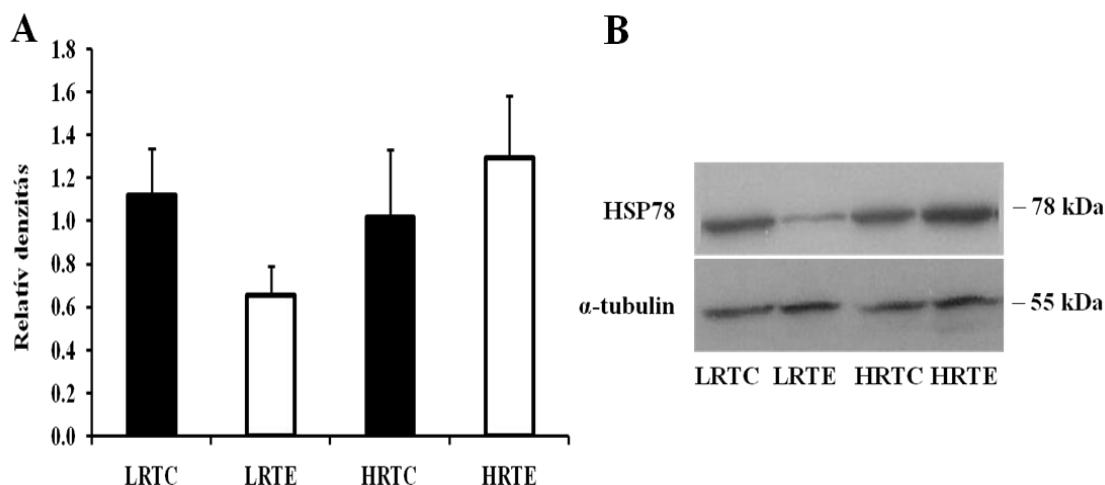
Míg a citoszólban a proteaszóma felelős a sérült fehérjék lebontásáért, addig a Lon proteáz a mitokondriumban végzi ugyanezt a feladatot (Hori és mtsai 2002, Hart 2012). Edzés hatására csak a HRT csoportban mértünk szignifikáns különbséget, az LRT csoportban nem történt változás. Továbbá szignifikáns a különbség a(z) LRTE és HRTE csoportok között (11. ábra).



11. ábra A Lon proteáz mennyiségi változása

*A Lon proteáz a mitokondriumban felelős a sérült fehérjék lebontásáért. A Lon proteáz mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A Lon proteáz mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * p <0,05.*

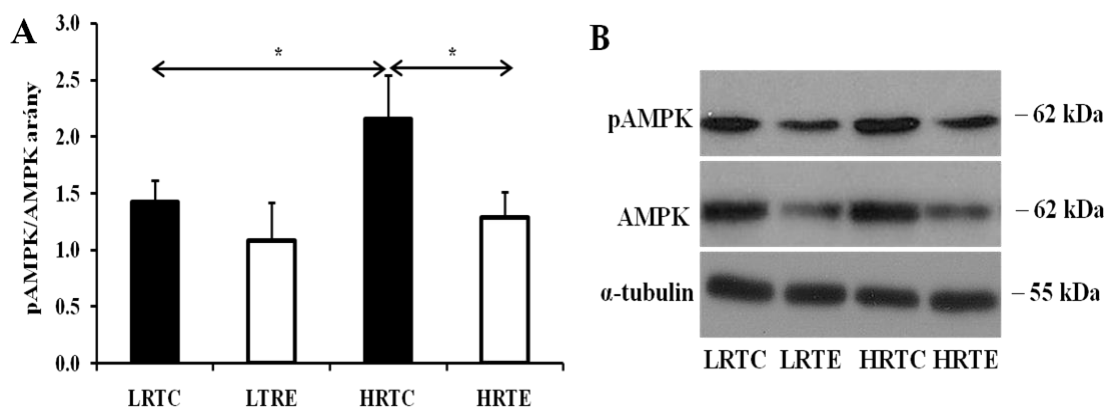
A HSP78 egy mitokondriális chaperone, amely a mitokondriumban a sérült fehérjéket jelöli meg a lebontó enzimek számára. A HSP78 szintjében nem történt változás a négy kísérleti csoporton belül (12. ábra).



12. ábra A HSP78 fehérje mennyiségi változása

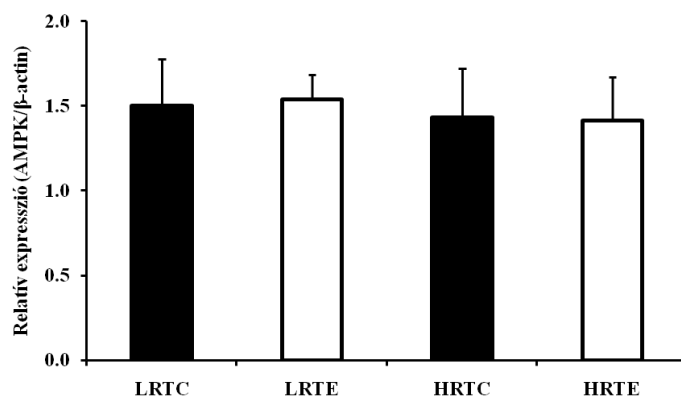
A HSP78 mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A HSP78 mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: $\text{átlag} \pm \text{SE}$.

Az AMPK α aktivitás fontos visszajelzője a vázizom edzéshez való adaptációjának (Narkar és mtsai 2008), amit mi a pAMPK α /AMPK α arányával becsültük. Szignifikáns növekedést figyelhetünk meg a HRTC csoportban a(z) LRTC, ill. a HRTE csoporthoz képest (13. ábra). A vázizomban található AMPK α fehérje mennyisége mellett megmértük az AMPK α mRNS szintjét is, de itt nem találtunk különbséget az egyes csoportok között (14. ábra).



13. ábra Az AMPK α aktivitása (pAMPK α /AMPK α arány)

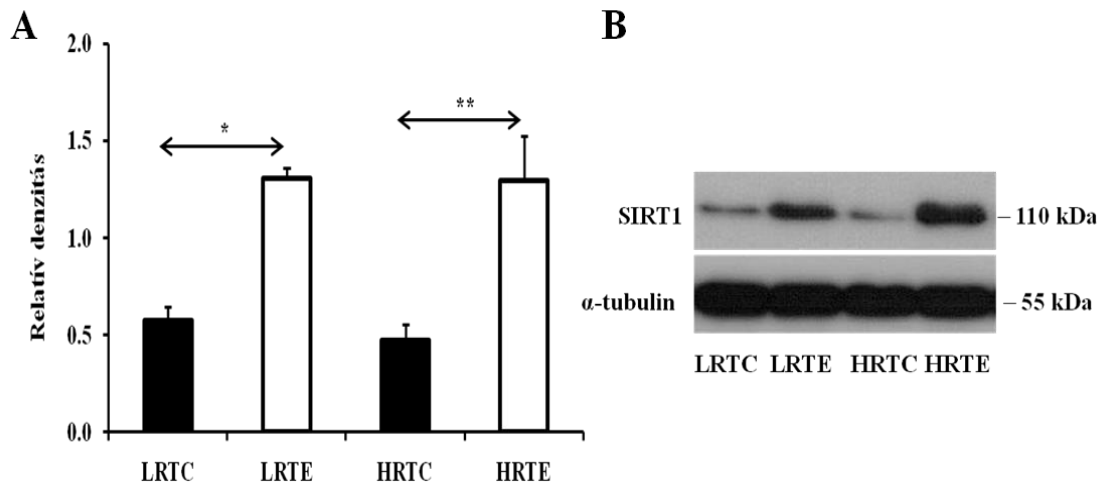
Az AMPK α aktivitás fontos visszajelzője a vázizom edzéshez való adaptációjának. Az AMPK α és a pAMPK α mennyiségi változását mutató hisztogram (A). Az AMPK α és pAMPK α mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, * $<$ p0.05.



14. ábra Az AMPK α mRNS expressziója

Az AMPK α mRNS expresszióját RT-PCR módszerrel mértük. Az ábrán: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE.

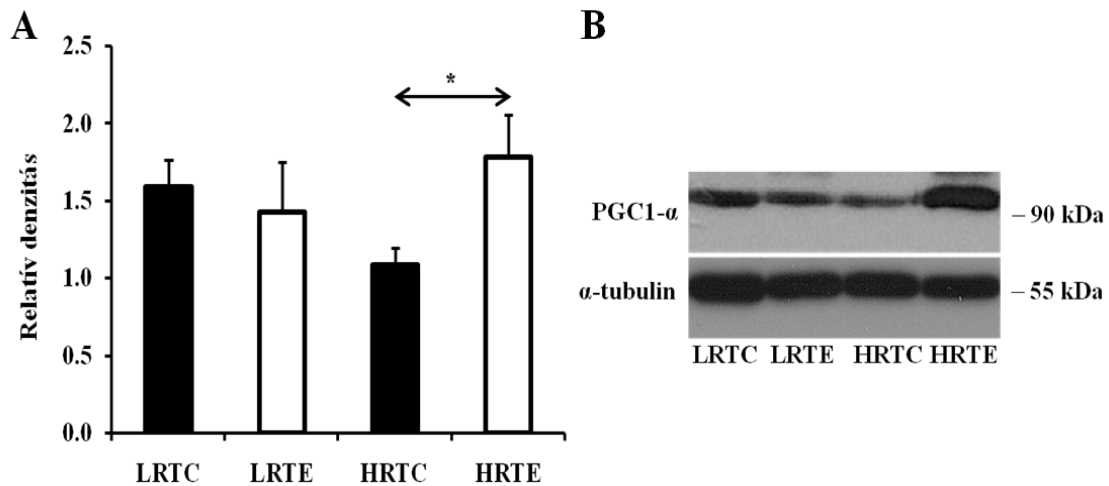
A SIRT1 fehérje érzékeny markere a metabolikus változásoknak (Li 2013). Kontroll csoportok között nem mértünk különbséget (LRTC vs. HRTC), de edzés hatására mindkét kísérleti csoportban (LRTE és HRTE) szignifikáns különbséget, növekedést mértünk a szintjében (15. ábra).



