

Futási képesség alapján szelektíven tenyésztett
patkányok agyának vizsgálata rezveratrol adagolás és
rendszeres testedzés hatására

Doktori tézisek

Sárga Linda
(Szűcs Linda)

Testnevelési Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Virág László egyetemi tanár, DSc
Dr. Pósa Anikó, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sipos Kornél professor emeritus, CSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pavlik Gábor professor emeritus, DSc
Dr. Osváth Péter egyetemi docens, PhD
Dr. Pucsok József egyetemi tanár, DSc

Budapest
2015

Bevezetés

Az emberiség egyik legősibb vágya a halhatatlanság. Habár ez nem lehetséges, az élet meghosszabbítására azóta is folyamatosan törekszünk. Így egyre többet tudunk már olyan jelenségekről, mint a sejtek differenciálódása, osztódása, apoptózisa... stb. Ezek a molekuláris folyamatok olyan összehangoltan működnek, akár egy szimfonikus zenekar. Ebben a zenekarban pedig az egyik legfontosabb résztvevő a DNS, melyet hisztonfehérjék vesznek körül. A hisztonok funkciói közül az egyik legfontosabb, hogy védjék a genetikai információt azáltal, hogy körülölelik, ily módon is sérthetlenné téve azt. Ebben a szoros ölelésben fontos szabályozó funkciót töltenek be a hiszton-deacetiláz enzimek. Emlősöknél a hiszton-deacetilázoknak négy csoportját különítjük el. A III. csoport merőben eltér a többitől. Sirtuin fehérjék alkotják, mely elnevezés a „silent information regulator two protein” angol szavakból összerakott betűszó. A sirtuinokra felfedezésük óta nagy várakozással tekintenek az élet meghosszabbítására törekvők.

A sirtuin fehérjék NAD^+ -függő enzimek, melyek szinte változatlan formában vannak jelen az archeobaktériumoktól egészen az emberi szervezetig. Funkciójukat tekintve deacetilázok, mono-ADP-ribozil-transzferázok vagy mindkét típusú aktivitással bírnak. Emlősökben hét csoportjukat tudjuk elkülöníteni, ebből a hétből a SIRT1 a legismertebb. Ezen az enzimen sikerült először bizonyítani a deacetiláz funkciót. Kezdetben a hisztonok deacetilálása nyert bizonyítást, később kiderült, hogy a sejt egyéb fehérjéit is képesek deacetilálni. A SIRT1 minden szövetféleségben kifejeződik, így az agyban is. Nagy mennyiségben van jelen a például az agykéregben, a hippocampusban, a kisagyban, a hipotalamusban, és kis mennyiségben a fehérállományban. Szinte kizárólag a neuronokban található meg. Mára több mint 2000 publikációt szenteltek a sirtuinok lehetséges terápiás hasznának. A legtöbb szerző a sirtuinok aktiválását az étrend változtatásával oldaná meg. Ez azzal járna, hogy többféle gyümölcs, zöldség és magféleiség szerepelne az étlapon, hiszen ezek bővelkednek antioxidánsokban. Az antioxidánsok többsége a polifenol vegyületek körébe tartozik.

A polifenolok növények által termelt vegyületek, melyeket két fő csoportra oszthatunk: flavonoid és nem-flavonoid szerkezetű polifenolokra. A rezveratrol (3,5,4'-sztilbéntriol) a nem-flavonoid csoportba sorolható, leginkább a vörös szőlőben, a borban és a földimogyoróban van jelen nagy mennyiségben. Annak ellenére, hogy nagyon kis mennyiségben jut át a vér-agy gáton, máris számos publikáció szól az agyi folyamatokra gyakorolt jótékony hatásáról. Szintén leírták többen is, hogy növeli a SIRT1 fehérje aktivitását, ami növeli a sejtek élettartamát. Az, hogy az aktivitás fokozása direkt vagy indirekt módon zajlik-e le, még vita tárgyát képezi. Mindezek tükrében nagyon is ajánlott az

egészségünk érdekében növelni a gyümölcsök mennyiségét étrendünkben. Ahhoz azonban, hogy valóban egészségesek legyünk még egy dolgot feltétlenül be kell vezetnünk: a rendszeres testmozgást!

Az ősidőkben az ember naponta több tíz kilométert gyalogolt, hogy gyűjtögessen, vagy vadásszon. Mára a fejlett országokban mindenki jelentős fehérje és cukortöbbletet fogyaszt, emellett viszont elfelejtkezik a mozgás szükségességéről. Szerencsére vannak dicsérendő kivételek is, akik hódolnak a rendszeres testmozgásnak. Élettani értelemben a sportoló és a „tévénéző” ember olyannyira különbözik egymástól, hogy ennek leírására a kutatóknak új modellt kellett létrehozni. Lauren G. Koch és Steven L. Britton (a Michigan Egyetem kutatói) éppen ezért egy sokgenerációs szelektív tenyésztési eljárásba fogtak, melynek során a patkányokat futási képességük alapján válogatták és pároztatták. Négy évvel később Wisløff és munkatársai ezen állatok 11. generációját vizsgálva megállapította, hogy a „aktív” és „inaktív” genetikájú csoportok között 347%-os futási teljesítménykülönbség van. Emellett az „inaktív” állatok a metabolikus szindróma tüneteit mutatták. 2008-ban lehetőség nyílt kísérletet kezdeni ugyanezen tenyésztési program 22. generációjából származó állatokkal. Leginkább az érdekelt, hogy a központi idegrendszerben (különösen az agy és a hippocampus területén) milyen különbségek figyelhetők meg. Számos tanulmány szól a testedzés központi idegrendszerre kifejtett jótékony hatásáról. A rendszeres mozgás növeli a sejtek túlélését oxidatív stressz során, fokozza a szövetek erezettségét, a neurotrofinok termelését... mely folyamatok hatására új neuronok keletkeznek, ezáltal javul a tanulási képesség és a memória. Másrészt széles körben ismert, hogy a testmozgás során nagy mennyiségben keletkeznek reaktív oxigéngyökök (ROS). Még nem tisztázott, hogyan képes a testmozgás ennyi jótékony hatást kifejteni a megnövekedett ROS ellenére.

