

A mitokondriális és epigenetikai változások vizsgálata
futási képességeik alapján szelektíven tenyésztett
patkányokon diétás megszorítás és állóképességi edzés
hatására

Doktori értekezés

Torma Ferenc Gergely

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Szmodis Márta, egyetemi docens, PhD
Dr. Atlasz Tamás, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tihanyi József, rector emeritus, DSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pavlik Gábor, professor emeritus, DSc
Dr. Pucsok József, egyetemi tanár, DSc

Budapest
2018

*„ A gének lehetőségek. Információk. Domináns módon ránk kényszeríthetnek dolgokat,
vagy lehetőségeket kínálhatnak föl. Mindenekelőtt azonban: tervek.
A gének semmire sem képesek, amíg el nem olvassák és fel nem használják őket.
Néhány tervvel ezek közül nem tudunk mit kezdeni - ezek arról döntenek,
hogyan emberek legyünk-e vagy baktériumok. Mások hosszú ideig lappanghatnak...”*

Giulia Enders

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
Ábrák és táblázatok jegyzéke	9
1. <u>Bevezetés</u>.....	12
2. <u>Irodalmi áttekintés</u>	15
2.1. A genetika és az aerob teljesítmény kapcsolata	15
2.2. Állóképességi terhelés és a hím reprodukciós rendszer	17
2.3. A kalória visszafogás	18
2.3.1. Diétás megszorítások és a kalóriamegvonás	21
2.3.2. A kalóriamegvonás kérdései.....	22
2.3.3. A kalória visszafogás humán és emberszabású vonatkozásai	23
2.3.4. Kalória visszafogás hatása a tanulásra és az anyagcserére.....	25
2.4. Molekuláris - és biokémiai háttér	28
2.4.1. Agyi eredetű növekedési faktor	28
2.4.2. cAMP érzékeny-elem kötő fehérje.....	32
2.4.3. A mitokondriumok szerepe az energiatermelésben, mitokondriális biogenezis ...	34
2.4.4. BDNF és a mitokondriális funkciók kapcsolata.....	38
2.4.5. Az RAC-alfa szerin / treonin protein-kináz (Akt) és a myostatin-follistatin tengely	40
2.4.6. Epigenetika	42
3. <u>Célkitűzések</u>	46

4. <u>Anyag és módszer</u>	49
4.1. Vizsgálati állatok	49
4.2. Edzésprotokoll	51
4.3. Táplálkozási protokoll	52
4.4. A rövidtávú memória mérése	54
4.5. Kapaszkodási teszt	54
4.6. A szövetek feldolgozása	55
4.7. Biokémiai vizsgálatok	56
4.7.1. AcH3-ChIP Kromatin immunoprecipitációs eljárás.....	56
4.7.2. DNS izolálás	57
4.7.3. AcH3-ChIP – BDNF-qPCR	58
4.7.4. RNS izolálás	58
4.7.5. DNS-, RNS- koncentráció mérés és integritás vizsgálat	59
4.7.6. cDNS szintézis.....	59
4.7.7. BDNF mRNS 'real time quantitative PCR' (qRT-PCR).....	59
4.7.8. Összfehérje meghatározás és BDNF koncentráció mérés ELISA technikával	60
4.7.9. Western Blot	61
4.7.10. A 2', 7'-diklór-dihydrofluorocin-diacetát alapú (H2DCFD) reaktív gyökök mennyiség becslése.....	62
4.8 Statisztikai analízis	66
5. <u>Eredmények</u>	67
5.1. Az állatok fiziológiás és funkcionális eredményei	67
5.2. A hippocampusz minták feldolgozása során született eredmények	72
5.3. A gastrocnemius minták feldolgozás során született eredmények	80
5.4. Here szöveti minták feldolgozás során született eredmények	88
6. <u>Diszkusszió</u>	92

6.1. A szelekció és a diétás megszorítás hatása a memóriára és a hippocampális régió BDNF szabályozásra, mitokondriális státuszra	92
6.1.1. Mit jelent az „eltérő genetikai adottság” az LCR-HCR csoportoknál?	92
6.1.2. A LCR-HCR állatok memória státusza DR hatására.....	93
6.1.3. Az LCR-HCR állatok BDNF gén promoter kontrollja és lehetséges epigenetikai szabályozó folyamatok	94
6.1.4. Az mitokondriális biogenezis a HCR-LCR állatok hippocampális régiójában?.....	98
6.2. A szelekció, az állóképességi edzés és a diétás megszorítás hatása az élettani mutatókra és a vázizom mitokondriális státuszára	101
6.2.1. Az LCR-HCR állatok fizikai teljesítőképességének státusza DR és állóképességi edzés hatására	101
6.2.2. Mitokondriális biogenezis és anyagcsere az LCR-HCR állatok gastrocnemius izmaiban	102
6.2.3. A Sirt1 fehérje kapcsolata a mitokondriális biogenezissel.....	103
6.2.4. Az LCR-HCR állatok izomzatán tapasztalt változások összefoglalása.....	106
6.3. A szelekció és az állóképességi edzés hatása a spermatogenezisre, az oxidatív stressz és mitokondriális biogenezis markerekre HCR-LCR állatokban	109
6.3.1. Mitokondriális biogenezis a here szöveti állományában.....	109
6.3.2. <i>Oxidatív stressz, állóképességi aktivitás és spermatogenezis kapcsolata az LCR és a HCR csoportokban</i>	109
7. <u>Következtetések</u>	113
8. <u>Összefoglalás</u>	118
9. <u>Summary</u>	120
10. <u>Irodalomjegyzék</u>	122

11. Saját publikációk jegyzéke 151

Köszönetnyilvánítás 152

Rövidítések jegyzéke:

ADP	Adenozin-difoszfát
AMPK	Adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
ATP	Adenozin-trifoszfát
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
cAMP	ciklikus adenozin-3,5 monofoszfát
cDNS	Komplementer DNS
CH	Szénhidrát
ChIP	Kromatin immunprecipitáció
COX4	Cytochrome C oxidase subunit IV, citokróm C oxidáz IV. alegysége
CR	Calorie restriction, kalória visszafogás
CRE	CREB recognition element, CREB felismerési elem
CREB	cAMP response element-binding protein, cAMP válaszelem-kötő fehérje
CREM	cAMP response element modulator, cAMP válaszelem modulátor
dNTP	Dezoxinukieotid oldat mix
DR	Dietary Restriction, diétás megszorítás
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	Enzyme-linked immuneasorbent assay, enzimkötéses immunoszorbens vizsgálat
EODF	Every other day fasting, minden másnap táplálék megvonás
FOXO1	Forkhead box protein O1
GPx1	Glutation-peroxidáz 1
SOD2	Szuperoxid dizmutáz 2
H2DCFDA	2', 7'-diklór-dihidrofluorcein-diacetát

H3K14	Hiszton H3 lizin 14
HCR	High capacity runners, nagy futókapacitású vonal
IGF-1	Insulin-like growth factor 1, inzuliszerű növekedési
faktor-1	
IGFBP	Insulin-like growth factor 1 binding protein, Inzulinszerű növekedési faktor 1 kötő fehérje
LCR	Low capacity runners, alacsony futókapacitású vonal
LDHC	Laktát dehidrogenáz C
miRNS	mikroRNS
NAD+	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NF-κB	Nukleáris faktor kappaB
NGF	Nerve growth factor, idegnövekedési faktor
NP40	Nonidet P-40 (oktil-fenoxi-polietoxi-etanol)
NRF1	Nucleáris respiratorikus faktor 1
Odf-1	Outer dense fiber protein 1
P53	P53 tumor-fehérje/ celluláris tumor antigén p53
PCR	Polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
pCREB	A CREB fehérje foszforilált formája
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1, Peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1
PMSF	Fenilmetánszulfonil-fluorid
PrCR	Fehérje kalória megvonás
qRT-PCR	quantitative, real time polymerase chain reaction, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció
RE1	Neuron-restrictive silencing element 1
REST	RE1 silencing transzkripció factor
S6K	Riboszóma protein S6 kináz
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A
sdRNA	Double stranded RNA, Kettős szálú RNS

SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate-poliakrilamide gél elektroforézis
siRNS	Small interfering RNA, kis interferáló RNS
SIRT1-7	Szirtuin 1-7
SVZ	Subventrikuláris Zóna
TBST	Tris-Buffered Saline- Tween 20, Tris-pufferolt sóoldat-Tween 20
TEMED	Tetrametiletiléndiamint
TrkB	2-es típusú neurotróf tirozin kináz receptor

Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák listája

Áttekintő ábrák

1. ábra: A patkány BDNF molekula aminosav szekvenciája és 3D szerkezete29
2. ábra: A BDNF gén struktúrája.....30
3. ábra: A CREB dimer-DNS kapcsolat.....33
4. ábra: A szirtuinok által katalizált reakció.....38
5. ábra: Az anabolikus/katabolikus és az extacelluláris ingerek összefoglaló ábrája
.....41
6. ábra: A hiszton H3 fehérjemolekula és a K14 acetilációja.....44
7. ábra: A vizsgálati állatok futókapacitása és érrendszeri jellemzői50
8. ábra: A vizsgált állatok csoportbeosztása és elvégzett vizsgálatok.....53

Az állatok fiziológiás és funkcionális eredményei

9. ábra: A kezelések hatására bekövetkező testtömeg változás67
10. ábra: A maximális oxigén felvétel eredményei a kezelési időszak végeztével.....68
11. ábra: Az állatok futási képességének növekedése havonként lebontva.....69
12. ábra: A passzív elhárítás teszt eredményei a kezelési időszak végeztével.....70
13. ábra: A kapaszkodási teszt eredményei a kezelési időszak végeztével.....71

A hippocampusz minták feldolgozása során született eredmények

14. ábra: SIRT1 fehérje koncentráció hippocampusz mintákból.72
15. ábra: PGC-1 és NRF1 mérési eredmények hippocampusz mintákból73

16. ábra: COX4 mérési eredmények hippocampusz mintákból.....	74
17. ábra: pCREB/ CREB mérési eredmények hippocampusz mintákból	75
18. ábra: BDNF fehérje mennyiség hippocampusz mintákban.....	76
19. ábra: Hiszton H3K14 acetilációs eredmények hippocampusz mintákból	77
20. ábra: BDNF mRNS eredmények hippocampusz mintákból.....	78

A gastrocnemius minták feldolgozás során született eredmények

21. ábra Sirt1 fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból.	80
22. ábra: Acetilált lizin mennyiség patkány gastrocnemius izomból	81
23. ábra: PGC-1 alfa és NRF1 fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból.	82
24. ábra: SDHA fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból	83
25. ábra: pAkt/Akt fehérje mennyiség aránya patkány gastrocnemius izomból	84
26. ábra: Follisztatin fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból	85
27. ábra: pAMPK/AMPK fehérje mennyiség aránya patkány gastrocnemius izomban	86

A hereszöveti minták feldolgozás során született eredmények

28. ábra Mitokondriális biogenesis markerek here szövetben a HCR és LCR állatokban.....	88
29. ábra: Oxidatív stressz és p53 acetiláci a HCR és LCR állatokban.....	89
30. ábra: Spermatogenezis markerek a HCR és LCR állatokban.....	90

Összefoglaló ábrák

31. ábra: A hippocamális BDNF jelátviteli folyamatok és az epigenetika kapcsolata.	100
32. ábra: Az állóképességi edzés hatása az HCR csoportra gastrocnemius izomban	108
33. ábra: Spermatogenezis és az állóképességi aktivitás mértéke az LCR és a HCR csoportokban	112

Táblázatok

1. táblázat: A vizsgálati állatok lényegesebb tulajdonságai	51
2. táblázat: Az állatoknak adagolt táp összetétele	53
3. táblázat: Vizsgálataink során használt elsődleges antitestek.	64
4. táblázat: A diétás megszorítás és a különböző fenotípus hatása a hippocampusra és a memóriára	79
5. táblázat: A diétás megszorítás, állóképességi edzés és a különböző fenotípus hatása a gastrocnemius izomra és a fiziológias mutatókra	87
6. táblázat: Az állóképességi edzés hatása a here szövetre a LCR és HCR csoportokban	91

1. Bevezetés

A szerzőt régóta foglalkoztatja a kérdés, hogy mi tesz valakit tehetségessé különböző képességek elsajátítása, fejlesztése terén. A mindennapi életben gyakran találkozunk olyanokkal, akik az élet egy bizonyos területén kimagasló tehetséggel bírnak: gyorsabban futnak, magasabbra ugranak, jobb ritmusérzőkük van, mint az átlagos képességű populációnak. Ezen képességek egy meghatározott intervallumon belül fejleszthetők ugyan, de úgy tűnik, a sáv tetejét erőteljesen az egyének öröklött tulajdonságai határozzák meg. Ez a kvázi determinisztikus elképzelés akkor a legszembevetőbb, ha bizonyos tulajdonságok extrémítását vizsgáljuk. Jó példa ezen extrémításokra az élsport, ahol a sportolók szinte emberfeletti teljesítményeket tudnak produkálni. Ezek az egyének azért képesek nem mindennapi eredményekre, mert a tárgyi és környezeti feltételeik megléte mellett, a szervezetüket felépítő egységek olyan „kód” (DNS) irányításával működnek, mely az említett teljesítmény leadásához szükséges képességek kifejlését lehetővé teszi. Az egyéni képességek felső korlátjának meghatározása igencsak komplex feladat. A kevésbé jó adottságokkal rendelkezők feltehetik a kérdést: meddig és milyen eszközökkel lehet (sportos példánknál maradva) egészségesen fejleszteni kondicionális képességeiket? Továbbá, hol vannak azok a beavatkozási pontok, melyek tudatos modulálásával jobb eredmények érhetők el? Vizsgálataink során az eltérő „tehetség”-„hajlam” modellezésére egy vad típusú patkányfajból tenyésztett alacsony és magas futókapacitású patkánypopulációval dolgoztunk.

Az utóbbi években előtérbe kerültek az olyan epigenetikai (olyan öröklődési forma, ami nem a bázis szekvencia változásban realizálódik) vizsgálatok, melyek eredményei azt sugallják, hogy az életvitel és a környezeti körülmények hatással vannak a kromatin állomány hiszton komponensének modifikációjára is. Ez önmagában még nem tűnik olyan nagy jelentőségűnek, ám ezek a változások befolyásolhatják bizonyos gének expresszióját - mi több, továbbörökíthetők az utódok számára is. Az öröklött tulajdonságok, az anyagcsere folyamatok hálózata, a génexpressziós folyamatok és a fehérje funkciók egymásra gyakorolt hatásai a legegyszerűbb élő szervezeteket is igen bonyolult struktúrává

teszik. A komplex rendszernek egy kis szeletét képezik a sportban és a fizikai teljesítőképesség kialakításában kiemelkedő szerepet játszó, az oxigénhez felhasználáshoz köthető, energianyerő anyagcsere folyamatok. Az aerob anyagcsere központi jelentőségű sejtorganelluma a mitokondrium, melynek funkcionális és kvantitatív vizsgálata az epigentiai változásokkal karöltve közelebb vihet bennünket a fizikai teljesítőképesség, az öregedési folyamatok vagy akár komplex patomechanizmusú betegségek megértéséhez is.

Fejlődése során számos hatás éri az élő szervezetet. Ezek közül az ember talán a fizikai aktivitását és a táplálkozását tudja a leghatékonyabban befolyásolni (rendszeres sport/fizikai aktivitás, egészséges, mértékletes táplálkozás). Számos tanulmány számol be arról, hogy ezen tényezők tudnak a legtöbbet tenni az egészség megőrzéséért. A fizikai aktivitásnak egészségre gyakorolt pozitív tulajdonságairól már sok tanulmány beszámolt (1,2).

Robert Boyle (1627-1691) korának egyik legnagyobb kutatója, az Angol Királyi Természettudományos Társaság (Royal Society) egykori elnöke, aktív éveinek csúcspontjára vetett egy 24 pontból álló listát, mely a tudományos megismerés szerinte legfontosabb célkitűzéseit tartalmazta. Ezen a listán az első és legfontosabb feladatként: „Az élettartam meghosszabbítása” szerepelt. A Boyle óta eltelt évszázadok folyamán rengeteg ismeretanyagot halmozott fel az emberiség, de jelenlegi ismereteink szerint kevés olyan eljárás létezik, mellyel hatékonyan növelhető az élettartam.

Definíció szerint két fogalmat érdemes megkülönböztetni: Az átlagos élettartamot, mely egy populációban átlagosan, az egyedek születéstől a pusztulásukig eltelt időtartamot jelöli és maximális élettartamot, ami viszont a populációban az egyed teoretikus maximumát adja meg. Szigorúan az utóbbi a populációban valaha megfigyelt legöregebb egyed élettartama.

Nagy reményekkel kecsegtet a kalória visszafogás, melyről számos kutatócsoport bebizonyította, hogy bizonyos fajoknál maximális élettartam növelő hatása van. Ezen megfigyelések mellett számtalan betegség megelőzésében mutattak ki pozitív hatást (3-5). A kalória visszafogás és az állóképességi edzés fontos jelátviteli útvonalakat aktivál,

melyek bizonyos esetekben hasonlóságot mutatnak. A szervezet e két módszerrel történő perkondicionálása alkalmas lehet egyfelől a fizikai teljesítőképesség növelésére, másfelől a metabolikus betegségek megelőzésére. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre azzal kapcsolatban, hogy vajon különböző futási képességű vagy aerob kapacitású egyedek, hogyan reagálnak az említett kezelésekre, illetve gyengébb képességek esetén a problémák milyen mechanizmusok „sérülésében” keresendők.

Tanulmányunkban agyi- (hippokampusz), váz izom- (m. gastrocnemius) és hereszöveten vizsgáltuk a táplálkozási megszorítás (dietary restriction DR lásd később) epigenetikai vetületét és ezen szövetek anyagcsere funkciójára és mitokondriális biogenezisére gyakorolt hatását. Kutatásunk érdekességét adja, hogy a kezeléseket két eltérő fenotípussal rendelkező alpopuláción demonstráljuk, így kapva differenciáltabb képet arról, hogy az általunk alkalmazott diétás megszorítás és edzés milyen különbségeket, illetve egyezéseket mutat az eltérő csoportokban. A különböző adottságú egyedek sokszor igen markáns különbségeket mutatnak, még akkor is, ha a kezelési feltételeket uniformizáljuk. Ezen megfigyelések a sportszakemberek számára is fontosak lehetnek, hiszen ilyenkor kerülnek előtérbe az egyénre szabott edzésformák, táplálkozási protokollok.

A következőkben a futási képességeikben eltérő állatcsoportokon demonstráljuk a táplálkozás és az állóképességi edzés fontosságát, előtérbe helyezve a populációk sejtelettani adaptációját. A disszertációban bemutatjuk, hogy az eltérő képességek fejlesztése nem csak az edzésre adott adaptációban keresendő, hanem számos más környezeti feltétel mellett a táplálkozási szokások is nagy jelentőséggel bírhatnak. Rámutatunk arra, hogy az eltérő futókapacitású egyedek speciális hippokampális, vázizomzati és hím reprodukciós rendszerei különbségeket mutatnak mind az oxidatív anyagcsere, mind neurális faktorok szintjén.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A genetika és az aerob teljesítmény kapcsolata

Az aerobkapacitás vagy a futókapacitás tágabb értelemben sport teljesítmény genetikai vizsgálata sok nehézséggel jár. Ezen jellegek számos gén együttes működésének eredményeképpen alakulnak ki (episztázis hatás), illetve egyes gének több jellegre is hatással vannak (pleiotrópia). Mindezek mellett az állóképességi edzés vagy a táplálkozás, mint környezeti hatás szintén fontos tényező a kifejlett egyed fenotípusának kialakításában (6).

Rengeteg beszámoló született, mely az aerob kapacitást a fenotípus szintjén taglalja. Ezek szerint a maximális oxigénfelvétel meghatározó tényezői az aerob enzimek katalitikus kapacitása, az izom mitokondrium sűrűsége, hajszálér-, kapilláris ellátottság, a hematokrit, a perctérfogat és a tüdő O₂ diffúziós kapacitása (7,8). Ezen tényezők megfigyelésével a fiziológiában jártas kutató becsülni tudja az oxigénfelvételt és az ezzel szoros kapcsolatban álló állóképességi teljesítményt. A genetika háttér vizsgálatánál a helyzet napjainkban viszont még korántsem egyértelmű. Meglepően ritkák az olyan leírások, melyek a maximális oxigénfelvétel genetikai eredőjét taglalják.

A kiemelkedő sportteljesítmény genetikai háttérének meghatározására irányuló vizsgálatok nem mutatnak egyértelmű eredményeket (9). Léteznek ugyan olyan gének, melyek kimutathatóan jelentőséggel bírnak a sport teljesítmény kialakításában (ACE I/D, ACTN3 R577X), ám kapcsolatuk erőssége nem elég ahhoz, hogy egyértelmű prediktív markerként használhatóak legyenek. Bray recenziójában (10) összesen 239 gént mutat be, melyek a „fitnesz és teljesítmény térképen szerepelnek”, ezek közül 214 autoszomális, 7 az X kromoszómán található, további 18 pedig mitokondriális eredetű szekvencia. Már az első ránézésre sokkal egyszerűbben kezelhető testmagasságra is igen bonyolult gén konstellációk hatnak. Az allél variánsok, polimorfizmusok és azok egymásra gyakorolt hatása sok esetben megnehezíti a mennyiségi és minőségi jellegek tanulmányozását illetve ok-okozati kapcsolatok felderítését. Genom szintű asszociációs vizsgálatok (Genom-wide

association studies, GWA) kimutatták, hogy több mint 600 génvariáns hozható összefüggésbe a testmagassággal, ám ezek varianciája csak kis mértékben magyarázza a fenotípusban megjelenő varianciát (11,12). Timmson és munkatársai az aerob testedzés génexpressziós molekuláris keretrendszerének felderítésére tettek kísérletet. Bioinformatikai módszerekkel és microarray vizsgálatokkal közel 100 gén expressziójának különbségét figyelték meg (13).

A genetikai háttér mellett a környezeti feltételeknek is óriási szerepük van a kifejlett egyedek fenotípusának kialakításában. Nagy elemszámú klinikai vizsgálatokból kiderült, hogy az alacsony edzés kapacitás, a terhelhetőség és az ezzel szoros kapcsolatot mutató aerob kapacitás, jobban előrejelzi a korai morbiditást, illetve mortalitást, mint akár a kettestípusú diabétesz vagy a magas vérnyomás. A klinikai vizsgálatok eredményei illetve Ilya Prigogine non-equilibrium termodinamikai nézetei (14) vezették Koch és Britton szerzőpárost az Aerob Hipotézis megfogalmazásához (15). Elméletük szerint az oxigén metabolizmusában megfigyelhető eltérések és az ehhez köthető oxidatív mechanizmusok, illetve a szabályozási rendszerek hatékonysága tesz különbséget a komplex, „kóros” és „egészséges” állapotok kialakulása között (15-17) .

Az aerob hipotézis igazolására egy genetikailag heterogén patkány populációból alacsony és magas futókapacitású állatok több generáción keresztül történő szelektálása kezdődött meg (18). A magas (High Capacity Runner, HCR) és alacsony (Low Capacity Runner, LCR) futókapacitású családokon rotációs tenyésztés alkalmaztak, ezzel elkerülve a beltenyészet kialakulását és elősegítve a szelekciós szempont jobb érvényesülését (egy heterogén populációban nagyobb az allél diverzitás, a beltenyésztési együttható generációnként kevesebb, mint 1%). A futási kapacitás már a 11. generációnál is közel 350%-os elérést mutatott (19). Az állóképesség csökkenése mellett, a cukor anyagcsere zavarai, inzulin rezisztencia, zsíryanycsere zavarok, továbbá a kardiorespiratorikus rendszer problémái is dúsulni kezdtek az LCR populációban. Ezekkel összefüggésben pedig az LCR állatok várható élettartama is csökkent (15).

Az állatok szelektív tenyésztése egy olyan egyedülálló modell megalkotásához vezetett, ahol egy genetikailag heterogén populáción lehetett vizsgálni, hogy a komplex öröklött tényezők milyen kapcsolatban állnak az olyan környezeti hatásokkal, mint amilyen az állóképességi edzés vagy a kalória visszafogás és a diétás megszorítások.

2.2. Állóképességi terhelés és a hím reprodukciós rendszer

Napjaikig számos kutatási eredmény halmozódott fel arról, hogy a mozgásszegény életmód negatív hatással van a tesztikuláris funkciókra (20,21). Az állóképességi edzés esetében úgy tűnik a mozgás mennyiség és intenzitás is befolyásoló tényezőként jelenhet meg. Wheeler korai vizsgálatai arról számol be, hogy azon hosszútávfutók, akik legalább 64 km-t futnak hetente alacsonyabb tesztoszteron szinttel rendelkeznek, mint a hasonló tulajdonságú, de nem edző kontrolcsoport tagjai (22). Hasonló eredményeket találtak, Ayers és mtsai. (23), akik a nyolcvanas évek közepén kimutatták, hogy a hosszú távú állóképességi edzés csökkenti a tesztoszteron termelést. Az alacsonyabb nyugalmi tesztoszteron szint pedig, a spermatogenezis csökkenésével (24) vagy alacsonyabb spermium motilitással (25) is járhat.

Az Outer dense fiber protein 1 (Odf-1) fehérje, egy az érett spermiumok farki részében helyet foglaló struktúrfehérje, melynek fontos szerepe van a spermiumok mobilitásában (26). Az Odf-1 és a spermium specifikus izoenzim, a laktát dehidrogenáz C (LDHC) mennyiségi meghatározása indikátora lehet a spermatogenezis mértékének. E két fehérje szöveti koncentrációjukból következtetni tudunk a reprodukciós szervrendszer működési hatékonyságára (27). Az LDHC expresszió a meiózis megindulása után aktiválódik (28). LDHC-proteint először a preleptotén spermatocitákban lehet kimutatni, de a spermatidákban és a spermatozoákban is nagy mennyiségben van jelen (29). Fő szerepe a szövet specifikus energiatermelésben, az anaerob glikolízis folyamatában van. Kifülcfontosságú szerepét példázza, hogy az LDHC genetikai ablációja infertilitással járt egerekben (29). Az a hím terméketlenségben egy másik szerepet játszó folyamat az oxidatív stressz, melyről több kutató csoport is leírta, hogy összefüggésbe hozható az

alacsonyabb testis funkciókkal (30). A szabadgyök termelődést a hím reprodukciós szerv esetében sokszor kapcsolatban áll a mitokondriális respirációval (31,32). A hímvarsejtek sajátossága, hogy a kifejlett spermiumok mitokondriális állománya a spermium nyaki része utáni, középső kompartmentben lokalizálódik, ám ezek a sejtorganellumok nem jutnak be a megtermékenyített petesejtbe ezzel elősegítve az utód mitokondriális genomjának homoplazmiáját. Viszont feltételezhetően a spermiumok mitokondriális státusza befolyásolhatja a megtermékenyítő képességük hatékonyságát. Estünkben a hippokampusz és a vázizom mellett érdekes lehet megvizsgálni a divergens aerob-futó kapacitású állatok reprodukciós szervrendszerének állóképességi edzésre adott adaptációját is a mitokondriális biogenezis markerek tükrében.

Jelenlegi tudásunk szerint még senki nem vizsgálta, eltérő aerob képességű állatmodellen a testedzés hatását a spermatogenezis markerekre és az ezzel talán kapcsolatban álló tesztikuláris mitokondriális biogenezis jelátviteli útvonalát. A fentebb említett aerob kapacitás apjában két komponensből tevődik össze: első a veleszületett képességek, melyek bármilyen edzés nélkül kialakulnak, második az ún. adaptációs aerob kapacitás, mely testedzés hatására nőni tud, de például dohányzás határára az expozíció során csökkenhet is. Feltételezhető, hogy a testedzés és az obezitásra való hajlam (mely az alacsony futókapacitású csoportra jellemző (33) befolyásolja a hím reprodukciós rendszer anyagcseréjét is, ezzel kihatva a spermatogenezis folyamatára. Az állóképességi edzésre adott pozitív alkalmazkodás feltételezhető, ám az állatcsoportok eltérő terhelhetőségi szintje miatt az adaptációban is különbségekre lehet számítani.

2.3.A kalória visszafogás

Az ember (de szinte az összes élő organizmus) evolúciós fejlődése során szelekciós tényezőként jelent meg, hogy minél hatékonyabban legyen képes felhasználni a rendelkezésre álló táplálékot. A tápanyagok raktározási mechanizmusai is kulcsfontosságúak voltak a túlélés szempontjából. Az évezredek során olyan gének fejlődtek ki és öröklődtek tovább, melyek az optimális energiatárolást promótták (34).

Elődeink mindennapi életében valószínűleg ritkán fordult elő a konzisztens tápanyagbevitel. Normálisnak számított az akár több napig is tartó éhezéssel járó periódus (34). Az ókor és a középkor embere is igencsak ki volt szolgáltatva a környezeti változásoknak, mely a táplálékszerzés lehetőségeire is hatást gyakorolt. Az ipari forradalom óta a fejlett országokban az egy főre jutó táplálékbevitel mind mennyiségi, mind minőségi értelemben növekedésnek indult (35). A várható élettartam is emelkedni kezdett, ez magyarázható egyfelől a kielégítő tápláltsági állapotokkal, másfelől az olyan forradalmi felfedezések kihasználásával, mint amilyen az antibiotikum vagy az aktív/passzív immunizálás. Kezdték megjelenni olyan betegségek, melyek azelőtt orvosi ritkaságnak számítottak (metabolikus betegségek, infarktusok, daganatos megbetegedések). A kalória bevitel emelkedésével csökkent a napi munkavégzés mennyisége. Az energetikai változások evolúciós szempontból nagyon rövid idő alatt történtek. A genetikai architektúrák olyan környezethez alkalmazkodtak, melyre a nem perzisztens- vagy az alacsonyabb kalória bevitel volt jellemző, így valószínű az anyagcsere betegségek megjelenése összefüggésbe van azzal, hogy őseink nem a jelenlegi diétás környezethez adaptálódtak.

A legtöbb ember érthető igénye a hosszú élet, ám manapság célszerű hozzátenni: a „jó életminőségben eltöltött” hosszú élet. Az orvostechnika vívmányai és a korszerű gyógyszeres kezelések ugyanis sok esetben hatékonyan tudják kezelni a kialakuló betegségeket, ám a kezelt páciensek életminősége nem feltétlenül magas fokú és messze áll az optimálistól. Egyre inkább kerülnek előtérbe olyan technikák, melyek divatos szóval élve „holisztikusan”, a szervezet egészére fejtik ki pozitív hatásukat. A fizikai aktivitáson és a vegyes, mértékletes: „egészséges” étrenden kívül kevés technikának van ilyen „univerzális” hatása. Számos olyan vegyület és molekula létezik (pl.: vörösbors: resveratrol (36,37), ginzeng: ginsenosidok (38), fokhagyma kéntartalmú vegyületei (39), stb.), melyek kedvező élettani hatással bírnak és esetleg segítenek egyes betegségek megelőzésében, kezelésében, de kevés az olyan, melyről tudományos igényű munkákban leírták, hogy képes az élettartamot növelni.

A kalória visszafogással (CR), mint prevencióeszközzel viszonylag régóta foglalkozik a tudomány. Először az 1930-as években figyelték meg, hogy azon állatok, melyek a

maximális fertilitáshoz szükséges kalóriamennyiség csökkentett hányadát kapták, akár 40%-kal is hosszabb ideig éltek (40). A CR azért került a kutatók figyelmének középpontjába, mert számos tanulmány számolt be arról, hogy ennek a kezelésnek élettartam-növelő hatása van a törzsfán egymástól nagyon távol elhelyezkedő fajok esetében is. Élettartam-növekedést figyeltek meg kutyáknál (41), rágcsálóknál (egér, patkány, hörcsög) (42) ecetmuslicáknál (43,44) , Caenorhabditis elegansnál (fonálféreg) (45), kerekcsigánál (46,47), különböző pókfajoknál (48), halfajoknál (49,50) baktérium-, gomba-törzseknél (51-53). A CR-re reagáló fajok változatosságából úgy tűnik, hatása filogenetikailag konzerválódott az élővilágban. A kedvező hatások egyrészt magyarázhatóak azzal, hogy az anyagcserehez köthető, illetve a kor előrehaladtával megjelenő betegségek gyakorisága az alkalmazás során mintha csökkenne. Másfelől a CR során „lassuló anyagcserevel” egyidejűleg, előtérbe kerülnek az ún. „repair” mechanizmusok. Léteznek viszont olyan megfigyelések is, melyek nem támogatják a CR élettartam-növelő képességét. Cooper és munkatársai például rövidebb élettartamot tapasztaltak házi légy (*Musca domestica*) modell használatánál (54). Továbbá egyes rágcsáló vonalak tekintetében is kérdéses a CR hatékonysága (55). Ennek ellenére sokkal több az olyan információ, mely a CR pozitív hatásáról számol be.

A mai civilizációs betegségek előretörésével érdemes elgondolkodni, hogy vajon a táplálékhiányra berendezkedett szervezet túltáplálása mennyiben okolható az egészségi állapotban megjelenő a problémákért. Az utóbbi években a szakmai írások tanulsága szerint ez igen is releváns probléma. Hazánkban és a világ más fejlett országaiban is komoly gondot okoz a keringési, metabolikus és daganatos betegségek egyre nagyobb arányú megjelenése a lakosságban, és ez sok esetben összefüggésbe hozható a táplálkozással, túltápláltsággal (56-58). A továbbiakban a CR és más experimentális táplálkozási protokollok speciális hatásait fogjuk ismertetni, fontosabb tulajdonságaikat kiemelni, és bemutatjuk a CR kivitelezése folyamán felmerülő kérdéseket is.

2.3.1. Diétás megszorítások és a kalóriamegvonás

A kalóriamegvonás szóösszetétel könnyen értelmezhetőnek tűnik: vegyünk egy kísérleti modellállatot, mérjük meg, mennyi táplálékot fogyaszt ad libitum, majd mérsékeljük a kínálatot egy általunk meghatározott mennyiséggel. Ez a szakirodalmi ajánlások szerint 10-60%-nyi mennyiséget jelent.

A fentiek ismeretében célszerű az étkezési protokollok között mégis különbséget tenni. A CR klasszikusan az ad libitum százalékos megvonása az arányok megtartásával. A szakirodalomban „Dietary Restriction”-nek, diétás megszorításnak (DR-nek) nevezik az olyan kezelési módokat, melyek beavatkoznak ugyan az ad libitum kínálatba, de nem a klasszikus módon. Ezek közé tartozik a fehérje megvonás (protein restriction: PrR), egyes aminosavaké, szénhidrát megvonás (ChR) és a zsírok megvonása (FR). A DR kategóriába tartoznak még, olyan kivitelezési formák melyeknél a táplálékkínálat időbeli elosztást vagy összetételét módosítják. Ennek egyes formái is a CR-hez hasonló pozitív tulajdonságokkal bírnak (59-61). Idetartozik, a már említett időbeli elosztást módosító, az irodalomban leggyakrabban szereplő intermittáló koplalás (intermittent fasting: IF), melynek egyik formája a minden másnapi táplálék megvonás (every other day fasting: EODF). Az EODF esetében mérhető kalória bevitel hosszútávon megegyezik egy 20-30%-os napi CR-rel, mely mérsékelt kalória visszafogásnak felel meg (62).

Az intermittáló koplalás (IF) előnyei között megemlíthetjük a könnyebb kivitelezhetőséget és ezen tulajdonság nem csak a kutató energia befektetésének (lustaságának) kedvez. A pozitívumok közé tartozik, hogy ez a kezelés igen ”életszerű”, hiszen természetes körülmények között gyakran váltogatják egymást az éhezéssel-bőséges időszakok, sokkal inkább, mint egy előre meghatározott táplálékmenyiség egyenletes adagolása (bár ez vitatott téma). Itt hívjuk fel a figyelmet arra a megfigyelésre, miszerint a vizsgált állatok nem feltétlenül osztják be a kapott táplálékot. CR során a rendelkezésükre álló táplálék elfogyasztása után előfordulhatnak éhezéssel periódusok, hasonlóan az EODF táplálékmenyiség megvonási fázisához. Az EODF kivitelezés részben képes kezelni azt a problémát is, mely az állatok tömegváltozásából, illetve, hosszabb vizsgálatok esetén az állatok

korából adódik. A fiatal állatok energiaigénye fejlődésük folyamán nő, majd a koruk előrehaladtával csökkeni, kezd. A klasszikus kivitelezésnél, a felkínált adagok mennyiségét, az előbb említett tömeg- és életkorváltozásokhoz kellene igazítani a megbízható eredmény érdekében (63). Ez komoly kivitelezési gondokat okoz, melyeket nehéz orvosolni.