15. ábra A SIRT1 fehérje mennyiségi változása

A SIRT1 fehérje, mint metabolikus változásra érzékeny marker. A SIRT1 mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A SIRT1 mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: $\text{átlag} \pm SE$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

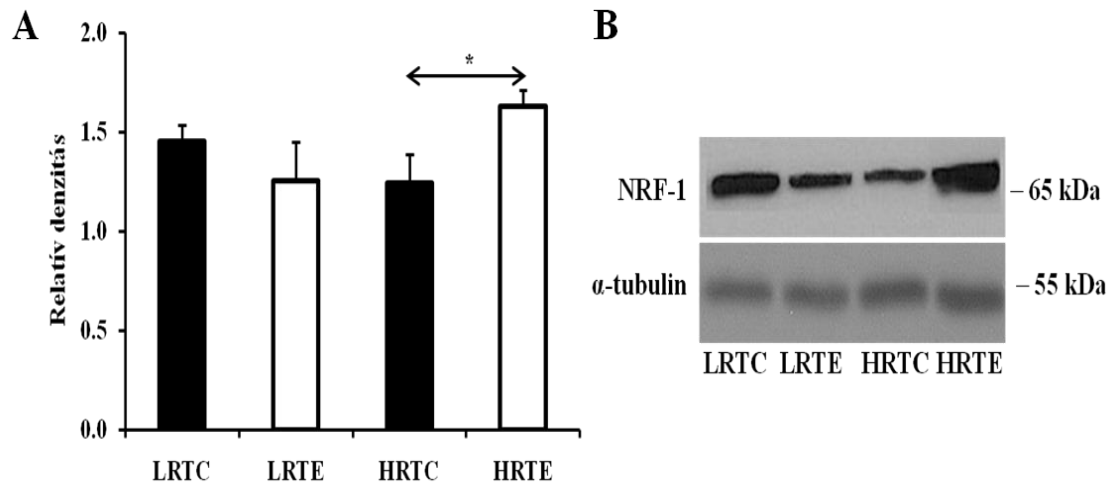
A mitokondriális biogenezis egyik fontos eleme a PGC1- α , amelyről tudott, hogy edzés hatására nő a szintje (Safdar és mtsai 2011). Ennek ellenére növekedést csak a HRTE csoportban mértünk, a(z) LRTE és a(z) LRTE csoport között nem változott a PGC1- α szintje (16. ábra).



16. ábra A PGC1- α fehérje mennyiségi változása

A PGC1- α fehérje a mitokondriális biogenezis fő szabályozója. A PGC1- α mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A PGC1- α mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, *p<0,05.

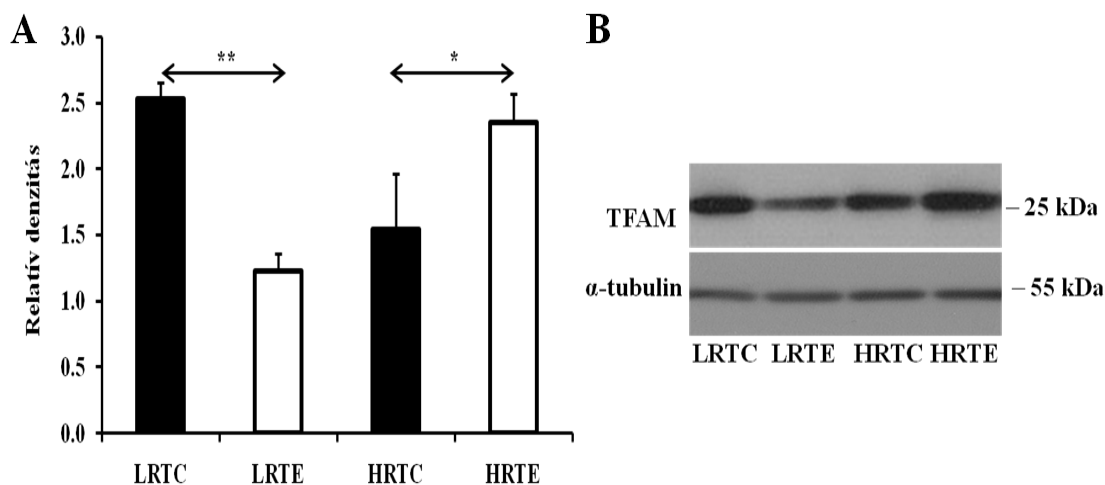
A PGC1- α szabályozza a mitokondriális biogenezisben résztvevő TFAM és NRF-1 fehérjéket. A(z) NRF-1 fehérje szintjének változása a PGC1-1 α szintjéhez hasonló mintázatot mutatott. A(z) NRF-1 edzés hatására csak a HRTE csoportban mutatott szignifikáns különbséget az „edzhető” kontroll csoporthoz képest, növekedést, míg a(z) LRTE és a(z) LRTE csoportok között nem találtunk különbséget (17. ábra).



17. ábra Az NRF-1 fehérje mennyiségi változása

Az NRF-1 fehérje a mitokondriális biogenezisben vesz részt. Az NRF-1 mennyiségi változását mutató hisztogram (A). Az NRF-1 mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTE – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTE – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: $\text{átlag} \pm SE$, $*p < 0,05$.

A TFAM fehérje szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) LRTE csoportban, mint a(z) LRTC csoportban. A HRT állatok esetében a testedzés pedig növelte ezen fehérje mennyiségét (18. ábra).

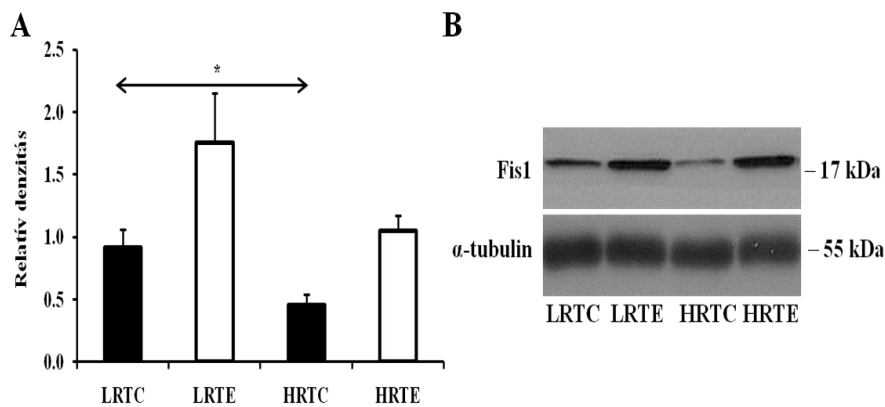


18. ábra A TFAM fehérje mennyiségi változása

A TFAM fehérje a mitokondriális biogenezisben vesz részt. A TFAM mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A TFAM mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag±SE, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

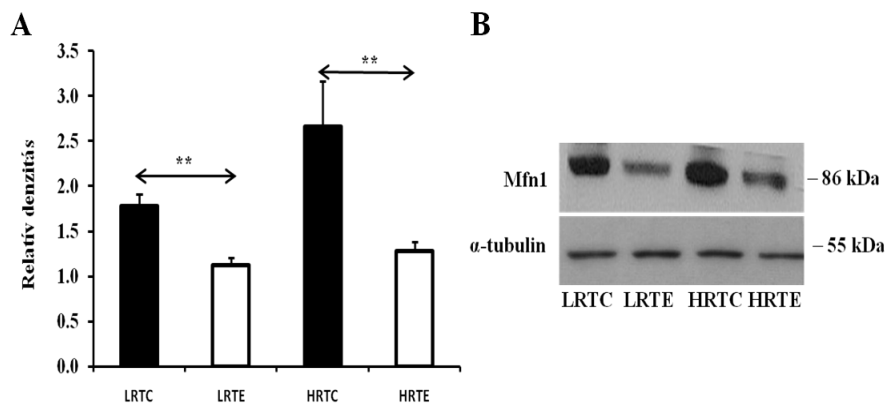
A mitokondriumok minőségi kontrolljának szabályozásáért részben fiziós és fúziós folyamatok felelnek (Chan 2006, Westermann 2010). A mitokondriumban a fiziós folyamatokért részben a Fis1 felelős, melynek szintje a HRTC állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) LRTC állatokhoz képest (19. ábra). Edzés hatására mindkét csoportban (LRT és HRT) növekvő tendenciát figyelhetünk meg a kontroll csoporthoz képest, bár szignifikáns különbséget nem sikerült kimutatnunk.

A mitokondrium fúziós folyamatáért felelős fehérje, az Mfn1 szintje ellentétesen változott a Fis1-hez képest. Kontroll körülmények között nem volt különbség, míg edzés hatására szignifikánsan csökkent a tartalma mindkét edző (LRTE és HRTE) csoportban (20. ábra).



19. ábra A Fis1 fehérje mennyiségi változása

A mitokondrium minőségi kontrolljáért felelős a Fis1 fehérje, mely a fizios folyamatokat szabályozza. A Fis1 mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A Fis1 mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, *p<0,05.



20. ábra A(z) Mfn1 fehérje mennyiségi változása

A mitokondrium minőségi kontrolljáért felelős a(z) Mfn1 fehérje, mely a fúziós folyamatokat szabályozza. A(z)Mfn1 mennyiségi változását mutató hisztogram (A). A(z)Mfn1 mennyiségének változását reprezentáló röntgen kép (B). Az (A) és (B) panelekben: LRTC – „edzésnek ellenálló”, kontroll, (n=6); LRTE – „edzésnek ellenálló”, edző, (n=7); HRTC – „edzésre reagáló”, kontroll, (n=6), HRTE – „edzésre reagáló”, edző, (n=8). A feltüntetett értékek: átlag \pm SE, **p<0,01.

5. Megbeszélés

Az edzhetőség a profi sport szintjén óriási jelentőséggel bír, de a mindennapi egészség érdekében végzett rendszeres testedzés során is kiemelt szerepe van, hisz egy amatőr sportoló is mindig fejlődni akar. Az edzhetőség egy igen összetett dolog, amely széles határok között mozog, többek között a genetika is befolyásolja. Ezért nagy kihívás egy olyan figyelemre méltó mechanizmust meghatározni, amely hozzájárulhat az ugyanarra az edzés ingerre adott eltérő reakciók alaposabb megismeréséhez, ill. ahhoz, hogy megértsük az edzhetőség hátterében zajló folyamatokat. Jelen disszertációban lehetőségünk volt edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkányokon elfogulatlanul vizsgálni az edzhetőséget, az állóképességi edzés hatását a mitokondriális biogenezisre vázizomzatban.

A vizsgálat megkezdése előtt feltételeztük, hogy *az általunk alkalmazott 12 hetes futószalagos terhelés után az LRT és HRT csoportokat vizsgálva jelentős eltérés lesz mérhető az állatok maximális oxigén felvétele és futási teljesítménye között a kontroll és az edző csoportokat illetően (1. hipotézis)*. A 12 hetes futószalagos edzés megkezdése előtt a(z) LRT és HRT állatok $VO_2\text{max}$ értékei és futási távolsága között nem találtunk szignifikáns különbséget, amely azt sugallja, hogy az edzhetőség nem függ teljes mértékben a kiindulási $VO_2\text{max}$ értékektől (Bouchard és mtsai 1999). Állóképességi edzésre adott sokkal nagyobb mértékű válasz figyelhető meg a futási távolságban a(z) LRT és HRT állatok között, mint a $VO_2\text{max}$ -nál, amely a $VO_2\text{max}$ értékekben bekövetkező változások korlátolt edzhetőségét jelzik. Ezt a megállapítást számos humán tanulmány is alátámasztja (Keller és mtsai 2011), miszerint a magas-intenzitású aerob teljesítmény nincs kapcsolatban a maximális oxigénszállító kapacitással (Vollaard és mtsai 2009), valamint a kiindulási aerob kapacitás sem pozitívan sem negatívan nincs összefüggésben a testedzés által kiváltott maximális aerob teljesítménnyel (Timmons és mtsai 2010). Továbbá, szintén humán vizsgálatokkal azt is alátámasztották, hogy az edzéshez való alkalmazkodás során az aerob teljesítményben és az aerob kapacitásban történő fejlődés egymástól függetlenül is végbemehet (Radak és mtsai 2011).

Természetesen az aerob kapacitáson kívül sok más tényező is hozzájárulhat a jobb futóteljesítményhez, amelyek magyarázatul szolgálhatnak a HRT állatok jelentősebb eredményeihez a futási távolságot illetően a 12 hetes terhelés végére, ahogy azt Weston és munkatársai tanulmányából megtudhatjuk. 9 afrikai és 8 kaukázusi közel azonos VO₂max értékekkel rendelkező 10 km-es hosszútávfutónál vizsgálták a plazma laktát szintet és a citrát szintetáz aktivitást, miközben mérték a maximális O₂ fogyasztásukat, csúcs futószalagos sebességüket (peak treadmill velocity) és a fáradással szembeni ellenállásukat egy magas intenzitású futószalagos terhelés során. Az afrikai futók fáradással szembeni ellenállása, citrát szintetáz aktivitása és 3-hydroxyacyl-CoA dehidrogenáz szintjük is magasabb volt kaukázusi társaikhoz képest, amely magyarázatot adhat az afrikai futók dominanciájára a hosszútávfutás versenyszámaiban (Weston és mtsai 1999). Más szerzők is mutattak ki kapcsolatot a plazma laktát szintje és a verseny irama között hosszútávfutás esetében (Farrell és mtsai 1979).

A mitokondriális hálózat kiemelkedő jelentőséggel bír a testedzés által kiváltott metabolikus változásokkal szembeni megküzdés folyamatában. Holloszy állatkísérleten alapuló úttörő munkája kimutatta, hogy a rendszeres testedzés növeli a mitokondriális enzimek aktivitását és a mitokondrium tartalmát is (Holloszy 1967). Holloszy felfedezését humán vizsgálatok is alátámasztják. Spina és munkatársai a citrát szintetáz aktivitás, béta-hydroxyacyl-CoA dehidrogenáz, mitokondriális tioláz és a karnitin acetyltransferáz közel 30%-os növekedéséről számolnak be edzés hatására (Spina és mtsai 1996).

Vizsgálatunk elején feltételeztük, hogy *az edzés által bekövetkezett változások a redox egyensúlyban szerepet játszanak az edzésre adott eltérő válaszokban (2. hipotézis)*. Davies és munkatársai kutatása alapján azt mondhatjuk, hogy a ROS az edzés által kiváltott mitokondriális biogenezisben fontos szerepet játszik (Davies és mtsai 1982). Ahogy azt az eredményeknél láthatjuk a ROS kiindulási szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a(z) HRT állatokban, mint a(z) LRT állatokban. A ROS nemcsak izomsejten belüli, hanem izomsejten kívüli forrásokból is termelődhet. Megerőltető terhelés izomsérülést eredményezhet, amely a neutrofilok és makrofágok aktiválódásához vezethet az interferon- γ , interleukin-1 és tumor nekrozis faktorokon keresztül. Ezek az immunsejtek nagymértékben termelnek ROS-t, amelyek a neutrofil

védelmi vonal központi elemei (Steinbacher és mtsai 2015). Vizsgálatunkban a két kontroll csoport állatainál találtuk a ROS kiindulási szintjében a különbséget, amely állatok a kéthetente esedékes futószalagos VO₂max mérésen kívül semmilyen terhelésnek nem voltak kitéve. Ezenfelül az állatok dekapitálása is 2 nappal az utolsó edzés befejezése után történt, hogy elkerüljük az akut metabolikus hatásokat. Ennek ellenére lehetséges, hogy a(z) LRT állatok kontroll csoportjában ezért detektáltunk magasabb ROS szintet. Mivel vizsgálatunk során az interferon- γ , interleukin és tumor nekrozis faktorokat nem mértük, így nem tudjuk eredményekkel alátámasztani ezt a lehetőséget, így pontos választ sem tudunk adni a két kontroll csoport között tapasztalható eltérésre. A ROS szintet H₂DCFDA segítségével mértük, amely nem mutatott különbséget a HRTE és LRTE csoport között.

Emellett a ROS számos jelző folyamatban vesz részt, a redox homeosztázis fenntartásában is, ami szorosan kapcsolódik a sejtszintű anyagcseréhez (Radak és mtsai 2012). Jelen vizsgálatunkban ellentétes irányú a ROS szintje és a NAD⁺/NADH arány az „edzésre reagáló” állatok kontroll és edző csoportja között (HRTC és HRTE csoport), amely kontrollált redox homeosztázist feltételez. A NAD⁺/NADH arány csökkenéséről növekvő intenzitású edzés mellett (10 perc edzés kerékpáron a VO₂max 40 és 70%-án) mások is beszámolnak (Sahlin és mtsai 1987), amely megfigyelések egybevágóak az általunk kapott eredményekkel. Azonban ezt a kapcsolatot nem találtuk az „edzésnek ellenálló” (LRT) csoportok között. Másrészt, a COX-4 szintjében sem mutattunk ki szignifikáns eltérést a két kontroll csoport között, ami azt sugallja, hogy a redox egyensúlyban bekövetkező lehetséges eltérések nem befolyásolják szignifikánsan a mitokondriális biogenezist. COX-4 esetében szignifikáns növekedést csak a(z) LRTE és LRTE, valamint a HRTC és HRTE csoportok között mértünk, amely eredményünk összecseng Short és munkatársai megfigyelésével, akik 16 hetes aerob edzés hatására az általunk is vizsgált markerek hasonló változását írták le. A citrát szintetáz és a citokróm c oxidáz aktivitás nőtt, de a COX-4 mRNS szintje, valamint a PGC-1 α , NRF-1 és TFAM szintje is (Short és mtsai 2003).