2.3.2. A kalóriamegvonás kérdései

A CR-vizsgálatánál leggyakrabban használt emlős modellek Muridae családba tartozó fajok, például *Rattus norvegicus* vagy *Mus musculus*. Ezeknél az állatoknál lényeges (ahogy más állati szervezeteknél is), hogy a posztnatális időszak mely fázisában alkalmazzák a kalóriamegvonást, hiszen a fiatalkorban fellépő energia- és tápanyaghiány veszélyeket rejthet magában. Erről számol be Harrison vizsgálata is, melyben C57BL/6J egereknél alkalmaztak kalória visszafogást közvetlenül az elválasztás után. Esetükben élettartam-csökkenésről lehetett beszámolni, sőt azt is feltételezték, hogy a CR genetikai állománytól függően fejti ki hatását (64,65). A túl korán alkalmazott CR más szempontból sem javallott. A fiatal állatokon alkalmazott CR nehezen kezelhető, -hiszen mint az előző szegmensben utaltunk rá-, az egyed fejlődése során jelentős testsúlygyarapodás figyelhető meg, így a tápanyag/táplálék igény is fokozatosan nő. Ezt a szempontot figyelembe véve igen csak nehéz olyan kalória megvonáson alapuló protokollt kivitelezni, mely előnyös egy fiatal alany számára (66).

Fontos szempont a táplálék micro és macro tápanyag összetétele, hiszen elvárható lenne csupán a kalória tartalmú összetevők megvonása. Az ásványi anyagok és vitaminok stb. esetleges hiánya így nem okozhat problémát. Figyelmet érdemelnek azok a megállapítások is, melyek szerint a kalorierg csoportba tartozó fehérje, zsír vagy szénhidrát (Carbohydrate, Ch) izolált megvonása is járhat előnyökkel.

Mari és munkatársai közleményükben arról számoltak be, hogy drosophilában a kalória bevitel fehérje tatalmú komponensének csökkentése (PrCR) jobban növelte az élettartamot, mint a hasonló mértékű szénhidrát (Ch) kalória megvonás (67). A felkínált kalória fehérje- illetve szénhidrát összetétele, megoszlása befolyásolni képes a CR kivitelezési formák eredményét. Nem elég csupán a táplálék kalóriatartalmával foglalkozni. Ezt demonstrálta Pamplona és Barja munkája is, melyben közel 20%-os élettartam növekedésről írnak PrCR hatására patkányoknál (68). Érdekes megfigyelés, hogy emberen kivitelezett ChCR nem eredményez különösebb változást sem az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF1), sem a kötőfehérjének (IGFBP) vér szintje tekintetében (69). Számos állatfajnál viszont a CR IGF-1 szint csökkenéssel jár és ez összefüggésbe hozható élettartam növekedéssel. A növekedési faktorok fontosságára egy másik tanulmány is rámutat, Suh és munkatársai 100 év feletti humán alanyok IGF-receptorát vizsgálták (70). Eredményeik szerint ezen személyek estében gyakori a receptor mutációja, mely a jelátvitel alacsonyabb hatékonyságával jár együtt. Az IGF-szint csökkenésével lassulnak az anabolikus folyamatok (így például az izomtömeg-gyarápodás is) és csökken egyes daganatok kialakulásának kockázata.

Az ismeretanyag bővülésével kiderült, nemcsak a fehérjék per se, hanem a fehérjék építőkövei, az aminosavak is szerepet játszhatnak a CR-vizsgálatok során megfigyelt élettartam növekedésében. Ebben a tekintetben a legfontosabbnak tartott két aminosav a triptofán és a metionin. Metionin megvonás esetén is tapasztalható élettartam növekedés még akkor is, ha a totál kalória bevitel változatlan (71). Mindezek mellett, metionin szegény étrend esetén számos olyan fiziológiás értéket mértek az állatok öregedése során, melyek inkább a fiatalabb fenotípusra jellemzőek (vércukor, inzulin-szenzitivitás) (72,73).

2.3.3. A kalória visszafogás humán és emberszabású vonatkozásai

A kalória visszafogás figyelemreméltó hatásainak láttán a szkeptikus kutatóban megfogalmazódhat az a kérdés, hogy vajon az „egyszerűbb” szervezeteken túl (mint

amilyenek a gombák, férgek, rovarok, rágcsálók) a főemlősök szervezetére is hasonló élettartam-növelő hatása van-e a CR-nek? Az emberi, főemlős szervezetet sokszor bonyolultabb/eltérő szabályozási rendszerek irányítják, mint a zárójelben szereplő élőlényekét, így feltételezhetően tápanyag-energiaigényük is eltérő lehet. 2009-ben jelent meg egy összefoglaló a Science folyóiratban, mely 20 éven át tartó longitudinális vizsgálatok eredményeit taglalta (74). A közlemény arra a következtetésre jutott, hogy a mérsékelt CR (mínusz 30% ad libitum) késlelteti vagy egyes esetekben meg is szünteti az öregedéssel kapcsolatos betegségek patogenezisét rhesus majmoknál, ezzel javítva túlélési esélyüket, valamint - talán ettől nem teljesen függetlenül – maximális élettartamukat is képes növelni. Más szerzők is foglalkoznak humán vonatkozású témákkal, ám emberek esetében a CR pozitív hatása korántsem egyértelmű (75-78). Ami biztos, hogy a krónikus túltápláltság minden kétséget kizáróan növeli számos betegség kockázatát és az ehhez köthető megnövekedett mortalitást.

Mégis van néhány beszámoló, melyek humán alanyok közreműködésével végzett vizsgálatokon, megfigyeléseken alapul. A legfigyelemreméltóbb ezek közül a Biosphere 1 és a Biosphere 2 projekt. Ezen vizsgálatok előzményei az 1950-es években elvégzett, az ún. Minnesota-vizsgálatok voltak, melyről Keys és munkatársai több lapban is beszámoltak (79,80). Azóta tudjuk, hogy a hosszantartó koplalást követően az anyagcsere lelassul, a szervezet oxigénfelvétele csökken.

A bioszféra 2 projekt keretein belül 8 vizsgálati alany élt 2 éven keresztül egy 12750 m²-alapterületű üveg- és acélépítményben Tuscon (USA, Arizona) mellett. Az építmény belseje és környezet között nem volt anyagáramlásra lehetőség, így a résztvevők a napsugárzáson kívül csak az építményen belüli erőforrásokra támaszkodhattak (ideértve az oxigént is). A kivitelezés leírásával, eredményeivel több cikk is foglalkozik (81-83). A CR szempontjából a projekt leglényegesebb karakterisztikája, hogy a vizsgálat kezdetén kiderült: a csoport kevesebb táplálékot tud termelni, mint amit a vizsgálat előtt megjósoltak. (Kezdetben a kutatás nem a Minnesota-vizsgálatok célkitűzését akarta megvalósítani). Ennek következményeképpen a Biosphere 2 projekt egy egyedülálló táplálékhiányt produkáló kezeléssé vált, amely lehetővé tette a hosszú ideig fennálló energiakorlátozás

hatásainak leírását (82). A vizsgálat végén 50 élettani változást írtak le, melyek főként a hematológiai, hormonális és sejt-biokémiai paraméterek eltéréseit mutatták. Az értékek pedig többé-kevésbé követték a rágcásalók és a majmok CR-vizsgálataiban mért trendeket.

Egy másik jelenség, melyre a szakirodalom utalni szokott humán vonatkozásban, az Okinava „effektus”. Okinava egy japán sziget, a Rjúkjú-szigetek része a Kelet-kínai tengeren. Az Okinaván élő emberek között található a legtöbb 100 éven felüli (az ún. centenarianok). A sziget lakosainak étrendjét az izoláltság miatt évszázadokig az alacsony kalória bevitel jellemezte, és ehhez alacsony glikémiás terhelés is társult. A tradicionális étrendet folytatók táplálékbevitelére Okinawán 30 százaléka volt csupán a Japán átlagnak. Ki kell emelni, hogy étrendjükben gyakran fordulnak elő halból készült ételek és magas ásványi anyag tartalmú zöldségek (pl.: jamgyökér, keserűdinnye, hínárféleségek). Az okinavai ember összkalória bevitelére cirka 1780 kcal volt a 2060 kcal-as nagy szigetek átlagával szemben (84). Szakértők többek között az alacsony kalória bevitellel magyarázzák az itteniek hosszú élettartamát, melynek folyamán ritkák a korhoz kötött betegségek. A helyzet azonban sajnos változóban van a szigeteken. Az utóbbi évtizedekben Okinawán is csökkenő tendenciát mutat a várható élettartam, melyet néhányan a „nyugati étrend”, illetve a XX. századig ritka migrációs folyamatok megjelenésével hoznak összefüggésbe (85-87).

2.3.4. Kalória visszafogás hatása a tanulásra és az anyagcserére

Érdeklődésünket a CR/DR iránt, a fentebb leírtakon túl, azon eredmények keltették fel, melyek a CR vázizomra és idegrendszerre gyakorolt hatásáról írnak. A CR képes volt javítani kísérleti állatok memóriáját (62). A fizikai aktivitás neuroprotektív hatása jól dokumentált (88-91), a CR/DR hasonló hatásáról kevesebb vizsgálat született, és a pontos hatásmechanizmusa sem feltárt. Feltételezések szerint a diétás megszorítások és a kalória visszafogás a tápanyag hiányával prekondicionálja az agyi struktúrákat, így az agysejtek később jobban viselnek el stressz állapotokat (62). A metabolikus és oxidatív stressz állapotok pedig sokszor mitokondriális funkciókhoz köthetők (92-94). A tanulás és tartós memória kialakításában központi szerepet játszik az ún. hosszú távú potenciáció

(szakirodalomban long-term potentiation: LTP). A CR sikeresen csökkentette a szinaptikus kapcsolatok megerősödésében szerepet játszó LTP romlást patkány hippocampusban (95).

1993-ban publikáltak olyan megfigyeléseket, melyek szerint középkorú állatok jobban teljesítenek a sugaras útvesztő tesztben (állatok tanulási képességét vizsgáló teszt) és jobb motoros koordinációval rendelkeznek, ha kalória visszafogásban részesülnek (96). A tanulásban fontos szerepet játszanak a neurotrofinok, ezek közül is az utóbbi években az agyi eredetű növekedési faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) került a középpontba. A kitüntetett figyelmet többek között azért érdemelte ki, mert Hall és mtsai. erős pozitív korrelációt fedeztek fel a hippocampus BDNF szintje és a tanulási képességek között, patkányoknál (97). Számunkra ez azért érdekes, mert az agy BDNF szintje úgy tűnik, nem független a táplálkozási szokásoktól (98).

Humán vonatkozásban a CR hatása a kognitív képességekre, az élettartamhoz hasonlóan, nem olyan egyértelmű. Emberen kivitelezett CR-vizsgálatok ritkák, és mint már fentebb utaltunk rá, kivitelezésük etikai problémákba ütközik. Mégis néhány szerző a mérsékelt energia bevitt összefüggésbe hozza olyan idegrendszeri megbetegedések csökkent gyakoriságával, mint amilyen az Alzheimer-betegség és a Parkinson-kór (99,100).

A memória formálás több szempontból is az agy speciális részeihez köthető. Kiemelkedő jelentőséggel bír a hippocampus, mely a limbikus rendszer részét képezi. A hippocampus a medio temporális lebenyben a cortex alatt helyezkedik el. Anatómiai könyvek hippocampus proper néven különítik el a gyrus dentatus és a cornu ammonis régiókat. A hippocampus afferens impulzusokat kap entorhinális kéreg (EC) (Br28, Br34) régióiból. Az EC második rétegéből futnak axonok a gyrus dentatus (GD) granuláris sejtjeihez. A GD-től az angol irodalomban ún. „mossy fiber”-eken keresztül jut az impulzus az amon szarv CA3-as régiójában található piramissejtkekhez, majd innen a Schaffer féle kollaterálisokon terjed a CA1-es régió sejtjeihez. Végül a kört a subicum és az EC mély rétegei zárják. Indulnak még az EC harmadik rétegéből is impulzusok, melyek megkerülve a CA3-as sejteket egyből a CA1 részen afferentálnak. Az előbb említett hármas átkapcsolást Per Érsen 1971-es munkája óta triszinaptikus hálózatként ismerjük (101).

Érdemes még megemlíteni a hippocampális kosársejteket melyek GABA-erg aktivitásukkal visszatérő gátlás hurkokon keresztül modulálják a piramissejt aktivitást, főként a CA3 régiókban (102).

A humán alanyokhoz szokott szakemberben felmerül a kérdés, hogy vajon milyen módon lehet mérni a memóriát illetve a tanulási képességet rágcsálók esetén. Számos eljárást dolgoztak ki annak megfelelően, hogy a kutatás a kognitív funkciók mely aspektusait célozzák. Ezek közé tartoznak a labirintus tesztek: sugaras útvesztő, Morris vízi útvesztő, melyek a térbeli tájékozódást célozzák (103), tárgyfelismerési tesztek, melyek a percepciók képességeire fókuszálnak (104). Az aktív-passzív elhárítási tesztek egy bizonyos inger elkerülést vagy éppen előnyben részesítést vizsgálják és az eredményekből az állat emlékező képességére, memóriájára következtetnek (105). Vizsgálatunkban, a passzív elhárítási tesztet alkalmaztuk, mellyel az állatok közép-rövidtávú memóriája becsülhető. Választásunk azért esett erre az eljárásra, mert a hippocampális régió meghatározó szerepet tölt be az említett memória kivitelezésében.

2.4. Molekuláris és biokémiai háttér

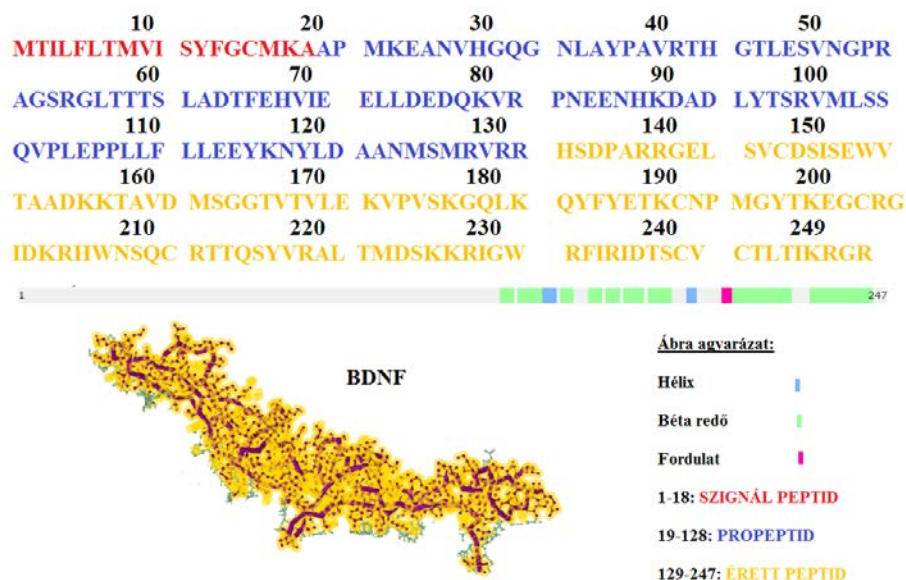
2.4.1. Agyi eredetű növekedési faktor

A BDNF (brain-derived neurotrophic factor) az idegsejtek differenciálódásában és túlélésében kulcsfontosságú szerepet betöltő molekula. Az 1950-es években fedezték fel az első neurotrofikus molekulát, az NGF-et (106), majd később 1981-ben a csoport második tagját, a BDNF-et. Először sertés-idegsejteken mutatták ki neuroprotektív hatását (107). Nemsokára az is kiderült, hogy a BDNF szisztémás hiánya (vagy epileptogénikus állapotokban pont a megnövekedett expressziója (108)) komoly idegrendszeri degenerációkat tud okozni, ebből következően szintjének abnormális változása számos betegség, neurológiai elváltozás hátterében állhat (109).

Az idegrendszer sejtállományának döntő többsége a prenatális időszakban képződik. Ám az utóbbi 20 év eredményei arra mutatnak rá, hogy a „felnőtt” agy bizonyos részein idegsejt gyarapodást lehet megfigyelni. Először a hippokampusz zona subventricularis részében (SVZ) és a gyrus dentatusban mutattak ki neurogenézist (110), majd később a szaglógumóban (111) is. A neurogenesis folyamata úgy tűnik, szoros kapcsolatban áll a BDNF-szint emelkedéssel (112-114). A tudományterületet egyre nagyobb népszerűség kezdte övezni, ahogy további agyi régióban is (striatum, septum, thalamus és a hypothalamus) idegsejt gyarapodást mutattak ki BDNF hatására (115).

A TrkB Tropomiozin receptor kináz B, más néven tirozin receptor kináz B egy protein kináz receptor, melynek potenciális ligandja a BDNF. Érdekesség, hogy a BDNF prekursora a proBDNF (32 kDa: 1.ábra), egy ún. p75NTR (neurotrophin receptor p75) receptorhoz tud kapcsolódni, mely a tumor nekrosis faktor receptor szupercsalád tagja (116). A proBDNF a Golgi apparátusban modifikálódik és így alakul ki az „érett” BDNF (14 kDa) molekula. Ez a molekulaforma az intersticiális térbe jutva képes ingerelni a TrkB-receptort más sejtek, vagy a sejt saját membránjának felszínén. Alapvetően két fajta teljes láncú TrkB receptor izoform létezik (117,118), ezekről feltételezik, hogy aktiválódásuk

elősegíti a sejtdifferenciálódást, -túlélést, a neuritek növekedését, és fokozza a szinaptikus plaszticitást (108,119-121).



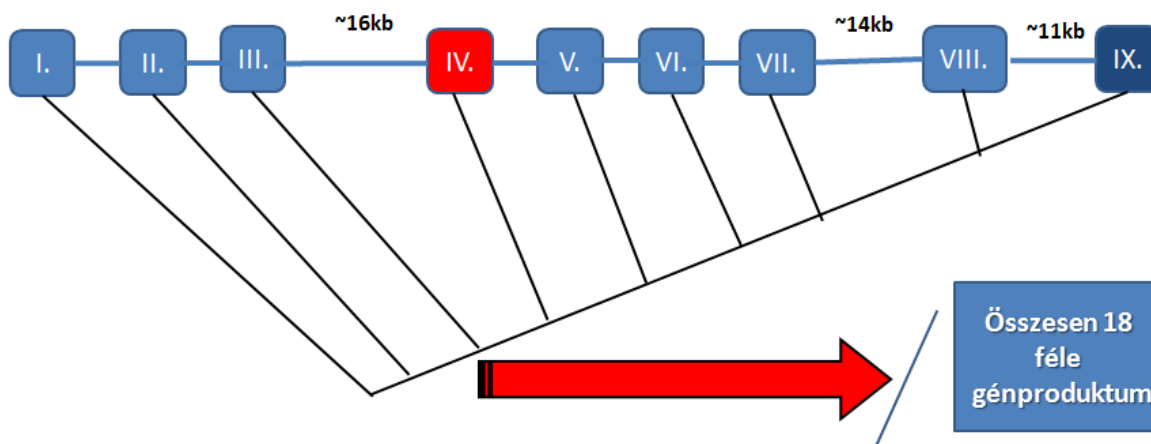
1. ábra

A patkány BDNF molekula aminosav szekvenciája és 3D szerkezete

(Szekvencia:<http://www.uniprot.org/uniprot/P23363>, Struktúra: Robinson RC., Radziejewski C. és mtsai. *Biochemistry* (1995) –alapján (122): <http://www.rcsb.org/>)

A patkány genomában nyolc különböző promóter régiót lehet elkülöníteni a BDNF gén esetében (I-VIII exon). Összesen 18 féle génátírat képződhet az alternatív splicing mechanizmus és az eltérő poliadenilációs helyek miatt. Figyelemreméltóan mind a 18 transzkriptumokról ugyanaz a BDNF (preproBDNF) fordítódik. Itt fontos megemlíteni, hogy a szakirodalomban a promóter régiók nomenklatúrája eltérhet, hiszen Aid 2007-es munkája óta (123) régebbi publikációkban szereplő III. régió felel meg a IV. régiónak, illetve a régi IV. a VI-nak és a régi V-ös promóter pedig a IX. régiót jelöli (a BDNF gén szerkezetéről eddigi ismereteink szerint Hong és mtsai. által közölt információk (124) alapján

a 2. ábrán látható). Ezen változtatásokat mindenképpen figyelembe kell venni a 2007-nél régebbi szakirodalom olvasásánál.



2. ábra

A BDNF gén struktúrája.

Hong J. 2008-as közleménye alapján (110). Pirossal az általunk vizsgált promóter szakaszt jelöljük. IX.-es doboz jelöli a „közös” kódoló exont.

A BDNF gén kifejeződése az idegrendszeren kívüli szöveteken korlátozott, ugyanis a BDNF gén tartalmaz egy ún. neuron 'restrictive silencing element 1' - (RE1) kötőhelyet, melyhez egy RE1 silencing (RE csendesítő) transzkripció faktor (REST) tud kapcsolódni, és gátolni a gén átíródást (125). A vázizom és az agy szekréciós funkciójával foglalkozó vizsgálatok arra utalnak, hogy a BDNF szerepet játszhat az izomszövet regenerációjában, hiszen csökkent szintje megváltoztatja myogenezist és regenerációt egerekben (126). A mechanizmus háttere azonban nem tisztázott. Pedersen és Febbraio kiváló összegzése arról ír, hogy a BDNF az IL-6-tal (inter leukin 6) karöltve nemcsak az izom hipertrofiában játszik szerepet, hanem az AMPK-mediált (Adenozin monomphosphate aktivált protein kináz) zsírsav oxidációban is (127,128).

Számos eredmény arra enged következtetni, hogy a BDNF közrejátszik olyan betegségek kialakulásában, mint az Alzheimer kór, depresszió, epilepszia vagy különböző addikciós kórképek. Példának okáért kimutatták, hogy ha a humán pre-pro BDNF 66-odik pozíciójű valin aminosav metioninra módosul, nagymértékben megnő a skizofrénia prevalenciája az érintett egyéneknél (129). Az említett nukleotid polimorfizmus valószínűleg a BDNF szállítását és szekrécióját korlátozza, ezért hajlamosít ez a mutáció skizoid elváltozásokra (130). Az egészséges, de a mutációval rendelkező személyek csökkent epizodikus memóriával rendelkeztek és mágneses rezonancia adatok szerint hippocampális neuron integritásuk kevésbé fejlett.

Fontos tény, hogy a BDNF szabályzásban döntő szerepet játszanak az életvitel különböző összetevői, azon belül is különösen a fizikai aktivitás (131). Az utóbbi évtizedekben a tudományos és ismeretterjesztő irodalomban egyre gyakrabban találkozhatunk az „edzett agy” kifejezéssel. A rendszeres testedzésnek a legtöbb, a kor előrehaladtával megjelenő betegség prevenciójában van kiemelt szerepe. A vázizom és a kardiovaszkuláris rendszer funkciójának megőrzése hatással van az idegrendszer egészségére is. Prakash (132) áttekintő munkájából tudhatjuk, hogy a rendszeres fizikai aktivitás képes csökkenteni a kor előrehaladtával megjelenő kognitív hanyatlást, degeneratív betegségek megjelenését, illetve csökkenti a mortalitást is. Az általunk használt alacsony futókapacitású állatokat rövidebb élettartam jellemzi, így esetükben a fizikai aktivitás nem elhanyagolható jelentőségű. Néhány publikáció a táplálkozáshoz köthető ismert és az új anorexián transzkripciós folyamatok erősödését feltételezi a BDNF fehérje jelenlétében (133,134). Park beszámolója szerint a magas kalóriatartalmú, zsírdús diéta csökkenti a neurogenesis markerek megjelenését a hippocampus gyurus dentatus régiójában (135), mi több a magas zsírtartalmú diétát folytató csoport BDNF szintje is alacsonyabb volt a kontroll csoportnál. A kalória fogyasztás mérséklés és a kognitív teljesítmény növekedés összefüggéséről is találunk információt, ezek szerint 30%-os kalória mérséklés javította a verbális memóriát idősödő humán alanyoknál (136). A túlzott energia bevitel miatt kialakuló obesitas pedig neuroinflammációt (137-139), hippocampális diszfunkciókat (140) okozhat, melyek mind hozzájárulnak a memória és egyéb agyi

funkciók hanyatlásához. Az említett neurionflamációs-neurodegeneratív folyamatok háttérében pedig mitokondriális diszfunkciók állhatnak (141-143). (Részletesen a 2.3.4. pontban) Vizsgálatunkban az alacsony futókapacitású állatok elhízásra hajlamosabbak, (144) így esetükben a kalória visszafogás alkalmazása preventív eszközként merülhet fel.

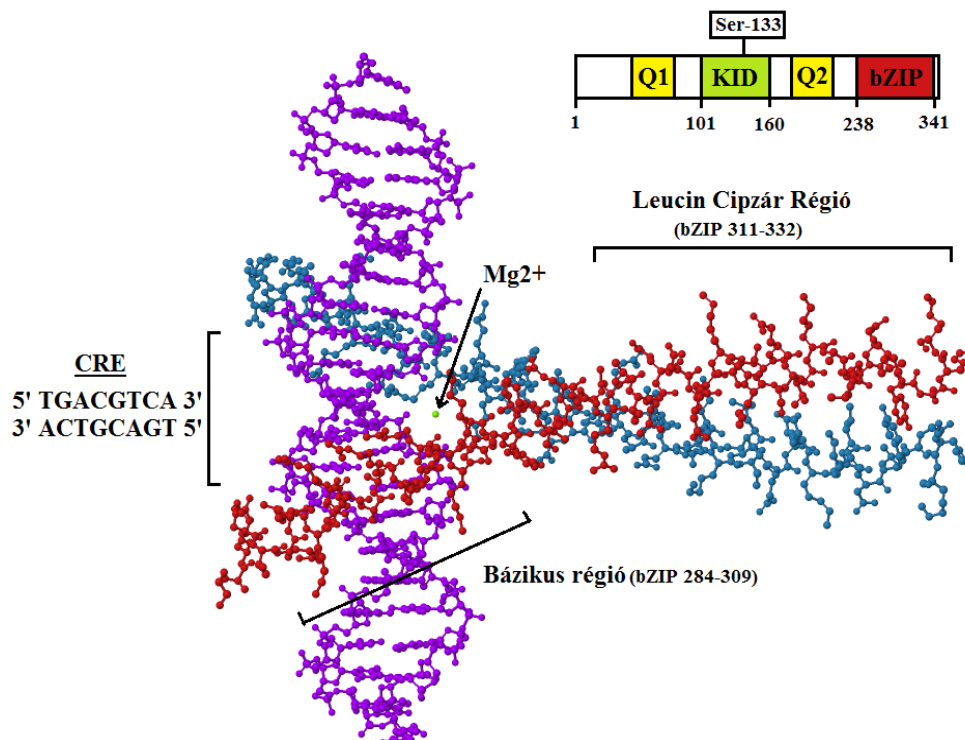
2.4.2. A cAMP érzékeny elemet kötő protein

A c-AMP Responsive Element Binding protein (CREB) egy 1987-ben azonosított 43 kDa molekulású fehérje (145), melyet a szomatosztatin gén transzkripciójában betöltött szerepével összefüggésben fedeztek fel. Azóta kiderült, hogy a CREB egy a leucin cipzár domént tartalmazó fehérjecsald fontos képviselője.

A ciklikus AMP az idegsejteken belül másodlagos hírvivő anyagként előforduló molekula. A cAMP egy sereg, a sejt környezetében létrejött változás eredményeképpen szintetizálódhat, főként G proteinek és protein kinázok aktivációjának eredőjeként. A cAMP pedig további kinázokat aktivál (pl. Protein kináz A). A CREB szabályozása igen összetett, több mint 300 különféle stimulusról derítették ki, hogy képes aktiválni ezt a molekulát (146). Ezen fehérjék a génátírás regulációban töltik be szerepüket. A CREB speciális, ún. cAMP response elements/cAMP érzékeny (CRE) DNS régiókhöz tud kötődni (3. ábra).

Lonze a CREB molekula három izoformjáról számol be (147) (CREB-A, CREB-B, htCREB), ezek mind tartalmaznak egy uniform bZIP (bázikus leucin zipzár) régiót. Az említett bZIP, egy bázikus cipzár domain, mely a DNS kapcsolódását segíti elő. A leucinban gazdag domain egy másik CREB molekulával történő homo-, illetve más leucin zipzárral rendelkező fehérjékkel történő heterodimer kialakítását teszi lehetővé. A CREB-ek tartalmaznak még egy glutaminban gazdag Q1 és Q2 régiót. Ez a terület felelős a bazális transzkripciós folyamatok kialakításáért (transzkripciós faktorokkal és az RNS-polimerázzal való kapcsolódás). Végül megtalálható bennük a KID (kinase-inducible

domain) elnevezésű aminosav lánc, mely specifikus protein kinázokra érzékeny(147-149). A CREB protein kinázokkal áll kapcsolatban, melyek a CREB-et foszforilálva (pCREB) szabályozzák aktivitását és így magát a transzkripciót: a 133. pozíciójű szerin foszforiláció lokális transzkripciós folyamatokat aktivál. A foszforilációs mechanizmus, az idegrendszerért extracellurális stimulációra reagál (147). Fontos még megemlíteni, hogy az idegsejten kívüli Ca^{2+} ionok beáramlása feszültség- vagy ligand-függő csatornákon keresztül is szükséges a CREB aktiválódásához (150). Ennek lehet kulcsfontosságú szerepe a már fentebb említett LTP kialakításában.



3. ábra

A CREB dimer-DNS kapcsolat

A képen a CREB molekula 285-339. aminosav láncja látható kapcsolódva a CRE palindrom konszenzus szekvenciával. Lila molekula a DNS kettős hélixet jelöli, a piros és kék a CREB monomereket. Fölötte a teljes molekula, doménekkal. (Struktúra: Schumacher M., Goodman R., Brennan R., J Biol Chem. (2000) – alapján (151): RCSB Protein Data

Bank alapján, ref.: IDH3, Display Options/Style: Ball és Stick, Color: Subunit, Surface: None)

A szakirodalom a CREB-et sokszor hozza összefüggésbe a „szinaptikus plaszticitással”, mely igencsak „divatos” kifejezés a memória és az idegsejt/idegrendszer fiziológia leírásánál. Maga a szóösszetétel nagyjából annyit jelent, hogy az idegrendszer különböző környezeti helyzetek/elvárások változásának mennyire képes megfelelni. Természetesen mindezen változás az idegrendszer hálózat szintjén értendő és az idegsejtek közötti szinaptikus kapcsolatok erősödésének vagy gyengülésének dinamikájára utal. Ez komplex folyamat, mely magában foglalhatja a szinapszisok kiépülését, az idegsejtek elektrofiziológiai működését, sőt akár az új idegsejtek differenciálódását is. A CREB fehérjék több száz gén expresszióját befolyásolhatják (148). Úgy tűnik, a DR elősegíti a CREB foszforilációját (152), és szerepet játszik a BDNF gén működésében is. Többek között a IV exon promoter régiójában is találtak CRE köthelyet (152-154). Viszont a CREB-BDNF információáramlás fordítottja is megvalósulhat, hiszen a BDNF regulálja számos géntermék transzkripcióját, melyek ugyan csak a CREB aktiválásához köthetőek (155).

2.4.3. A mitokondrium szerepe az energiatermelésben, mitokondriális biogenezis

A mitokondrium az eukarióta sejtekre jellemző sejtalkotó, melynek létfontosságú szerepe van az oxidatív anyagcsere lebonyolításában. A mitokondriumban játszódnak olyan alapvető energianyerő folyamatok, mint a zsírsav oxidáció vagy a citromsav ciklus, melynek fontos komponense a szukcinát dehidrogenáz A enzim (SDHA). Az SDHA enzim a szukcinát-fumarát átalakulást katalizáló, az elektrontranszport láncban is szerepet vállaló szukcinát-ubikinon oxidoreduktáz komplex tagja (komplex II) (156). Ez az enzim komplex a mitokondriumok belső membránjába integrálva helyezkedik el a citokróm c-oxidáz (COX) együtt, mely ugyancsak a transzport lánc tagja (komplex IV). A szövetek citokróm c-oxidáz 4-es (COX4) alegység-, illetve az SDHA fehérje koncentrációja az oxidatív kapacitás egyik fontos indikátora, továbbá alkalmas mitokondrium mennyiség becslésére (157). A mitokondriumok mennyiségi változása és funkcionális stabilitása kulcsfontosságú

tényező a sejtek energiasztásának kialakítása szempontjából, mely pozitív kapcsolatot mutat az oxigénfelvétellel és az ehhez társuló aerob teljesítménnyel (158).

A mitokondriális biogenezis során új mitokondriumok keletkeznek, mennyiségük emelkedését számos jelátviteli folyamat indukálja. A mitokondriumok képesek osztódni és fuzionálni, ezzel fenntartva funkcionális és strukturális stabilitásukat (159). Majdnem minden eukarióta sejtben megtalálhatóak és többek között osztódó képességük utal endoszimbiotikus eredetükre (160). A de novo mitokondriális biogenezis kulcsfontosságú molekulája a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor-1-alfa (PGC-1), melyet az irodalom a mitokondriális biogenezis „mester szabályozó” molekulájaként tart számon (161-166).

A PGC-1 alfa egy transzkripciós cofaktor fehérje, melyet a mitokondriális biogenezissel és az oxidatív anyagcsere funkciók szabályozásával társítanak. A PGC-1 alfa expressziós szintje elsősorban azokban a szövetekben magas, melyek mitokondriumban gazdagok és melyeket aktív oxidatív metabolizmus jellemez (1-es típusú vázizom rost-, szívizom-, májszövet) (127). Eredetileg a PGC-1 alfát az adaptív termogenezissel foglalkozó csoportok írták le. Először a barnazsír szövet alacsony hőmérsékleti körülményekre adott válaszreakciójánál mutatták ki, ahol szerepet játszik a hideg környezetben tapasztalható hő kibocsátás szabályozásában (138). A figyelem középpontjába akkor került, amikor olyan folyóiratok, mint a *The Cell* elkezdtek cikkezni annak lehetőségéről, hogy az aktivált PGC-1 alfával esetleg kontrollálható az obezitás (139). Egyre gyakrabban jelentek meg olyan leírások a PGC-1-alfáról, melyek szerint a mitokondriális biogenezis indukálásában van kulcsfontosságú szerepe (131,139,140).

Az NRF-1 (nuclear respiratory factor 1) és a mitokondriális biogenezis kapcsolatáról először Scarpulla és mtsai. számoltak be (141). Kimutatták, hogy az NRF-1 a mitokondriális transzkripciós faktor A (mtTFA vagy Tfam) promóter régiójához kötődve indukál transzkripciót. Az mtTFA pedig a mitokondriális DNS (mtDNS) megkettőződésért felelős. Az NRF-1 fontos láncszem a nukleáris és a mitokondriális gének expressziójának kontrollálásában. Az NRF-1 az mtTFA mellett néhány olyan gén átíródásához is köthető,

melyek a respirációs folyamatokban, továbbá a hem alegység szintézisében töltenek be meghatározó szerepet.

A PGC-1 alfa és a NRF-1 kapcsolatáról Wu közleményében olvashatunk (139), itt a PGC-1 erősen stimulálja az NRF-1 gén expresszióját. Bebizonyították, hogy a PGC-1 co-aktivátorként van jelen az NRF-1 által közvetített transzkripciós mechanizmusnál, a fehérjék mennyiségének mérésével pedig következtetni lehet a mitokondrium képződés dinamikájára (142).

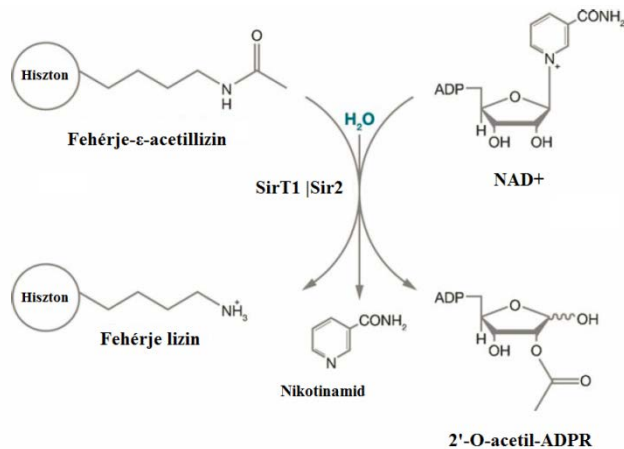
A mitokondriális biogenezist egyik kiváltó ingere a sejten belüli ATP szint csökkenés, mely az esetek többségében oxigénhiánnyal párosul (161). Ilyen környezet alakul ki edzés hatására (izomban), illetve szisztémás hipoxiás körülmények között (pl. magaslati környezetben). Az AMP/ATP arány ebben az esetekben az AMP irányába tolódik el. A magas AMP szint aktiválja az adenzin-monofoszfát-aktivált protein-kinázt (AMPK), mely Jager közleménye alapján (167) direkt foszforilálja és ezzel aktiválja a PGC-1 alfát. Az AMPK szerepét O'Neill csoportja is megerősítette (168), ők mutatták ki, hogy AMPK béta alegység hiányában csökken a de novo mitokondrium képződés és ez a vázizom csökkent teljesítményben is megmutatkozik.

Az anyagcsere státusz másik fontos indikátora a sejten belüli NAD⁺/NADH arány. A nukleáris és a citoplazmás NAD⁺ szintre érzékeny molekula a Sirt1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1: NAD⁺ dependens deacetyláz molekula, részletek a lentebb), melyet több kutatócsoport is összefüggésbe hozott a mitokondrium fejlődéssel. Tekintve, hogy a NAD⁺ szint emelkedése sokszor az energiahányos folyamatokkal hozható kapcsolatba és a publikációk a PGC1 alfa aktivációját írják le Sirt1 hatására (169,170), ésszerűnek tűnik a feltételezés, ám meg kell említeni, hogy speciális esetek viták tárgyát képezik (171).

A Sirtuinok története a *Saccharomyces cerevisiae* silent information regulator 2 (Sir2) enzimjének felfedezésével indult, mely Sirt1 homolog NAD⁺-függő deacetyláz enzim és a hiszton fehérjékre mutat nagy specifikitást. A Sir2 aktivitását hozták összefüggésbe (172-

175) a CR által indukált élettartam növekedésével. Sir2 homologok jelenlétét számos fajban kimutatták, ezek közé tartozik a *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica), *Caenorhabditis elegans* (fonálféreg), rágcsálók, mi több, az emberben is megtalálható. Eddigi tudásunk szerint emberben hét Sir2 homolog különböztethető meg (Sirt1-7), ezen szirtuinok hasonló doménekkal rendelkeznek, de más subcelluláris szinteken lokalizálhatóak. Evolúciós szempontból azért jelentős a Sir2, mert eddigi ismereteink szerint csoportjának olyan képviselője, melynek homologjai az idők folyamán az emberben is konzerválódtak. Fontos megemlíteni, a szirtuinok hiányoznak olyan élőlényekből, mint amilyenek a fonálférgek vagy a növények (176). Ez felveti a kérdést, hogy a szirtuinok vajon, mint redundáns molekulák vannak-e jelen a szervezetekben, melyek feladata egyéb fehérjestruktúrákhoz hasonló. Emlősök esetében nem tűnik valószínűnek, hiszen azok az egerek, melyek szervezetéből hiányzik a SIRT1 gén, alacsony testsúllyal születnek, és csak ritkán élnek a korai posztnatális időszakon túl (177). A Sirt1 deficitet metabolikus abnormalitások kísérik, ezek közül a szív és érrendszeri funkciók romlása (178), illetve a csökkent lokomotoros aktivitás a legpotensebbek (178-181). Az irodalomban a legtöbbet idézett szirtuin a Sirt1, mely vizsgálatok szerint túlnyomó többségben a nukleuszban található (182,183), ám a citoplazmában is kimutatható. (184)

Mint már említésre került, a Sirt1 aktivitásához elengedhetetlenül szükséges a NAD⁺, (173,185,186), melyet a fehérje, mint kosubsztrát használ. Az energianyerő folyamatok során (beta oxidáció, glikolízis, citrátkör) NAD⁺ redukció történik és NADH keletkezik. Az említett folyamat energiabőség esetén a NADH irányába tolódik el. Energiahiányos állapotban a NAD⁺ szint növekedhet, ha az elektron transzport lánc NADH-t oxidál. Utánpótlás hiányában a NAD⁺/NADH arány NAD⁺ irányba tolódik, mely a Sirt1 aktiválódását indukálhat. Rodgers és mtsai. (187) közleménye alapján hosszabb éhezés után 50%-kal növekedett a hepatociták NAD⁺ tartalma, mely fokozta a Sirt1 aktivitást. (4. ábra)



4. ábra

A szirtuinok által katalizált reakció

Anthony A. Sauve, Cynthia Wolberger Annu. Rev. Biochem. (2006) alapján (188)

A Sirt1 sejten belüli szintjét különböző metabolikus stressz faktorok befolyásolják, ezek közé tartozik az oxidatív stressz, edzés és a kalória visszafogás. Cohen és mtsai. számos szövetféleségben (agy, vese, máj, zsírszövet, vázizom) Sirt1-szint növekedést találtak kalória visszafogás hatására (189). Esetükben az ad libitum táplálék mennyiség 60%-a eredményezte a fehérje mennyiségének növekedését. Más szerző a NAD⁺ koncentráció emelkedését írta le CR hatására, mely Sirt1 aktivációt okozott a fehérjeszint emelkedése nélkül (190). A Sirt1 overexpressziója pozitív metabolikus változást eredményezett egereken. Ilyenek voltak a csökkent zsírkészlet, a mérsékelt koleszterin és glükóz szérumszint koncentráció (191,192). Összességében az állatok ellenállóbbak voltak az elhízással és kevésbé alakult ki náluk glükóz intolerancia.

A kalória visszafogás fenotípusai közé tartozik a megnövekedett motoros aktivitás, mely SIRT1 knock out (KO) egerekben eltűnik. A CR-re jellemző fenotípus kialakításában feltételezhetően szerepe van a Sirt1-nek (193). Li és mtsai. arról számoltak be, hogy a CR hatásra megfigyelhető élettartam növekedés eltűnik SIRT1 KO állatoknál (194). A kalória

visszafogás mellett számos más metabolikus stressz állapot is hatással van a Sirt1 aktivitásra/szintre (195-197). Sirt1 targetek közé tartoznak DNS sérülésre érzékeny fehérjék: a Ku70, a FOXL2, a NBS1 (198,199) és a FOXO család tagjai (FOXO1,-3,-4), melyek az apoptózis és a sejtciklus vezérlésében vesznek részt. Célpontja még az NF-kB, mely a tumorszupresszor p53 fehérjével van kapcsolatban (196). Számunkra érdekes aspektus, hogy a Sirt1 képes lehet deacetilálni a PGC1-alfát, (200) ezzel elősegítve a mitokondriumok gyarapodását, a folyamat még azonban nem teljesen tisztázott.

2.4.4. BDNF és a mitokondriális funkciók kapcsolata

A növekedési faktorokról régóta tudjuk, hogy szerepet játszanak az oxidatív anyagcsere szabályzásában, azon belül is a mitokondriális anyagcsere folyamatokban. A neurotrofinok egzakt hatásáról azonban kevés ismeretanyag áll rendelkezésünkre. Merkham és munkatársai egéragy-mitokondriumok oxigénelektrodos vizsgálatánál kimutatták (201), hogy azok a sejtek, melyeket BDNF-el kezeltek, több oxigént vesznek fel, mint a kezeletlen populáció. Ugyanez a kutatócsoport egy korábbi, 2004-es közleményében patkányokon vizsgálta a mitokondriális oxidáció hatékonyságát (202). Ekkor fedezték fel, hogy a BDNF az agyra specifikus aktivitást mutat, hiszen májszöveten nem növelte a komplex 1 (respiratorikus enzim) aktivitását. Ezek után jogosan merült fel a kérdés, hogy vajon a BDNF hat-e valamilyen módon a mitokondriális biogenezisre.

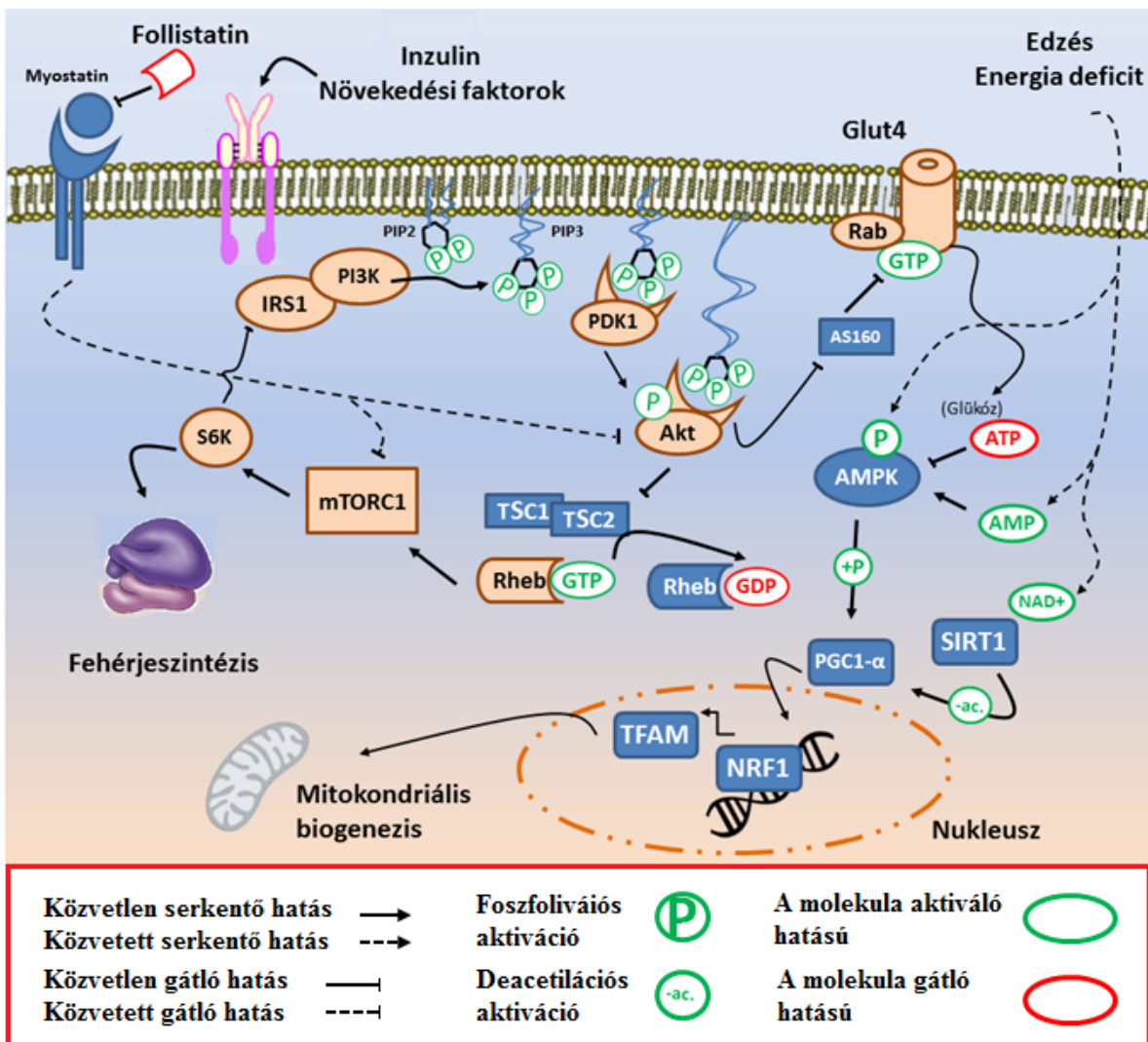
Számos olyan idegrendszeri betegség van, mely összefüggésbe hozható a mitokondriumok működési zavarával, és az ezzel együtt járó reaktív oxigéngyökök (ROS) felszaporodásával. Sokszor ezekhez a kórképekhez a BDNF-szint csökkenése is társul. Testedzés hatására izomszövetben fokozódik a PGC-1 alfa szintje és mitokondriális biogenezis figyelhető meg(162,203). Az izomhoz hasonló helyzetet feltételez Wareski 2009-es munkájában (204) neuronok esetében is. Ezt a nézetet támogatja számos riport, melyek a fizikai aktivitás hatására memória és egyéb kognitív funkciók javulásáról írnak, összekapcsolva mindezt a BDNF-szint emelkedéssel(90,91,205). Sajnos a PGC-1 alfa

idegrendszeri szerepéről viszonylag kevés információ található az irodalomban, azonban az idegsejtek ROS elleni védekezésében, úgy tűnik, kulcsfontosságú szerepet tölt be a PGC-1 alfa, hiszen szintjének emelkedése sikeresen mérsékelte az idegsejt kultúrák pusztulását, a sejtek saját antioxidáns enzimjein keresztül (SOD-2, GPx1)(206). Ezek után talán nem meglepő, hogy PGC-1 alfa knock out egereknél károsul a BDNF-hez kötött dendritfejlődés (207). Fontos megemlíteni, hogy ebben az esetben a TrkB-receptor expressziója érintetlen marad!

A táplálkozás, CR/DR hatása a mitokondriális funkciókra a testedzéssel ellentétben nem magától értetődő. 2005-ben a Science folyóiratban megjelent egy beszámoló, mely szerint a CR támogatni képes a mitokondriális biogenezist (208). Ezt a felfedezést mi más kutatócsoportokkal egyetemben furcsa eredménynek találtuk. Hancock például 30%-os CR hatására sem agyban sem vázizomban, de még szív és zsírszövetben sem tudott kimutatni mitokondriális fehérje vagy mRNS emelkedést (209). Felmerülhet a kérdés, vajon hogyan viszonyulnak ehhez a kérdéshez a krónikus illetve akut diétás kezelések, illetve nem közvetett eredményekkel állunk-e szemben: vegyük például azt a megfigyelést, miszerint a táplálékuktól megvont állatok többet mozognak (210).

2.4.5. Az RAC-alfa szerin / treonin protein-kináz (Akt) és a myostatin-follistatin tengely.

A sejtek fejlődését, osztódását, fehérje anabolizmusát jelentősen befolyásoló rendszer a PI3K/Akt/mTOR jelátviteli lánc. A folyamatok extracelluláris aktiváló molekulája az inzulin és az egyéb növekedési faktorok (IGF1, MGF, de a BDNF is.), melyek membrán receptorukhoz kapcsolódva indítják be a jelátvitel mechanizmust. Ez, a főként foszfokinázokból álló „biogépezet” precízen koordinálja a sejt anyagcseréjének irányát (5. ábra).



5. ábra

Az anabolikus/katabolikus és az extacelluláris ingerek összefoglaló ábrája

Chen és mtsai., Li és mtsai. továbbá Fernandez-Marcos és mtsai. (179,180,186) publikációinak anyaga alapján készített, saját összefoglaló ábra. A sejten kívüli hormonális ingereket az Akt fehérje közreműködésével lezajló mechanizmusok integrálják. Az AMPK a sejten belüli „energia hiányra” érzékeny fehérje, míg az mTOR komplex(ek)et a „tápanyag bőséget” aktiválja az Akt fehérje közreműködésével.

Az Akt foszforiláció a glükóz transzport folyamatokra, és ezzel egyidejűleg az inzulin érzékenységre is hat (211). Az Akt targetek közé tartozik egy 160 kDa molekulatömegű fehérje (AS160 vagy TBC1D1), mely a GLUT4 inzulindependens glükóz transzporter sejtmembránra történő transzlokációját koordinálja. Az AS160-gátlása a Rab fehérje aktiválódását okozza, melynek hatására a GLUT4 a külső sejtmembrán felszínére helyeződik, és lehetővé teszi a glükóz beáramlás a sejtbe.

A myostatin fontos regulátora főként a vázizomszövet gyarapodásának. Myostatin hatására az Akt jelátviteli mechanizmus gátlás alá kerül (212) és az izom fehérjeszintézis is csökkent mértékű. A myostatin fehérjéhez nagy affinitással kötődik a follistatin, mely a myostatin bioavilitását csökkentve neutralizálja a myostatint (213), ezzel elősegítve az anabolikus folyamatok előtérbe kerülését. A myostatin hiány illetve a follistatin túltermelés fokozott vázizom gyarapodással jár. Erre népszerű példa a belga kék (Belgian Blue) marha, mely a vonal tenyésztése során a myostatint kódoló szekvencia funkciója sérült és az állatok szélsőségesen nagy izomtömeggel rendelkeznek (214).

Érdekes, hogy a merőben ellentétes anyagcsere változásokat indukáló AMPK (AMP-activated protein kinase, AMP-aktivált protein kináz, az energia hiányos folyamatokat érzékelő „mester regulátor” fehérje (215) a GLUT4 transzlokáció esetében az Akt-aktivitásához hasonló transzlokációs folyamatokat indukál (GTP-áz gátlása foszforilációval) (216).

2.4.6. Epigenetika

Az epigenetika egy nemrég kialakult tudományág. Maga a szó a genetikai kódon kívüli, a genetikai kódon felüli szabályozásra utal. Crick 1970-ben fogalmazta meg a molekuláris biológia centrális dogmáját, melyben kifejti, hogy a sejten belül az információ áramlása a DNS, RNS, fehérje irányt követi (217). (Érdekes a „dogma” szóhasználat, hiszen tudományos kontextusban ritkán használnak teológiai tartalommal bíró szavakat, pláne nem

olyat, mely megkérdőjelezhetetlenséggel kapcsolatos.) Crick tétele lényegében igaz is lenne, ha nem kötné ki, hogy más irányba információáramlás nem valósulhat meg. A korábban „junk”/ „szemét” régióknak titulált szakaszok mára komoly jelentőséggel bírnak a génszabályzás szempontjából. A (humán) DNS állomány körülbelül 1%-a kódol csak fehérjéket, az összes többi „junk” nagy mennyiségben tartalmaz génszakaszok transzkripcióját szabályozó szekvenciákat (másoknak a kromatin szerkezet kialakításában van döntő szerepük). A kérdés, vajon mi kontrollálja magukat a szabályozó szakaszokat? Vajon a genetikai kód integráltan tartalmazza az információt a különböző sejtek differenciálódásának és anyagcsere változásának irányáról? Ez nem valószínű. Kiderült ugyanis, hogy ha őssejteket eltérő környezetbe helyeznek, azok sejten kívüli milió függvényében fognak differenciálódni (218). Egy-egy ugyanazon genetikai kóddal rendelkező őssejt tenyészet a környezeti tényezők hatására alakul más és más szöveti struktúrára jellemző sejtcsoporttá. A genetikai kód ezek szerint úgy fogható fel, mint egy könyv, melynek eltérő olvasataiként jelennek meg a különböző szöveti sejtek. Fontos kiemelni, hogy a kódolvasást a környezet tudja szabályozni, s a genetikai kódolvasás a sejtdifferenciálódás után sem független a környezeti változásoktól.

Az életmód és egyéb szervezetet ért hatások számos módosulást okozhatnak a DNS-nukleoszóma szerkezetében. Ezek közül a leginkább kutatottak a DNS metiláció, hiszton -acetiláció -metiláció, -ubiquitináció, -foszforiláció és a szumoiláció. Beszámolnak arról is, hogy a rendszeres fizikai aktivitás és a táplálkozás hatással lehet az epigenetikára (219-222).

Az epigenetikai vizsgálatok újabban nagy figyelemnek örvendő területe az epigenetikai heritabilitás, mely azzal a lehetőséggel foglalkozik, hogy a szülőket ért hatások „DNS-szintű lenyomata”, milyen mértékben jelenik meg az utódokon. Elsősorban azt kutatja, hogy vajon a szülők életvitele milyen változásokat okoz a kromatin állományon és ez milyen mértékben öröklődik, illetve öröklődik-e egyáltalán? Erre eklatáns példa a sárga, aguti egerek esete (223). Ezek az egerek obezek, számos metabolikus rendellenesség jellemzi őket, és rövid életük során keringési rendellenességek mutatkoznak rajtuk. Ha viszont ezek a rágcsálók a gesztációs időszak alatt módosított étrendet kapnak (folsav, B12

vitamin, kolin szuplementáció), akkor az utódok részben védetté válnak a későbbi metabolikus elváltozásokkal szemben.

A hiszton fehérjék a DNS struktúra kialakításában résztvevő proteinek. A DNS anti-parallel dupla hélix szerkezetű molekula, felépítésében 4 féle szerves bázis és egy pentóz-foszforsav gerinc vesz részt. A DNS a foszfát csoport miatt negatív töltéssel rendelkezik. A hiszton fehérjék nagy mennyiségben tartalmaznak lizin és arginin aminosavakat, ezek a struktúrát pozitív töltéssel ruházzák fel. Ebből következik, hogy a negatív töltésű DNS elektrosztatikusan tud kötődni a pozitív töltésű hiszton oktamerhez. Tulajdonképpen a DNS „hisztonokra csévélve” foglal helyet. A hiszton fehérjék egy 8 alegységből álló oktamer alkotnak, és ez a struktúra adja a kromatin fehérje „alapatát”. Az oktamer kialakításában 4 típusú hiszton vesz részt: a H2A, a H2B, a H3 és a H4 (illetve az egyes típusoknak léteznek lokusz specifikus izoformjai is). A kromatin állomány tartalmaz még egy hiszton H1-elnevezésű proteint, mely a nukleoszómák további egymáshoz kapcsolódásáért, a kromatin állomány „sűrítéséért” felelős (főként a heterokromatin állományban).



6. ábra

A hiszton H3 fehérjemolekula és a K14 acetilációja

A Lizin 14 aminosav acetilációja és a fehérje- aminosav szekvenciája patkányban
(<http://www.uniprot.org/uniprot/P84245> adatbank)

Tanulmányok kimutatták, hogy a hisztonokat felépítő lizin molekula acetilációja illetve deacetilációja befolyásolni képes génexpressziós folyamatokat (224-226). Különösen érdekes a hiszton H3, mivel ennek N terminális végén egy „farok szerű struktúra” helyezkedik el („kilóg a nukleoszómából”), és az ezen a régión elhelyezkedő aminosavak számos enzim célpontjai (6. ábra). Érdekes lenne tudni, vajon az esetleges hiszton acetilációk a BDNF promóter régiójában befolyásolják-e a gén expresszióját. A hisztonok acetilációja ugyanis a pozitív töltést „lefedti” a molekulán. Az elmélet szerint, ahol a hiszton fehérje acetilálódik, ott a DNS-hiszton kapcsolat, átalakul egy lazább szerkezetté. Erről a lazább szerkezetről pedig nagyobb fokú génátíródás mutatható ki (227-230), jobban hozzáférnek a transzkripció faktorok.

3. Célkitűzések

Vizsgálataink során célul tűztük ki, hogy futási képességeik alapján szelektíven tenyésztett patkányon határozzuk meg a diétás megszorítás és a testedzés hatására bekövetkező az epigenetikai és mitokondriális változásokat. Az állatok feldolgozása után, alapvetően két szövet típusra koncentráltunk: idegszövetre (hippokampusz), és a vázizomszövetre (m. gastrocnemius). Kíváncsiak voltuk, hogy az eltérő fenotípusnak, adottságoknak, melyek többek között a futási képességekben manifesztálódnak, milyen epigenetikai, illetve mitokondriális vonzatuk lehet. Az állatok két populációját az alacsony futókapacitású (LCR) és magas futókapacitású populációk (HCR) képezték.

Az epigenetika tárgykörét a kromatin állomány BDNF specifikus, hiszton H3 fehérjét felépítő 14. aminosav (lizin) acetilációja felől közelítettük meg. A mitokondriális biogenezissel foglalkozó kutatásainkban pedig a Sirt1, PGC-1 alfa és az ezekkel kapcsolatba hozható, a sejt energetikai státuszára érzékeny struktúrákat vizsgáltuk.

A farmakológiai gyakorlatban a készítmények hatásmechanizmusáról régóta ismert, hogy egy populációban a legtöbb egyeden megfigyelhető hatás a „target” hatásnak felel meg. (Ez vérnyomáscsökkentő gyógyszer esetén például, a vérnyomás csökkentését jelenti). Azokat nevezik „responder” csoportnak, akiken a „target” változás figyelhető meg, és ők alkotják a populáció többségét. Egy másik kisebb csoport a populáción belül a „nonresponder” csoport, melyek a kezelés hatására nem mutatnak változást. Általában a legkisebb elemszámmal rendelkező a „revers-responder” csoport, akik a várt hatással ellentétes változásokat produkálnak (vérnyomáscsökkentő példánknál maradván esetükben a vérnyomás nő). Az általunk használt állatmodellben egy populáció mesterségesen szelektált szélsőségesen gyenge és kiemelkedő teljesítményű egyedei szerepelnek. Feltételezésünk szerint a populáció két szélén elhelyezkedő patkánycsoportok eltérő módon reagálhatnak az általunk alkalmazott diétás megszorításokra és az edzéshatásra. Az irodalmi adatokból kiderült, hogy a környezeti feltételek és hatások képesek igen nagymértékben befolyásolni a genetikai kód olvasatát. Feltételezzük, hogy mind a DR, mind az edzéshatás élettanilag

pozitív hatásokat fog indukálni mind a két vizsgált vonalban. A hatás mértéke azonban várakozásunk szerint elmarad az LCR csoportban a HCR mintákéhoz viszonyítva.

Kísérleteink három csoportra oszthatóak:

1) A DR hatását vizsgáltuk szelektíven tenyésztett patkányokon. A kezelés után vizsgáltuk memóriájukat illetve a BDNF epigenetikai kontrollját (hiszton acetiláció) továbbá mitokondriális biogenezist (PGC-1, NRF jelátviteli útvonal) a hippocampusz mintákban.

2) A DR és állóképességi edzés hatását vizsgáltuk szelektíven tenyésztett patkányok gastrocnemius izmaiban. A hippocampuszhoz hasonlóan mértük a mitokondriális biogenezis-, illetve metabolikus markerek (AMPK, Akt, follisztatin) mennyiségét.

3) Az állóképességi edzést edzés hatását vizsgáltuk a csoportok spermatogenezis markereire, a herék mitokondriális biogenezisére, illetve oxidatív stressz markereire.

Hipotéziseinket a következőképpen fogalmazhatjuk meg.

A. A hippocampusz vizsgálatánál feltételeztük, hogy:

- a. A vizsgált csoportokban kimutatható a memória képesség és a BDNF szint kapcsolata.
- b. A diétás megszorítás fokozza a BDNF termelést és javítja a memória képességet mind a két állatcsoportban és ehhez epigenetikai, hiszton acetilációs módosulás társul.
- c. Az alkalmazott DR kezelésnek nincs számottevő hatása hippocampális mitokondriális biogenezisre.

B. A gastrocnemius izom és terhelésélettani paraméterek vizsgálatánál feltételezzük, hogy:

- a. A vizsgált állatcsoportokban az állóképességi edzés igen, viszont az alkalmazott táplálkozási protokoll nem indukál mitokondriális biogenezist a gastrocnemius izomban.

- b. Az LCR állatok gyengébb teljesítménye mitokondriális és metabolikus adaptáció hiánnyal magyarázható.
- c. Az alkalmazott állóképességi edzés és az alkalmazott táplálkozási protokoll javítja a kezelt csoportok életkilátásait.
- d. A terhelés élettani változások nagyobb mértékűek lesznek a HCR csoportokban, mint az LCR állatoknál.

C) A hím reprodukciós szerv vizsgálatánál feltételeztük, hogy:

- a. Az állóképességi terhelés pozitívan befolyásolja az edző csoportok spermatogenezis markereit.
- b. Az állóképességi edzés, hatással van a here szöveti mitokondriális bogenezisre és oxidatív stresszmarkeire.

4. Anyag és módszer

4.1. Vizsgálati állatok

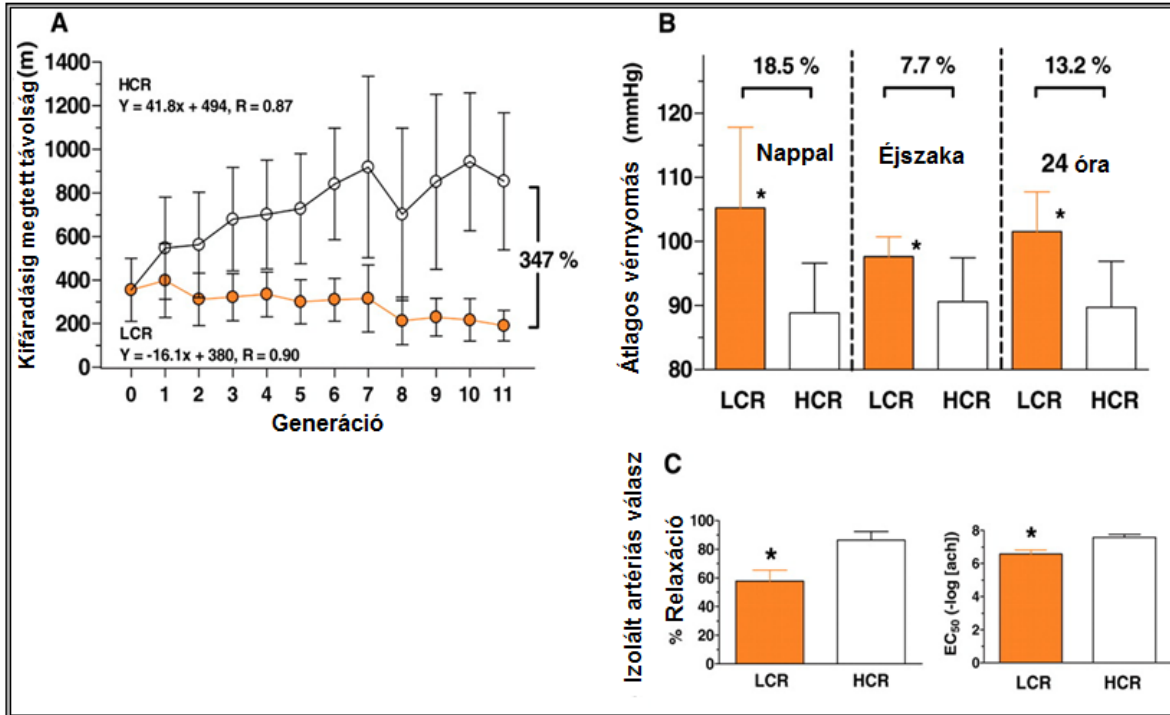
Futási képességeik alapján szelektíven tenyésztett 13 hetes hím Wistar patkányokat használtunk. A szelekció az Egyesült Államokban történt (University of Michigan, Ann Arbor, USA) a következőképpen: 186 egyedszámú N:NIH patkány csoportot (231) futópádon futtatni kezdtek növekvő terheléssel (sebességnövekedés). Az állatok közül szelektálták azon egyedeket (10%), melyek a legrosszabb, illetve a legkiemelkedőbb teljesítményt nyújtották a futási idő tekintetében. Azon állatokat melyek a legjobban teljesítettek, pároztatták hasonló teljesítményű társaikkal, illetve a rosszul teljesítőket a rosszul teljesítőekkel. Így formálva magas (High Capacity Runner: HCR) és alacsony (Low Capacity Runner: LCR) futókapacitású vonalat (7-8. ábra). Az állatok szelekciós protokollját Koch és Britton 2001-es munkája részletezi (18). A LCR állatok rövidebb élettartammal és az oxidatív stresszel szemben alacsonyabb ellenálló képességgel rendelkeztek (15,33,37). Koch 2011-es írásából tudhatjuk, hogy a LCR vonal hajlamos kardiovaszkuláris betegségekre, és olyan metabolikus szindrómára jellemző tünetek alakulnak ki bennük, mint a viscerális zsírfelhalmozódás, magas vérnyomás, diszlipidémia és nem utolsósorban inzulin rezisztencia (1.táblázat). A tapasztalt különbségek a vonalak 10. generációjában kezdenek élesen elkülönülni. Vizsgálatainkban ezen állatok 22. generációjával dolgozunk. A hím állatok 11 hetes korukban érkeztek repülővel a Semmelweis Egyetem Sporttudományi Kutatóintézetébe (Budapest, Magyarország).

Érdekes tény, hogy Wikgren és munkatársai kimutatták, hogy HCR állatok bizonyos kognitív képessége fölülmúlja az LCR állatokét. Az állatok fent említett tulajdonságai miatt igen jó alanyul szolgálnak a DR hatásainak vizsgálatára, mivel az eredmények differenciált következtetésekre lehetnek alkalmasak. Vizsgálataink során alávetettük magunkat a „The Guiding Principles for Care és Use of Animals”, EU előírásainak és a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával folytattuk a kutatást.

Vizsgálatunkat N=36 állattal végeztük.

Az első DR kísérletében mind a két vonalból 6 kontroll illetve 6 kezelt állat hippokampus mintáit használtuk: HCR-C, HCR-DR, LCR-C, LCR-DR. A tesztisz esetében a HCR-C, HCR-T, LCR-C, LCR-T állatok mintáit.

A gastrocnemiust érintő kísérletben ugyancsak n=6 elemszámmal mind a két vonalból kontroll C, DR, és edző: T csoportok izmait vizsgáltuk: HCR-C, HCR-DR, HCR-T, LCR-C, LCR-DR, LCR-T.



7. ábra

A vizsgálati állatok futókapacitása és érrendszeri jellemzői (19)

A: a vizsgálatban használt állatok futókapacitásának változása generációnként.

B: a csoportok átlagos vérnyomásértékei. C: a csoportok izolált artériás válasza.

1. táblázat

A vizsgálati állatok lényegesebb tulajdonságai (12,13)

LCR állatok	HCR állatok
Ab ovo keveset tudnak futni	Ab ovo sokat tudnak futni
Fogékonyak a metabolikus szindrómára	Jó metabolikus funkciók
Alacsony aerob kapacitás	Magas aerob kapacitás
Enzim defektusok, anyagcserezavarok	Oxidatív enzimek túlsúlya
Inzulin rezisztencia	Normális inzulin érzékenység
Nagyobb testtömeg	Normális, illetve az alatti testtömeg
Magas átlag vérnyomás	Normális vérnyomás
Kardiovaszkuláris deficit	Normális kardiális státusz
Csökkent izolált artériás válasz	Normális izolált artériás válasz

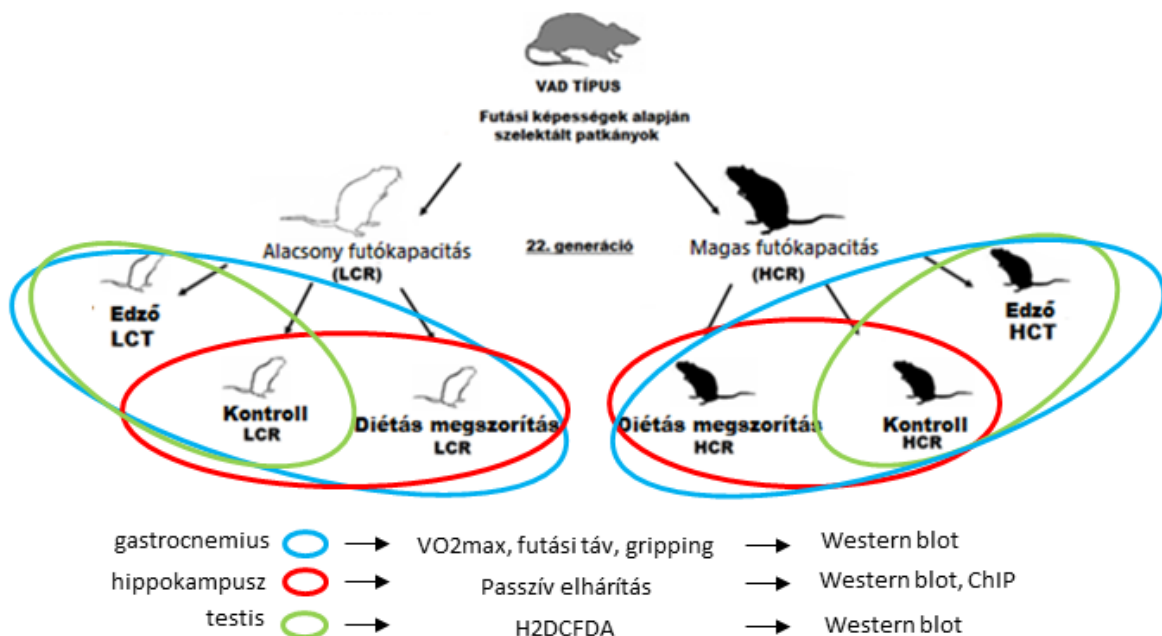
4.2. Edzésprotokoll

Az edzésben részesülő állatok aerob kapacitásuk 60%-ának megfelelő sebességen edzettek speciálisan kisállatok edzésére kifejlesztett futópádon. Az edzési protokoll első három napjában az állatokat a futópados futás körülményeihez szoktattuk. Ezt követően 3 hétig mérsékelt terheléssel, 10m/min sebességgel 5%-os meredekséggel edzettek az állatokat. A maximális oxigénfelvételt speciálisan kisállatok számára kialakított zárt rendszerű spiroergométerrel mértük (Columbus Inst. Columbus, Ohio). Az oxigénfelvételt fokozatosan emelkedő intenzitás mellett mértük, addig amíg: (i) már nem tapasztaltunk

számottevő oxigénfelvétel emelkedést a sebesség növelésével, (ii) amíg a vizsgálati állat képtelen volt pozícióját megtartani a futópádon, illetve (iii) amíg a légzési hányados meg nem haladta az 1-es értéket: ($RQ = VCO_2/VO_2 > 1$). A VO_{2max} adatok alapján állítottuk be az állatok terhelésének mértékét. Az edzések a hét 5 napján 40-60 perc idő intervallumig tartottak, 12 héten keresztül végeztük, a szoktatás és a csökkent terhelésű hetekkel együtt összesen 16 hétig. Az edzés elejére 5 percig egy 5m/perc-es „bemelegítő” fázist iktattunk. Az edző csoportot mind az LCR (n=6), mind a HCR csoportból (n=6) képeztünk. A VO_{2max} mérés során regisztráltuk a futási távolságot is.

4.3. Táplálkozási protokoll

Vizsgálataink során a számos előző szerző által alkalmazott ún. intermittáló táplálékmegvonás, angol nevén every other day fasting (EODF)(66) alkalmaztunk. Ez az eljárás az enyhe 20% körüli kalória visszafogásnak felel meg hosszú távon, a kezelésre a továbbiakban, mint dietary restriction (DR) utalunk, hiszen ez a kivitelezési forma nem teljesen azonos a klasszikus kalória visszafogással (CR). A kezelést 13 hetes korukban kezdtük a következő csoportokat formálva: High Capacity Runner - Kontroll (HCR-C), High Capacity Runner - Dietary Restricted (HCR-DR) és Low Capacity Runner- Kontroll (LCR-C) végül Low Capacity Runner- Dietary Restricted (LCR-DR). n=6/csoport. (8. ábra) Speciálisan patkányok táplálására alkalmas pellet tápot adagoltunk (LT/r rágcsálótáp INNOVO kft. 2100 Gödöllő, összetétel: 2. táblázat) az állatoknak. A víz ad libitum állt rendelkezésre a vizsgálati állatoknak, a táplálékukat minden másnap a reggeli órákban (CET 08:00-10:00 között) teljesen megvontuk 24 órára, majd egy nap elteltével ismét ad libitum fogyaszthattak táplálékot. A kezelés 16 hétig tartott. Az állatok testtömegét heti rendszerességgel mértük 5grammos pontossággal (Transporta karos mérleg) reggel 8:00 és 8:30 között. Az edző állatok ad libidum táplálékmennyiség állt rendelkezésre.