Disszertációmban szignifikánsan magasabb szintet figyeltünk meg a karbonilált fehérjék szintjében a HRTE patkányok csoportjában az HRTC csoportéhoz képest, míg a(z) LRT állatok esetében ilyen változást nem tapasztaltunk. A fehérje karboniláció a fehérje oxidáció egyik típusa, amelyet a ROS elősegít (Pradeep és mtsai 2013), ha nő a

ROS szintje, akkor nő a karbonilált fehérje szintje is (Nystrom 2005). A karbonilált fehérjéket a fehérjék oxidatív károsodásának markereként használjuk, azonban a mérsékelt fokú karboniláció összefüggésben lehet a fehérje turnover folyamatával (Radak és mtsai 2011). Így a fehérje karboniláció jelzi, hogy a sérült fehérjék lebontásra kerüljenek javításra, mert a karboniláció egy visszafordíthatatlan/javíthatatlan módosulás (Nystrom 2005). A fehérje degradáció szintjét a proteaszóma R2-es alegységének és a LonP fehérjének a segítségével mértük, amely housekeeping fehérjéről tudjuk, hogy a rendszeres testedzés növelni tudja a szintjüket. Ez egy fontos folyamat, mert a fehérjék oxidatív módosulásai a fehérjék funkcióvesztését eredményezik (Poppek és mtsai 2006, Radak és mtsai 2008). A(z) LRT és HRT csoportok közötti különbség hiánya a proteaszóma indukcióban azt jelezheti, hogy ez a citoszólban található fehérje független lehet az edzhetőségtől. Azonban nem ez történt a mitokondriumban lebomló oxidált fehérjékkel, mivel a LonP csak a HRTE csoportban nőtt a(z) LRTE és HRTC csoportokhoz képest. A Lon proteáz enzim szintje a HRTC csoportban alacsonyabb szinthez közelít, mint a(z) LRTE csoportban ($p=0.22$). Azonban, egy korábbi vizsgálatunk eredményeit figyelembe véve tudjuk, hogy az öregedés gátolja a Lon proteáz a vázizomban, és ennek hatását a testedzés mérsékelni képes, az állóképességi teljesítmény növelni (Koltai és mtsai 2012). Ezért nem jelenthetjük ki, hogy a Lon proteáz fehérje szerepet játszik az edzhetőségben.

Kutatásunk elején feltételeztük, hogy *az adenosin-monofoszfát-aktiválta protein kináz (AMPK) jelentős hatással bír a vázizomzatban az edzésre (3. hipotézis)*. Az AMPK-ról érdemes tudni, hogy a terhelés intenzitásának megfelelően aktiválódik, amely aktiválódást már a maximális aerob kapacitás ≈ 60 %-ánál is megfigyeltek, míg mások alacsony intenzitásnál az AMPK aktivitás hosszantartó, elnyújtott hatását találták (Richter és mtsai 2009). Az AMPK egy fontos jelző molekulája az állóképességi edzésnek, és az AMPK AICAR-ral való stimulálásával növekvő aerob teljesítményről lehet beszámolni (Narkar és mtsai 2008). A nem edző kontroll állatok csoportjai közül a HRT csoportban szignifikánsan nagyobb AMPK aktivitást mértünk, mint a(z) LRT csoportban, amely így a HRT állatok számára nagyobb érzékenységet mutat a metabolikus változások érzékelése felé. Ebből adódóan nem jelenthetjük ki egyértelműen, hogy az AMPK α aktivitással járó magasabb szint kedvezőbb metabolikus állapot jelent a jobb aerob edzhetőség számára. Az AMPK α mRNS szintjében nem

találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között, de a(z) mRNS és a fehérje szint közötti eltérés nem igazán meglepő, a(z) mRNS lebomlása, a nem megfelelő transzkripció, a(z) miRNS szabályozása vagy a megváltozott fehérje lebontás következtében. Lessard és munkatársai (Lessard és mtsai 2013) egy tanulmányukban arról számolnak be, hogy akut edzés hatására az AMPK megfelelően aktiválódott a(z) LRT és HRT állatokban, és nem valószínű, hogy kapcsolatban áll az edzés ingerre adott eltérő alkalmazkodással (Ai és mtsai 2002). Az edzésre csökkenő AMPK aktivitás a(z) LRT csoportban a citrát szintetáz csökkenéssel együtt azt sugallja, hogy a mitokondriummal összefüggő faktorok fontosak lehetnek az edzhetőség során. Valóban, az AMPK béta alegységének csökkenése a vázizomzatban csökkent edzés toleranciát eredményez anélkül, hogy jelentős változás következne be a mitokondrium tartalomban vagy a cukor anyagcserében (H. B. Lee és mtsai 1990).

Edzés hatására növekvő SIRT1 szintet mértünk az „edzésnek ellenálló” és az „edzésre reagáló” csoportokban, amely alapján feltételezhetjük, hogy a(z) LRT és HRT állatok edzhetősége közötti különbség független a SIRT1 szinttől. Érdekes, hogy a PGC1- α tartalom csak a HRTE csoportban nőtt. Jelenleg megoszlanak a vélemények arról, hogy a SIRT1 szerepet játszik-e a PGC1- α aktivációjában. Néhány tanulmány (Puigserver és mtsai 1999, Nemoto és mtsai 2005), beleértve Holloszy kutatócsoportját (Goodrick 1980) is, azt feltételezik, hogy a PGC1- α deacetilációja gátolja a SIRT1 aktivitást és a mitokondriális biogenezist, míg más cikkek a SIRT1 által deacetilált PGC1- α aktivitásról számolnak be (Lagouge és mtsai 2006, Feige és mtsai 2008, Canto és mtsai 2009).

Jelen vizsgálat célja a mitokondriális biogenezis tanulmányozása volt, amely hozzájárulhat az edzésre adott eltérő alkalmazkodás folyamatához. *Feltételeztük, hogy a mitokondriális biogenezisben szerepet játszó faktorok magyarázzák az LRT és HRT állatok eltérő edzhetőségét (4. hipotézis).* A mitokondriális biogenezist a PGC1- α , NRF-1 és TFAM fehérjék szabályozzák. Ahogy azt korábban említettük, a PGC1- α edzés hatására nőtt a HRTE csoportban a HRTE-hez képest, de nem nőtt a(z) LRTE csoportban a(z) LRTE-hez képest. A TFAM szintje edzésre csökkent az „edzésnek ellenálló” LRT állatoknál, és nőtt az „edzésre reagáló” HRT csoportban. A TFAM kapcsolatban van a magasabb aerob állóképességgel (Norrbom és mtsai 2010), amit mi is nagyobb mértékben mértünk a HRTE csoportban. A TFAM ellentétesen változik edzés

hatására a(z) LRT csoportban a HRT csoporthoz képest, amely alapján ez a fehérje limitáló faktor lehet az edzhetőségben. Ezen kívül a Lon proteáz szintje párhuzamosan változott a TFAM szintjével. A Lon proteáz közreműködik a fehérjék stabilitásában, replikációjában, transzkripciójában és translációjában is, valamint szerepet játszik a TFAM, steroidogenic acute regulatory protein és az akonitáz fehérjék lebontásában (Matsushima és mtsai 2012). Továbbá az NRF-1 a PGC1- α -hoz hasonlóan változott; az NRF-1 edzés hatására indukálódott a HRT csoportban, de a(z) LRT csoportban nem. Így a PGC1- α által szabályozott elemek csak az edzésre fogékony állatok csoportjában nőttek.

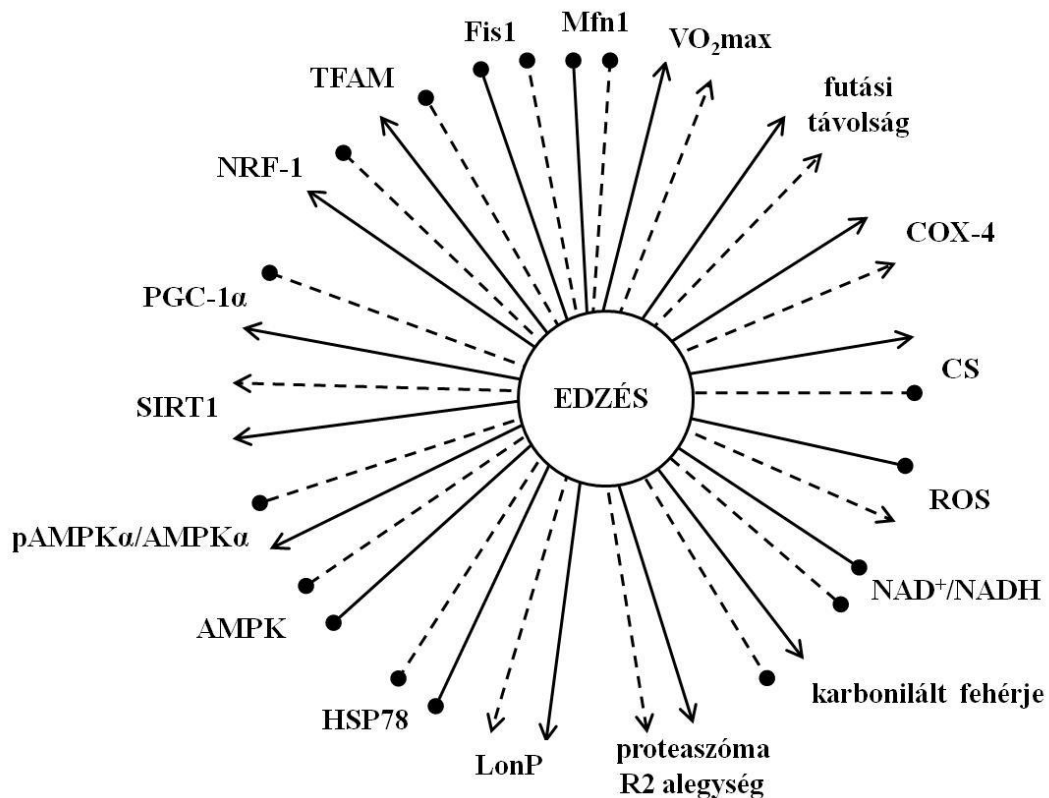
Eredményeink alapján a vázizom vizsgálatához megfogalmazott hipotézisekre a következő válaszokat adhatjuk:

1. Az általunk alkalmazott 12 hetes futószalagos terhelés után az LRT és HRT csoportokat vizsgálva jelentős eltérés lesz mérhető az állatok maximális oxigén felvétele és futási teljesítménye között a kontroll és az edző csoportokat illetően. **A kontroll csoportokhoz képest mind a(z) LRTE, mind a HRTE csoportokban szignifikáns növekedést mértünk a maximális oxigén felvétel és a futási teljesítmény esetében. Éppen ezért jelentős eltérést nem figyeltünk meg a maximális oxigén felvételnél, így ez a rész NEM IGAZolódott be, míg a futási távolságnál IGAZ a hipotézisünk, hiszen a két edző csoport között jelentős volt a különbség.**
2. Az edzés által bekövetkezett változások a redox egyensúlyban szerepet játszanak az edzésre adott eltérő válaszokban. **NEM IGAZ, mert nem találtunk egyértelmű oxidatív marker(ek)e)t, amely(ek) megmagyarázná(k) az eltérő edzhetőséget. Bár a ROS szintjében szignifikáns volt a különbség a(z) LRT és HRT állatok kontroll csoportja között.**
3. Az adenosin-monofoszfát-aktiválta protein kináz (AMPK) jelentős hatással bír a vázizomzatban az edzésre. **IGAZ, mert a HRTC és. LRTE állatok között szignifikánsan nagyobb volt az AMPK aktivitás szintje, amely nagyobb potenciált jelent a metabolikus változások érzékelése felé. Ezenkívül a**

csökkenő tendenciát mutató AMPK és szignifikánsan csökkent citrát szintetáz aktivitás a(z) LRTE állatokban szintén ezt a megfigyelést erősíti.

4. A mitokondriális biogenezisben szerepet játszó faktorok magyarázzák az LRT és HRT állatok eltérő edzhetőségét. **IGAZ, mert a vizsgált mitokondriális biogenezisben szerepet játszó PGC-1 α , NRF-1 és TFAM fehérjék edzés hatására szignifikánsan nőttek a HRT csoportban, míg a(z) LRT csoportban nem.**

A kutatás során kapott mérési eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze (21. ábra):



21. ábra A kutatás során kapott eredmények összefoglalása

LRT: - - ➔ növekedés, - - ● csökkenés;

HRT: ➔ növekedés, ● csökkenés.

6. Következtetések

Következtetésként elmondhatjuk, hogy az „edzésnek ellenálló” LRT és az „edzésre reagáló” HRT patkányok az első olyan heterogén kísérleti állatmodell képviselik, amely segítségével megérthetjük az eltérő edzhetőség háttérében álló molekuláris hálózatot (Koch és mtsai 2013). Eredményeink azt sugallják, hogy a (1) kiindulási $VO_2\text{max}$ értékek nincsenek hatással az aerob edzésre; (2) az edzés kiváltotta változások a redox egyensúlyban nem limitáló tényezők az eltérő edzhetőségnek; és (3) az AMPK aktivitás, citrát szintetáz, karbonilált fehérjék, NRF-1, PGC1- α , TFAM és a Lon proteáz állóképességi edzés során felelősek az edzhetőségért. Az „inbred” állatmodellekhez képest, ahol lényegében minden lókuszt rögzített, az „outbred” szelektált vonalak fenntartják a genetikai komplexitást, amely egyedülálló kombinációkat tesznek lehetővé az allélok variációjában többszörösen kölcsönható lókuszok esetében, amely szelektációs nyomás hatására gazdagodik (Carlborg és mtsai 2006). Transzlációs célra az „edzésnek ellenálló” és az „edzésre reagáló” szelektált vonalakban látszólag elkülönülnek a mitokondriális biogenezisért felelős elemek, és ezért elfogulatlan bizonyítékot szolgáltatnak annak a feltételezésnek a támogatására, amely szerint a növekedés és a remodeling jellemzők a felelősek az edzés során elért különbségekért (Timmons és mtsai 2010, Koch és mtsai 2012), de nem bizonyítja az okozat összefüggését (Koch és mtsai 2012).

7. Összefoglalás

Az edzhetőségnek nagy jelentősége van a mindennapi, rekreációs sporttevékenységet végzőknél és az elit sportolóknál egyaránt. Edzhetőség alapján szelektíven tenyésztett patkányokkal („edzésnek ellenálló – low response trainers (LRT) és „edzhető”/„edzésre reagáló” – high response trainers (HRT)) végeztük kutatásunkat annak érdekében, hogy az állóképességi edzés hatását vizsgáljuk a mitokondriális biogenezisre. Az állatok 3 hónapon keresztül, a hét 5 napján 30 perces futószalagos terhelésen vettek részt, ahol a sebességet a $VO_2\text{max}$ -uk 70%-nak megfelelően állítottunk be. Ahogy azt vártuk, edzés hatására szignifikáns különbséget mértünk a futási távolságban a(z) LRT és HRT állatok között. Azonban a $VO_2\text{max}$, a COX-4, a redox homeosztázist biztosító markerek (reaktív oxigén gyökök (ROS)), silent-informator-regulator 1 (SIRT1), $NAD^+/NADH$ arány, proteaszóma (R2 alegység), és a mitokondriális hálózat fenntartásáért felelős mitochondrial fission protein (Fis1) és mitochondrial fusion protein (Mfn1) vizsgálata után kijelenthetjük, hogy ezek a markerek nem befolyásolják egyértelműen az eltérő edzhetőséget a(z) LRT és HRT csoportban. Másrészt, eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az AMP-activated protein kinase alpha ($AMPK\alpha$) alap aktivitásában található különbség, és az állóképességi edzés kiváltotta változás a citrát szintetáz, karbonilált fehérje, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1- α), nuclear respiratory factor (NRF1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) és Lon proteáz szintjében limitáló tényező lehet az általunk vizsgált edzhetőség alapján szelektált patkány populációban. Eredményeinkre támaszkodva megállapíthatjuk, hogy a mitokondriális biogenezissel összefüggő faktorok eltérő módon alkalmazkodnak állóképességi edzés során az „edzésnek ellenálló” és az „edzésre reagáló” patkányokban.

8. Summary

Trainability is very important in every day recreational physical activity and professional athletes, too. In this study, we were interested in the effect of exercise in the mitochondrial biogenesis in training resistance (low response trainers (LRT)) and training sensitive (high response trainers (HRT)) rats. Rats were trained five times a week, 30 min per day for 3 months at the 70% VO_2max . As expected, we found significant difference in running distance between LRT and HRT groups. However, we declared that VO_2max , COX-4, redox homeostasis associated markers (reactive oxygen species (ROS)), silent mating-type information regulation 2 homolog (SIRT1), $NAD^+/NADH$ ratio, proteasome (R2 subunit), mitochondrial fission protein (Fis1) and mitochondrial fusion protein (Mfn1) not influence strongly the differences in trainability between LRT and HRT animals. On the other hand, we found difference in basal activity in AMP-activated protein kinase alpha ($AMPK\alpha$) level, and the endurance training-induced changes in level of citrate synthase peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1- α), nuclear respiratory factor (NRF1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) and Lon protease could limit the trainability between these studied groups. We conclude that mitochondrial biogenesis-associated factors adapt differently to aerobic exercise training in training resistance and training sensitive rats.

9. Irodalomjegyzék

Adhihetty PJ, Uguccioni G, Leick L, Hidalgo J, Pilegaard H, Hood DA (2009) The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297: C217-225.

Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC (2011) Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc*, 86: 876-884.

Ai H, Ihlemann J, Hellsten Y, Lauritzen HP, Hardie DG, Galbo H, Ploug T (2002) Effect of fiber type and nutritional state on AICAR- and contraction-stimulated glucose transport in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282: E1291-1300.

Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*, 100: 1512-1521.

Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL (2000) Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 32: 1576-1581.

Amm I, Sommer T, Wolf DH (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1843: 182-196.

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

Arany Z (2008) PGC-1 coactivators and skeletal muscle adaptations in health and disease. *Curr Opin Genet Dev*, 18: 426-434.

Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature*, 451: 1008-1012.

Austin S, Klimcakova E, St-Pierre J (2011) Impact of PGC-1alpha on the topology and rate of superoxide production by the mitochondrial electron transport chain. *Free Radic Biol Med*, 51: 2243-2248.

Austin S, St-Pierre J (2012) PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci*, 125: 4963-4971.

Baar K (2004) Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. *Proc Nutr Soc*, 63: 269-273.

Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*, 16: 1879-1886.

Baker JS, McCormick MC, Robergs RA (2010) Interaction among Skeletal Muscle Metabolic Energy Systems during Intense Exercise. *J Nutr Metab*, 2010: 905612.

Barbieri E, Sestili P (2012) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct*, 2012: 982794.

Bengtsson J, Gustafsson T, Widegren U, Jansson E, Sundberg CJ (2001) Mitochondrial transcription factor A and respiratory complex IV increase in response to exercise training in humans. *Pflugers Arch*, 443: 61-66.

Betteridge DJ (2000) What is oxidative stress? *Metabolism*, 49: 3-8.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5: 9-19.

Blair SN, Kohl HW, 3rd, Paffenbarger RS, Jr., Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW (1989) Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*, 262: 2395-2401.

Bo H, Zhang Y, Ji LL (2010) Redefining the role of mitochondria in exercise: a dynamic remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 1201: 121-128.

Bouchard C (2012) Genomic predictors of trainability. *Exp Physiol*, 97: 347-352.

Bouchard C, An P, Rice T, Skinner JS, Wilmore JH, Gagnon J, Perusse L, Leon AS, Rao DC (1999) Familial aggregation of VO₂max response to exercise training: results from the HERITAGE Family Study. *J Appl Physiol* (1985), 87: 1003-1008.

Bouchard C, Dionne FT, Simoneau JA, Boulay MR (1992) Genetics of aerobic and anaerobic performances. *Exerc Sport Sci Rev*, 20: 27-58.

Bouchard C, Lesage R, Lortie G, Simoneau JA, Hamel P, Boulay MR, Perusse L, Theriault G, Leblanc C (1986) Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. *Med Sci Sports Exerc*, 18: 639-646.

Bouchard C, Sarzynski MA, Rice TK, Kraus WE, Church TS, Sung YJ, Rao DC, Rankinen T (2011) Genomic predictors of the maximal O₂ uptake response to standardized exercise training programs. *J Appl Physiol*, 110: 1160-1170.

Bradford M, Williams W (1976) New, rapid, sensitive method for protein determination. *Fed Proc*, 35:

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303: 2011-2015.

Canto C, Auwerx J (2012) Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev*, 64: 166-187.

Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458: 1056-1060.

Carlborg O, Jacobsson L, Ahgren P, Siegel P, Andersson L (2006) Epistasis and the release of genetic variation during long-term selection. *Nat Genet*, 38: 418-420.

Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, 100: 126-131.

Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 79-99.

Chang HC, Guarente L (2014) SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 25: 138-145.

Choi JE, Mostoslavsky R (2014) Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Curr Opin Genet Dev*, 26: 24-32.

Chondrogianni N, Petropoulos I, Grimm S, Georgila K, Catalgol B, Friguet B, Grune T, Gonos ES (2014) Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med*, 35: 1-71.

Colditz GA (1999) Economic costs of obesity and inactivity. *Med Sci Sports Exerc*, 31: S663-667.

Constable SH, Favier RJ, McLane JA, Fell RD, Chen M, Holloszy JO (1987) Energy metabolism in contracting rat skeletal muscle: adaptation to exercise training. *Am J Physiol*, 253: C316-322.

Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P (2007) Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*, 59: 293-298.

Costford SR, Bajpeyi S, Pasarica M, Albarado DC, Thomas SC, Xie H, Church TS, Jubrias SA, Conley KE, Smith SR (2010) Skeletal muscle NAMPT is induced by exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E117-126.

Countryman AJ, Saab PG, Llabre MM, Penedo FJ, McCalla JR, Schneiderman N (2013) Cardiometabolic risk in adolescents: associations with physical activity, fitness, and sleep. *Ann Behav Med*, 45: 121-131.

Cunha TF, Moreira JB, Paixao NA, Campos JC, Monteiro AW, Bacurau AV, Bueno CR, Jr., Ferreira JC, Brum PC (2012) Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *J Appl Physiol* (1985), 112: 1839-1846.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329: 23-38.

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

de Gonzalo-Calvo D, Fernandez-Garcia B, de Luxan-Delgado B, Rodriguez-Gonzalez S, Garcia-Macia M, Suarez FM, Solano JJ, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A

(2013) Chronic training increases blood oxidative damage but promotes health in elderly men. *Age (Dordr)*, 35: 407-417.

Ding H, Jiang N, Liu H, Liu X, Liu D, Zhao F, Wen L, Liu S, Ji LL, Zhang Y (2010) Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1800: 250-256.

Farrell PA, Wilmore JH, Coyle EF, Billing JE, Costill DL (1979) Plasma lactate accumulation and distance running performance. *Med Sci Sports*, 11: 338-344.

Fedorova M, Kuleva N, Hoffmann R (2009) Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1792: 1185-1193.

Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, Auwerx J (2008) Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*, 8: 347-358.

Figueiredo PA, Mota MP, Appell HJ, Duarte JA (2008) The role of mitochondria in aging of skeletal muscle. *Biogerontology*, 9: 67-84.

Finaud J, Lac G, Filaire E (2006) Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36: 327-358.

Fiorino E, Giudici M, Ferrari A, Mitro N, Caruso D, De Fabiani E, Crestani M (2014) The sirtuin class of histone deacetylases: regulation and roles in lipid metabolism. *IUBMB Life*, 66: 89-99.

Fletcher GF, Balady G, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Sivarajan Froelicher ES, Froelicher VF, Pina IL, Pollock ML (1996) Statement on

exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. A statement for health professionals by the Committee on Exercise and Cardiac Rehabilitation of the Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation*, 94: 857-862.

Forster F, Unverdorben P, Sledz P, Baumeister W (2013) Unveiling the long-held secrets of the 26S proteasome. *Structure*, 21: 1551-1562.

Friedenreich CM, Orenstein MR (2002) Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr*, 132: 3456S-3464S.

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

Gaesser GA, Rich RG (1984) Effects of high- and low-intensity exercise training on aerobic capacity and blood lipids. *Med Sci Sports Exerc*, 16: 269-274.

Gollnick PD, Armstrong RB, Saltin B, Saubert CWt, Sembrowich WL, Shepherd RE (1973) Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 34: 107-111.

Goodrick CL (1980) Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, body weight, and metabolic rate. *Gerontology*, 26: 22-33.

Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T (2000) cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 274: 350-354.

Guclu A, Erdur FM, Turkmen K (2016) The Emerging Role of Sirtuin 1 in Cellular Metabolism, Diabetes Mellitus, Diabetic Kidney Disease and Hypertension. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 124: 131-139.

Gurd BJ, Perry CG, Heigenhauser GJ, Spriet LL, Bonen A (2010) High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab*, 35: 350-357.

Halliwell B (1995) How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp*, 61: 73-101.

Haluzik M, Haluzikova D, Boudova L, Nedvidkova J, Barackova M, Brandejsky P, Novotny V, Vilikus Z (1999) The relationship of serum leptin levels and parameters of endurance training status in top sportsmen. *Endocr Res*, 25: 357-369.

Handschin C, Spiegelman BM (2008) The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, 454: 463-469.

Hardie DG (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 4: S7-12.

Hardie DG (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25: 1895-1908.

Hart N (2012) A rendszeres fizikai aktivitás és a SIRT aktiválás hatása a különböző genetikai háttérrel rendelkező patkányok fiziológiai teljesítményére. *Sporttudományok Doktori Iskola*.

Hart N, Sarga L, Csende Z, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Radak Z (2014) Resveratrol attenuates exercise-induced adaptive responses in rats selectively bred for low running performance. *Dose Response*, 12: 57-71.

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

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: 2278-2282.

Holloszy JO (1993) Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. *J Gerontol*, 48: B97-100.

Holloszy JO (2004) Adaptations of skeletal muscle mitochondria to endurance exercise: a personal perspective. *Exerc Sport Sci Rev*, 32: 41-43.

Holloszy JO (2008) Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 7: 5-18.

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

Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, Yamaguchi A, Sato N, Ozawa K, Kitao Y, Miyazaki M, Harding HP, Ron D, Tohyama M, D MS, Ogawa S (2002) Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease. *J Cell Biol*, 157: 1151-1160.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs385/en/>.

http://www.who.int/topics/physical_activity/en/.

Huang CC, Wang T, Tung YT, Lin WT (2016) Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1alpha Expression Levels in Rats of Different Age. *Int J Med Sci*, 13: 260-270.

Huxley AF (1957) Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem*, 7: 255-318.

Hwang JW, Yao H, Caito S, Sundar IK, Rahman I (2013) Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic Biol Med*, 61: 95-110.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403: 795-800.

Irrcher I, Adhietty PJ, Sheehan T, Joseph AM, Hood DA (2003) PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C1669-1677.

Ishizaki M, Allen JE, Beatty PR, Stephens RS (1992) Immune specificity of murine T-cell lines to the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*, 60: 3714-3718.