8. ábra

A vizsgált állatok csoportbeosztása és elvégzett vizsgálatok

2. táblázat

Az állatoknak adagolt táp összetétele

Beltartalom		Mikroelemek	
Szárazanyag	86,0 %	Vas	163 mg/kg
Nyersfehérje	20,0 %	Cink	75 mg/kg
Nyerszsír	4,0 %	Jód	1,3 mg/kg
Nyersrost	4,3 %	Mangán	82 mg/kg
Nyersshamu	7,8 %		
Nitrogén mentes kivonat	49,9 %	Vitaminok	
Metab. energia	11,9 MJ/kg	A vitamin	18 000 NE/kg
		D3 vitamin	1 000 NE/kg
		E vitamin	75 mg/kg
		K3 vitamin	3 mg/kg
		B1 vitamin	18 mg/kg
		B2 vitamin	12 mg/kg
		B6 vitamin	10 mg/kg
		B12 vitamin	0,2 mg/kg
		Folsav	4,0 mg/kg
		Biotin	0,02 mg/kg
		Linolsav	1,9 mg/kg
		Kolinklorid	600 mg/kg
		C-vitamin	50 mg/kg
		Összetevők	
		búza, kukorica, árpa, extrahált szójadara, napraforgó, búza takarmányliszt, tejpor, élesztő, napraforgó olaj, ásványi anyagok, vitaminok	
		A táp egyéb jellemzői	
		• Tápméret: 18 mm átmérőjű pellet	
Aminosavak			
Arginin	0,22 %		
Lizin	0,97 %		
Methionin	0,30 %		
Methionin + cisztin	0,64 %		
Triptofán	0,26 %		
Threonin	0,75 %		
Isoleucin	0,15 %		
Leucin	0,30 %		
Valin	0,97 %		
Makroelemek			
Kalcium	1,08 %		
Foszfor	0,86 %		
Nátrium	0,21 %		

4.4. A rövidtávú memória mérése

A passzív elhárítás teszt (passive avoidance test, PAT) egy laboratóriumi kisállatok (egér, patkány) közép- és rövidtávú memóriájának mérésére alkalmas módszer. Az eljárás az állatok azon tulajdonságán alapul, hogy a rágcsálók kerülnek a fényes nyílt területeket és inkább a sötétebb területeket részesítik előnyben. A vizsgálathoz szükséges berendezés egy két rekeszből álló doboz, melyben a rekeszeket közös válaszfal szeparálja. A két térrész között átjáró van. Az egyik térrész jól megvilágított fehér (világos kamra), míg a másik fekete és rosszul van megvilágítva (sötétkamra). A sötétkamra aljában fémháló van beépítve, mely feszültségre kapcsolható. Normális esetben, ha az állatokat a fényes kamrába helyezzük, azok átmennek a sötétkamrába (azokat az állatokat ki kell zárni a tesztből, melyek nem felelnek meg ennek a követelménynek, esetünkben az összes állat megfelelt ennek a kritériumnak). Maga a vizsgálat két részből áll: egy ún. akvizíciós (kondicionáló) fázisból és egy (vagy több) tesztfázisból.

Az akvizíció során először az állatot a világos kamrába helyezzük, miután átment a sötétkamrába, ott enyhe elektromos sokk éri a lábát, ezzel kialakítva a sötétkamrától való félelmet.

A tesztfázis során az állatokat ismét a világos kamrába helyezzük, és mérjük a világosban töltött látencia időt. Amennyiben a patkány hosszú időt tölt a világosban, a normál viselkedéshez képest „passzívan”, úgy következtethetünk arra, hogy megtanulta, a sötétkamrában negatív hatás éri. A világos térrészben töltött látencia idő pozitív korrelációt mutat az állatok emlékező képességével. A tesztfázist az akvizíciós fázis másnapján végeztük, azzal megegyező időpontban.

4.5. Kapaszkodási teszt

Az állatok erő kifejtését kapaszkodási (az irodalomban gripping tesztként ismert) teszttel mértük, (232) az edzés és a DR kezelési időszak után minden csoportnál a feldolgozás előtti

3. napon. A teszttel a krónikus kezelések kumulált hatását kívántuk szemléltetni. A vizsgálat során egy cca. 40cm magas állványra erősített fém drótra helyeztük az állatokat, úgy, hogy csupán két elülső lábukkal tudják megragadni a kapaszkodási felületet. Ezt követően stopperórával addig mértük az eltelt időt, ameddig az állatok a párnázott alátámasztási felületre nem estek.

4.6. A szövetek feldolgozása

Az állatok testtömegüknek megfelelő mennyiségű pentobarbital injekciót kaptak (45mg/kg), miután a szer kifejtette szedato-hipnotikus hatását, az állatokat dekapitáltuk, a gastrocnemius izmot, a tesztit és az agyat műtéti úton eltávolítottuk, a hippokampuszt izoláltuk. A levett szövetet folyékony nitrogénbe helyeztük, majd -80 °C-on tároltuk.

A mintákat jégen 10s-on keresztül közepes fokozaton (IKA's Ultra-Turrax homogenizer) tártuk fel kétszeres mennyiségű PBS-ben (pH 7,4). Ezt a prehomogenátot 4 felé alikvotoltuk ChIP, qRT-PCR, Western blot és az ELISA vizsgálatokhoz. A ChIP vizsgálatot friss szövetből azonnal elvégeztük, a többi alikvotot -80 °C tároltuk.

4.7. Biokémiai vizsgálatok

4.7.1. AcH3-ChIP Kromatin immunoprecipitációs eljárás

Az eljárás azon a jelenségen alapul, melynek folyamán a nukleoszómákban nukleinsav szekvenciákhoz (DNS szekvenciák) hiszton fehérjék kötődnek. Ezen kapcsolatok a szövet feldolgozása után is megtarthatók, mi több, a lizátumból ki is nyerhetők Chromatin Immunoprecipitáció (ChIP) segítségével (Acetyl-Histone H3 Immunoprecipitation Assay Kit (Cat# 17-245 Upstate/Millipore)). A prehomogénáthoz ChIP lízis puffert adtunk, és a kromatint szonikátor segítségével ~1000-4000 bázispár hosszúságú nukleotid polimerekké törtük.

Az eljárás ezután, röviden annyiból állt, hogy formaldehidet adtunk a 100 μ l lizátumhoz mely megközelítőleg 30mg szövetet tartalmazott. A formaldehid 1% cc.-ben volt jelen. A mintákat 15 percig inkubáltunk 37 C fokon. Ezután a Formaldehid eltávolítása végett jégen hűtött PBS-sel mostuk, mely proteáz inhibitorot tartalmazott (1mM fenil-metil-szulfonil-fluorid). A mosás után 700xg -n 4 percig 4 C fokon centrifugáltuk az oldatot és kipipettáztuk a felülúszót, majd ismét mostuk. A mosások után a felülúszót tízszeresére hígítottuk ChIP Dilution Pufferrel (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, 167mM NaCl), ehhez proteáz inhibitorot adtunk (PMSF). A kész kromatin oldatot -20 C fokon tároltuk az immunoprecipitáció elvégzéséig.

Az immunoprecipitáció előtt egy ún. pre-clear fázist is beiktattunk, hogy elkerüljük az agaróz szemcsék aspecifikus reakciójából és az aspecifikus termékek reakciójából adódó kölcsönhatásokat. Ezért a homogenátumhoz 75 μ l lazac sperma DNS / fehérje agaróz szemcsét adtunk. Majd 30 percig 4 °C fokon inkubáltuk agitáció mellett. Ezt követően lecentrifugáltuk 700xg -n 1 percig és megszabadultunk a pellettől, továbbiakban a „tisztított” felülúszóval dolgoztunk.

Anti-acetyl histone H3 (AcH3) specifikus-antitestet (Catalog # 06-599, Upstate/Millipore) adtunk 2 μ g felülúszó frakcióhoz, melyet jégen mozgatva egy éjszakán át

inkubáltunk. 1ml mintát megtartottunk antitestmentes kontrollnak (nyúl szérum IgG) (Cat# I5006, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). Az antigén-antitest komplex megkötéséhez 60 µl lazac sperma DNS / fehérje agaróz szemcsét adtunk az oldathoz, 4 C fokon 1 órán keresztül forgatva inkubáltuk. Az agaróz szemcse-ellenanyag-kromatin komplexet 1 percig 4 °C-on 700xg -n centrifugálva nyertük ki.

A komplexet 3-5 percig forgatva mostuk 4 °C-on 1 ml 'Low Salt Immune Complex Wash Buffer'-rel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl), majd centrifugálás után 'High Salt Immune Complex Wash Buffer'-rel (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 500mM NaCl), aztán 'LiCl Immune Complex Wash Buffer' rel (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8.1); és végül 2x1ml 1X TE bufferrel (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

Ezt követően a komplex eluációja 250µl eluációs puffer hozzáadásával történt (1%SDS, 0.1M NaHCO₃). A csöveket 15 percig forgatva inkubáltuk. Vortexelés és centrifugálás után a felülúszó új csőbe került.

4.7.2. DNS izolálás

A protein DNS- kötések felbontásához 20µl 5M NaCl oldatot használtunk, 65C°-on 4 órát inkubálva. A proteinek emésztése 10µl 0,5M EDTA, 20mcl 1M Trisz-HCl (pH 6.5), és 2mcl 10mg/ml proteináz K hozzáadásával történt, 45C°-on inkubálva 1 órán keresztül. A DNS purifikációja fenol/kloroform extrakcióval, majd alkoholos kicsapatással történt. A kicsapatás előtt 20mcg glikogén került az oldatba a DNS-hozam növelésének érdekében. A DNS pelletet 70%os etanollal mostuk, majd levegőn száradni hagytuk, ezt követően DNáz/RNáz mentes vízben újra feloldottuk. A DNS mintákat -20 °C tároltuk.

4.7.3. AcH3-ChIP – BDNF-qPCR

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, az acetilált hisztonokból mennyi kötődött a BDNF promóter régióhoz, ChIP után nyert DNS extraktumot vizsgáltuk polimeráz láncreakcióval (PCR). A PCR során patkány specifikus BDNF exon IV promoter primer párt használtunk. Vizsgálatunkban (-73 -tól +14 bp) Fw: TCTATTTTCGAGGCAGAGGAGGTATC, Rv: AATGGGAAAGTGGGTGGGAG, primert választottuk hasonlóan más nivós publikációkban használtakhoz. (140, 223)

A ChIP során nyert mintákat ‘quantitative real-time PCR’ (qPCR) vizsgálatnak vetettük alá (lásd BDNF mRNS-nél). A Ch-IP során nyert értékeket pedig a teljes BDNF exon IV promóter értékekkel normalizáltuk.

4.7.4.RNS izolálás

Az izolálást a Nucleospin®RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) utasításai alapján végeztük. Részleteiben: a -80 °C-on tárolt prehomogénátot felolvasztottuk és 30mg szövethez hozzáadtuk ~350µl R1 puffert továbbá 3,5µl bétamerkapto etanolt. A szövetet a pufferben tovább bontottuk KA®-Werke homogenizátor segítségével, 60 másodpercig, maximális fordulatszámon. A homogénátot a gyártó által leírt módon kezeltük: szűrtük a lizátumot, megkötöttük az RNS frakciót, elemésztettük a DNS frakciót, és mostuk a szilikagél membránt. Az RNS tartalom elúciójához 60µl RNase-mentes vizet használtunk és a finom centrifugálás után a felfogott mennyiséggel ismét eluáltuk az oszlopot 11000xg -n 1 percig.

4.7.5. DNS-, RNS-koncentráció mérés és integritás vizsgálat

Az 1,71-1,97 abszorbancia hányadost 260/280nm hullámhossznál, továbbá 1,79 és 1,88 közötti abszorbancia hányadost 260/230nm hullámhossznál fogadtunk el. Az RNS mintákat -80 fokon tároltuk. Az RNS integritást etídium bromid festéssel vizsgáltuk (S18-S28-as frakciók).

4.7.6. cDNS szintézis

A BDNF mRNS meghatározáshoz először cDNS-t szintetizáltunk, TetrocDNA Synthesis kit (Cat#BIO-65026 Bionline, Luckenwalde, Németország) segítségével. A következő reagenseket használtuk: 1µg izolált RNS, 1µl random hexamer primerek, 1 µl 10mM-os dNTP, 1µl RNáz gátló, 0,25 µl 200 µg/µl koncentrációjú reverz transzkriptáz (végtérfogát: 20µl). Az oldatot 10 percig 25°C fokon inkubáltuk. A primer kapcsolódás után egy 60 perces primer elongáció történt 42°C- fokon hőmérsékleten. A reakciót egy 5 perces 80°C fokon termináló fázissal fejeztük be. A szintézis során nyert cDNS-t -20°C fokon tároltuk.

4.7.7. BDNF mRNS 'real time quantitative PCR' (qRT-PCR)

A BDNF mRNS detektálásához patkány specifikus BDNF primert használtunk Fw: CCATGAAAGAAGCAAACGT, Rw: CTCCAGCAGAAAGAGCAGA. Az általunk kivitelezett PCR reakció során Sybr Green detekciós protokollt alkalmaztunk, EvaGreen® festékkel (Biotium, Hayward, CA, USA). Az amplifikáció során egyforma mennyiségű DNS templátot, 10mcl „ImmoMix™completeready-to-use heat-activated 2×” reakció elegyet (Bionline GmbH, Luck-enwalde, Germany), 1 µl már említett 20xEvaGreen festéket, 2.5 µl 10 nmol/L-os Fw-Rw mix primert (IBAGmbH, Göttingen, Németország) és desztillált vizet kevertünk össze 20 µl végtérfogóban. Az amlifikáció környezeti feltételeit

Rotor-Gene 6000 thermal cycler (Corbett Life Science/Qiagen, London, UK) teremtette meg. Egy 10 perces 95°C fokos fázis után 40 ciklus 10sec-es 95°C fokos, 20sec-es 60°C fokos, és 30sec-es 72°C fokos fázist futtatunk. Az utolsó ciklus után olvadáspont analízissel vizsgáltuk a mérés validitását. A megbízhatóságot agaróz gél elektroforézissel is ellenőriztük. Ha az elektroforézis után a ~280 bp. tartományban csak egy csík volt megfigyelhető, az amplifikáció eredményeit elfogadtuk.

4.7.8. Összfehérje meghatározás és BDNF koncentráció mérés ELISA technikával

A vizsgálathoz a prehomogenátot tovább kezeltük. A prehomogenátot tovább homogenizáltuk (IKA T10 basic ULTRA-TURRAX DISPERSER 50/60Hz Németország) jégen lízispuffer hozzáadásával 1:1 arányban (137mM NaCl, 1% NP 40, 10% glicerol, 20mM Tris 8.0 pH). A prehomogenáthoz proteáz/foszfataz inhibitorok is kerültek: Aprotinin (2µg/ml), Leupeptin (5µg/ml), PMSF (1mM), Na orthovanadát (1mM) a minta önmérsztésének megakadályozása miatt. Ezután a homogenát 40 percen keresztül jégen rázóállványra került (100 rpm). Ezt követően a homogenátot centrifugába helyeztük, és 15000g-n lecentrifugáltuk a felülúszót pipettával óvatosan elkülönítettük a pellettől. A felülúszót külön eppendorfba gyűjtöttük, majd összfehérje koncentráció-meghatározást végeztünk.

A minták fehérjetartalmát Bradford protein assay-el határoztuk meg (BioRad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate). A mintákat 96 lyukas platere vittük föl triplikátumokban majd Multi Scan EX (Thermo Labsystem) géppel mértük az abszorbanciát 595nm hullámhosszon. Az eredményeket az Ascent Software for Multiscan- szoftverrel értékeltük ($r^2 > 0,98$). A minták fehérjetartalmát a legkisebb koncentrációjú mintához állítottuk be (agy: ~10mg/ml, izom: ~9,53mg/ml)

A BDNF koncentráció meghatározásához BDNF ELISA kit-et (E-Max ImmunoAssay System, Promega, Madison, WI) használtunk, a plateket platet Multi Scan EX géppel olvastuk. A BDNF mennyiséget a minták totál fehérjetartalmához normalizáltuk.

4.7.9. Western Blot

Az azonos fehérjekoncentráció beállítása után 2x Laemmli Mintapufferhez (120mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,01% brómfenol kék) a diszulfid-hidak feltárásához 5%-nyi béta-merkaptoetanolt pipettáztunk, majd az így nyert oldatot a homogenáthoz pipettáztuk 1:1 arányban és 5 percig 95C°-on melegítettük. Az így nyert denaturált mintákat későbbi felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

A szövetminták specifikus fehérjéinek kimutatása és relatív koncentrációjuk meghatározása Semi-Dry Western Blot technikával történt.

A vizsgálat első lépése a minták fehérjéinek molekulatömeg szerinti szeparálása, mely SDS-poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) útján történt. A poliakrilamid gélt saját magunk öntöttük. Az szeparáló géleknél (1,5M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% ammonium perszulfát, 0,04% TEMED) 8%, 10% és 12%-os akrilamid koncentrációkat használtunk a detektálni kívánt fehérje méretétől függően. A fedőgél (1M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% ammónium perszulfát, 1,75% TEMED) minden esetben 5%-os akrilamid tartalommal bírt. A zsebekbe 40-90µg fehérjét vittünk fel. A készüléket futtató pufferrel (10x törzsoldat: 30,3g/l tris, 144g/l glicin, 10g/l SDS, pH 8.3) töltöttük fel, és átlagosan 60-90 percig futattuk 150 V feszültségen.

A fehérjék szeparálása után a fehérjéket PVDF-membránra transzferáltuk (30kDa< Millipore Immobilon-P pórus méret: 0,45µm, 30kDa> Millipore Immobilon-P^{SQ} pórus méret: 0,2 µm) sem-dry transzfer egység segítségével (Cleaver Scientific, UK) , 20%-os metanolos transzfer puffer (3,03g/l Tris, 14,4g/l glicin, 20% metanol) használatával. A membránt a transzfer előtt 1 percig metanolban aktiváltuk, a gélről leválasztottuk a fedő-

réteget és transzfer pufferbe áztattuk 1 percen keresztül. A (+) szűrőpapír, membrán, gél, szűrőpapír (-) szendvics összeállítása után, a transzfer 30 Voltos feszültségen történt 50-120 perc terjedelemben a detektálni kívánt fehérje méretétől függően.

A membránt ezután két percig TBST-ben mostuk, majd két órán keresztül blokkoltuk 5%-os tejpor TBST oldattal, vagy 1%-os BSA TBST oldattal 4 C fokon. Ezt követően elsődleges antitesttel inkubáltuk 4 °C fokon egy éjszakán keresztül (a használt antitesteket a 3. táblázat-ban foglaltuk össze). Az elsődleges antitest leöntése után 3x10 perc TBST mosás fázis következett. Miután mostuk a membránt nyúl/kecske/egér másodlagos tormaperoxidáz glikoproteinnel konjugált antitesttel inkubáltuk 1,5 órán keresztül 4 °C-on. A röntgenfilmen való jel detektálás előtt a membránt reagens szubsztráttal (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA) kezeltük, és 5 percig fénytől védve inkubáltuk. A röntgenfilmen az adott mintában megjelenő specifikus fehérjék koncentrációját az előhívás után megjelenő sávok szemléltetik (melyek egy-egy reprezentáns eredménye western blot grafikonok fölött láthatók). A detektált sávok sötétsége arányos a membránon jelenlévő célfehérje és ahhoz specifikusan kötődő ellenanyag mennyiségével. Az elektroforézis során elkülönített fehérjékhez referenciaként Hyper PAGE II protein markert használtunk (Bioline, USA). A jelek erősségét denzitometráltuk imageJ szoftver segítségével és a denzitás görbe alatti terület meghatározásával kvantifikáltuk. A vizsgált fehérjék denzitás értékét normalizáltuk, housekeeping fehérjeként alfa-tubulint és béta-aktint használtunk.

4.7.10. A 2', 7'-diklór-dihidrofluoracein-diacetát alapú (H2DCFDA) reaktív gyökök mennyiség becslése

A here szövetből történő mérés során 2', 7'-diklór-dihidrofluoracein-diacetát (H2DCFDA) fluorescent festésen alapuló eljárást alkalmaztunk (Invitrogen-Molecular Probes #D399). A festés képes becsülni a szöveten becsüli steady state redox státuszt és információt ad a szöveti oxidatív stressz mértékéről (233). Az eljárás röviden: a festés során a 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) acetát redukált formáját használjuk (H2DCFDA), mely ebben az

állapotában nem fluoreszcens. A tömény H2DCFDA-t 12,5 mM koncentrációig etanolban hígítottuk és -80 °C-on sötétben tároltuk. Az oldatot felhasználás előtt frissen hígítottuk kálium-foszfát pufferrel 125 µM-ra. Fluoreszcens reakciót 96 lyukú, fekete mikropléten végeztük. A lyukakba kálium-foszfát puffert mértünk (pH 7,4) 152 mM / lyuknak megfelelő mennyiségben. Ezután 8 µl hígított szövet homogenizátumot és 40 µl 125 µM-os festéket adunk hozzá a 25 µM végső festékkoncentráció eléréséhez. A fluoreszcencia intenzitásának változását öt percenként 30 percen keresztül figyeltük meg. A reakció során, az oxidáció eredményeképpen a H2DCFDA molekula acetát csoportja lehasad. A kémiai átalakulás következtében a deacetilált, oxidált forma visszanyeri fluoreszcens tulajdonságát, mely 485/538 nm (gerjesztési/emissziós) hullámhosszon detektáltuk és kvantifikáltuk. A detektált mennyiséget összfehérje tartalomra normalizáltuk.

3. táblázat

Vizsgálataink során használt elsődleges antitestek

Antitest	Gyártó	Molekulasúly	Koncentráció	Katalógus szám
BDNF	SantaCruz anti-BDNF (N-20)	14 kDa	1:500	Sc-546
PGC1α	Santa Cruz PGC-1 (H-300)	90 kDa	1:500	Sc-13067
NRF1	Santa Cruz NRF1 (H-300)	68 kDa	1:500	Sc-33771
AMPKα	Cell Signalling AMPK α	62 kDa	1:1000	#2532
α-Tubulin	Santa Cruz Anti α tubulin	55 kDa	1:5000	Sc-8035
β-actin	Santa Cruz Actin (I-19)	43 kDa	1:2000	Sc-1616
CREB	Cell Signalling CREB (48H2)	43 kDa	1:1000	#9197

Antitest	Gyártó	Molekula súly	Koncentráció	Katalógus szám
SIRT1	Santa Cruz SIRT1 (H-300)	100-120 kDa	1:1000	Sc-15404
Cytochrome c oxidase	Santa Cruz COX4 (D-20)	17 kDa	1:500	Sc-69359
Phospho- CREB	Upstate Anti-phospho- CREB (Ser 133)	43 kDa	1:500	#05-807
Acetilált hiszton H3K14	Upstate/Millipore Anti-acetyl histone H3	18 kDa	1:500	#06-599
Acetilált lizin	Cell Signalling Acetylated Lysine	-	1:1000	#9441
SDHA	Santa Cruz H- 204	70kDa	1:2000	sc-98253
Phospho- AMPK	Cell Signalling Thr 172	62 kDa	1:1000	#2535
Akt	Cell Signalling	60 kDa	1:1000	#9272

Phospho-Akt	Cell Signalling Ser 473	60 kDa	1:1000	#9271
Follistatin	Santa Cruz H- 114	35 kDa	1:500	sc-30194
LDHC	Santa Cruz	35 kDa	1:2000	sc-377305
Odf-1	Santa Cruz	27 kDa	1:1000	sc-27907
P53	Santa Cruz	53 kDa	1:2000	sc-99
Acetilált P53 K373, K382	Upstate	53 kDa	1:2000	06-758
mtTFA	Santa Cruz	25 kDa	1:500	sc-30963

4.8. Statisztikai analízis

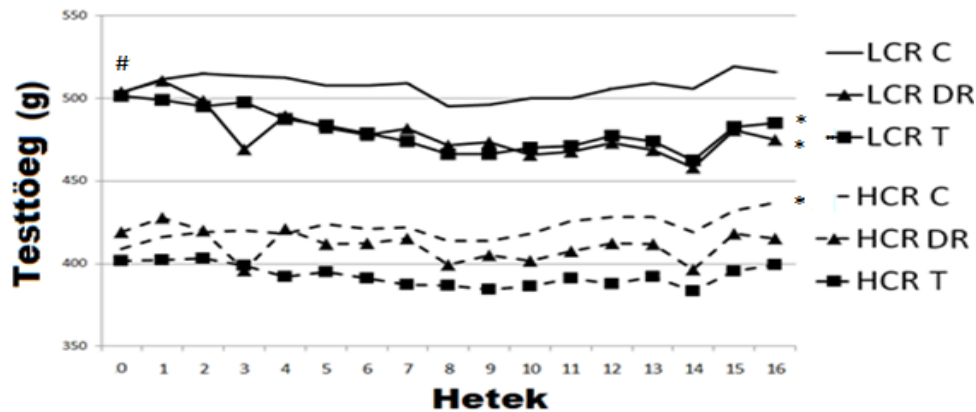
A statisztikailag szignifikáns különbségek kimutatásához Statistica 13 programot használtunk. A normalitás (Shapiro–Wilk test) vizsgálat elvégzése után a normális eloszlást mutató változókat egy szempontos varianciaanalízissel vizsgáltuk. Azon változóknál, melyek nem mutattak normális eloszlást (kapaszkodás teszt, exon IV acetiláció, memória adatok), Kruskal Wallis ANOVA-t alkalmaztunk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztuk meg, és ezeket jelöljük ábráinkon. A memória-BDNF mennyiség kapcsolat meghatározásához, mivel a memória adatok nem mutattak normális eloszlást, Spearman-féle rangkorrelációs együtthatót számoltunk.

5. Eredmények

5.1. Az állatok fiziológias és funkcionális eredményei

Vizsgálatunk kezdetén a HCR csoport egyedeinek testtömege szignifikánsan kevesebb volt, mint a LCR egyedeinek, ez a különbség a kezelés végén is megmaradt (LCR-C: 503 ± 72 g, , HCR-C: 409 ± 51 g, 9. ábra)

A kezelések csak a LCR csoportban okoztak testtömeg csökkenést (LCR DR 503.57 ± 33.51 ; 475.00 ± 27.08 , LCR T 501.25 ± 67.00 : 485.00 ± 66.20). A HCR állatok testtömege a kezelések hatására szignifikánsan nem változott, viszont a HCR kontroll csoportnál tömeggyarapodása volt megfigyelhető (HCR C 409.00 ± 51.41 : 437.00 ± 53.46). Az LCR kontrollnál ez elmaradt (LCR C 503.33 ± 72.30 : 515.83 ± 69.31).

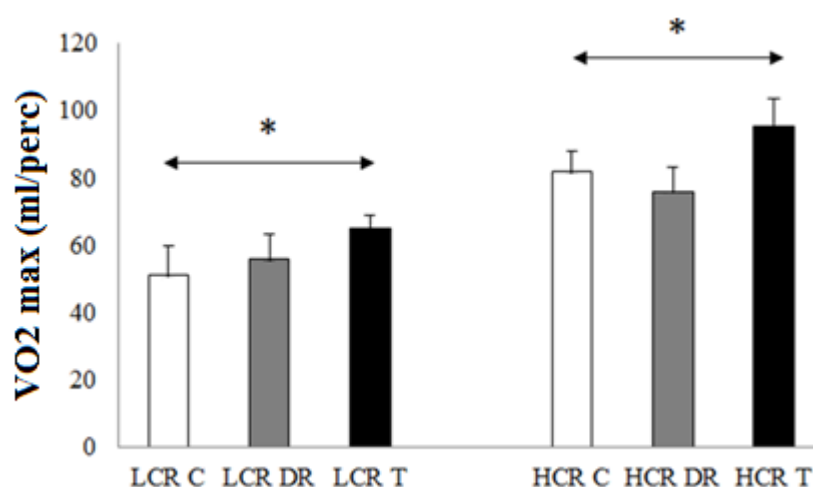


9. ábra

A kezelések hatására bekövetkező testtömeg változás

A csillag a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbséget jelöli a kettőskereszt pedig a kontroll csoportok különbségét jelzi a kezdeti állapotban. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: edző csoport, a pontok az átlag értékeket jelölik, a szórásokat a könnyebb olvashatóság érdekében nem tüntettük fel).

Az LCR és a HCR állatok maximális relatív oxigénfelvétele különbözött ($p < 0,05$). Az LCR-C egyedeknek átlagosan 50 ml, a HCR-C patkányoknak pedig átlagosan 80 ml. A DR-nek vizsgálataink alapján nincs számottevő hatása a $VO_2\text{max}$ -ra (10. ábra). Nem így az állóképességi edzésnek, mely szignifikánsan emelte a maximális oxigénfelvételt mind a két patkányvonalban.



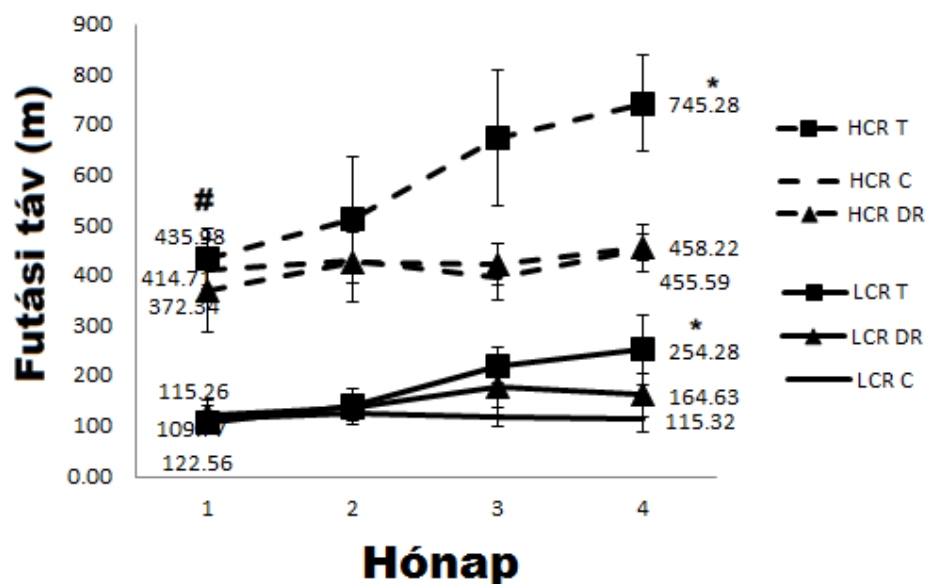
10. ábra

A maximális oxigén felvétel eredményei a kezelési időszak végeztével.

Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnél és a csillag szignifikáns különbséget jelöli a kontroll csoportokhoz képest, $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T állóképességi edzést végző csoport.)

A futási képességek (futási táv) a kísérlet kezdetén közel 370%-os különbséget mutatkozott az LCR és a HCR vonal között. A HCR állatok esetében edzés hatására jelentősen nőtt a futási táv (11. ábra). A DR úgy tűnik, nem befolyásolja számottevően az

állatok futási képességeit. (Habár a LCR csoportban növekvő trend figyelhető meg DR hatására) Az edzés a LCR állatok populációján is sikereket ért el a futási távolság és a sebesség tekintetében, bár a távolság növekedés mértéke nem közelítette meg a HCR egyedek fejlődését a relatív fejlődés felülmúlta a HCR csoportot (HCR+163%, LCR+220%).



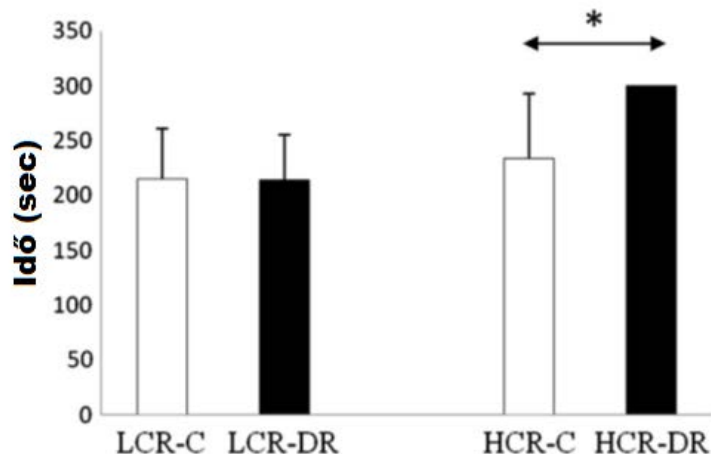
11. ábra

Az állatok futási képességének növekedése havonként lebontva.

Feltüntetett értékek: átlagok \pm SE, a csillag szignifikáns különbséget jelöli a kontroll csoporthoz képest, $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, T: állóképességi edzést végző csoport.)

A passzív elhárítás teszt eredményeit a 12. ábra szemlélteti. Méréseink alapján kijelenthetjük, hogy a HCR-DR csoport egyedei fölülmúlták az összes többi csoportot a rövidtávú memória tekintetében. A szórások hiánya pedig arra utal, hogy ezen csoport

egyedei a tesztben előírt mind a 6 percet a világos rekeszben töltötték. Fogalmazhatnánk úgy is, hogy maximális eredményt értek el a teszten.

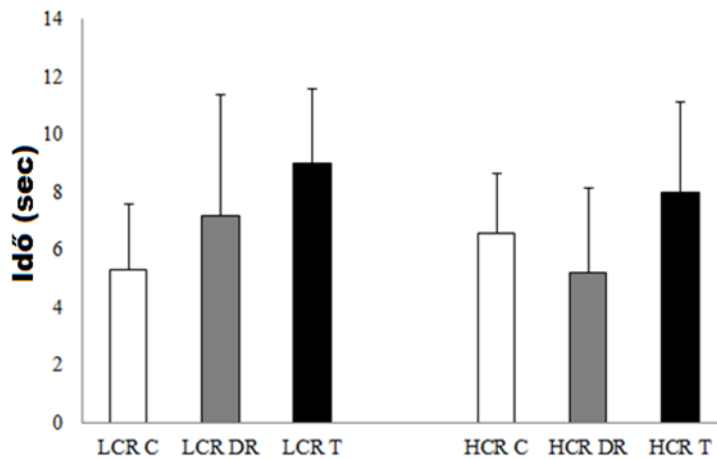


12. ábra

A passzív elhárítás teszt eredményei a kezelési időszak végeztével.

Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöli. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T állóképességi edzést végző csoport).

A kapaszkodási tesztben a DR és az edzés hatására nem mutatkozott különbség az erőkifejtés nagyságát mérő tesztben, egyik állatcsoportban sem (13. ábra), de edzés hatására növekvő trend figyelhető meg (habár az értékek szórása igen magas).



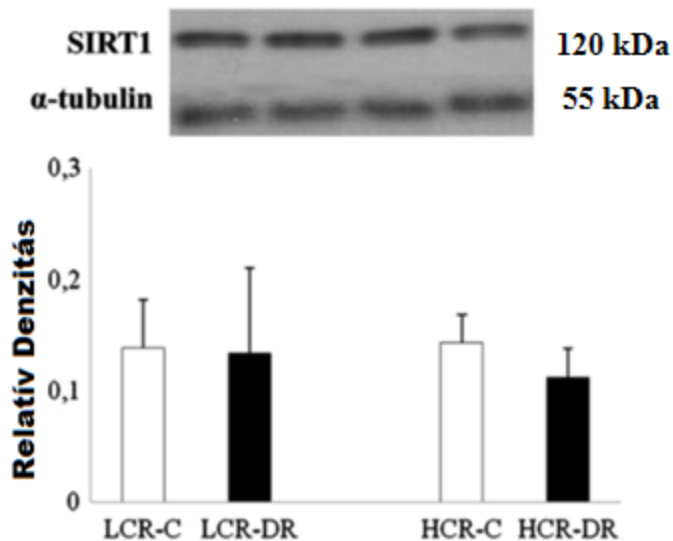
13. ábra

A kapaszkodási teszt eredményei a kezelési időszak végeztével.

Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T állóképességi edzést végző csoport).

5.2. A hippocampusz minták feldolgozása során született eredmények

A SIRT1 aktivitás/koncentráció sok esetben növekszik kalória visszafogás/DR hatására különböző szövetekben. Eredményeink szerint ez a hiszton deacetyláz funkcióval is rendelkező molekula mennyisége nem mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között DR hatására (14. ábra).