Jakicic JM (2002) The role of physical activity in prevention and treatment of body weight gain in adults. *J Nutr*, 132: 3826S-3829S.

Ji LL, Hollander J (2000). Antioxidant defense: Effects of aging and exercise. *Free Radicals in Exercise and Aging*. Z. Radak, *Human Kinetics*: 35-72.

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

Joyner MJ, Coyle EF (2008) Endurance exercise performance: the physiology of champions. *J Physiol*, 586: 35-44.

Joyner MJ, Green DJ (2009) Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol*, 587: 5551-5558.

Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, Shoubbridge EA (2007) The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell*, 18: 3225-3236.

Keller P, Vollaard N, Babraj J, Ball D, Sewell DA, Timmons JA (2007) Using systems biology to define the essential biological networks responsible for adaptation to endurance exercise training. *Biochem Soc Trans*, 35: 1306-1309.

Keller P, Vollaard NB, Gustafsson T, Gallagher IJ, Sundberg CJ, Rankinen T, Britton SL, Bouchard C, Koch LG, Timmons JA (2011) A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol*, 110: 46-59.

Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U, Ellingsen O (2005) Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 67: 161-172.

Kikuchi N, Nakazato K (2015) Effective utilization of genetic information for athletes and coaches: focus on ACTN3 R577X polymorphism. *J Exerc Nutrition Biochem*, 19: 157-164.

Kim HM, Yu Y, Cheng Y (2011) Structure characterization of the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta*, 1809: 67-79.

Kishida T, Inaba R, Iwata H (1997) [Relationships between maximal oxygen uptake (VO₂max) and physical activity, blood pressure and serum lipids]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 52: 475-480.

Klusiewicz A, Starczewski M, Ladyga M, Dlugolecka B, Braksator W, Mamcarz A, Sitkowski D (2014) Reference values of maximal oxygen uptake for polish rowers. *J Hum Kinet*, 44: 121-127.

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

Koch LG, Britton SL, Wisloff U (2012) A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. *Trends Cardiovasc Med*, 22: 29-34.

Koch LG, Pollott GE, Britton SL (2013) Selectively bred rat model system for low and high response to exercise training. *Physiol Genomics*, 45: 606-614.

Koltai E (2011) Az IGF-1 és a rendszeres testedzés hatása az öregedés molekuláris folyamataira: a sirtuinok szerepe. *Sporttudományok Doktori Iskola*.

Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ, Radak Z (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 303: R127-134.

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

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006)

Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, 127: 1109-1122.

Lakka TA, Bouchard C (2005) Physical activity, obesity and cardiovascular diseases. *Handb Exp Pharmacol*, 137-163.

Lakka TA, Laaksonen DE (2007) Physical activity in prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32: 76-88.

LaMonte MJ, Blair SN, Church TS (2005) Physical activity and diabetes prevention. *J Appl Physiol* (1985), 99: 1205-1213.

Lee HB, Park MS, Chung SH, Lee YB, Kim KS, Hwang SD, Moon C (1990) Peritoneal solute clearances in diabetics. *Perit Dial Int*, 10: 85-88.

Lee I, Berdis AJ, Suzuki CK (2006) Recent developments in the mechanistic enzymology of the ATP-dependent Lon protease from *Escherichia coli*: highlights from kinetic studies. *Mol Biosyst*, 2: 477-483.

Lee I, Suzuki CK (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta*, 1784: 727-735.

Lessard SJ, Rivas DA, Alves-Wagner AB, Hirshman MF, Gallagher IJ, Constantin-Teodosiu D, Atkins R, Greenhaff PL, Qi NR, Gustafsson T, Fielding RA, Timmons JA, Britton SL, Koch LG, Goodyear LJ (2013) Resistance to aerobic exercise training causes metabolic dysfunction and reveals novel exercise-regulated signaling networks. *Diabetes*, 62: 2717-2727.

Li X (2013) SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45: 51-60.

Li X, Kazgan N (2011) Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int J Biol Sci*, 7: 575-587.

Libert S, Guarente L (2013) Metabolic and neuropsychiatric effects of calorie restriction and sirtuins. *Annu Rev Physiol*, 75: 669-684.

Lin X, Wang D, Wen L, Zhou S, Hu Y, Zhang Y (2017) Intron polymorphism in MYL1 gene is associated with individual cardiac trainability to endurance training in human myocardium. *J Sports Med Phys Fitness*, 57: 144-153.

Little JP, Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ (2010) A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol*, 588: 1011-1022.

Liu T, Lu B, Lee I, Ondrovicova G, Kutejova E, Suzuki CK (2004) DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J Biol Chem*, 279: 13902-13910.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4: 118-126.

Lu B, Lee J, Nie X, Li M, Morozov YI, Venkatesh S, Bogenhagen DF, Temiakov D, Suzuki CK (2013) Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell*, 49: 121-132.

Lucia A, Martin MA, Esteve-Lanao J, San Juan AF, Rubio JC, Oliván J, Arenas J (2006) C34T mutation of the AMPD1 gene in an elite white runner. *Br J Sports Med*, 40: e7.

Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM (2011) Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*, 186: 13-42.

Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4: 429-434.

Marosi K (2012) A rendszeres testmozgás hatása az agy öregedésére állatkísérletes modellekben. Sporttudományi Doktori Iskola.

Marton O, Koltai E, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S, Radak Z (2010) Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology*, 11: 679-686.

Marton O, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Boldogh I, Radak Z (2015) Mitochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Arch*, 467: 779-788.

Marton O, Koltai E, Takeda M, Mimura T, Pajk M, Abraham D, Koch LG, Britton SL, Higuchi M, Boldogh I, Radak Z (2016) The rate of training response to aerobic exercise affects brain function of rats. *Neurochem Int*, 99: 16-23.

Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G (1997) Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness*, 37: 235-239.

Matsuo M., Kaneko T (2000). The chemistry of reactive oxygen specieses and related free radicals. *Free Radicals in Exercise and Aging*. Z. Radak, *Human Kinetics*: 1-34.

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

Matsushima Y, Kaguni LS (2012) Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim Biophys Acta*, 1819: 1080-1087.

Merksamer PI, Liu Y, He W, Hirschev MD, Chen D, Verdin E (2013) The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging (Albany NY)*, 5: 144-150.

Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, Fujitsuka N (1998) Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1381: 113-122.

Nakamura E, Moritani T, Kanetaka A (1996) Effects of habitual physical exercise on physiological age in men aged 20-85 years as estimated using principal component analysis. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 73: 410-418.

Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang YX, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H, Kang H, Shaw RJ, Evans RM (2008) AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*, 134: 405-415.

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

Norrbom J, Wallman SE, Gustafsson T, Rundqvist H, Jansson E, Sundberg CJ (2010) Training response of mitochondrial transcription factors in human skeletal muscle. *Acta Physiol (Oxf)*, 198: 71-79.

Nystrom T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24: 1311-1317.

O'Neill HM (2013) AMPK and Exercise: Glucose Uptake and Insulin Sensitivity. *Diabetes Metab J*, 37: 1-21.

Ohanna M, Bonet C, Bille K, Allegra M, Davidson I, Bahadoran P, Lacour JP, Ballotti R, Bertolotto C (2014) SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget*, 5: 2085-2095.

Olesen J, Kiilerich K, Pilegaard H (2010) PGC-1alpha-mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 460: 153-162.

Orrenius S (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39: 443-455.

Pan T, Kondo S, Le W, Jankovic J (2008) The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 131: 1969-1978.

Pardo PS, Boriek AM (2011) The physiological roles of Sirt1 in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*, 3: 430-437.

Pardo PS, Boriek AM (2012) An autoregulatory loop reverts the mechanosensitive Sirt1 induction by EGR1 in skeletal muscle cells. *Aging (Albany NY)*, 4: 456-461.

Park S, Mori R, Shimokawa I (2013) Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Mol Cells*, 35: 474-480.

Peterson CM, Johannsen DL, Ravussin E (2012) Skeletal muscle mitochondria and aging: a review. *J Aging Res*, 2012: 194821.

Philp A, Chen A, Lan D, Meyer GA, Murphy AN, Knapp AE, Olfert IM, McCurdy CE, Marcotte GR, Hogan MC, Baar K, Schenk S (2011) Sirtuin 1 (SIRT1) deacetylase activity is not required for mitochondrial biogenesis or peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation following endurance exercise. *J Biol Chem*, 286: 30561-30570.

Pool AJ, Axford JS (2001) The effects of exercise on the hormonal and immune systems in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 40: 610-614.

Poppek D, Grune T (2006) Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal*, 8: 173-184.

Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, Mohammadi M, Finck BN, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Burgess SC (2009) FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 10853-10858.

Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ (2011) Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*, 1: 941-969.

Pradeep AR, Ramchandraprasad MV, Bajaj P, Rao NS, Agarwal E (2013) Protein carbonyl: An oxidative stress marker in gingival crevicular fluid in healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects. *Contemp Clin Dent*, 4: 27-31.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, 286: 1368-1371.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*, 423: 550-555.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92: 829-839.

Radak Z, Bori Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos, II, Terzis G, Nikolaidis MG, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Kumagai S, Naito H, Boldogh I (2011) Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 51: 417-423.

Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 7: 34-42.

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

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 27: 69-74.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*, 38: 17-23.

Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, Goto S (2002) Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 445: 273-278.

Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H, Nakamoto H, Goto S (2000) Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, 383: 114-118.

Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E (2011) Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Mol Aspects Med*, 32: 305-315.

Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M (2012) Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxid Redox Signal*,

Richter EA, Ruderman NB (2009) AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J*, 418: 261-275.

Romanello V, Sandri M (2010) Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Curr Hypertens Rep*, 12: 433-439.

Romanello V, Sandri M (2013) Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of protein degradation in striated muscles. *J Mol Cell Cardiol*, 55: 64-72.

Sack MN, Finkel T (2012) Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:

Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA (2011) Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*, 286: 10605-10617.

Sahlin K, Katz A, Henriksson J (1987) Redox state and lactate accumulation in human skeletal muscle during dynamic exercise. *Biochem J*, 245: 551-556.

Saleem A, Adhietty PJ, Hood DA (2009) Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 37: 58-66.

Sandvik L, Erikssen J, Thaulow E, Erikssen G, Mundal R, Rodahl K (1993) Physical fitness as a predictor of mortality among healthy, middle-aged Norwegian men. *N Engl J Med*, 328: 533-537.

Sano M, Schneider MD (2005) Energizer: PGC-1 alpha keeps the heart going. *Cell Metab*, 1: 216-218.

Santin G, Piccolini VM, Barni S, Veneroni P, Giansanti V, Dal Bo V, Bernocchi G, Bottone MG (2013) Mitochondrial fusion: a mechanism of cisplatin-induced resistance in neuroblastoma cells? *Neurotoxicology*, 34: 51-60.

Sarga L, Hart N, Koch LG, Britton SL, Hajas G, Boldogh I, Ba X, Radak Z (2013) Aerobic endurance capacity affects spatial memory and SIRT1 is a potent modulator of 8-oxoguanine repair. *Neuroscience*, 252: 326-336.

Sarna S, Sahi T, Koskenvuo M, Kaprio J (1993) Increased life expectancy of world class male athletes. *Med Sci Sports Exerc*, 25: 237-244.

Scarborough P, Bhatnagar P, Wickramasinghe KK, Allender S, Foster C, Rayner M (2011) The economic burden of ill health due to diet, physical inactivity, smoking, alcohol and obesity in the UK: an update to 2006-07 NHS costs. *J Public Health (Oxf)*, 33: 527-535.

Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem*, 97: 673-683.

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

Shepherd D, Garland PB (1969) The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*, 114: 597-610.

Shiroma EJ, Lee IM (2010) Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity. *Circulation*, 122: 743-752.

Short KR, Vittone JL, Bigelow ML, Proctor DN, Rizza RA, Coenen-Schimke JM, Nair KS (2003) Impact of aerobic exercise training on age-related changes in insulin sensitivity and muscle oxidative capacity. *Diabetes*, 52: 1888-1896.

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82: 291-295.

Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2009) Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)*, 74: 1411-1442.

Spina RJ, Chi MM, Hopkins MG, Nemeth PM, Lowry OH, Holloszy JO (1996) Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* (1985), 80: 2250-2254.

Steinbacher P, Eckl P (2015) Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 5: 356-377.

Strohle A (2009) Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm (Vienna)*, 116: 777-784.

Sullivan PW, Morrato EH, Ghushchyan V, Wyatt HR, Hill JO (2005) Obesity, inactivity, and the prevalence of diabetes and diabetes-related cardiovascular comorbidities in the U.S., 2000-2002. *Diabetes Care*, 28: 1599-1603.

Sung E, Han A, Hinrichs T, Vorgerd M, Manchado C, Platen P (2014) Effects of follicular versus luteal phase-based strength training in young women. *Springerplus*, 3: 668.

Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S (2008) Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism*, 57: 986-998.

Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA (2010) Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal*, 12: 323-325.

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

Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou EG, Puigserver P, Spiegelman BM, Maratos-Flier E (2003) Characterization of the peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 alpha (PGC 1alpha) expression in the murine brain. *Brain Res*, 961: 255-260.

Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005) PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 66: 562-573.

Van Buren DJ, Tibbs TL (2014) Lifestyle interventions to reduce diabetes and cardiovascular disease risk among children. *Curr Diab Rep*, 14: 557.

Vaquero A (2009) The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int J Dev Biol*, 53: 303-322.

Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC (2010) Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci*, 35: 669-675.

Vina J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE, Pallardo FV (2009) Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 1369-1374.

Virbasius JV, Scarpulla RC (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1309-1313.

Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, 68: 1015-1068.

Vollaard NB, Constantin-Teodosiu D, Fredriksson K, Rooyackers O, Jansson E, Greenhaff PL, Timmons JA, Sundberg CJ (2009) Systematic analysis of adaptations in aerobic capacity and submaximal energy metabolism provides a unique insight into determinants of human aerobic performance. *J Appl Physiol*, 106: 1479-1486.

Wadley AJ, Turner JE, Aldred S (2016) Factors influencing post-exercise plasma protein carbonyl concentration. *Free Radic Res*, 50: 375-384.

Wan Z, Root-McCaig J, Castellani L, Kemp BE, Steinberg GR, Wright DC (2014) Evidence for the role of AMPK in regulating PGC-1 alpha expression and mitochondrial proteins in mouse epididymal adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*, 22: 730-738.

Wang P, Fedoruk MN, Rupert JL (2008) Keeping pace with ACE: are ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists potential doping agents? *Sports Med*, 38: 1065-1079.

Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS (2006) Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 174: 801-809.

Westerblad H, Bruton JD, Katz A (2010) Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res*, 316: 3093-3099.

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

Weston AR, Karamizrak O, Smith A, Noakes TD, Myburgh KH (1999) African runners exhibit greater fatigue resistance, lower lactate accumulation, and higher oxidative enzyme activity. *J Appl Physiol* (1985), 86: 915-923.

White AT, Schenk S (2012) NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303: E308-321.

Wierman MB, Smith JS (2014) Yeast sirtuins and the regulation of aging. *FEMS Yeast Res*, 14: 73-88.

Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO (2007) Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1 α expression. *J Biol Chem*, 282: 194-199.

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

Yates LB, Djousse L, Kurth T, Buring JE, Gaziano JM (2008) Exceptional longevity in men: modifiable factors associated with survival and function to age 90 years. *Arch Intern Med*, 168: 284-290.

Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337: 1062-1065.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33: 337-349.

Zhu K, Prince RL (2015) Lifestyle and osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*, 13: 52-59.

Zhu LL, Liu Y, Cui AF, Shao D, Liang JC, Liu XJ, Chen Y, Gupta N, Fang FD, Chang YS (2010) PGC-1 α coactivates estrogen-related receptor- α to induce the expression of glucokinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298: E1210-1218.

Zoladz JA, Pilc A (2010) The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol*, 61: 533-541.

Zungu M, Schisler J, Willis MS (2011) All the little pieces. -Regulation of mitochondrial fusion and fission by ubiquitin and small ubiquitin-like modifier and their potential relevance in the heart. *Circ J*, 75: 2513-2521.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- **Marton O**, Koltai E, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S, Radak Z. (2010) Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology* 11: 679-686.
- **Marton O**, Koltai E, Takeda M, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Boldogh I, Radak Z. (2015) "itochondrial biogenesis-associated factors underlie the magnitude of response to aerobic endurance training in rats. *Pflugers Arch* 467: 779-788.
- **Marton O**, Koltai E, Takeda M, Mimura T, Pajk M, Abraham D, Koch LG, Britton SL, Higuchi M, Boldogh I, Radak Z. (2016) The rate of training response to aerobic exercise affects brain function of rats. *Neurochem Int* 99: 16-23.

10.2. Független közlemények

- Radák Z, Silye G, Bartha C, Jakus J, Stefanovits-Bányai E, Atalay M, **Marton O**, Koltai E.(2013) The effects of cocoa supplementation, caloric restriction, and regular exercise, on oxidative stress markers of brain and memory in the rat model. *Food Chem Toxicol* 61:36-41.
- Ihász F, Karsai I, Kaj M, **Marton O**, Finn KJ, Csányi T. (2015). Characteristics of cardiorespiratory output determining factors among 11-19-year-old boys at rest and during maximal load: Its impact on systolic hypertension. *Acta Physiol Hung* 102:263-73.
- Laurson KR, Welk GJ, **Marton O**, Kaj M, Csányi T. (2015) Agreement and Diagnostic Performance of FITNESSGRAM®, International Obesity Task Force, and Hungarian National BMI Standards. *Res Q Exerc Sport* 86 Suppl 1:S21-8.

11. Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Radák Zsoltnak a támogatásáért, útmutatásáért, az évek során a tudásom gazdagítására tett erőfeszítéseierért. Köszönöm, hogy a Sporttudományi Kutatóintézet falai között egy második családot biztosított számomra.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Koltai Erikának, aki a kezdeti lépésektől fogva végig mellettem állt, barátilag támogatott, tanított és segített, hogy minél jobban el tudjam sajátítani a biokémiai módszereket. Kitartása, önzetlensége és szorgalma mindig követendő példaként áll előttem.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani Bori Zoltánnak, akitől szintén sok segítséget kaptam, és aki nélkül a PCR mérések nem jöhettek volna létre.

Köszönettel tartozom a Sporttudományi Kutatóintézet egykori és jelenlegi munkatársainak, akikkel együtt dolgozva a nehézségek is leküzdhetővé váltak.

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