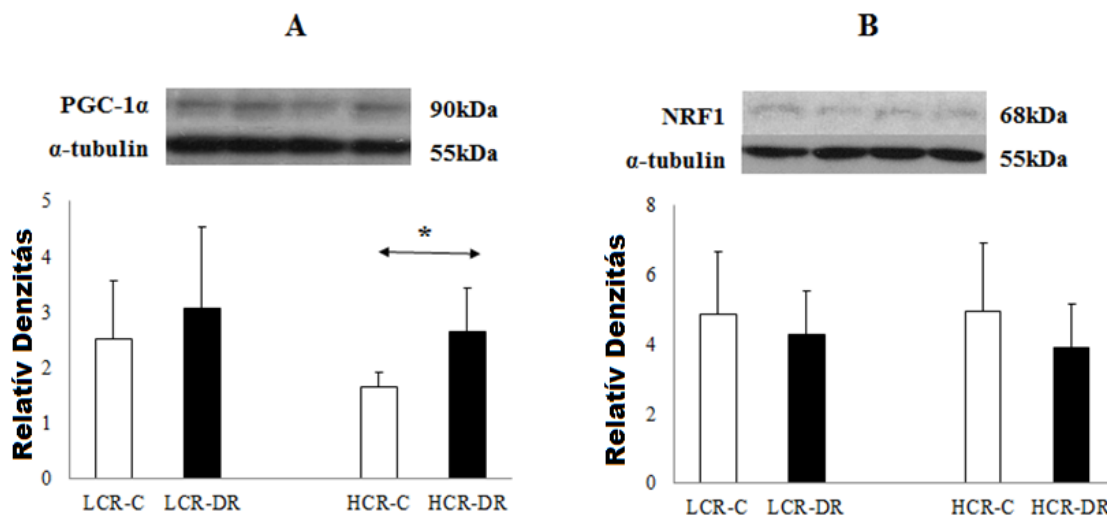
14. ábra

SIRT1 fehérje koncentráció hippocampusz mintából.

Feltüntetett értékek: átlag \pm SE. $p < 0,05$. (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

A PGC1 alfa transzkripciós co-faktor mérésénél szignifikánsan emelkedett értéket tapasztaltunk a HCR-DR csoport esetében (15. A ábra) a HCR-C csoporthoz képest. Ez a co-aktivátor, mint már fentebb is említettük, kapcsolatba hozható a SIRT1 aktivitásával. Mindazonáltal a nukleáris respiratorikus faktor (NRF1) nem mutatott eltérést a csoportok között (15. B ábra), habár az NRF-1-et a PGC-1 alfa ún. „down-stream” fehérjéjeként

tartják számon. A PGC1 alfa szintje növekedett ugyan a HCR csoportban DR hatásra, ám úgy tűnik, ez a hatás nem volt elegendő az agyban az NRF-1 jelátvitel aktivációjához.

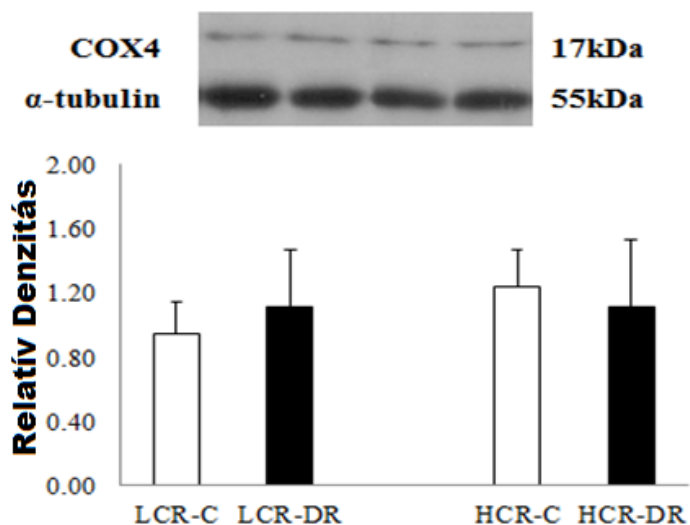


15. ábra

PGC-1 és NRF1 mérési eredmények hippocampusz mintából

A: Western Blot eljárással mért PGC-1 alfa mennyiség hippocampusz mintában B: Western Blot technikával mért NRF1 mennyiség hippocampusz mintában. Feltüntetett értékek: átlag ± SE, a kettősnél és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

A mitokondrium mennyiség becslésére alkalmas COX4 koncentráció nem mutatott különbséget sem a HCR-LCR populációk, sem a DR-hatás tekintetében a patkányok hippocampusz mintáiban (16. ábra).

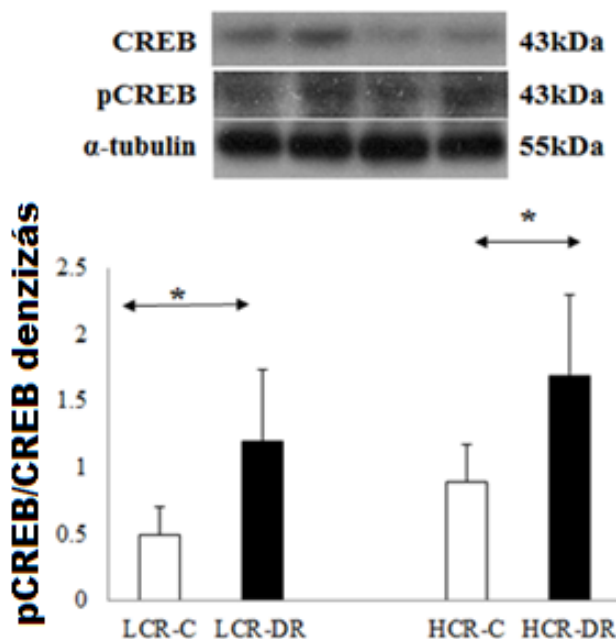


16. ábra

COX4 mérési eredmények hippocampusz mintából

Western Blot eljárással mért COX4 tartalom, mely a mitokondrium mennyiséggel arányos hippocampusz mintában. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, $p < 0,05$. (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

A CREB hippocampális foszforilációjában emelkedést tapasztaltunk DR-hatására mind a két patkányvonalnál (17. ábra).

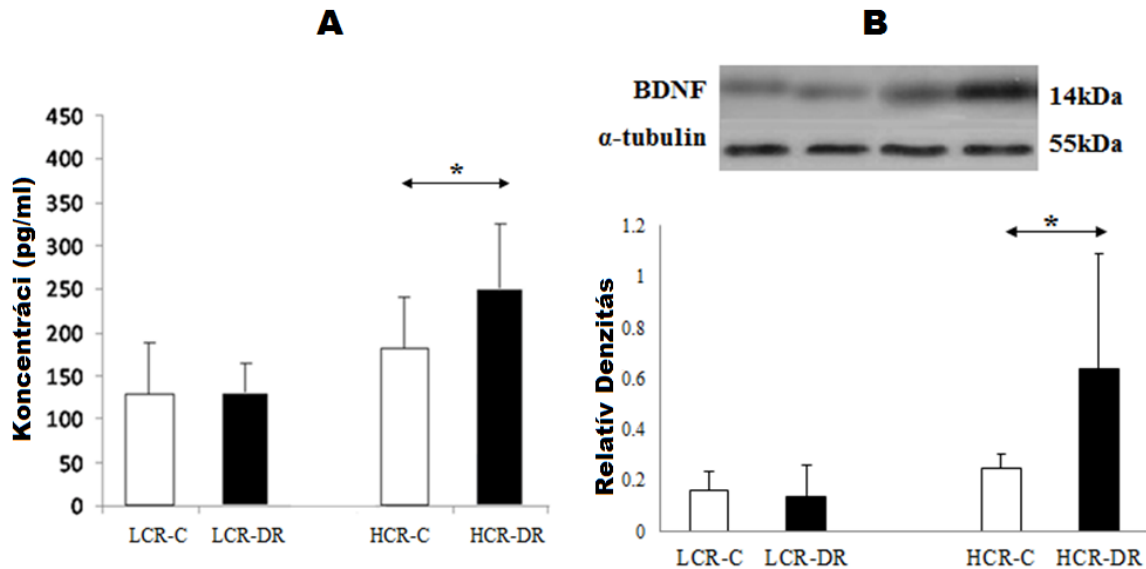


17. ábra

pCREB/ CREB mérési eredmények hippocampusz mintából

Western Blot mérések, foszfo CREB/ CREB aránya hippocampusz mintában. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

Vizsgálataink szerint a DR növelni képes a BDNF szintet a magas futókapacitással rendelkező patkányok egyedeinél. Ezt mind a Western blot (18. B ábra), mind az ELISA (18. A ábra) mérési eredmények egyöntetűen megerősítik. Azt az irodalomban is sokszor előforduló nézetet, hogy a táplálkozási szokások hatással vannak a kognitív képességekre, esetünkben kiemelten a rövidtávú memóriára (passzív elhárítási teszt), igazolni tudjuk a HCR állatok esetében. A memória eredmények és a BDNF western blot denzitás értékek esetünkben pozitív korrelációt mutatnak Spearman $r_s = 0,52$ $p = 0,015$.

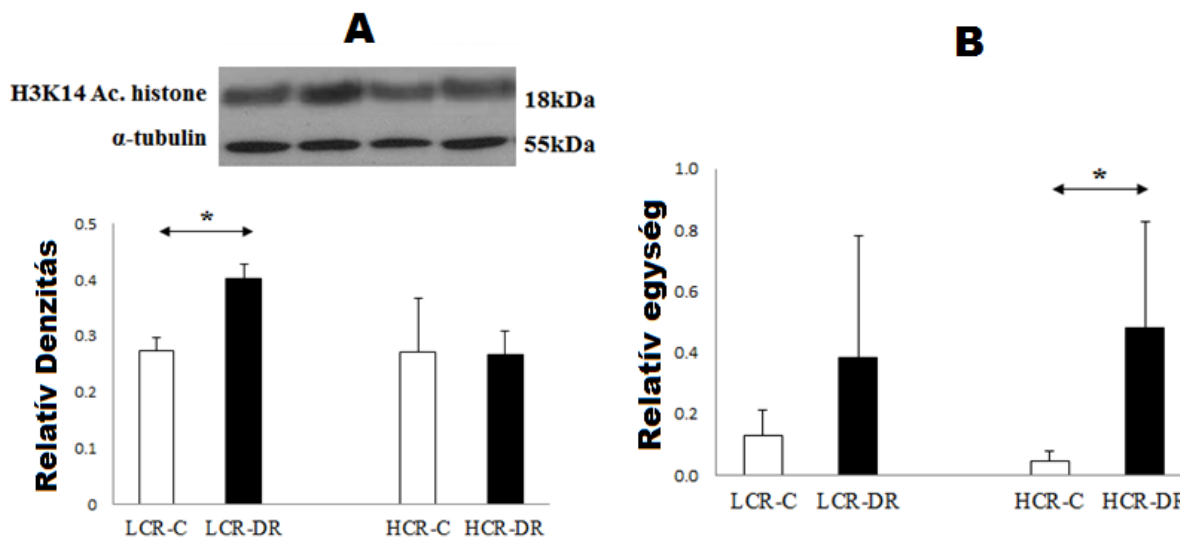


18. ábra

BDNF fehérje mennyiség hippocampusz mintákban

A: ELISA mérési eredmények. B: Western Blot mérési eredmények. A feltüntetett értékek: átlag ± SE, a kettősnél és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

Érdekes megfigyelésünk, hogy a totál hiszton H3 acetiláció csak az LCR-DR állatokban növekedett szignifikánsan (19. A ábra). A specifikus hiszton H3-BDNF IV. promoter kapcsolat azonban a HCR vonal egyedeinél magasabb volt másnapenkénti etetés következtében (19. B ábra). A LCR egyedeknél csak tendenciózus emelkedés figyelhető meg.

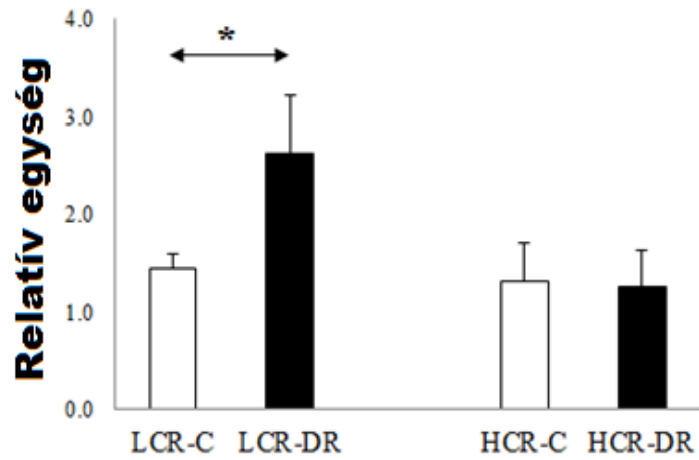


19. ábra

Hiszton H3K14 acetilációs eredmények hippocampusz mintákból

A: a teljes hiszton H3K14 acetiláció Western blot eredményei, B: a BDNF exon IV környezetében mért hiszton H3K14 acetiláció chromatin immunoprecipitációval mérve. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

A BDNF mRNS eredmények azonban nem követték a ko-immunoprecipitáció trendjét. Az mRNS esetében csak LCR-DR csoportban (hasonlóan a nem specifikus hiszton H3 eredményekhez) találtunk szignifikánsan emelkedett szintet (20 ábra). Az agyi, hippocampális markerek mérési eredményeit és a memória adatokat a 4. táblázatba gyűjtöttük össze, melyben az összegzett markerek nem utalnak szignifikáns mitokondriális biogenezire a hippocampális régióban DR hatására egyik vonalba sem.



20. ábra

BDNF mRNS eredmények hippokampusz mintákból

„Real time” kvantitív PCR technikával mért BDNF mRNS mennyiség Feltüntetett értékek: átlag ± SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport)

4. táblázat

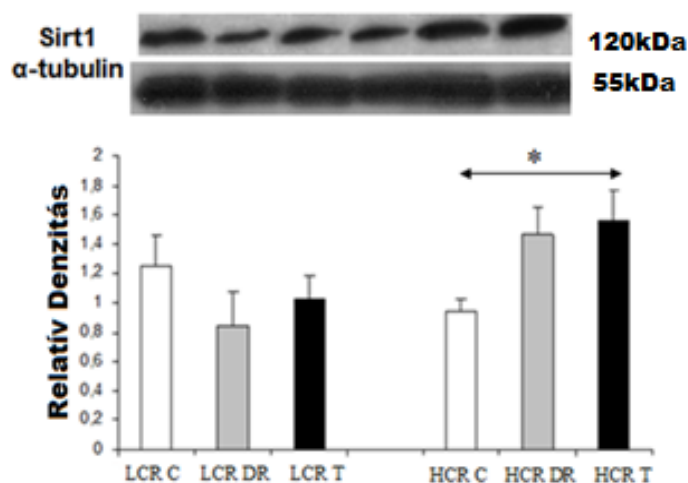
A diétás megszorítás és a különböző fenotípus hatása a hippocampuszra és a memóriára

Jelölések: 0: nincs szignifikáns változás a kontrollhoz képest; +: szignifikáns növekedés tapasztalható a kontrollhoz képest; - szignifikáns csökkenés tapasztalható a kontrollhoz képest, LCR: alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, DR: minden másnap etetett-csoport.

Hippokampusz		
	LCR-DR	HCR-DR
Rövid távú memória	0	+
Sirt1 (WB)	0	0
PGC-1 α (WB)	0	+
NRF-1 (WB)	0	0
COX4 (WB)	0	0
BDNF (ELISA)	0	+
BDNF (WB)	0	+
ac. H3K14 (WB)	+	0
BDNF mRNS (PCR)	+	0
BDNF pIV (PCR)	0	+
pCREB/CREB (WB)	+	+

5.3. A gastrocnemius minták feldolgozás során született eredmények

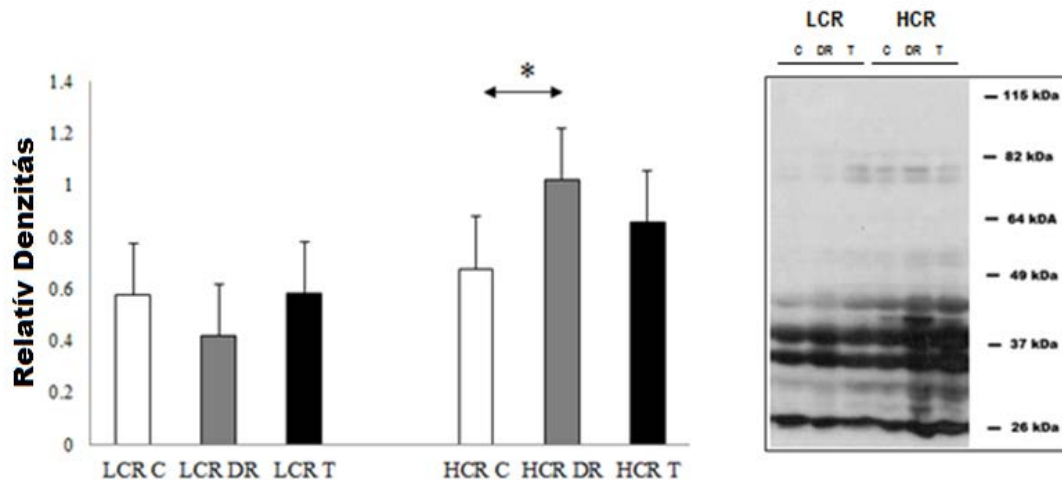
Az izomminták feldolgozása során szignifikánsan magasabb SIRT1 fehérje mennyiséget tapasztaltunk a HCR-T állatoknál a HCR kontroll csoporthoz képest. A DR nem volt hatással egyik általunk vizsgált csoport SIRT-1 szintjére sem (21. ábra). A lizin aminosav-oldalláncok acetiláltsága csak a HCR-DR csoportban növekedett (22. ábra).



21. ábra

Sirt1 fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból

Western blot eljárással mért Sirt1 fehérje mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)

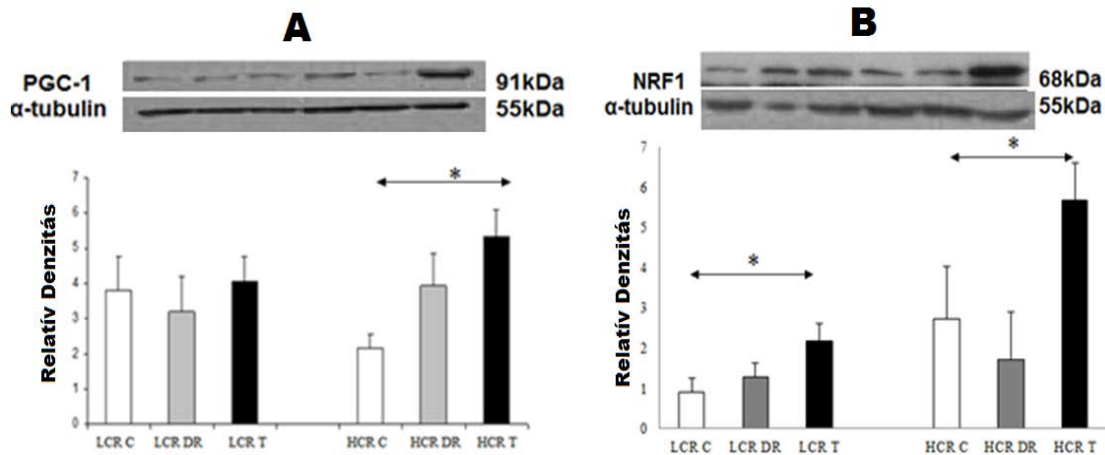


22. ábra

Acetilált lizin mennyiség patkány gastrocnemius izomból

Western blot eljárással mért acetilált lizin mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)

A PGC-1 alfa értékeket (23. A ábra) és ezzel párhuzamosan az NRF-1 fehérje szinteket (23. B ábra) is a testmozgás jelentősen emelte a HCR csoportban. Ezzel szemben a LCR csoport egyedei ebben a tekintetben csupán az NRF-1 változásával reagáltak az edzés hatására, ám ez nem eredményezte az SDHA mitokondriális fehérje mennyiség növekedését (24. ábra).

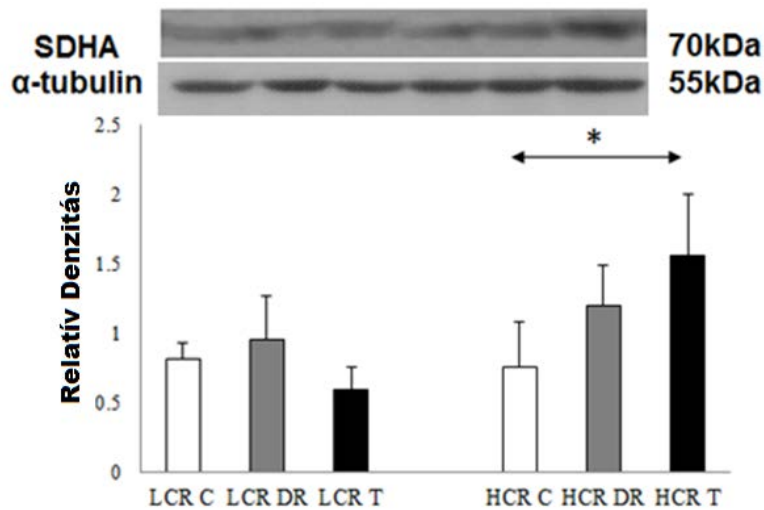


23. ábra

PGC-1 alfa és NRF1 fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból

A: Western blot eljárással mért PGC-1 alfa fehérje mennyiség, B: Western blot eljárással mért NRF1 alfa fehérje mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)

A mitokondriális biogenezis fokozódását a PGC-1 alfa, NRF1 szintek mellett a szukcinát dehidrogenáz A (SDHA) alegység szintjének emelkedése (24. ábra) is bizonyítja a HCR állatokban, edzés hatására. Az NRF1 fehérje mennyisége nő állóképességi edzésre, ám mérésünk tanúbizonysága szerint a mitokondrium-szám becslésre alkalmas SDHA mennyiség az LCR állatokban nem változik sem edzés, sem DR hatására.

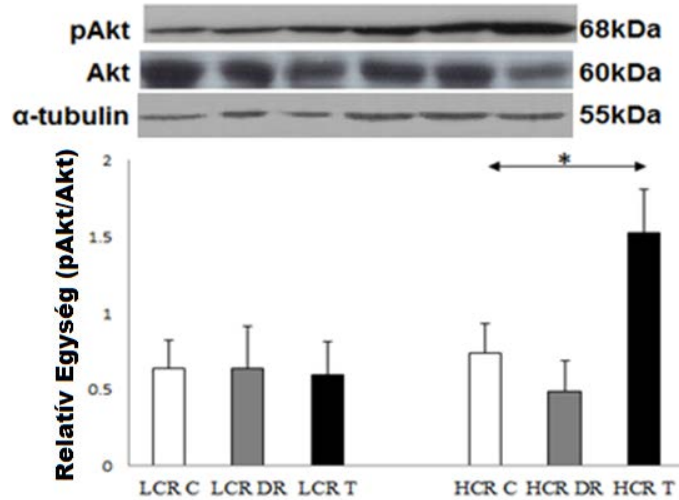


24. ábra

SDHA fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból

Western blot eljárással mért SDHA fehérje mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport

A anabolikus folyamatokat indukáló és az inzulin sejten belüli folyamatait mediáló Akt foszforilációja robusztus emelkedést mutatott a HCR-T csoportban a kontroll csoporthoz képest (25. ábra). A LCR állatokban ezzel ellentétben nem mutatható ki az Akt jelátviteli folyamatok aktiválódása.



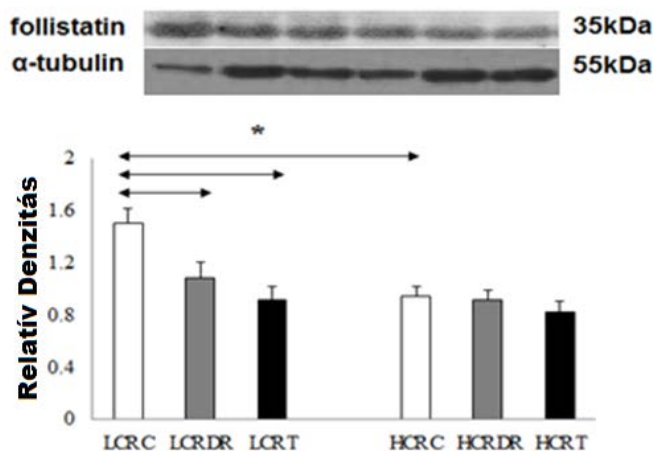
25. ábra

pAkt/Akt fehérje mennyiség aránya patkány gastrocnemius izomból

Western blot eljárással mért pAkt/Akt fehérje mennyiség Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnél és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)

Az anabolikus folyamatok egy másik indikátorát, a follisztatin izomszöveten belüli koncentrációját is mértük (26. ábra). Az LCR állatok esetében mind az állóképességi edzés, mind a DR follisztatin szint-csökkenést indukált. Az HCR csoportban ugyan nem mutatható ki fehérjeszint-csökkenés, de az eredmények változásról sem tanúskodnak. Így feltételezhetően a HCR állatok esetében nem köthető számottevő krónikus katabolikus válasz a szervezetüket ért metabolikus stressz hatásához. Sőt az Akt foszforilációs adatok emelkedett szénhidrát felvételre és jobb extracelluláris inger integrációs képességre utalnak (inzulin- és növekedési faktor érzékenység). Továbbá az AMPK fehérje növekedett foszforilációja is megerősíti az utóbbi nézetünket (27. ábra). Az AMPK AMP érzékeny molekula, melynek foszforilációja az energiahányos állapotokra bekövetkező, jól

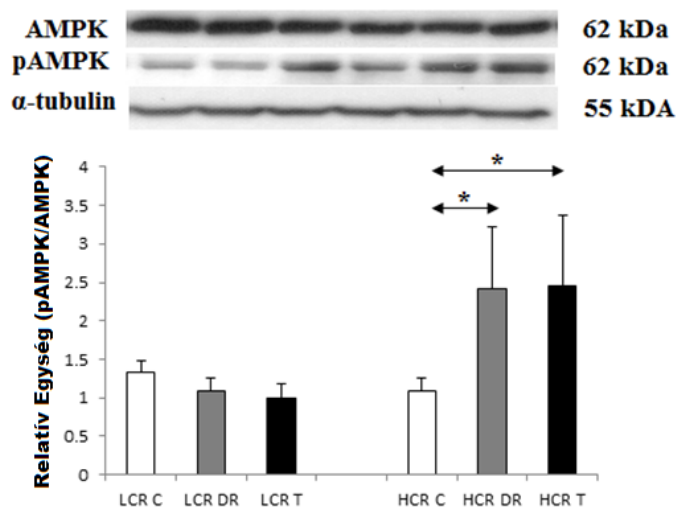
koordinált metabolikus válaszok indikátora. A gastrocnemius izomból mért eredményeket és a fiziológias mutatókat az 5. táblázatban foglaltuk össze, melyből a mitokondriális biogenezis markerek szignifikáns emelkedése olvasható ki a HCR állatoknál. Viszont a terhelésélettani eredményekre az állóképességi edzés mind a két csoportban pozitívan hatott. Az LCR csoportban pedig mind két kezelés alkalmas volt a testtömeg pozitív irányú kontrolálására.



26. ábra

Follisztatin fehérje mennyiség patkány gastrocnemius izomból

Western blot eljárással mért follisztatin fehérje mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)



27. ábra

pAMPK/AMPK fehérje mennyiség aránya patkány gastrocnemius izomban

Western blot eljárással mért pAMPK/AMPK fehérje mennyiség. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, DR: minden másnap etetett csoport, T: állóképességi edzést végző csoport)

5. táblázat

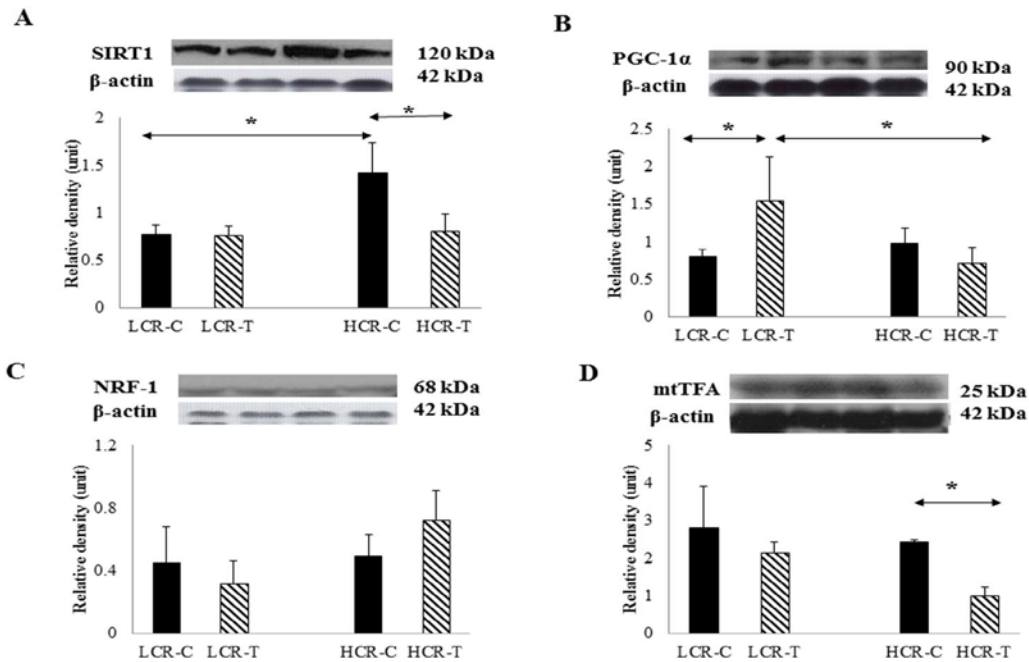
A diétás megszorítás, állóképességi edzés és a különböző fenotípus hatása a gastrocnemius izomra és a fiziológiás mutatókra

Jelölések: 0: nincs szignifikáns változás kontrollhoz képest; +: szignifikáns növekedés tapasztalható a kontrollhoz képest; - szignifikáns csökkenés tapasztalható a kontrollhoz képest, LCR: alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, DR: minden másnap etetett-, T: állóképességi edzésben részesült csoport

Gastrocnemius Izom					
	LCR-DR	LCR-T		HCR-DR	HCR-T
Futási táv	0	+		0	+
Testtömeg	-	-		0	0
VO2 max	0	+		0	+
Kapaszkodás	0	0		0	0
SirT1	0	0		0	+
ac. Lizin	0	0		+	0
PGC-1 α	0	0		0	+
NRF-1	0	+		0	+
Follistatin	-	-		0	0
SDHA	0	0		0	+
pAMPK/AMPK	0	0		+	+
pAkt/Akt	0	0		0	+

5.4. Here szöveti minták feldolgozás során született eredmények

A mitokondriális biogenezis folyamatában részvevő markerek tekintetében a SIRT1, a PGC-1 α és az mtTFA fehérjék mutattak eltérést. A SIRT1 fehérje (28A ábra) szignifikánsan nagyobb volt a kontrol magas futókapacitású állatcsoportban, az edzett és a LCR-C csoporthoz viszonyítva. A PGC-1 α (28B ábra) ezzel szemben csak az LCR csoportban növekedett meg szignifikánsan. A mitokondriális transzkripcós faktor A (mtTFA) (28D ábra) pedig érdekes módon csökkenést mutatott állóképességi edzés hatására a HCR csoportban. Az NRF-1 fehérje nem mutatott szignifikáns eltérést az egyik csoportban sem (28C ábra).

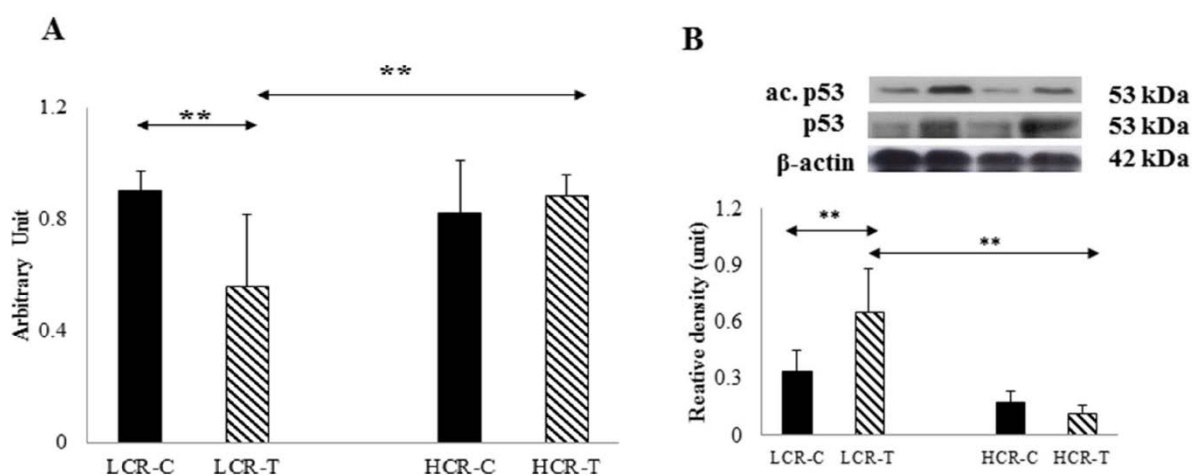


28. ábra

Mitokondriális biogenesis markerek here szövetben a HCR és LCR állatokban.

(A) SIRT1, (B) PGC1 α , (C) NRF-1, (D) mtTFA fehérjék Western blot eljárással mért eredményei. Feltüntetett értékek: átlag \pm SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, T: állóképességi edzést végző csoport).

Az steady state oxidatív stressz státusz az alacsony futókapacitású egyedekben kedvező irányba változott állóképességi edzés hatására (29A ábra). Esetükben csökkent mértékű oxidált 2', 7'-diklór-fluorescein volt detektálható indikálva ezzel az alacsonyabb oxidatív stressz mértékét. A javuló szöveti redox környezet pedig elősegítheti a reprodukciós funkciók javulását. A P53 fehérje acetiláltsága (29B ábra) növekedett az LCR állatokban edzés hatására, míg a HCR állatokban alacsony szinten, változatlan maradt.

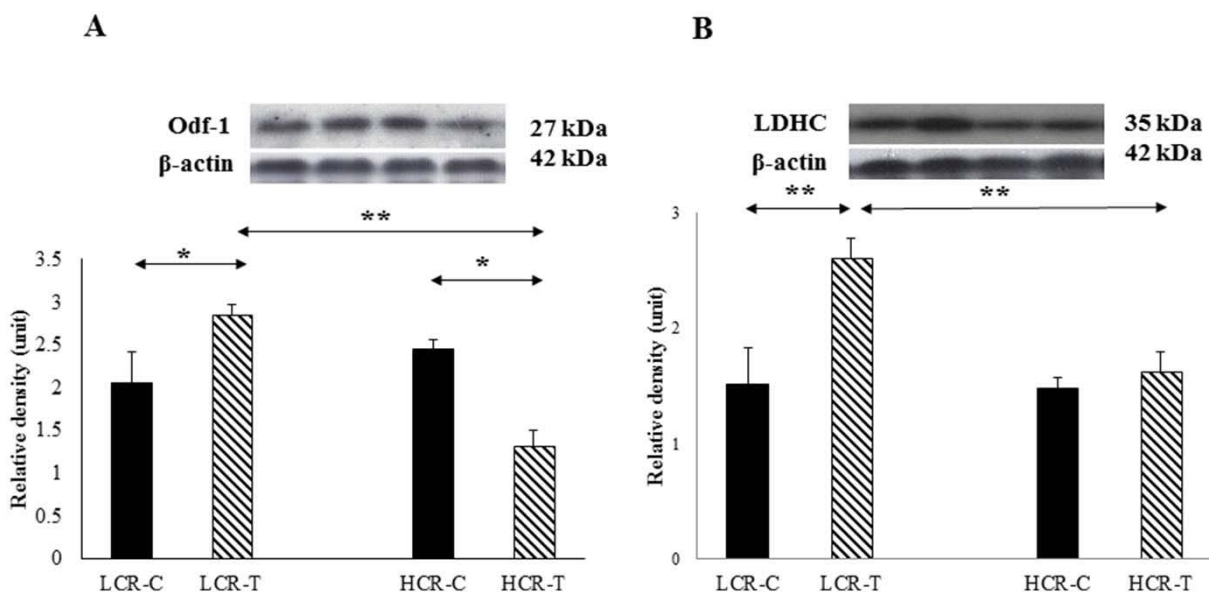


29. ábra

Oxidatív stressz és p53 acetiláció a HCR és LCR állatokban.

(A) Diklór-dihidrofluorocin-diacetát (H₂DCFDA) fluorescens indikátor segítségével becsültük a HCR és a LCR állatok hereszöveiben a steady state ROS mennyiséget. (B) Western blot eljárással mért p53 antitumor fehérje acetilációjának mértéke. Feltüntetett értékek: átlag ± SE, a kettősnyíl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, T: állóképességi edzést végző csoport).

A spermatogenezis markerek tekintetében, mind az Odf-1 fehérje (30A ábra), mind a LDHC fehérje (30B ábra) emelkedést mutatott a LCR csoportban állóképességi edzés hatására. Ráadásul mind a két esetben az eltérés a HCR-T csoporthoz képest is szignifikáns volt, így az LCR csoportban edzés hatására hatékonyabb reprodukciós funkció valószínűsíthető. Ezzel párhuzamban a HCR egyedeknél az általunk alkalmazott edzés még, akár ronthatja is reprodukciós potenciált, mint arra az Odf-1 eredmények utalnak (30A ábra).



30. ábra

Spermatogenezis markerek a HCR és LCR állatokban

(A) Odf-1 és (B) LDHC fehérjék, Western blot eljárással mért eredményei. Feltüntetett értékek: átlag ± SE, a kettősnyl és a csillag szignifikáns különbséget jelöl. $p < 0,05$ (LCR: Alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású, C: kontroll csoport, T: állóképességi edzést végző csoport).

6. táblázat

Az állóképességi edzés hatása a here szövetre a LCR és HCR csoportokban

Jelölések: 0: nincs szignifikáns változás kontrollhoz képest; +: szignifikáns növekedés tapasztalható a kontrollhoz képest; - szignifikáns csökkenés tapasztalható a kontrollhoz képest, LCR: alacsony futókapacitású csoport, HCR: magas futókapacitású csoport, DR: minden másnap etetett-, T: állóképességi edzésben részesült csoport

Here szövet		
	LCR-T	HCR-T
Sirt1 (WB)	0	-
PGC-1 α (WB)	+	0
NRF-1 (WB)	0	0
mtTFA (WB)	0	-
Oxidatív stressz	-	0
ac. P53 (WB)	+	0
Odf-1 (WB)	+	-
LDHC (WB)	+	0

6. Diszkusszió

6.1. A szelekció és a diétás megszorítás hatása a memóriára és a hippocampális régió BDNF szabályozásra, mitokondriális státuszra

6.1.1. Mit jelent az „eltérő genetikai adottság” az LCR-HCR csoportoknál?

Colman és kutatócsoportja 2009-ben közölte le a 30%-os kalória visszafogás eredményét emberszabású rhesus majmokon (74). A beavatkozás szignifikánsan csökkentette a kor előrehaladtával tapasztalható agyszöveti atrófiát. Ezzel egyidejűleg sikerült megtartani az állatok szürkeállományi térfogatát az idegrendszeren belül. Ezek az adatok a CR tárgykörében forradalmi jelentőségűek, hiszen mindezidáig ez a leghosszabb időtartamot felölelő, a táplálék mennyiségi változóival foglalkozó experimentális vizsgálat (20 éves longitudinális vizsgálat). Valószínű ezek az eredmények adják a legrelevánsabb információt humán populációkra vonatkozóan is. Számos más leírás is foglalkozik a CR-rel összefüggésbe hozható szisztémás és idegrendszeri pozitív hatásokkal, ám csak kevés veszi figyelembe a vizsgált populációk pedigrijét. Kivételt képeznek természetesen az olyan kísérletek, melyekben speciálisan egy vagy több gén „knockout” vagy „knockin” hatását kutatják. Természetes körülmények között egy populáció egyedei, mennyiségi jellegeiket tekintve közel normális eloszlást mutatnak (234). Valamilyen tulajdonságában kiemelkedő és a szerény képességű egyedek a harang görbe két szélén helyezkednek el, és csoportjaik elemszáma is kicsi. Leggyakoribbak az átlagos tulajdonságú egyedek. Egy-egy enzim vagy speciális fehérje defektusa esetén könnyebb azonosítani azon gént vagy géneket, melyek a tulajdonság kialakulásában játszanak szerepet (bár nem minden esetben). Ám sokkal nehezebb a helyzet, ha a fenotípus olyan genetikai hátterére kérdezzük rá, mint amilyen a futókapacitásra vagy a memóriára. Ezek a tulajdonságok nem feltétlenül a klasszikus mendeli genetikai szabályok szerint öröklődnek és sok gén együttes hatása fogja kialakítani a fenotípust (poligénes hatások, stb.).

Az aerob kapacitás mely mérhető egyfelől a maximális oxigén felvétellel, másfelől becsülhető a futási kapacitással, egy komplex gén-környezet együttműködés integrációból

származó tulajdonság. Magában foglal veleszületett jellegeket, továbbá fizikai aktivitásra, edzésre, - egyes esetekben táplálkozási szokásokra – stb., létrejött adaptációs folyamatokat. Koch és Britton pedigre alapú vizsgálata a két patkányvonal fenotípusában (aerob kapacitásában) megjelenő varianciát 40%-ban tudta magyarázni a gének kumulatív hatásával (235). Hipotézisük szerint több lokuszon elhelyezkedő allélvariációk együttes hatása eredményezi a HCR és az LCR állatok aerob-futókapacitásbeli különbségeit. A gén konstellációk pedig feltehetően a szelekció során preferált fenotípusnak megfelelően fixálódnak. Az állatok tenyésztésénél az amerikai partner igyekezett kerülni a beltenyészet kialakulását, hiszen ebben az esetben csökken az alléldiverzitás és a fenotípus kevésbé tudja reprodukálni a feltételezhetően számos gén együttműködésének eredményeként lezajló folyamatokat. Saját vizsgálatunkban az LCR állatok vizsgált élettani paraméterei nagyobb mértékben változtak, mint HCR társaiké. Az LCR állatok testtömege DR hatására a kezdeti állapot 94%-ára mérséklődött a HCR állatok esetén, a végérték csupán kezdeti érték 96-%, mely nem is szignifikáns eltérés. Ez első ránézésre nem tűnik óriási differenciának, ám klinika relevanciája már néhány százalékos testtömeg veszteségnek is lehet, hozzátevé azt, hogy az LCR egyedek nagyobb kiindulási testtömeeggel is rendelkeztek.

A vizsgált állatok esetében a szakirodalomban főként izom (váz és szív) és máj szöveteket érintő vizsgálatokat találunk, tekintve, hogy ezen szövetek anyagcseréje igen intenzív és többnyire a kutatócsoportok az állatok anyagcsere abnormalitásai felől közelítik a tárgykört. Az agyi struktúrák vizsgálatai viszont ritkák ebben a tárgykörben, eredményeik így hiánypótló jellegűek.

6.1.2. A LCR-HCR állatok memória státusza DR hatására

Eredményeink szerint a magas futókapacitású állatok szignifikánsan jobban teljesítettek a passzív elhárítás teszten DR hatására, a két szelektált csoport között azonban nem volt kimutatható különbség kezeletlen állapotban. Wikgren T-útvesztőben vizsgálta az állatok kognícióját (236), eredményei szerint a HCR állatok jobban teljesítettek, mint LCR társaik,

ám a motoros tanulási képességek tekintetében nem adódott számottevő különbség. A viselkedés, a memória és az agyi folyamatok fenotípusban megjelenő következményei igen komplex rendszert alkotnak, és úgy tűnik a tanulási képességek korántsem olyan egyértelmű következtetésekkel szolgálnak, mint a máj vagy az izomrendszer funkcionális adatai.

Az általunk vizsgált memória funkciók, úgy tűnik összefüggésbe hozhatóak a BDNF molekulával, (Spearman $r_s = 0,52$ $p = 0,015$) hiszen a BDNF mennyiség emelkedése a memória eredményekhez hasonló trendet mutat. Eredményeink hasonlítanak Gomez és Pinilla megfigyeléseire (237). Az LCR állatokon viszont a diétás megszorítás hatására nem jelentkezett a HCR tapasztalható jobb memória, melyre BDNF szintjük is utalhat. A memória inprinting és a szinaptikus plaszticitás kialakításában kulcsfontosságú szerepet tölt be a BDNF molekula. Hiányában számos idegrendszeri zavar jelentkezik és a vizsgálati állatok memóriaproblémákkal küzdenek (238,239).

6.1.3. Az LCR-HCR állatok BDNF gén promóter kontrollja és lehetséges epigenetikai szabályzó folyamatok

Az általunk vizsgált BDNF gén szabályzása összetett. A BDNF gén ugyanis a DNS-ről nem teljesen analóg módon íródik át (ahogy a legtöbb géntermék sem). Az eddig leírt nyolc promóter régió közül vizsgálatunkban a IV-es promóter expresszióját vizsgáltuk. Ez a régió korábbi szerzők beszámolóí alapján környezeti hatásokra érzékeny, ezek közé tartozik a fizikai aktivitás, illetve a testedzés (240).

Az LCR állatok esetében tapasztalható emelkedett hiszton H3K14 acetiláció a kromatin struktúra nyitottabb, kevésbé kondenzált formájára utal. A lazább struktúrához pedig irodalmi adatok alapján fokozott génátíródás is társulhat (224-226). Esetünkben a BDNF IV-es promóter fokozott hiszton H3 acetilációja csak a HCR állatokban mutatható ki (241). Az LCR állatokban csak, mint tendenciáról beszélhetünk, szignifikáns emelkedés nélkül. Az LCR állatok esetében tapasztalható BDNF mRNS mennyiség növekedés hasonló

irányba változik, mint az összacetilációs eredmények, ám a változatlan BDNF fehérjemennyiség és a HCR-DR egyedek promóter IV- ac-H3K14 eredményei magyarázatra szorulnak.

A hiszton H3 a DNS nukleoszómáját alkotó hiszton oktamer tagja. A DNS spirálisan van „feltekeredve” ezekre a fehérje struktúrákra (oktamerenként 2 hiszton H3 van jelen). A patkány genom ~2,75 milliárd bázispárt tartalmaz, egy nukleoszómára pedig megközelítőleg 150 bázispár tekeredik fel (242). Ebből következően a néhány kilobázis-hosszú BDNF promóter IV hisztonja nagyon kis mennyiségben van jelen az összes hiszton H3-hoz képest. Az összhiszton acetiláltság az egész genom integritását jellemzi, a BDNF promóter IV -hiszton H3 pedig a kromoszómán belül lokális transzkripció környezetet. A „lokális” hiszton acetilációból tehát önmagában nem, vagy csak nagyon óvatosan következtethetünk a „teljes” mennyiségére (vagy fordítva). Esetünkben egyértelműen látszik, hogy a BDNF promóter IV-es régiójának nyitottsága nem feltétlenül jár együtt ugyanakkora összkromatin állomány nyitottsággal.

A CREB transzkripció fehérje emelkedett foszforilációja összhangban van a BDNF promóter IV mérési eredményekkel. A BDNF mRNS eredmények tűnnek csak ellentmondásosnak.

A válasz valószínűleg a BDNF mRNS összetett transzkripció szabályozásában és poszttranszkripció mechanizmusokban keresendő. Mint már említettük, eddigi ismeretünk szerint a BDNF esetében nyolc promóter régióról beszélhetünk. Ezekről Aid közleménye alapján (123) a különböző exon kombinációk és poliadenilációs helyek miatt 18 féle mRNS tud átiródní. A BDNF 252 aminosavat kódoló „értelmes” szekvenciát az mRNS-ek 3' végén található bázishármasok kódolják (IX-jelölésű egység). Ugyanazt a kódoló szekciót tehát mind a 18 génátírat tartalmazza és mérési eredményeink szerint az általunk vizsgált régióból nem olyan arányban keletkezik fehérje, hogy csupán azzal magyarázni tudjuk a BDNF protein mennyiség változását. Valószínű a fehérjeszint emelkedéséhez az egyes promóter régióból származó mRNS-ek más-más mértékben járulnak hozzá, mi több ezek élettartama is eltérhet (243).

A BDNF promóter IV-ről 1998 óta tudjuk, hogy rendelkezik CRE konszenzus szekvenciával (244). A BDNF promóter I-ről például csak később írták le, hogy ez a bázis szekvencia is alkalmas a CREB fehérje kötésre (245).

Ha a BDNF fehérje képződés szabályozása eddig nem tűnt volna elég sokrétűnek, a legújabb kutatási eredmények még hozzá tudnak tenni a rendszer komplexitásához (29. ábra). A 2006-ban Nobel-díjjal kitüntetett Andrew Z. Fire és Craig C. Mello kutatópáros nevéhez fűződő az RNS interferenciaként ismert folyamat leírása tovább színesítheti az eddigi képet. Léteznek ugyanis olyan génátíratok, melyeket microRNS-ként (miRNS) ismer a tudomány (másik csoport a kettős szálú RNS speciális formája az ún. kis interferáló RNS (siRNS), mely a mikroRNS-hez nagyon hasonló folyamatokat indukál a sejtben, ám eredetük és hatásmechanizmusuk alapján különböznek egymástól). Ezeknek az RNS-eknek lényeges funkciója a poszt-transzkripció gécnsendesítés. A folyamat során egy génproduktummal (mRNS-el) a génről való átíródás után a micro- és egyéb interferáló RNS-ek kapcsolatba lépnek és gátolják a riboszómális fehérjeszintézist, vagy az mRNS gyors lebontását indukálják. Esetünkben az LCR csoportnál az összkromatin hiszton H3 acetilációja fokozódott, ezzel jobb feltételeket biztosítva egyes gének átíródáshoz. Lehetséges, hogy az LCR állatok emelkedett H3 összacetilációja a miRNS-ek szintjén is érvényesül, fokozódik transzkripciójuk, és ez a BDNF mRNS-transzláció csökkenéséhez vezet. A BDNF- mRNS esetében is kimutatták, hogy léteznek olyan kis, 20-30 bázispárból álló RNS molekulák, melyek poszt-tanszkripció gécnsendesítésre alkalmasak. Ezek közé tartoznak a miRNS-124 (246) és a miR-206 jelölésű (247,248) miRNS-ek. Az LCR állatok érzéketlenségében a DR hatásra talán szerepet játszik az összhiszton H3 acetilációból fakadó, vélhetően magasabb miRNS szint. A nagyobb mért BDNF mRNS szint pedig egy kompenzációs mechanizmusként fogható fel, melynek segítségével a LCR-DR állatok meg tudták tartani bazális BDNF szintjüket. Nézetünket támogatja Mojtahedi vizsgálati eredménye (249), melyben nehéz és könnyű fizikai aktivitásnál mérték a miRNS-124 szintjét és a BDNF fehérje koncentrációt patkány hippocampusban. Esetükben az alacsony intenzitású edzés növelte a BDNF szintet, ám a megterhelő edzés nem. A magas intenzitású csoportban pedig robosztus emelkedés volt tapasztalható a miRNS-124 értékekben. A

fentebbi BDNF mRNS-miRNS kapcsolatát taglaló feltételezések azonban spekulatív jellegűek, hiszen jelen vizsgálataink nem terjedtek ki a miRNS frakciókra. A folyamat tisztázásához további mérések szükségesek!

Az LCR állatok érzékenyebbek a szervezetüket ért stressz hatásokra és szabályozásuk is rosszabb, mint HCR társaiké. Vizsgálataink során ezt mi is tapasztaltuk és nézetünket más ugyanilyen patkányokkal foglalkozó kutatócsoportok is megerősítik (15,19,33). Ezek után a BDNF szint stagnálása és az mRNS szint emelkedése talán nem is olyan meglepő eredmény. A mechanizmus pontos megismeréséhez további vizsgálatok lennének szükségesek, melyek a BDNF mRNS (ek) és az interferencia elemek kapcsolatát demonstrálják.

A BDNF gén szabályozásánál még érdemes megemlíteni, hogy a BDNF molekula különböző promóterei és poliadenilációs helyei egyes hipotézisek szerint az mRNS stabilitásában, fordíthatóságában és a sejten belül az mRNS ún. szubcelluláris lokalizációjában játszanak szerepet. Ebből arra következtethetünk, hogy a promóter produktumok egyrészt a bazális BDNF szintért, ezzel a neuron túléléséért felelősek (permisszív hatás). Másrészt, mint például a IV-es aktivitás függő régiók, BDNF expresszióval a szinaptikus kapcsolatok kialakításáért, plaszticitásáért felelősek (instruktív hatás (250)). Úgy tűnik az LCR állatok estében a DR az összkromatin struktúra acetilltságára hat, míg az HCR egyedek estében inkább lokális acetiláció figyelhető meg a BDNF IV promóter régiója esetében

A modellként használt állatcsoportokban az eltérő fenotípusú állatok eltérő adaptációt mutatnak ugyanazon kezelés hatására, a változások pedig, talán BDNF mRNS és a hiszton acetilációs mintázatban a legszembetűnőbbek. A kérdésre: pontosan, melyek azok a pontok, ahol esetünkben a két rágcsálóvonal genetikája a fenotípussal állítható párhuzamba, igen nehéz válaszolni. A nehézségeket egyfelől az okozza, hogy ezeket az állatokat a „természetben megszokotthoz” nagyon hasonló módon állította elő az amerikai partner. Ezalatt azt értve, hogy nem biokémiai, sejtbiológiai módszereket alkalmaztak a tenyésztés során, pusztán a fenotípusra támaszkodtak. A sokszor hasonló fenotípusok pedig akár a

várnál nagyobb genetikai változatosságot is mutathatnak (lásd test magság, VO₂max). A modell előnye, mely a genetikai állomány diverzitását adja egyben a hátránya is lehet, ha konkrét, általánosítható eltéréseket keresünk. Az állatok teljes genomjának szekvenálása és összehasonlító elemzése igen drága és időigényes folyamat lenne, és mint az irodalmi áttekintésben utaltunk is rá nem mindig váltják be a hozzájuk fűzött reményeket. A kérdés másik aspektusát pedig Ron Vale, egy a motorfehérjéről tartott előadásban elhangzott gondolata világítja meg briliánsán: "Vegyünk egy vegyi üzemet és kapjuk kézbe az üzem néhány alkatrészét, csöveket, szelepeket stb. és próbáljunk következtetni ezekből az elemekből az egész üzem működésére... mindezt a Holdról szemlélve. A biológia, biokémia óriási léptékű fejlődésének ellenére valahol itt tart ma a biológia". (251). Ennek ellenére a bioinformatika és a számítási kapacitás fejlődésével valószínű egyre jobban meg fogjuk érteni ezen összetett rendszerek szabályozását is.

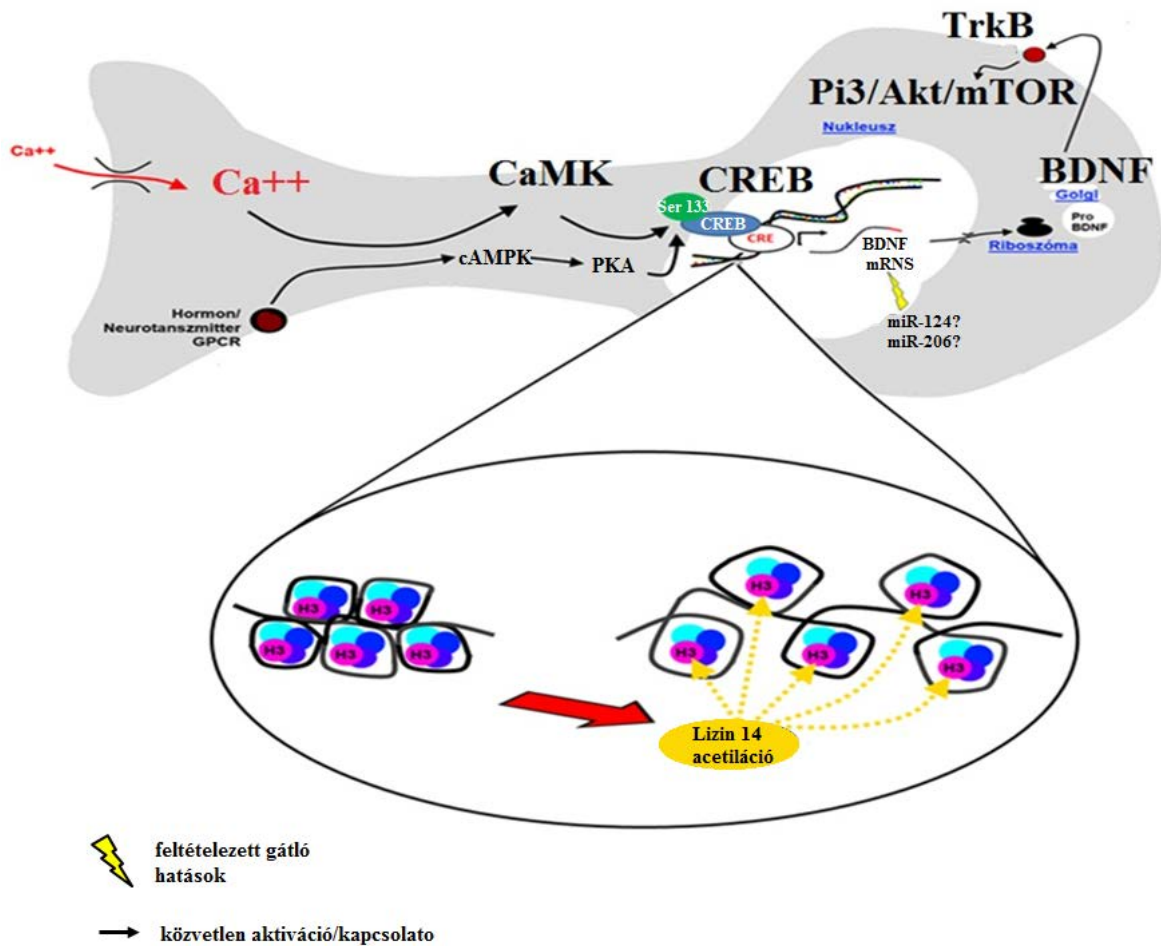
6.1.4. Az mitokondriális biogenezis a HCR-LCR állatok hippokampális régiójában?

Vannak bizonyítékok a BDNF szint emelkedése és a mitokondriális biogenezis kapcsolatára is (201,207), ám a mi esetünkben ezt az összefüggést nem tudjuk igazolni. A magyarázat egyfelől lehet a BDNF molekula permisszív hatása, tehát a molekula jelenléte szükséges, de nem elégséges a mitokondrium gyarapodás indukálásához. Másfelől a DR megszorítások során gyakran megfigyelt állatvonal specifikus „ismeretlen háttérváltozók” (252) is közrejátszhatnak.

A testedzéssel együtt járó mitokondrium szám emelkedés különböző (ám főleg váz és szívizom) szövetek esetében igen jól dokumentált. Furcsának hat viszont, hogy a CR/DR hatásnál is kimutattak mitokondriális biogenezt indukáló faktorok szintjének emelkedését. (253,254) Edzéshatás esetén, normális táplálkozási feltételek mellett, folyamat „logikája” a következő: a testedzés fokozott kémiai energia (ATP) igényét a mitokondrium mennyiség emelkedésével lehet kielégíteni, az emelkedéshez szükséges „építőanyag” pedig a táplálékból kerül a szervezetbe. Az agy esetében az energiaigény növekedés nem számottevő még testedzés alatt sem, ellentétben a szív és vázizomszövetekkel. A

metabolikus környezet CR/DR hatásra nem hasonlít minden elemében a fizikálisan terhelt állapotról. CR/DR esetében az ad libitum állapothoz képest „alapanyaghiány” alakul ki és a rendszer elemek stabilizálása irányába lenne „ésszerű” eltolni a folyamatokat (repair mechanizmusok), nem pedig az új struktúrák kialakítása felé (egyszerű példával élve nem építünk új kályhát, ha fogytán a tűzifa, hanem a meglévő kályhát javítjuk meg). Ezen feltételezést támogatja, az ún. "diposable soma" teória (255,256) mely szerint az energiahányos állapotban a szervezet túlélőfolyamatait (longevity assurance mechanisms: LAMs) aktiválja a későbbi sikeres genetikai információ továbbvitele érdekében. Igaz, nem mindig szerencsés biológiai folyamatokat antropomorfizálni, ám az energiaminimumra törekvés elve minden élő és fizikai struktúra sajátja, nem beszélve evolúció során megjelenő szelekciós előnyökről.

Méréseink szerint csupán a HCR- patkányok reagáltak PGC-1 alfa mennyiség emelkedésével DR-re a hippokampális régióban, ám más mutatókban változatlan állapotokat mértünk. Megkülönböztetett figyelmet érdemel a COX-4 fehérje, melynek szintje a mitokondrium mennyiséggel mutat erős pozitív kapcsolatot. Az oxidatív anyagcsere sejten belüli centrumai a mitokondriumok. Az oxigén jelenlétében az energia döntő többségét az oxidatív foszforiláció folyamatában realizálja a sejt. Az idegsejtek különösen érzékenyek a vércukor szint változásaira nem véletlen, hogy a cukorbetegség első tünetei is az idegvégződés környékén alakulnak ki. Az LCR állatok metabolikus kockázati tényezőkkel rendelkeznek és ez valószínű az agyi struktúrákon is érvényesül. Eredményeink alapján a mitokondriális biogenezis nem mutat szignifikáns változást a vizsgált csoportokban, ám a DR re adott epigenetikai változások és ezzel összefüggésbe hozható BDNF szint eltérő képet mutat.



31. ábra

A hippocampális BDNF jelátviteli folyamatok és az epigenetika összefoglalása

Az idegrendszeri aktivitás révén a Ca^{++} ionok idegsejtbe történő beáramlására („long term potentiation”), illetve hormonális/neurotranszmitter hatásra a CREB fehérje foszforilálódhat (szerin 133), mely fokozhatja a BDNF gén expresszióját. A felnagyított rész a DNS hiszton kapcsolatot demonstrálja, ahol a hiszton H3 K14 acetiláció egy nyitottabb struktúrát eredményez. A Marosi 2014-es (257) közleményének ábráját módosítva, saját és irodalmi adatok alapján feltételezett mechanizmusok összefoglalása.

6.2. A szelekció, az állóképességi edzés és a diétás megszorítás hatása az élettani mutatókra és a vázizom mitokondriális státuszára (B)

6.2.1. Az LCR-HCR állatok fizikai teljesítőképességének státusza DR és állóképességi edzés hatására

A vázizomzat energiaigényét nagymértékben befolyásolja a fizikai aktivitás. Fejlettebb szervezetek esetében egyik szövet sem mutat olyan nagymértékű energiaigény növekedést mozgás hatására, mint az izomszövet. A folyamat egyértelmű, hiszen a mozgási energiát a vázizom (vér esetében szívizom) állítja elő kémiai energia felhasználásával. A kémiai energiát főként a mitokondriumok a terminális oxidáció során termelik, elsősorban ATP formában. A hippokampusszal ellentétben a vázizomban van egy egyszerűen kivitelezhető eljárás, mely normális egyedeknél egyértelmű mitokondriális biogenezist okoz. Ez pedig az állóképességi edzés.

Figyelemre méltóan az LCR állatok edzés hatására közel 220%-os fejlődést produkáltak a HCR állatok 171%-os (163% vs LCR-C) futókapacitásbeli fejlődésével szemben. Bízhatóak a maximális oxigén felvétel adatok is, itt a LCR állatok ~23%-al nagyobb oxigénfelvételt tudtak produkálni az edzési periódus végeztével a kontroll csoporthoz viszonyítva, a HCR ~10%-ával szemben. Az LCR T csoport futókapacitása és maximális oxigén felvétele a HCR állatok kontroll csoportjához közeledett. A kapaszkodási testben egyik csoport sem produkált fejlődést, hiszen az általunk alkalmazott edzésprogram inkább az aerob állóképesség növelését célozta, mintsem a statikus erő-állóképesség fejlesztését. A növekvő trend alapján viszont azzal spekulálhatunk, hogy egy növelt intenzitású (90% VO₂ max<) edzés periódus után akár szignifikáns erőgyarapodást is elvárhatunk még az LCR állatok esetében is, tekintve, hogy magas intenzitáson végzett intervall edzésekről kimutattak már, hogy patkányoknál szorító erő növelő hatása van (258). A fentiek ismeretében, habár a genetikai determináltság valószínűleg robosztus a két mesterségesen szegregált patkánycsoportban, a környezeti tényezők, kiváltképpen az állóképességi edzés, segítséget tud nyújtani az ab ovo különbségek csökkentésében. Korábbi kutatások vázizomban, szívizomban és májszövetben is beszámoltak anyagcsere rendellenességekről,

többek között magas koleszterin, triglicerid és glükóz szintekről LCR állatok estében (33,259). A magas vércukorszinthez inzulin rezisztencia is táruult és ezzel összefüggésben az inzulin jelátviteli folyamat hatékonysága is csökkent.

6.2.2. Mitokondriális biogenezis és anyagcsere az LCR-HCR állatok gastrocnemius izmaiban

Miként már fentebb utaltunk is rá, a cukoranyagcsere és a mitokondriális funkciók kapcsolatba hozhatók. Vázizom-sejtkultúrákban a PGC-1 alfa overexpressziója növelte az inzulin érzékeny glükóz-transzporter fehérje a GLUT4 expresszióját (260,261), ám in vivo vizsgálatoknak ezt nem sikerült megerősíteni, sőt PGC-1 alfa transzgenikus modellben GLUT4 mRNS csökkenést mutató eredményeket is közöltek (262). A glükóz-transzport folyamatok és a PGC1 alfa kapcsolatában még nincs teljes konszenzus, ám PGC-1 alfa overexpresszió növeli az olyan glükoneogenezisben fontos szerepet játszó gének expresszióját, mint amilyen a foszfoenolpiruvát karboxikináz (PEPCK) és a glükóz-6-foszfataz (G6P-ASE). Van bizonyíték arra, hogy az inzulin gátolja a PGC1 alfa aktivitást (263), ugyanis a FOXO1 (Forkhead box protein O) transzkripció faktor foszforilálódik az inzulin jelátviteli mechanizmus eredményeképpen. A FOXO1 Akt által történő foszforilációja (T24, S256, S319) gátolja a fehérje nukleuszba történő transzlokációját és elősegíti a fehérje lebontását. Az idézett szerzők szerint a PGC1 alfa a FOXO1-el a transzkripció folyamatokban való együttműködés révén képes aktiválni a glükoneogenezis gének expressziós folyamatait (264). Akadnak olyanok is, akik indirekt kapcsolatot feltételeznek (265). Kalória visszafogás, koplalás alatt az inzulin szint csökkenést mutat, továbbá az állóképességi edzés, az izom kontrakció is nagymértékben befolyásolja a glükóz transzport folyamatokat (266). Eredményeink szerint az LCR állatok mind a mitokondriális (PGC-1 alfa jelátvitel „érzékeltlensége”), mind a cukor anyagcsere (Akt-, AMPK elmaradt foszforilációja) tekintetében problémákkal küzdenek. Az LCR állatok a metabolikus szindróma jeleit mutatják, melynek egyik fontos patológiás elváltozása a már említett inzulin intolerancia. Érdekes tény, hogy a mitokondriális biogenezis szabályozása kettes

típusú diabéteszben szenvedő egyéneknél a normálisnál alacsonyabb hatásfokú (267). Ez és a fentebb leírtak magyarázhatják az LCR állatok esetében tapasztalt celluláris adaptáció malformításait. A kapott eredményekből egyértelműen kitűnik: a HCR állatok abszolút értelemben kiemelkedően reagálnak a testedzésre, ám relatív értelemben a két csoport eltérően teljesít. A HCR-T csoportban mitokondriális biogenezist indukáló mutatók emelkednek. Az SDHA mitokondriális enzim mennyiség emelkedett a HCR edző (T) csoportban ebből pedig a mitokondrium szám növekedésre következtethetünk.

6.2.3. A Sirt1 fehérje kapcsolata a mitokondriális biogenezissel

A Sirt 1 fehérje és a PGC1- alfa kapcsolatára irodalmi adatok utalnak. Több vizsgálat szerint a Sirt1 képes direkt módon, deacetilálni a PGC-1 alfát, ezzel aktiválva a transzkripciós faktort, ám valószínű az indirekt, más anyagcsere folyamatok indukálása útján gyakorolt hatás is (171,268,269). A Sirt-1 fehérje mennyisége a HCR állatoknál növekszik edzéshatásra, melyet hasonló trendben követ a PGC-1 alfa és az NRF-1 fehérje mennyiség növekedés. A Sirt-1 deacetiláz funkciójának emelkedésével az acetilált lizin eredmények is összefüggésbe hozhatóak, hiszen a metabolikus stressz hatására nem emelkedett az acetilációs szint a HCR-T csoportban, míg a HCR-DR csoportban növekedés volt tapasztalható. Az acetiláció emelkedése pedig lehet a Sirt1 szint változatlanságának oka. Az acetiláció értékelésénél érdemes figyelembe venni, hogy más deacetiláz funkciójú fehérjék is léteznek (hiszton deacetilázok és más szirtuinok)(196,270).

Az edzéssel és a táplálék megvonással összefüggésbe hozható energia hiány egy érdekes aspektusa a sejten belüli redox ekvivalensek koncentrációjának változása. A Sirt1 funkciók elemzésénél megkülönböztetett figyelmet érdemel a NAD⁺/NADH arány. Az izomzat ATP felhasználását oxigén jelenlétében a főként a citromsavciklusban keletkező NADH (és FADH) oxidációja révén (oxidatív foszforiláció) a mitokondrium fedezi. Oxigén hiányában viszont glikolízis anaerob irányt vesz a laktát dehidrogenáz enzim aktivitása révén, melynek eredményeképpen tejsav termelődik és NADH oxidálódik. A Sirt1 fehérje NAD⁺-ot használ kofaktorként, így szintjének emelkedése teoretikusan a Sirt1 aktiválódását vonja

maga után. A képet tovább színesíti a NAD⁺-NADH illetve Sirt1 különböző sejt kompartmenteken belüli koncentrációja. Nyugvó izomban a NAD⁺ és NADH 95%-ban a mitokondriumban található (NAD⁺: ~3,15 mmol/kg nedves tömeg, NADH 0,5 mmol/kg nedves tömeg (271), továbbá a citoszol és a mitokondrium NAD⁺/NADH aránya is komoly elérést mutat. Citoszolban az arány ~535,7, míg a mitokondriumban ~6,3. A mitokondriumok és a citoplazma közti NAD⁺-NADH áramlást söntrendszerek teszik lehetővé (a mitokondriális belső membrán átjárhatatlan a NAD⁺ és a NADH számára), ilyen a malát-aszpartát inga, a glicerín-3-foszfát inga és feltételezések szerint a laktát inga (272), illetve a NADH- citokróm-c keresztül történő direkt oxidációja (273). Ugyan tudomásunk szerint még senki nem mérte a redox ekvivalensek áramlásának dinamikáját állóképességi edzés alatt, az irodalmi adatok alapján az jósolható, hogy a citoszol redox állapota függ a söntrendszer hatékonyságától és a mitokondrium redox státuszától. Direkt mérések és metabolit indikátor módszerek (MIM) eredményei szerint a nukleáris és a citoplazmás NAD⁺-NADH mennyiség egyensúlyban van, így a citoszolban és a nukleuszban (ahol a Sirt1 fehérje kimutatható) stresszmentes körülmények között a két koncentráció megegyezik. A komplexitás további rétege, hogy a nukleáris kompartmentben gyakori poli-ADP-ribóz polimeráz enzimek (PARP) szintén NAD⁺ ot használnak kofaktorként és a NAD⁺ molekulákért versengve Sirt1-el (274), a nukleuszt ért stressz hatásokra lokális NAD⁺ szint csökkenést okoznak.

A fizikai aktivitásra bekövetkező NAD⁺/NADH változásról ellentmondásos eredmények szerepelnek az irodalomban, melyet valószínű a NAD⁺/NADH arány labilitása és a mérési technikák karakterisztikáiból adódó kihívások eredményezik. Úgy tűnik fontos szempont az edzésintenzitás: 65% és 100% VO₂max esetén totál NAD⁺ csökkenés (ember) (275), 75% VO₂max esetén változatlan totál NADH, NAD⁺ csökkenés (ember) (276), mérsékelt úszóterhelés (40% VO₂max): NAD⁺ szintemelkedés (patkány) (277), 60% VO₂max esetén NAD⁺ szintemelkedés (idős patkány).(170) 2,5 órás úszás: NAD⁺ emelkedés (egér) (278). Az adatokból kiderül, hogy a kérdésben nincs teljes konszenzus és valószínűsíthető a genetikai-, tápláltsági-, edzésadaptációs- és terhelés-specifikus faktorok szerepe.

Feltételezésünk szerint a HCR állatok edzésterhelése során a citoplazmás redox ekvivalensek oxidáltabb formában voltak jelen, mint DR esetében, melyet az edzésre bekövetkező nagyobb hatásfokkal működő mitokondriális söntrendszerek (279) illetve az általunk is demonstrált növekvő mitokondriális oxidatív kapacitás (mitokondriális enzimek emelkedése) eredményezhetett. Ez a Sirt1 és más, az izomsejt energiatátságára érzékeny rendszerek (AMPK) aktiválódásához vezethetett és az edzésidőszak előrehaladtával, mint egy „feedforward” mechanizmus, indukált további mitokondriális biogenezist. Az LCR állatok Sirt1, pAMPK/AMPK, PGC-1 alfa, SDHA értékeinek stagnálása valószínűleg izomzatuk gyengébb oxidatív kapacitása indokolja. Pontosabb képet az edzés terhelés alatt és után az izom redox státusz dinamikáját vizsgáló kutatás tudna adni, de mint már fentebb utaltunk rá a precíz kivitelezés technikai nehézségekbe ütközik. A mérési eljárások fejlődésével későbbi kutatások fontos megválaszolandó kérdése lehet, miként változik a NAD⁺-NADH mennyiségi különböző nagyságú terheltségi állapotokban és dóziszfüggő diétás feltételek mellett.

Sirt1-szintemelkedés egyik törzsnél sem volt tapasztalható DR-rel összefüggésben és a PGC-1 alfa indukált jelátviteli út sem aktiválódott. Ez némiképp ellentmond az irodalmi adatoknak, hiszen közleményekben sokhelyütt utalnak a CR és a Sirt1 kapcsolatára (189,197,280). Ebben a témában azonban nincs teljes egyetértés. Hancock és munkatársai 30%-os CR hatására nem találtak mitokondriális biogenezisre utaló jelet,(209) viszont a Sirt-1 fehérje és a mitokondrium képződés kapcsolatáról már évek óta cikkeznek a lapok, (169,281,282) a közvetlen kapcsolat azonban korántsem egyértelmű. Saját, heréken mért eredményeink például a Sirt1 - PGC1-alfa útvonal közvetett kapcsolatára utalnak (283).

A Sirt-1 aktivátorként számon tartott resveratrolról (vörös szőlő héjában megtalálható flavonoid) jelentek meg olyan információk, melyek szerint a vegyület adagolása a kalória visszafogásra is jellemző folyamatokat tud aktiválni, (198,284) Higashida viszont arra a következtetésre jutott, hogy a rezveratrol nincs hatással a mitokondriális biogenezisre (171). A mechanizmus részleteiről tehát még nincs teljes konszenzus. Az viszont tény, hogy a túlzott tápanyagbevitel veszélyeket rejt magában (61). Érdekes kérdés: a CR esetében is érvényesül-e a dózishatás, hiszen a már említett rezveratrol Scapagnini

összefoglalója alapján hormetikus hatást mutat (285). Az 1987-ben Frust által bevezetett „Hormetikus farmakológia”(286) alapján létezik egy optimális mennyiségi sáv, mely képes kiváltani a kedvező hatásokat, ám ha elhagyjuk ezt a tartományt, negatív, akár toxikus hatásokat is tapasztalhatunk. Az általunk alkalmazott DR egy mérsékelt 20%-os kalória visszafogásnak felel meg, hosszú távú alkalmazás során. Számos irodalmi eredmény támasztja alá a mérsékelt CR áldásos hatásait is, ám feltételezhető, hogy a 20%-os visszafogás nem minden folyamatstruktúrán és nem minden populáción fog egyforma amplitúdójú választ kiváltani (252).

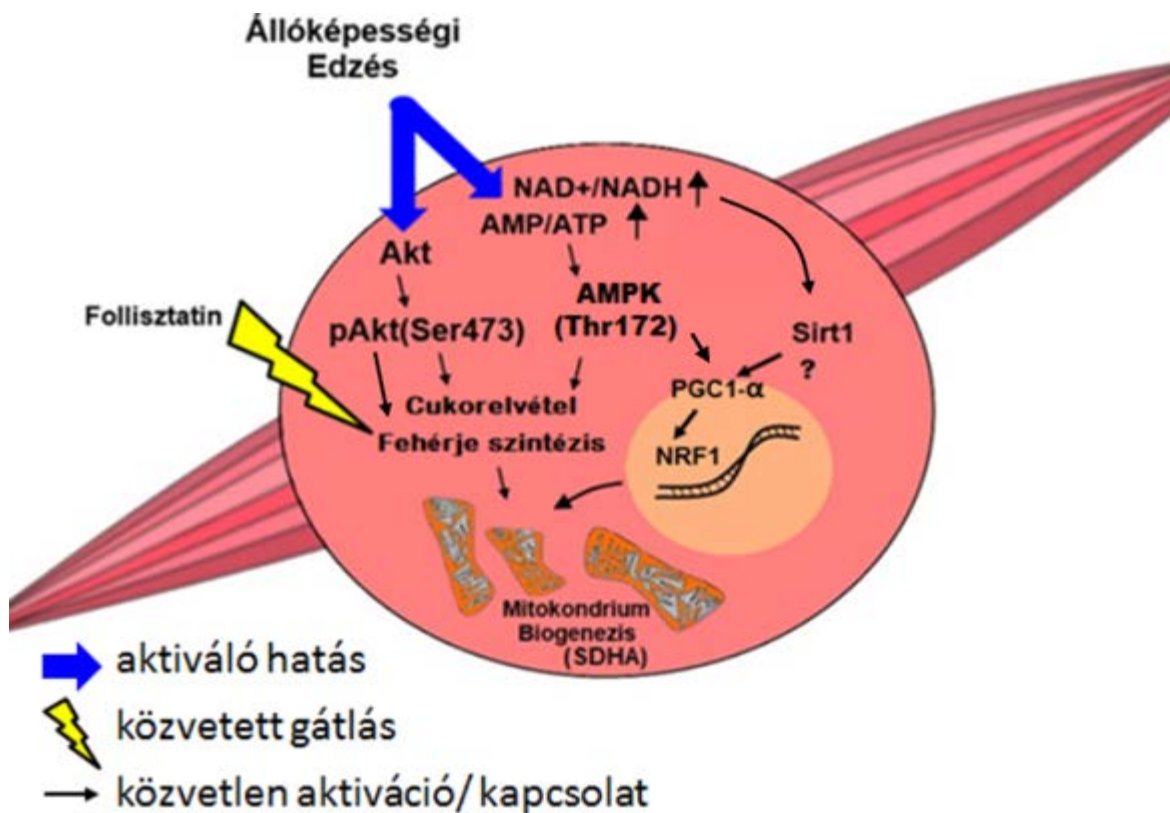
6.2.4. Az LCR-HCR állatok izomzatán tapasztalt változások összefoglalása

Az LCR és a HCR állatok vázizomzata esetében különbség mutatkozik edzés hatására a mitokondriális fehérjékben. Az LCR állatok a mért változókban nem reagálnak az edzésre olyan mértékben, mint a HCR állatok. Számottevő mitokondriális biogenezis esetükben nem mutatható ki. Akkor vajon mi magyarázza mégis ezen állatok funkció javulását edzés hatására? Kutatóintézetünk korábbi vizsgálatai (36) és más szerzők is megerősítik, hogy edzés hatására megemelkedik a Mitofusin-1 (MFN-1) fehérje szintje. Ez a fehérje mitokondrium fúziót indukálva segít megtartani a sejt energiatermelő folyamatainak integritását, és csökkenti a mitokondriális DNS mutáció gyakoriságát, a funkció romlását (287). A fúzió során a sejtorganellumok tartalma egyesül, mitokondriális fehérje nem bomlik le számottevő mértékben. Valószínűleg ez is közrejátszhat az LCR állatok változatlan SDHA értékek melletti futási képesség- és oxigén felvétel javulásnak.

A follisztatin fehérje csökkenése katabolikus állapot kialakulására utalhat az LCR csoportban, mind DR, mind edzés hatására. Ezzel egyidejűleg a főként az inzulin jelátviteli folyamatokban résztvevő Akt-kináz foszforilációja elmarad. Az anyagcsere „mester regulátoraként” számon tartott AMPK (288,289) aktivációja sem szignifikáns az LCR csoportban. Az irodalomban szereplő, az LCR állatoknál tapasztalható metabolikus deficitet saját eredményeink is alátámasztják. Az Akt és az AMPK foszforilációja ugyanis összefüggésben van a sejtek szénhidrát-anyagcsere forgalmával (290) (29. ábra). Sajnos az

LCR állatok esetében a fejlődés csak egy szűk tartományban képzelhető el. Fontos azonban kiemelni, hogy ugyan a LCR állatok kezelés nélkül számos kockázati tényezőt halmoznak fel, a kezelések hatására mégis az olyan élettani paramétereik, mint amilyen az oxigénfelvétel vagy a testtömeg relatíve nagyobb mértékben változnak (melyek önmagukban is kockázati tényezők), mint a HCR csoport értékei. A prevenció szempontjából ennek óriási jelentősége van, hiszen ha abszolút értékben el is maradnak a LCR állatok eredményei a HCR csoportétól, a csoportjukon belül a környezeti hatások jobban csökkentik a morbiditást és mortalitás kockázatát, mint a szerencsésebb genetikájú társaik esetében. Eredményeinket tehát semmiképpen sem szabad úgy interpretálni, hogy az LCR állatok képtelenek behozni „lemaradásukat”. Sokkal fontosabb azt hangsúlyozni, hogy habár a LCR csoportok egy veszélyeztetett populáció tagjaiként foghatók fel és fejlődésük csak egy szűkebb sávban képzelhető el, életkilátásaikat a táplálkozási szokások és a testedzés relatíve pozitívabban befolyásolja, mint a HCR csoport egyedeit.

A fiziológias mutatókban, mint amilyen a maximális oxigénfelvétel, a futási képesség, vagy a testtömeg, az edzés látványos, az általunk alkalmazott DR mérsékelt pozitív eredményeket tud elérni, mely javíthatja a LCR állatok túlélési esélyeit. A sejtben belüli metabolikus problémákat az LCR egyedek esetében egyik eljárás sem tudja teljes mértékben kezelni. Mégis mind a két módszer, de különösképpen az állóképességi edzés javasolható egy nagyon gyenge képességű populációknak is, hiszen ha robosztus fejlődés nem is érhető el, életkilátásaik és életminőségük javítható.



32. ábra

Az állóképességi edzés hatása az HCR csoportra gastrocnemius izomban

Az állóképességi edzéshez ATP felhasználás társul, mely aktiválja mitokondriális biogenezisben kulcsfontosságú mechanizmusokat és AMPK enzimen keresztül, a sejt cukor felvételére is pozitív hatást gyakorol. Állóképességi edzés hatására javulhat az Akt jelátviteli rendszer hatásfoka (szerin 473 foszforiláció), mely hozzájárulhat a fehérjeszintézis fokozódásához. (saját összefoglaló ábra)

6.3. A szelekció és az állóképességi edzés hatása a spermatogenezisre, az oxidatív stressz és mitokondriális biogenezis markerekre.

6.3.1. Mitokondriális biogenezis a here szöveti állományában

Eredményeink szerint az állóképességi edzésnek nem volt robusztus hatása a mitokondriális biogenezis markereire. A PGC1 α ugyan megemelkedett edzés hatására a LCR csoportban, de ezt nem követte sem az NRF1, - közvetlen PGC1 α „downstream” target- , sem a mtTFA mitokondrium specifikus transzkripciós faktor emelkedése. Érdekes viszont, hogy a HCR állatokban az mtTFA fehérje csökkenése volt kimutatható, mely talán szerepet játszhat az elmaradt spermatogenezis válasz kialakításában. Jelen kutatásunk esetén még számos kérdés nyitva áll a tesztikuláris mitokondrium képződés tekintetében. Mint már előzőekben is utaltunk rá a SIRT1 és a PGC1 α közvetlen kapcsolata mára korán sem egyértelmű, ezt jelen hereszöveti vizsgálataink is demonstrálták. Érdekes lehet a jövőben vizsgálni például a spermatogonális őssejtek mitokondriális státuszát, funkcionális integritását és biogenezisét állóképességi edzés hatására, hiszen ezekből a prekursor sejtekből alakulnak majd ki az érett spermiumok (291) és fejlődésük során a környezeti hatások befolyásolhatják megtermékenyítő képességüket.

6.3.1. Oxidatív stressz, állóképességi aktivitás és spermatogenezis kapcsolata az LCR és a HCR csoportokban

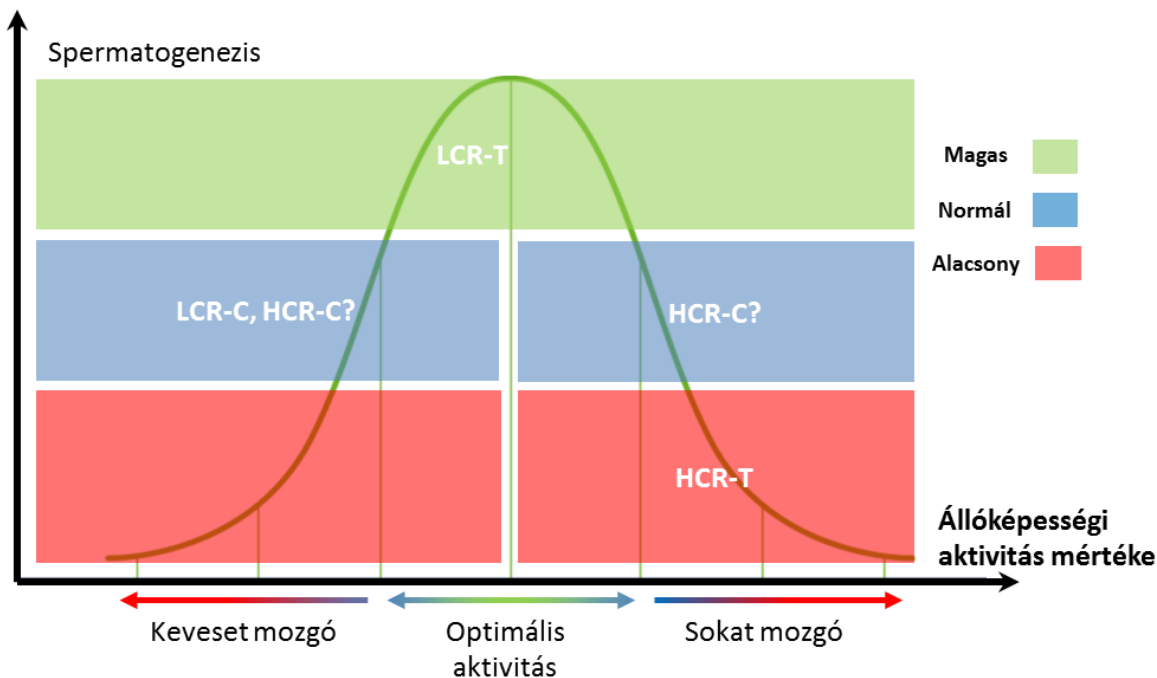
Eredményeink egyik figyelemre méltó aspektusa, hogy állóképességi edzés hatására a tumor szupresszor p53 fehérje acetilációja emelkedni látszik alacsony futókapacitású állatok esetében. Emellé pedig csökkent szöveti oxidatív stressz és megnövekedett spermatogenezis markerek társulnak. Az oxidatív stressz csökkenés, akár hatékonyabb mitokondriális respirációra is utalhat (292-294), ám ennek eldöntése további kutatásokat igényel a két patkánypopulációból származó spermiumok mitokondriumait vizsgáló eljárással (kvantitatív: mitotracker, illetve kvalitatív: elektron átviteli hatékonyság, membrán potenciál stb. vizsgálatok).

A p53 K167 acetilációja fontos szabályozó mechanizmus a sejtburjánzás mérséklésében és súlyos DNS sérülés esetén az apoptotikus folyamatok beindításában (295). A P53 fehérje esetében közel 300 poszt-transzlációs modifikációt írtak le (296). A fehérje funkcióját egyfelől befolyásolja az oldalláncok „totál” acetiláltsága, másfelől a különböző oldallánc specifikus, az ún. „kontextus függő” acetilálódás. Knights és mtsai. vizsgálatukban a P53 K373 acetilációjának apoptózist promotáló hatását mutatták ki (297). A fehérje deacetilációja, vagy acetilációja viszont, a szerzők analógiájával élve a hiszton kódhoz hasonlítható, és a P53 aktivitása „kontextus függő”, utalva ezzel arra, hogy különböző (anyagcsere, sejtciklus) állapotú sejtekben ugyan az a modifikáció eltérő effektor funkcióhoz társulhat (sejtciklus leállítása, DNS javítás, apoptózis). Az általunk vizsgált lizin oldalláncokról az utóbbi időben kiderült, hogy az acetiláció mellett más poszt-transzlációs módosulások is helyéül is szolgálnak. Ide tartozik a metiláció (298,299) és az ubiquitináció (296). A ubiquitináció a fehérje lebontás egyik jelölő molekulája (300), így az acetiláció stabilizálhatja a P53 fehérjét és elősegítheti a LCR állatokban a genomot ért stressz faktorokkal szembeni kompenzációt (apoptózis, sejtciklus leállítását). Tekintve, hogy az LCR állatok számos metabolikus betegségre fogékonyabbak, esetükben az acetiláció növekedése kompenzációs mechanizmusként értelmezhető, a HCR állatok P53 acetiláltság változatlansága pedig fokozott genetikai stabilitásukra utalhat.

A spermatogenezis markerek tekintetében a LCR-T csoport szignifikáns növekedést mutatott, továbbá az oxidatív stressz is alacsonyabb mértékű volt, ezzel szemben a HCR-T állatok spermatogenezis és oxidatív markerei nem változtak (LDHC, H2DCHDA) vagy speciális esetben csökkenést tapasztaltunk (Odf-1). A here szövetet számos sejtcsoport alkotja, melyek funkcionális eltérést mutatnak a spermatogenezis során (301), továbbá a csíravonal osztódása meiotikus folyamatok mentén történik (302), melynek molekuláris környezeti szabályozása még feltárássra vár és ezeken túl valószínűleg az edzés hatás is szövetspecifikus mechanizmusokon keresztül érvényesül. A környezeti tényezők fontosságát demonstrálta Ryu és mtsai. elegáns vizsgálatukban, ahol 12 és 24 hónapos csökkent spermatogeneziséű egerek összejtjeit 3 hónapos intervallumokkal fiatal hímekekbe ültették. A sejtek funkciói megtartottak maradtak akár 3 éven keresztül is (303).

Az eredmények összegzésével ismét előkerül a hormézis effektus, hiszen az élettani folyamatok többségénél sem a túl alacsony, sem a túl magas stimulus nem feltétlenül kedvező (304), hanem létezik, egy ún. optimális zóna (33. ábra). Ez igaz lehet az állóképességi terhelésre is, mivel a fizikai inaktivitás mellett a nagyon magas fizikai aktivitási szintről is közöltek a reprodukciós szervrendszert érintő negatív hatásokat (305,306).

A HRC csoport egyedeiről leírták, hogy szignifikánsan magasabb a spontán horizontális aktivitás mérhető esetükben az LRC csoporthoz viszonyítva (307), ezért, - mint azt az ábrán kérdőjellel (33. ábra) szemléltettük-, a HRC-C állatok napi mozgásmennyiségét nem tudjuk egyértelműen a „kevesebbet mozgó” kategóriába sorolni. Fennáll a kérdés, hogy a HCR-C csoport a magas spermatogenezis szinten túli, vagy még az alatti mozgás mennyiséget teljesített e naponta? Ennek a kérdéskörnek a vizsgálata további kísérleteket igényel, ahol egész napi mozgásmennyiség kerülne összevetésre a spermatogenezis markereivel.



33. ábra

Spermatogenezis és az állóképességi aktivitás mértéke az LCR és a HCR csoportokban

Az ábra a feltételezett kapcsolatot szemlélteti az állóképességi aktivitás és a spermatogenezis mértéke között. A jobb oldali színek a normál és az ahhoz viszonyított magasabb, illetve alacsonyabb szinteket jelzik. A csoport rövidítések: LCR-C, LCR-T, HCR-C és HCR-T pedig a csoportok feltételezett élettani állapotát jelölik a diagramon. A HCR-C csoport estén, a kérdőjel magyarázata a szövegben olvasható.

7. Következtetések

Előttünk más szerzők is beszámoltak kalória visszafogáshoz köthető BDNF szint emelkedésről. (98,308) Jelen vizsgálatunk arra mutat rá, hogy az emelkedett értékek valószínűleg a hiszton fehérjék proszttranszlációs modifikációjához is köthetők. Úgy tűnik, a táplálkozási szokások közvetlenül, a génelvasás mechanizmusában a kromatin struktúra szintjén is éreztetik hatásukat. A hiszen, a BDNF IV-es promoter régiójában mért acetiláció és CREB transzkripció faktor foszforilációja (Ser133) tovább erősíti ezen feltételezésünket.

A magas futókapacitású állatok DR hatására szignifikánsan jobb eredményt produkáltak az általunk alkalmazott memóriatesztben (passive avoidance). Ezen eredmények a BDNF szintben mért növekedésekhez hasonló mintázatot mutattak. A neurotrophin hipotézis szerint az idegsejtek túlélését a neurotrofinok, köztük a BDNF is nagyban elősegítik (309), továbbá neuronok mintegy "versengve a BDNF molekuláért" alakítják ki szinaptikus hálózatukat. Vizsgálatunk eredményei is azt sugallják, hogy valószínűleg ehhez hasonló mechanizmusok állhatnak a HCR állatok jobb rövidtávú memória képességeinek hátterében.

Jelen táplálkozási protokollok mellett az agyban és a vázizomban nem tudtunk kimutatni Sirt1 szint emelkedést, habár az izom esetében tendenciózus emelkedés figyelhető meg. A fizikai aktivitás Sirt1 fehérje emelkedéssel járt a HCR csoportban vázizom mintáiban. A ma leginkább elfogadott teória szerint metabolikus stressz állapotokban, mint amilyen a testedzés vagy a kalória megvonás megváltozik az AMP/ATP illetve a NAD⁺/NADH arány. Az eltolódás az AMP érzékeny fehérje, az AMPK aktiválódásához vezet. A felszabaduló növekedési faktorok pedig az Akt fehérje foszforilációját okozzák. Az AMPK pozitív hatással van a Sirt1 deacetyláz aktivitására (melyet a NAD⁺ szint promotál), mely folyamatok eredőjeként izomban a PGC-1 fehérje deacetylálódik. A deacetylált PGC-1 pedig fokozza a mitokondriális biogeneziben résztvevő gének transzkripcióját. Esetünkben csak a testedzés ilyen jellegű hatását tudtuk egyértelműen igazolni vázizom szövetben. Az

irodalomban a kalória visszafogás megítélése a mitokondriumok gyarapodásának tekintetében igen vegyes, nem egyértelmű. Továbbá olyan adatok is jelentek meg, melyek nem támogatják a Sirt1 által indukált mitokondriális biogenezis központi szerepét.

A kérdések tisztázásához hasznos lenne a későbbiekben jelen vizsgálathoz hasonló mérésekkel, sejtvonalakon történő vizsgálatokkal, illetve bioinformatikai módszerekkel elemezni a felhalmozott információt a homályos részletek eloszlása végett.

A vázizomszövet eredményeiből egyértelműen kitűnik az LCR csoport metabolikus adaptációjának csökkent hatékonysága. Akár az energia felhasználás anyagcsere markereit: Akt, AMPK akár a mitokondriális biogenezist szemléljük: PGC-1/NRF1/SDHA, az LCR csoport gyengén teljesít. Az LCR állatok ezen tulajdonságai csoportjukat egy betegségekre fogékony és abszolút értelemben véve gyenge fizikai teljesítőképességgel rendelkező populációvá teszi. Fontos viszont kiemelni, hogy a környezeti feltételek, főként az állóképességi edzés komoly relatív fejlődést képes produkálni az említett populációban.

A here szövet mérési eredményei megerősítik azt a nézetünket miszerint a metabolikus adaptáció a két futókapacitásában divergált törzsben eltérő karakterisztikákat mutat. A LCR állatok esetében az edzés pozitív irányba változtatta a spermatogenezis és a szöveti oxidációs stressz markereit. A HCR állatokban az edzés nem eredményezett számottevő javulást, ám meg kell említeni, hogy ezen egyedek nagyobb élettani stressz faktorokkal szembeni ellenálló képességgel bírnak, melyre alacsonyabb P53 acetilációs szintjük is utal

Összefoglalva, a következő megállapításokat tehetjük a hippokampális vizsgálathoz felállított hipotéziseinkről:

- a. A vizsgált csoportokban kimutatható a memória képesség és a BDNF szint kapcsolata.
- IGAZ
- b. A diétás megszorítás fokozza a BDNF termelést és javítja a memória képességet mind a két állatcsoportban és ehhez epigenetikai, hiszton acetilációs módosulás társul.

- Részben IGAZ, tekintve, hogy az LCR állatokban ez a hatás nem tapasztalható, illetve lokális a hiszton acetiláció növekedés csak a HCR állatoknál szignifikáns
- c. Az alkalmazott DR kezelésnek nincs számottevő hatása hippokampális mitokondriális biogenezisre.
 - IGAZ

Eredményeink alapján az alábbi megállapításokat tehetjük a gastrocnemius izom és terhelésélettani paraméterek vizsgálathoz felállított hipotéziseinkről:

- a. A vizsgált állatcsoportokban az állóképességi edzés igen, viszont az alkalmazott táplálkozási protokoll nem indukál mitokondriális biogenezist a gastrocnemius izomban.
 - Részben IGAZ, hiszen az LCR állatok esetében mitokondriális biogenezis nem tapasztalható.
- b. Az LCR állatok gyengébb teljesítménye mitokondriális és metabolikus adaptáció problémáival magyarázható.
 - IGAZ.
- c. Az alkalmazott állóképességi edzés és az alkalmazott táplálkozási protokoll javítja a kezelt csoportok életkilátásait
 - IGAZ, de ez főként az állóképességi edzésről mondható el.
- d. A terhelés élettani változások nagyobb mértékűek lesznek a HCR csoportokban mint az LCR állatoknál.
 - Részben IGAZ , hiszen a kapaszkodási eredmények nem különböztek. A futási képességek és a VO2max eredmények abszolút értelemben jobban fejlődtek a HCR csoportnál, de relatív értelemben a futási képességekben a LCR csoport nagyobbban fejlődött.

Eredményeink alapján, a következő döntéseket hozhatjuk meg a hím reprodukciós szerv vizsgálatánál megfogalmazott hipotéziseinkről:

- a) Az állóképességi terhelés pozitívan befolyásolja az edző csoportok spermatogenezis markereit.

Részben IGAZ. Egyértelmű pozitív változást csak a LCR csoportban találtunk.

Az általunk alkalmazott relatív képességeken alapuló edzés az HCR csoportban akár még negatívan is befolyásolhatja a spermatogenezist (LDHC eredmények).

- b) Az állóképességi edzés hatással van a here szöveti mitokondriális biogenezisre és oxidatív stressz markereire.

Részben IGAZ, hiszen az LCR állatok esetében kimutatható az oxidatív sztrezz markerek csökkenés állóképességi edzés hatására, de egyértelmű hatást a mitokondriális biogenezis változására nem találtunk.

Végezetül pedig szeretnénk a sporttudomány figyelmét a genetikai vizsgálatok felé irányítani. A kiválasztásban, a személyre szabott táplálkozási és edzés formulák kialakításban óriási jelentőséggel bír a genetikai háttér, illetve a környezeti hatásoknak a genetika kód környezetében érvényesülő változásai (DNS metiláció, hiszton acetiláció, transzkripciós faktorok aktiválása, csak hogy néhány példát említsünk). A sporttudományban azonban, ennek jelentősége nem túlzottan ismert és nem is igen elismert. A "sport genetika" többnyire kimerül az egyes deklaratív, predesztinatív génvariánsok, génkonstellációk keresésében, kevés figyelmet szentelve a genetikai kód "olvasatának megértésre". A genetika szabályozás sokkal többretegű, mintsem azt 20-30 évvel ezelőtt gondoltuk volna. A poszttranszkripciós, poszt-transzlációs (speciális esetben epigenetikai) módosulások, illetve az utóbbi években a genetikai kutatásokban központi szerepet kapó nukleinsav interferencia jelenségek fontosságának felfedezése egyértelművé kell, hogy tegye a sportszakember, -tudós számára is, hogy nem hagyhatja ezen új ismeretanyagokat figyelmen kívül. Akár az edzésstervezésről, akár egy étkezési terv összeállításáról legyen szó meg kell találnia azon alkalmazási módokat, ahol a fentebb említett szabályozási formák ismeretében, azokat megértve még hatékonyabban tudja növelni a sport

teljesítményt, vagy az általános teljesítőképességet. Ha úgy tetszik "még egészségesebb egyént tudjon nevelni". Az egészség ugyan nehezen megfogható fogalom, ám minden felelősen gondolkodó ember érthető igénye.

8. Összefoglalás

A táplálkozási szokások és az állóképességi edzés a legkülönbözőbb biokémiai folyamatokra vannak hatással. Az irodalomban kalória visszafogásnak (CR) és diétás megszorításnak (DR) nevezett kezelések hatnak az élethossz változásra, az oxidatív stressz folyamatokra, továbbá számos betegség prevalenciáját képesek csökkenteni kísérleti modellekben. Mindezek mellett a táplálkozási szokások a fizikai teljesítőképességre is hatással vannak, továbbá úgy tűnik, a kognitív képességeket is befolyásolják. Kutatási eredmények tanúbizonysága szerint a jobb rövidtávú memória eredmények a szinaptikus plaszticitást vezérlő neurotrofinnal, a BDNF-fel hozhatók összefüggésbe.

Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a minden másnapos táplálás (DR) milyen hatással van a BDNF gén expresszió epigenetikai szabályozására, illetve mérhető-e változás a PGC-1 alfa jelátviteli útvonalban.

A kísérlet során futási képességeik alapján szelektíven tenyésztett patkányokkal dolgoztunk, nagy-(HCR) illetve alacsony (LCR) futókapacitású vonallal. Mind a két vonalban egy-egy csoport DR-ben részesült. A kísérletsorozat második felében állóképességi terhelésnek is kitettük egy-egy állatcsoportot. A hippocampusz minták elemzése során a BDNF gén IV. promóter régiójának hiszton H3 lizin(K)14 acetilációs státuszára fókuszáltunk. Vázizom esetén pedig a Sirt1/PGC-1 alfa/NRF1 és az Akt, AMPK mediálta jelátviteli útvonalra.

Eredményink alapján az DR HCR csoport szignifikánsan jobban teljesített a passzív elhárítás teszten, mely valószínűleg kapcsolatban áll az emelkedett BDNF fehérje mennyiséggel is. A BDNF mRNS mennyiség egybevág ugyan az összkromatin hiszton H3 K14 acetilációs adatokkal, ám az adatok együttes értelmezése komplex szabályozási háttérre utal (egyéb promóter régiók szerepe, nukleinsav interferencia ect.).

A BDNF génextpresszió és a mitokondriális biogenezis úgy tűnik igen összetett, több rétegű folyamat. Az általunk vizsgált fenotípusok, eltérő adaptációs válaszokat

produkálnak. Ezen válaszok pedig figyelemre méltóan a kromatin struktúra szintjén is érvényesülnek.

Egyértelmű pozitív mitokondriális változásokat csak a HCR edző egyedek gastrocnemius izmában mértünk, ám a gyengébb képességű társaik futókapacitása relatív értelemben jobban fejlődött, mint szerencsés társaiké. A két vonal közti különbség pedig valószínűleg a mitokondriális (Sirt1/PGC-1 alfa/ NRF1) és sejtanyagcsere státuszt érzékelő (Akt, AMPK) folyamatok zavarában keresendő. Figyelemreméltó továbbá, hogy a mitokondriális biogenezis markerek egyik vizsgálati csoportban sem mutattak egyértelmű pozitív eredményt a here szövetekben állóképességi edzés hatására. Viszont az oxidatív stressz markerek az intervenció hatására csökkentek, míg a P53 acetiláció növekedett az LCR csoportban. Mindezek mellett a spermatogenezis markerei pozitívan változtak az LCR csoportban (LDHC, LDHC), míg ezzel ellentétes hatás volt tapasztalható a HCR csoportnál (Odf-1).

Ezek után valószínűsíthető, hogy a táplálkozási intervenciók, de állóképességi edzés egyértelműen javítja az LCR csoport élettani funkcióit és az ezzel szoros kapcsolatban álló életkilátásait is. Összességében pedig az eredmények hormetikus szabályozási karakterisztikára utalnak, melyek „optimális stimulus szintje” a stimuláció módjának függvényében (diétás megszorítás, testedzés, stb.) a különböző populációkon, de akár szerveken, szervrendszereken belül is, más hová eshet.

9. Summary

Dietary Restriction (DR) and endurance training has long been associated with multiform mechanisms which includes longevity, mitochondrial biogenesis, oxidative stress és disease prevention. Beyond these eating habits és dietary interventions play a major role not only in sport performance but they have a critical role maintaining cognitive functions. Numerous great publications have dealt with this issue recently. It seems that the better cognitive performance linked to dietary interventions has a strong relation with synaptic plasticity governing neurotrophin BDNF.

In our study we were interested whether running capacity as a phenotypic trait has any impact on the epigenetic modulation of the BDNF gene expression in alerted dietary conditions. An experimental model was created for the running capacity of rats. Low capacity runners (LCR) és high capacity runners (HCR) were identified and one group from each line was exposed to DR/EOF (Every Other day Feeding). In the second stage of the study one group from each line exposed to endurance training to trigger the PGC1 alpha pathway in the gastrocnemius muscle. In the hippocampal region our research focused on the histone H3 K14 acetylation pattern of the BDNF gene ~28Kb downstream to the actual coding sequence where the IV promoter region is located. The IV promoter is reported to be activity dependent és it is shown to have instructive roles in BDNF expression.

According to our finding EOF not only results in better cognitive function és elevated BDNF levels in HCR rat hippocampi, but it has the capability to modify the transcription environment at the level of chromatin structure. The mRNA data may imply a highly complex gene expression control in the case of BDNF. In term of mitochondrial biogenesis an unequivocal answer only given by the HCR trained group. Here significant SirT1/PGC1 alpha/NRF1 pathway activation detected in skeletal muscle. However the LCR trained animals sown to be more fit then the control ones and it may increase their life expectancy. With the described experimental settings our group cannot detect the activation of mitochondriogenic pathways in the hippocampus; however a significant increase in PGC 1

alpha levels were found at HCR/EOF group without further downstream signal transmission.

The regulation of BDNF gene expression és the mitochondriogenic pathways is a highly complex, multilayered mechanism as our result suggests with many. This complicated process seems to differ substantially in population with low és high running capacity. In case of sport és fitness it is essential to understés the individual needs whether one deal with diet or exercise protocol. It seems that distinct groups give quite different adaptive response even at the level of chromatin structure.

10. Irodalomjegyzék

1. Barrientos RM, Frank MG, Crysdale NY, Chapman TR, Ahrendsen JT, Day HE, Campeau S, Watkins LR, Patterson SL, Maier SF. (2011) Little exercise, big effects: reversing aging and infection-induced memory deficits, and underlying processes. *J Neurosci*, 31: 11578-11586.
2. Radak Z, Ihasz F, Koltai E, Goto S, Taylor AW, Boldogh I. (2014) The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. *Free Radical Research*, 48: 84-92.
3. Mirzaei H, Di Biase S, Longo VD. (2016) Dietary Interventions, Cardiovascular Aging, and Disease: Animal Models and Human Studies. *Circ Res*, 118: 1612-1625.
4. Horne BD, Muhlestein JB, Anderson JL. (2015) Health effects of intermittent fasting: hormesis or harm? A systematic review. *Am J Clin Nutr*, 102: 464-470.
5. Fontana L, Hu FB. (2014) Optimal body weight for health and longevity: bridging basic, clinical, and population research. *Aging Cell*, 13: 391-400.
6. Karvinen S, Waller K, Silvennoinen M, Koch LG, Britton SL, Kaprio J, Kainulainen H, Kujala UM. (2015) Physical activity in adulthood: genes and mortality. *Sci Rep*, 5: 18259.
7. Weibel ER, Bacigalupe LD, Schmitt B, Hoppeler H. (2004) Allometric scaling of maximal metabolic rate in mammals: muscle aerobic capacity as determinant factor. *Respir Physiol Neurobiol*, 140: 115-132.
8. White CR, Seymour RS. (2005) Allometric scaling of mammalian metabolism. *J Exp Biol*, 208: 1611-1619.
9. Guth LM, Roth SM. (2013) Genetic influence on athletic performance. *Curr Opin Pediatr*, 25: 653-658.
10. Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. (2009) The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc*, 41: 35-73.
11. Wood AR, Esko T, Yang J, Vedantam S, Pers TH, Gustafsson S, Chu AY, Estrada K, Luan J, Kutalik Z, Amin N, Buchkovich ML, *és mtsai*. (2014) Defining the role of

- common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*, 46: 1173-1186.
12. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. (2009) Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9362-9367.
 13. 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* (1985), 110: 46-59.
 14. Prigogine I. (1978) Time, structure, and fluctuations. *Science*, 201: 777-785.
 15. Koch LG, Kemi OJ, Qi N, Leng SX, Bijma P, Gilligan LJ, Wilkinson JE, Wisloff H, Hoydal MA, Rolim N, Abadir PM, van Grevenhof EMés mtsai. (2011) Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. *Circ Res*, 109: 1162-1172.
 16. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Rinnankoski-Tuikka R, Purhonen T, Ketola T, Pullinen K, Vuento M, Mutanen N, Sartor MA, Reunanen H, Koch LGés mtsai. (2010) Gene expression centroids that link with low intrinsic aerobic exercise capacity and complex disease risk. *Faseb J*, 24: 4565-4574.
 17. Koch LG, Britton SL. (2008) Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. *J Physiol*, 586: 83-95.
 18. Koch LG, Britton SL. (2001) Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiol Genomics*, 5: 45-52.
 19. Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O, Haram PM, Swoap S, Al-Share Q, Fernstrom M, Rezaei K, Lee SJ, Koch LG, Britton SL. (2005) Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. *Science*, 307: 418-420.
 20. Sharpe RM. (2000) Lifestyle and environmental contribution to male infertility. *Br Med Bull*, 56: 630-642.
 21. Sharpe RM. (2010) Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365: 1697-1712.

22. Wheeler GD, Wall SR, Belcastro AN, Cumming DC. (1984) Reduced serum testosterone and prolactin levels in male distance runners. *Jama*, 252: 514-516.
23. Ayers JW, Komesu Y, Romani T, Ansbacher R. (1985) Anthropomorphic, hormonal, and psychologic correlates of semen quality in endurance-trained male athletes. *Fertil Steril*, 43: 917-921.
24. Hackney AC. (2008) Effects of endurance exercise on the reproductive system of men: the "exercise-hypogonadal male condition". *J Endocrinol Invest*, 31: 932-938.
25. Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, van der Spuy Z. (1995) Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril*, 64: 1189-1196.
26. Lindemann CB. (1996) Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell Motil Cytoskeleton*, 34: 258-270.
27. O'Bryan MK, Loveland KL, Herszfeld D, McFarlane JR, Hearn MT, de Kretser DM. (1998) Identification of a rat testis-specific gene encoding a potential rat outer dense fibre protein. *Mol Reprod Dev*, 50: 313-322.
28. Goldberg E, Eddy EM, Duan C, Odet F. (2010) LDHC: the ultimate testis-specific gene. *J Androl*, 31: 86-94.
29. Odet F, Duan C, Willis WD, Goulding EH, Kung A, Eddy EM, Goldberg E. (2008) Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biol Reprod*, 79: 26-34.
30. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. (2009) Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 21: 219-222.
31. Aitken RJ, Whiting S, De Iuliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. (2012) Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 287: 33048-33060.
32. Uribe P, Cabrilla ME, Fornes MW, Treulen F, Boguen R, Isachenko V, Isachenko E, Sanchez R, Villegas JV. (2018) Nitrosative stress in human spermatozoa causes cell death characterized by induction of mitochondrial permeability transition-driven necrosis. *Asian J Androl*, 20: 600-607.

33. 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.
34. Chakravarthy MV, Booth FW. (2004) Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* (1985), 96: 3-10.
35. Carnahan S, Balzer A, Panchal SK, Brown L. (2014) Prebiotics in obesity. *Panminerva Med*, 56: 165-175.
36. 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.
37. 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*, 61: 53-59.
38. Luo P, Dong G, Liu L, Zhou H. (2015) The Long-Term Consumption of Ginseng Extract Reduces the Susceptibility of Intermediate-Aged Hearts to Acute Ischemia Reperfusion Injury. *PLoS One*, 10: e0144733.
39. Amagase H. (2006) Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*, 136: 716S-725S.
40. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. (1989) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition*, 5: 155-171; discussion 172.
41. Lawler DF, Larson BT, Ballam JM, Smith GK, Biery DN, Evans RH, Greeley EH, Segre M, Stowe HD, Kealy RD. (2008) Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades. *Br J Nutr*, 99: 793-805.
42. Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. (1986) The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr*, 116: 641-654.
43. Min KJ, Flatt T, Kulaots I, Tatar M. (2007) Counting calories in *Drosophila* diet restriction. *Exp Gerontol*, 42: 247-251.

44. Carey JR, Liedo P, Harshman L, Zhang Y, Muller HG, Partridge L, Wang JL. (2002) Life history response of Mediterranean fruit flies to dietary restriction. *Aging Cell*, 1: 140-148.
45. Klass MR. (1977) Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech Ageing Dev*, 6: 413-429.
46. Snell TW. (2014) Rotifers as models for the biology of aging. *International review of hydrobiology*, 99: 84-95.
47. Fanestil DD, Barrows CH, Jr. (1965) Aging in the rotifer. *J Gerontol*, 20: 462-469.
48. Austad SN. (1989) Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela*. *Exp Gerontol*, 24: 83-92.
49. Comfort A. (1963) Effect of Delayed and Resumed Growth on the Longevity of a Fish (*Lebistes Reticulatus*, Peters) in Captivity. *Gerontologia*, 49: 150-155.
50. Keller ET, Murtha JM. (2004) The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 138: 335-341.
51. van Diepeningen AD, Maas MF, Huberts DH, Goedbloed DJ, Engelmoer DJ, Slakhorst SM, Koopmanschap AB, Krause F, Dencher NA, Sellem CH, Sainsard-Chanet A, Hoekstra RFés mtsai. (2010) Calorie restriction causes healthy life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev*, 131: 60-68.
52. Comfort A. (1989) The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction - Weindruch,R, Walford,RI. *Nature*, 338: 469-469.
53. Jiang JC, Jaruga E, Repnevskaya MV, Jazwinski SM. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *Faseb J*, 14: 2135-2137.
54. Cooper TM, Mockett RJ, Sohal BH, Sohal RS, Orr WC. (2004) Effect of caloric restriction on life span of the housefly, *Musca domestica*. *Faseb J*, 18: 1591-1593.
55. Forster MJ, Morris P, Sohal RS. (2003) Genotype and age influence the effect of caloric intake on mortality in mice. *Faseb J*, 17: 690-692.
56. Jahangir E, De Schutter A, Lavie CJ. (2014) Low weight and overweightness in older adults: risk and clinical management. *Prog Cardiovasc Dis*, 57: 127-133.

57. Joost HG. (2014) Diabetes and cancer: Epidemiology and potential mechanisms. *Diab Vasc Dis Res*, 11: 390-394.
58. Mule G, Calcaterra I, Nardi E, Cerasola G, Cottone S. (2014) Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy alliance. *World J Cardiol*, 6: 890-907.
59. Longo VD, Mattson MP. (2014) Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab*, 19: 181-192.
60. Swindell WR. (2012) Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev*, 11: 254-270.
61. Minor RK, Allard JS, Younts CM, Ward TM, de Cabo R. (2010) Dietary interventions to extend life span and health span based on calorie restriction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 65: 695-703.
62. Qiu G, Liu S, So KF. (2010) Dietary restriction and brain health. *Neurosci Bull*, 26: 55-65.
63. Goodrick CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider N. (1990) Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. *Mech Ageing Dev*, 55: 69-87.
64. Harrison DE, Archer JR. (1987) Genetic differences in effects of food restriction on aging in mice. *J Nutr*, 117: 376-382.
65. Schumacher B, van der Pluijm I, Moorhouse MJ, Kosteus T, Robinson AR, Suh Y, Breit TM, van Steeg H, Niedernhofer LJ, van Ijcken W, Bartke A, Spindler SRés mtsai. (2008) Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS Genet*, 4: e1000161.
66. Vitousek KM, Gray JA, Grubbs KM. (2004) Caloric restriction for longevity: I. Paradigm, protocols and physiological findings in animal research. *Eur Eat Disord Rev*, 12: 279-299.
67. Mair W, Piper MD, Partridge L. (2005) Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol*, 3: e223.

68. Pamplona R, Barja G. (2006) Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta*, 1757: 496-508.
69. Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. (2008) Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell*, 7: 681-687.
70. Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P. (2008) Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 3438-3442.
71. Malloy VL, Krajcik RA, Bailey SJ, Hristopoulos G, Plummer JD, Orentreich N. (2006) Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell*, 5: 305-314.
72. Stone KP, Wanders D, Orgeron M, Cortez CC, Gettys TW. (2014) Mechanisms of Increased in Vivo Insulin Sensitivity by Dietary Methionine Restriction in Mice. *Diabetes*.
73. Lees EK, Krol E, Grant L, Shearer K, Wyse C, Moncur E, Bykowska AS, Mody N, Gettys TW, Delibegovic M. (2014) Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell*.
74. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325: 201-204.
75. Stein PK, Soare A, Meyer TE, Cangemi R, Holloszy JO, Fontana L. (2012) Caloric restriction may reverse age-related autonomic decline in humans. *Aging Cell*, 11: 644-650.
76. Redman LM, Ravussin E. (2011) Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxid Redox Signal*, 14: 275-287.

77. Holloszy JO, Fontana L. (2007) Caloric restriction in humans. *Exp Gerontol*, 42: 709-712.
78. Roth GS, Lane MA, Ingram DK, Mattison JA, Elahi D, Tobin JD, Muller D, Metter EJ. (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science*, 297: 811.
79. Taylor HL, Keys A. (1950) Adaptation to caloric restriction. *Science*, 112: 215-218.
80. Grande F, Anderson JT, Keys A. (1958) Changes of basal metabolic rate in man in semistarvation and refeeding. *J Appl Physiol* (1985), 12: 230-238.
81. Walford RL, Bechtel R, MacCallum T, Paglia DE, Weber LJ. (1996) "Biospheric medicine" as viewed from the two-year first closure of Biosphere 2. *Aviat Space Environ Med*, 67: 609-617.
82. Weyer C, Walford RL, Harper IT, Milner M, MacCallum T, Tataranni PA, Ravussin E. (2000) Energy metabolism after 2 y of energy restriction: the biosphere 2 experiment. *Am J Clin Nutr*, 72: 946-953.
83. Verdery RB, Walford RL. (1998) Changes in plasma lipids and lipoproteins in humans during a 2-year period of dietary restriction in Biosphere 2. *Arch Intern Med*, 158: 900-906.
84. Willcox BJ, Willcox DC, Todoriki H, Fujiyoshi A, Yano K, He QM, Curb JD, Suzuki M. (2007) Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging - The diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. *Healthy Aging and Longevity*, 1114: 434-455.
85. Gavrilova NS, Gavrilov LA. (2012) Comments on dietary restriction, Okinawa diet and longevity. *Gerontology*, 58: 221-223; discussion 224-226.
86. Willcox DC, Willcox BJ, Todoriki H, Suzuki M. (2009) The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *J Am Coll Nutr*, 28 Suppl: 500S-516S.
87. Willcox BJ, Willcox DC, Todoriki H, Fujiyoshi A, Yano K, He Q, Curb JD, Suzuki M. (2007) Caloric restriction, the traditional Okinawan diet, and healthy aging: the diet of the world's longest-lived people and its potential impact on morbidity and life span. *Ann N Y Acad Sci*, 1114: 434-455.

88. Mattson MP. (2012) Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metab*, 16: 706-722.
89. Phillips C, Baktir MA, Srivatsan M, Salehi A. (2014) Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. *Front Cell Neurosci*, 8: 170.
90. Gomez-Pinilla F, Hillman C. (2013) The influence of exercise on cognitive abilities. *Compr Physiol*, 3: 403-428.
91. Roig M, Nordbrandt S, Geertsen SS, Nielsen JB. (2013) The effects of cardiovascular exercise on human memory: a review with meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 1645-1666.
92. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL. (2016) Mitochondrial Metabolism in Aging Heart. *Circ Res*, 118: 1593-1611.
93. Wang C, Youle R. (2016) Cell biology: Form follows function for mitochondria. *Nature*, 530: 288-289.
94. Ferreira DJ, da Silva Pedroza AA, Braz GR, da Silva-Filho RC, Lima TA, Fernandes MP, Doi SQ, Lagranha CJ. (2016) Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res*.
95. Eckles-Smith K, Clayton D, Bickford P, Browning MD. (2000) Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain Res Mol Brain Res*, 78: 154-162.
96. Means LW, Higgins JL, Fernandez TJ. (1993) Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiol Behav*, 54: 503-508.
97. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci*, 3: 533-535.
98. Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Li XJ, Mattson MP. (2003) Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2911-2916.

99. Pasinetti GM, Zhao Z, Qin W, Ho L, Shrishailam Y, Macgrogan D, Ressmann W, Humala N, Liu X, Romero C, Stetka B, Chen Lés mtsai. (2007) Caloric intake and Alzheimer's disease. Experimental approaches and therapeutic implications. *Interdiscip Top Gerontol*, 35: 159-175.
100. Love R. (2005) Calorie restriction may be neuroprotective in AD and PD. *Lancet Neurol*, 4: 84.
101. Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. (1971) Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res*, 13: 222-238.
102. Contreras D. (2004) Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural Netw*, 17: 633-646.
103. Vorhees CV, Williams MT. (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *Ilar J*, 55: 310-332.
104. Antunes M, Biala G. (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13: 93-110.
105. Zovkic IB, Sweatt JD. (2013) Epigenetic mechanisms in learned fear: implications for PTSD. *Neuropsychopharmacology*, 38: 77-93.
106. Levi-Montalcini R, Hamburger V. (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*, 116: 321-361.
107. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J*, 1: 549-553.
108. Tongiorgi E, Domenici L, Simonato M. (2006) What is the biological significance of BDNF mRNA targeting in the dendrites? Clues from epilepsy and cortical development. *Mol Neurobiol*, 33: 17-32.
109. Ernfors P, Kucera J, Lee KF, Loring J, Jaenisch R. (1995) Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol*, 39: 799-807.
110. Altman J, Das GD. (1965) Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207: 953-956.

111. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA. (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*, 21: 6718-6731.
112. Huang EJ, Reichardt LF. (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24: 677-736.
113. Baydyuk M, Xu B. (2014) BDNF signaling and survival of striatal neurons. *Front Cell Neurosci*, 8: 254.
114. Bekinschtein P, Kent BA, Oomen CA, Clemenson GD, Gage FH, Saksida LM, Bussey TJ. (2014) Brain-derived neurotrophic factor interacts with adult-born immature cells in the dentate gyrus during consolidation of overlapping memories. *Hippocampus*, 24: 905-911.
115. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*, 21: 6706-6717.
116. Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci*, 29: 12764-12767.
117. Boulle F, Kenis G, Cazorla M, Hamon M, Steinbusch HW, Lanfumey L, van den Hove DL. (2012) TrkB inhibition as a therapeutic target for CNS-related disorders. *Prog Neurobiol*, 98: 197-206.
118. Minichiello L. (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nature reviews Neuroscience*, 10: 850-860.
119. Lindholm JS, Castren E. (2014) Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. *Front Behav Neurosci*, 8: 143.
120. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther*, 138: 155-175.
121. Scharfman HE, Chao MV. (2013) The entorhinal cortex and neurotrophin signaling in Alzheimer's disease and other disorders. *Cogn Neurosci*, 4: 123-135.

122. Robinson RC, Radziejewski C, Stuart DI, Jones EY. (1995) Structure of the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 3 heterodimer. *Biochemistry*, 34: 4139-4146.
123. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T. (2007) Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res*, 85: 525-535.
124. Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. (2008) A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron*, 60: 610-624.
125. Hohl M, Thiel G. (2005) Cell type-specific regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) target genes. *Eur J Neurosci*, 22: 2216-2230.
126. Colombo E, Bedogni F, Lorenzetti I, Landsberger N, Previtali SC, Farina C. (2013) Autocrine and immune cell-derived BDNF in human skeletal muscle: implications for myogenesis and tissue regeneration. *J Pathol*, 231: 190-198.
127. Pratesi A, Tarantini F, Di Bari M. (2013) Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 10: 11-14.
128. Pedersen BK, Febbraio MA. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*, 8: 457-465.
129. Eisenberg DP, Ianni AM, Wei SM, Kohn PD, Kolachana B, Apud J, Weinberger DR, Berman KF. (2013) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val(66)Met polymorphism differentially predicts hippocampal function in medication-free patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 18: 713-720.
130. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112: 257-269.
131. Mattson MP. (2012) Evolutionary aspects of human exercise--born to run purposefully. *Ageing Res Rev*, 11: 347-352.
132. Prakash RS, Voss MW, Erickson KI, Kramer AF. (2015) Physical activity and cognitive vitality. *Annu Rev Psychol*, 66: 769-797.

133. Monteleone P, Maj M. (2013) Dysfunctions of leptin, ghrelin, BDNF and endocannabinoids in eating disorders: beyond the homeostatic control of food intake. *Psychoneuroendocrino*, 38: 312-330.
134. Rios M. (2013) BDNF and the central control of feeding: accidental bystander or essential player? *Trends Neurosci*, 36: 83-90.
135. Park HR, Park M, Choi J, Park KY, Chung HY, Lee J. (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci Lett*, 482: 235-239.
136. Witte AV, Fobker M, Gellner R, Knecht S, Floel A. (2009) Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 1255-1260.
137. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. (2017) Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci*, 40: 237-253.
138. Miller AA, Spencer SJ. (2014) Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*, 42: 10-21.
139. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ. (2010) Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol*, 219: 25-32.
140. Kanoski SE, Davidson TL. (2011) Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*, 103: 59-68.
141. Di Filippo M, Chiasserini D, Tozzi A, Picconi B, Calabresi P. (2010) Mitochondria and the link between neuroinflammation and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S369-379.
142. Wilkins HM, Swerdlow RH. (2016) Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. *Curr Top Med Chem*, 16: 849-857.
143. Errea O, Moreno B, Gonzalez-Franquesa A, Garcia-Roves PM, Villoslada P. (2015) The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 12: 152.

144. DeMarco VG, Johnson MS, Ma L, Pulakat L, Mugerfeld I, Hayden MR, Garro M, Knight W, Britton SL, Koch LG, Sowers JR. (2012) Overweight female rats selectively breed for low aerobic capacity exhibit increased myocardial fibrosis and diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302: H1667-1682.
145. Montminy MR, Bilezikjian LM. (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, 328: 175-178.
146. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal*, 16: 1211-1227.
147. Lonze BE, Ginty DD. (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*, 35: 605-623.
148. Barco A, Marie H. (2011) Genetic approaches to investigate the role of CREB in neuronal plasticity and memory. *Mol Neurobiol*, 44: 330-349.
149. Won J, Silva AJ. (2008) Molecular and cellular mechanisms of memory allocation in neuronetworks. *Neurobiol Learn Mem*, 89: 285-292.
150. Balkowiec A, Katz DM. (2002) Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci*, 22: 10399-10407.
151. Schumacher MA, Goodman RH, Brennan RG. (2000) The structure of a CREB bZIP.somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem*, 275: 35242-35247.
152. Tyagi E, Agrawal R, Zhuang Y, Abad C, Waschek JA, Gomez-Pinilla F. (2013) Vulnerability imposed by diet and brain trauma for anxiety-like phenotype: implications for post-traumatic stress disorders. *PLoS One*, 8: e57945.
153. Conti AC, Cryan JF, Dalvi A, Lucki I, Blendy JA. (2002) cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. *J Neurosci*, 22: 3262-3268.
154. Chen MJ, Russo-Neustadt AA. (2009) Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. *Hippocampus*, 19: 962-972.

155. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. (2011) CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem*, 116: 1-9.
156. Oyedotun KS, Lemire BD. (2004) The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. *J Biol Chem*, 279: 9424-9431.
157. Lithgow T. (2000) Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett*, 476: 22-26.
158. Porter C, Reidy PT, Bhattarai N, Sidossis LS, Rasmussen BB. (2015) Resistance Exercise Training Alters Mitochondrial Function in Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 47: 1922-1931.
159. Westermann B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 872-884.
160. Gray MW. (2012) Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4: a011403.
161. Liang H, Ward WF. (2006) PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 30: 145-151.
162. Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Tresguerres JA, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Vina J. (2012) Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1 α to exercise training. *Age*, 34: 669-679.
163. Scarpulla RC. (2008) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 321-334.
164. Da Cruz S, Parone PA, Lopes VS, Lillo C, McAlonis-Downes M, Lee SK, Vetto AP, Petrosyan S, Marsala M, Murphy AN, Williams DS, Spiegelman BM, Mészáros L. (2012) Elevated PGC-1 α activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab*, 15: 778-786.
165. Wenz T. (2009) PGC-1 α activation as a therapeutic approach in mitochondrial disease. *IUBMB Life*, 61: 1051-1062.

166. Chan MC, Arany Z. (2014) The many roles of PGC-1alpha in muscle - recent developments. *Metabolism*, 63: 441-451.
167. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 12017-12022.
168. O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jorgensen SB, Schertzer JD, Shyroka O, Kiens B, van Denderen BJ, Tarnopolsky MA, Kemp BE, Richter EA, et al. (2011) AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16092-16097.
169. Canto C, Auwerx J. (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*, 20: 98-105.
170. 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.
171. Higashida K, Kim SH, Jung SR, Asaka M, Holloszy JO, Han DH. (2013) Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1alpha activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. *PLoS Biol*, 11: e1001603.
172. Whitaker R, Faulkner S, Miyokawa R, Burhenn L, Henriksen M, Wood JG, Helfand SL. (2013) Increased expression of *Drosophila* Sir2 extends life span in a dose-dependent manner. *Aging (Albany NY)*, 5: 682-691.
173. 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.
174. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev*, 13: 2570-2580.
175. Frankel S, Ziafazel T, Rogina B. (2011) dSir2 and longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol*, 46: 391-396.

176. Greiss S, Gartner A. (2009) Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. *Mol Cells*, 28: 407-415.
177. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 10794-10799.
178. Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J. (2014) Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion. *PLoS One*, 9: e98972.
179. Imai S, Guarente L. (2010) Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. *Trends Pharmacol Sci*, 31: 212-220.
180. Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD. (2008) Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 841-853.
181. Yu J, Auwerx J. (2009) The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, 1173 Suppl 1: E10-19.
182. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*, 282: 6823-6832.
183. Zakhary SM, Ayubcha D, Dileo JN, Jose R, Leheste JR, Horowitz JM, Torres G. (2010) Distribution analysis of deacetylase SIRT1 in rodent and human nervous systems. *Anat Rec (Hoboken)*, 293: 1024-1032.
184. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, 16: 4623-4635.
185. Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*, 277: 45099-45107.
186. Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, Avalos JL, Escalante-Semerena JC, Grubmeyer C, Wolberger C, Boeke JD. (2000) A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6658-6663.

187. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434: 113-118.
188. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. (2006) The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem*, 75: 435-465.
189. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, 305: 390-392.
190. Guo X, Kesimer M, Tolun G, Zheng X, Xu Q, Lu J, Sheehan JK, Griffith JD, Li X. (2012) The NAD(+)-dependent protein deacetylase activity of SIRT1 is regulated by its oligomeric status. *Sci Rep*, 2: 640.
191. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, Gu W, Accili D. (2008) SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab*, 8: 333-341.
192. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, Guarente L. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, 6: 759-767.
193. Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L. (2005) Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science*, 310: 1641.
194. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. (2008) SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab*, 8: 38-48.
195. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Tsai H-T. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303: 2011-2015.
196. Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, Goto S, Boldogh I. (2013) Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic Biol Med*, 58: 87-97.

197. Graff J, Kahn M, Samiei A, Gao J, Ota KT, Rei D, Tsai LH. (2013) A dietary regimen of caloric restriction or pharmacological activation of SIRT1 to delay the onset of neurodegeneration. *J Neurosci*, 33: 8951-8960.
198. Anekonda TS, Adamus G. (2008) Resveratrol prevents antibody-induced apoptotic death of retinal cells through upregulation of Sirt1 and Ku70. *BMC Res Notes*, 1: 122.
199. Jeong J, Juhn K, Lee H, Kim SH, Min BH, Lee KM, Cho MH, Park GH, Lee KH. (2007) SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med*, 39: 8-13.
200. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. (2011) Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*, 93: 884S-890.
201. Markham A, Cameron I, Bains R, Franklin P, Kiss JP, Schwendimann L, Gressens P, Spedding M. (2012) Brain-derived neurotrophic factor-mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signalling pathways. *Eur J Neurosci*, 35: 366-374.
202. Markham A, Cameron I, Franklin P, Spedding M. (2004) BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur J Neurosci*, 20: 1189-1196.
203. Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. (2013) Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1alpha. *Exp Gerontol*, 48: 1343-1350.
204. Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, Safiulina D, Liiv J, Kuum M, Kaasik A. (2009) PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem*, 284: 21379-21385.
205. Kaliman P, Parrizas M, Lalanza JF, Camins A, Escorihuela RM, Pallas M. (2011) Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. *Ageing Res Rev*, 10: 475-486.
206. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo Rés mtsai. (2006) Suppression of reactive

- oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127: 397-408.
207. Cheng A, Wan R, Yang JL, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, Luo Y, Okun E, Mattson MP. (2012) Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat Commun*, 3: 1250.
208. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, 310: 314-317.
209. Hancock CR, Han DH, Higashida K, Kim SH, Holloszy JO. (2011) Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *Faseb J*, 25: 785-791.
210. Salvatore MF, Terrebonne J, Fields V, Nodurft D, Runfalo C, Latimer B, Ingram DK. (2016) Initiation of calorie restriction in middle-aged male rats attenuates aging-related motoric decline and bradykinesia without increased striatal dopamine. *Neurobiol Aging*, 37: 192-207.
211. Cartee GD. (2014) Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle. *Diabetologia*.
212. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. (2009) Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C1258-1270.
213. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S, Sunada Y, Tsuchida K. (2008) Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *Faseb J*, 22: 477-487.
214. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 7: 910-916.
215. Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BR, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, *és mtsai*. (2013) Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun*, 4: 3017.

216. Cartee GD. (2015) Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle. *Diabetologia*, 58: 19-30.
217. Crick F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227: 561-563.
218. Burdick JA, Vunjak-Novakovic G. (2009) Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue Eng Part A*, 15: 205-219.
219. Barnes SK, Ozanne SE. (2011) Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog Biophys Mol Biol*, 106: 323-336.
220. Milagro FI, Campion J, Cordero P, Goyenechea E, Gomez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martinez JA. (2011) A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *Faseb J*, 25: 1378-1389.
221. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. (2013) Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*, 18: 1208-1246.
222. Vaquero A, Reinberg D. (2009) Calorie restriction and the exercise of chromatin. *Genes Dev*, 23: 1849-1869.
223. Dolinoy DC. (2008) The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutr Rev*, 66 Suppl 1: S7-11.
224. Sanders YY, Liu H, Zhang X, Hecker L, Bernard K, Desai L, Liu G, Thannickal VJ. (2013) Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol*, 1: 8-16.
225. Shankar S, Kumar D, Srivastava RK. (2013) Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacol Ther*, 138: 1-17.
226. Kaelin WG, Jr., McKnight SL. (2013) Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*, 153: 56-69.
227. Grunstein M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389: 349-352.
228. Turner BM. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22: 836-845.

229. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 103: 263-271.
230. Kebede AF, Schneider R, Daujat S. (2014) Novel types and sites of histone modifications emerge as players in the transcriptional regulation contest. *Febs J*.
231. Hansen C, Spuhler K. (1984) Development of the National Institutes of Health genetically heterogeneous rat stock. *Alcohol Clin Exp Res*, 8: 477-479.
232. Deacon RM. (2013) Measuring the strength of mice. *J Vis Exp*.
233. 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.
234. Koch AL. (1966) The logarithm in biology. 1. Mechanisms generating the log-normal distribution exactly. *J Theor Biol*, 12: 276-290.
235. Koch LG, Britton SL. (2005) Divergent selection for aerobic capacity in rats as a model for complex disease. *Integr Comp Biol*, 45: 405-415.
236. Wikgren J, Mertikas GG, Raussi P, Tirkkonen R, Ayravainen L, Pelto-Huikko M, Koch LG, Britton SL, Kainulainen H. (2012) Selective breeding for endurance running capacity affects cognitive but not motor learning in rats. *Physiol Behav*, 106: 95-100.
237. Gomez-Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G. (2011) Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci*, 33: 383-390.
238. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. (2014) BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 Pt C: 677-683.
239. Bennett MR, Lagopoulos J. (2014) Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Prog Neurobiol*, 112: 80-99.
240. Gomez-Pinilla F. (2011) Collaborative effects of diet and exercise on cognitive enhancement. *Nutr Health*, 20: 165-169.
241. Torma F, Bori Z, Koltai E, Felszeghy K, Vacz G, Koch L, Britton S, Boldogh I, Radak Z. (2014) Eating habits modulate short term memory and epigenetical regulation of

- brain derived neurotrophic factor in hippocampus of low- and high running capacity rats. *Brain Res Bull*, 107: 54-60.
242. Richmond TJ, Davey CA. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423: 145-150.
243. Brinegar AE, Cooper TA. (2016) Roles for RNA-binding proteins in development and disease. *Brain Res*, 1647: 1-8.
244. Jin L, Wei W, Jiang Y, Peng H, Cai J, Mao C, Dai H, Choy W, Bemis JE, Jirousek MR, Milne JC, Westphal CHés mtsai. (2009) Crystal structures of human SIRT3 displaying substrate-induced conformational changes. *J Biol Chem*, 284: 24394-24405.
245. Tabuchi A, Sakaya H, Kisukeda T, Fushiki H, Tsuda M. (2002) Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. *J Biol Chem*, 277: 35920-35931.
246. Kenny PJ. (2014) Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci*, 16: 335-344.
247. Miura P, Amirouche A, Clow C, Belanger G, Jasmin BJ. (2012) Brain-derived neurotrophic factor expression is repressed during myogenic differentiation by miR-206. *J Neurochem*, 120: 230-238.
248. Radzikinas K, Aven L, Jiang Z, Tran T, Paez-Cortez J, Boppidi K, Lu J, Fine A, Ai X. (2011) A Shh/miR-206/BDNF cascade coordinates innervation and formation of airway smooth muscle. *J Neurosci*, 31: 15407-15415.
249. Mojtahedi S, Kordi MR, Hosseini SE, Omran SF, Soleimani M. (2012) Effect of treadmill running on the expression of genes that are involved in neuronal differentiation in the hippocampus of adult male rats. *Cell Biol Int*.
250. Lu B. (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem*, 10: 86-98.
251. (2002) Childhood Central Nervous System Germ Cell Tumors Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD).
252. Speakman JR, Mitchell SE. (2011) Caloric restriction. *Mol Aspects Med*, 32: 159-221.

253. Lettieri Barbato D, Baldelli S, Pagliei B, Aquilano K, Ciriolo MR. (2012) Caloric Restriction and the Nutrient-Sensing PGC-1 α in Mitochondrial Homeostasis: New Perspectives in Neurodegeneration. *Int J Cell Biol*, 2012: 759583.
254. Lopez-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, de Cabo R. (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1768-1773.
255. Kirkwood TB, Shanley DP. (2005) Food restriction, evolution and ageing. *Mech Ageing Dev*, 126: 1011-1016.
256. Hart RW, Turturro A. (1998) Evolution and dietary restriction. *Exp Gerontol*, 33: 53-60.
257. Marosi K, Mattson MP. (2014) BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab*, 25: 89-98.
258. Li FH, Li T, Ai JY, Sun L, Min Z, Duan R, Zhu L, Liu YY, Liu TC. (2018) Beneficial Autophagic Activities, Mitochondrial Function, and Metabolic Phenotype Adaptations Promoted by High-Intensity Interval Training in a Rat Model. *Front Physiol*, 9: 571.
259. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MO, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisloff U. (2009) Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res*, 81: 723-732.
260. 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.
261. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. (2001) Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3820-3825.

262. Miura S, Kai Y, Ono M, Ezaki O. (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem*, 278: 31385-31390.
263. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413: 131-138.
264. 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.
265. Schilling MM, Oeser JK, Boustead JN, Flemming BP, O'Brien RM. (2006) Gluconeogenesis: re-evaluating the FOXO1-PGC-1alpha connection. *Nature*, 443: E10-11.
266. Harrison BC, Bell ML, Allen DL, Byrnes WC, Leinwand LA. (2002) Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. *J Appl Physiol* (1985), 92: 313-322.
267. Raubenheimer PJ. (2004) Impaired mitochondrial activity and insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 350: 2419-2421; author reply 2419-2421.
268. Pallas M, Casadesus G, Smith MA, Coto-Montes A, Pelegri C, Vilaplana J, Camins A. (2009) Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res*, 6: 70-81.
269. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso Més mtsai. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 127: 1109-1122.
270. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 325: 834-840.

271. White AT, Schenk S. (2012) NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303: E308-321.
272. Brooks GA. (2009) Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol*, 587: 5591-5600.
273. Abbrescia DI, La Piana G, Lofrumento NE. (2012) Malate-aspartate shuttle and exogenous NADH/cytochrome c electron transport pathway as two independent cytosolic reducing equivalent transfer systems. *Arch Biochem Biophys*, 518: 157-163.
274. Bai P, Canto C, Oudart H, Brunyanszki A, Cen Y, Thomas C, Yamamoto H, Huber A, Kiss B, Houtkooper RH, Schoonjans K, Schreiber Vés mtsai. (2011) PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab*, 13: 461-468.
275. Graham T, Sjogaard G, Lollgen H, Saltin B. (1978) NAD in muscle of man at rest and during exercise. *Pflugers Arch*, 376: 35-39.
276. Sahlin K, Gorski J, Edstrom L. (1990) Influence of ATP turnover and metabolite changes on IMP formation and glycolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, 259: C409-412.
277. Dash RK, Dibella JA, 2nd, Cabrera ME. (2007) A computational model of skeletal muscle metabolism linking cellular adaptations induced by altered loading states to metabolic responses during exercise. *Biomed Eng Online*, 6: 14.
278. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakı C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J. (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*, 11: 213-219.
279. Li Y, Dash RK, Kim J, Saidel GM, Cabrera ME. (2009) Role of NADH/NAD⁺ transport activity and glycogen store on skeletal muscle energy metabolism during exercise: in silico studies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C25-46.
280. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakı 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.

281. Scarpulla RC. (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 1269-1278.
282. Mohamed JS, Hajira A, Pardo PS, Boriek AM. (2014) MicroRNA-149 inhibits PARP-2 and promotes mitochondrial biogenesis via SIRT-1/PGC-1alpha network in skeletal muscle. *Diabetes*, 63: 1546-1559.
283. Torma F, Koltai E, Nagy E, Ziaaldini MM, Posa A, Koch LG, Britton SL, Boldogh I, Radak Z. (2014) Exercise Increases Markers of Spermatogenesis in Rats Selectively Bred for Low Running Capacity. *PLoS One*, 9: e114075.
284. Barger JL. (2013) An adipocentric perspective of resveratrol as a calorie restriction mimetic. *Ann Ny Acad Sci*, 1290: 122-129.
285. Scapagnini G, Davinelli S, Kaneko T, Koverech G, Koverech A, Calabrese EJ, Calabrese V. (2014) Dose response biology of resveratrol in obesity. *J Cell Commun Signal*.
286. Furst A. (1987) Hormetic effects in pharmacology: pharmacological inversions as prototypes for hormesis. *Health Phys*, 52: 527-530.
287. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell*, 141: 280-289.
288. Hardie DG. (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*, 25: 1895-1908.
289. Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. (2014) AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metab*, 20: 10-25.
290. Manning BD, Cantley LC. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129: 1261-1274.
291. de Rooij DG. (2017) The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, 144: 3022-3030.
292. Starkov AA. (2008) The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1147: 37-52.
293. Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lecart S, Fontaine-Aupart MP, Hoebeke M. (2014) Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an

- in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim Biophys Acta*, 1837: 1790-1800.
294. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. (2017) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863: 1066-1077.
295. Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. (2008) Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, 133: 612-626.
296. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. (2019) The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 199-210.
297. Knights CD, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG, Avantaggiati ML. (2006) Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol*, 173: 533-544.
298. Shi X, Kachirskaia I, Yamaguchi H, West LE, Wen H, Wang EW, Dutta S, Appella E, Gozani O. (2007) Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol Cell*, 27: 636-646.
299. Huang J, Dorsey J, Chuikov S, Perez-Burgos L, Zhang X, Jenuwein T, Reinberg D, Berger SL. (2010) G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *J Biol Chem*, 285: 9636-9641.
300. Kwon YT, Ciechanover A. (2017) The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*, 42: 873-886.
301. Makela JA, Hobbs RM. (2019) Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reproduction*.
302. La HM, Hobbs RM. (2019) Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. *Cell Mol Life Sci*.
303. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. (2006) Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 24: 1505-1511.
304. Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, Goto S. (2008) Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev*, 7: 34-42.

305. Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, Garcia-Manso JM, Vaamonde-Lemos R, Swanson RJ, Oehninger SC. (2009) Response of semen parameters to three training modalities. *Fertil Steril*, 92: 1941-1946.
306. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. (2009) The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol*, 200: 259-271.
307. Novak CM, Escande C, Burghardt PR, Zhang M, Barbosa MT, Chini EN, Britton SL, Koch LG, Akil H, Levine JA. (2010) Spontaneous activity, economy of activity, and resistance to diet-induced obesity in rats bred for high intrinsic aerobic capacity. *Horm Behav*, 58: 355-367.
308. Lee J, Seroogy KB, Mattson MP. (2002) Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem*, 80: 539-547.
309. Thoenen H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*, 270: 593-598.

11. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Torma F, Bori Z, Koltai E, Felszeghy K, Vacz G, Koch L, Britton S, Boldogh I, Radak Z. (2014) Eating habits modulate short term memory and epigenetical regulation of brain derived neurotrophic factor in hippocampus of low- and high running capacity rats. Brain Res Bull, 107: 54-60.

Torma F, Koltai E, Nagy E, Ziaaldini MM, Posa A, Koch L, Britton S, Boldogh I, Radak Z. (2014) Exercise Increases Markers of Spermatogenesis in Rats Selectively Bred for Low Running Capacity. PLoS One, 9: e114075

Disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

Radak Z, Torma F, Berkes I, Goto S, Mimura T, Posa A, Balogh L, Boldogh I, Suzuki K, Higuchi M, Koltai E. (2018) Exercise effects on physiological function during aging. Free Radic Biol Med, 132: 33-41

Budai A, Horváth G, Tretter L, Radák Z, Koltai E, Bori Z, Torma F, Lukáts Á, Röhlich P, Szijártó A, Fülöp A. (2018) Mitochondrial function after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy in an experimental model. Br J Surg, 106(1):120-131

Köszönetnyilvánítás

Végezetül szeretném köszönetemet kifejezni témavezető mentoromnak, Prof. Dr. Radák Zsoltnak, hogy lehetőséget biztosított intézetében kísérleteim, vizsgálataim elvégzésére és szakmai tudásával pedig folyamatosan támogatta kutatásaimat. Az Ő vezetésével a magyar sporttudományban párját ritkító kutatási munka folyik, én pedig büszke vagyok, hogy ennek részese lehetek.

Köszönet illeti továbbá Dr. Sárga Lindát, illetve Dr. Koltai Erikát és Bori Zoltánt, akik a laboratóriumi munkafolyamat olykor igen bonyolult útvesztőjében segítettek boldogulásomat.

Köszönet az amerikai partnernek, hogy egyedülálló állatmodelljét rendelkezésünkre bocsájtotta.

Legvégül, de nem utolsó sorban pedig szeretnék köszönetet mondani a Molekuláris Edzésélettani Kutató Központ összes volt és jelenlegi dolgozójának és kedves családomnak, hogy segítettek munkámat.