A reaktív oxigéngyökök egy gyűjtőnév azokra az oxigéntartalmú molekulákra, melyek igen reakcióképesek vagy könnyen hozhatók reakcióképes állapotba. Számos ilyen molekula a szabadgyökök közé sorolható. Az oxigéntartalmú szabadgyökök leginkább a mitokondriumokban termelődnek a légzési oxigén felhasználása során. Fontos szabályozó funkcióval bírnak olyan folyamatok során, mint a sejtsztódás, a homeosztázis, intracelluláris jelátvitel, angiogenezis, az extracelluláris mátrix átépülése...stb. Másrészt fokozott reakciókészségük miatt DNS mutációkat, lipidperoxidációt és fehérjesérüléseket hoznak létre. Ezek a sérülések pedig gyulladós folyamatokat indítanak el és végül a sejt pusztulásához vezetnek. A neuronok, ezáltal az agy is különlegesen sérülékeny magas telítetlen zsírsavtartalma és fokozott oxigén-felhasználása miatt. A testedzés preventív funkcióval bír, hiszen végzése közben nő az oxidatív stresszel szembeni ellenállás és fokozódik az

anyagcsere sebessége. Az antioxidáns vegyületeknek fontos terápiás szerepet tulajdonítanak, különös tekintettel a sztatinokra, alkaloidokra, csak, hogy néhányat említsünk a polifenolok nagy családjából. Ezek a molekulák mind szabadgyökfogó tulajdonságúak. Sajnos azonban az antioxidánsok nem mindig képesek elhárítani a sejteket érő fenyegetést. Néha a szabadgyökök koncentrációja olyan magas, hogy mindenképpen számolni kell a sejtalkotók sérülésével. Emiatt szükség van a sejtekben javító mechanizmusokra is.

Az oxidatív stressz következtében létrejövő DNS-sérülés mindennaposnak mondható. Ezen sérülések javítása nélkülözhetetlen a génekészlet változatlansága érdekében. A DNS-t felépítő négy bázis közül a guaninnak a legkisebb a redox potenciálja, így könnyen oxidálódik, miközben 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-oxoG) keletkezik. Ez az átalakulás fokozottan mutagén, hiszen az 8-oxoG ahelyett, hogy a normál Watson-Crick szabályoknak megfelelően a citozinnal állna párban, inkább a Hoogsteen által megfigyelt adenin párt részesíti előnyben. Emiatt a magas mutagenitás miatt az evolúció során hamar megjelent egy olyan enzim, mely képes javítani ezt a hibát: a 8-oxoguanin DNS glikoziláz-1 (OGG1) végzi a báziskivágó javítás első lépését. Az OGG1 aktivitását több módon lehet változtatni a transzlációt követően: a CDK4 fehérje (Cyclin-dependent kinase 4) foszforilálja az OGG1-et, mely 2,5-szeresére emeli annak aktivitását. A p300 pedig acetilálja, ami szintén aktivitásnövekedéssel jár. Az OGG1 működésének sebessége igen fontos tényező, hiszen a 8-oxoG felhalmozódása az agyban a neurodegeneratív kórképeknek kedvez. Szintén ismert az irodalomban, hogy az öregedés során is nő a 8-oxoG mennyisége a hippocampus területén, miközben az OGG1 acetiláltsága csökken. Szöges ellentétben ezzel Stuart és munkatársai megfigyelték, hogy az OGG1 knockout egér teljesen normális fenotípusú. 2012-ben Boldogh és munkatársai elsőként írtak le számos bizonyítékot arról, hogy az OGG1 képes kapcsolódni a kivágás során szabaddá vált 8-oxoG-hoz, ezáltal a keletkező termék a Ras jelátviteli kaszkádot aktiválja, mely végül apoptózist indít el.

Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy létezniük kell az OGG1 aktivitását csökkentő enzimeknek is. Az aktivitás csökkentésére egy lehetőség a deacetiláció. E szerint az elmélet szerint kapcsolat lehet az OGG1 és a deacetiláz funkciójú SIRT1 között.

Célkitűzés

Vizsgálatom egyik célja volt, hogy bizonyítsam, a rendszeres testedzés képes ellensúlyozni a metabolikus szindróma negatívumait. Ahogy a Bevezetésben is említettem, a Michigan Egyetemről kapott patkánymodell tenyésztése során a futási képesség volt a szelekció alapja. Nem ez az első alkalom, hogy futási képesség alapján szelektált állatokon végeznek megfigyeléseket a testedzésről, de az ilyen hosszú ideig végzett szelekció eddig példa nélkül álló (több mint 10 éve tart, ami különösen hosszú idő figyelembe véve a patkány életidejét). A szelekció végső célja, azonosítani az aerob kapacitást meghatározó géneket. Természetesen az általam vizsgált 22. generációban ez a cél még nem érhető el, de ettől még értékes megfigyelések gyűjthetők a két állatcsoportról („aktív” és „inaktív” állatok), és értékes következtetések vonhatók le az emberi szervezetről, végső soron mi magunkról.

A laboratórium, ahol kísérleteimet végeztem elkötelezetten érdeklődik a mozgástudomány iránt. Felfedezésük óta a sirtuinok is vizsgálataik kerettüzeiben állnak. Bármennyire ősi fehérjecsoporthoz van is szó, a modern biológia számára ismeretlen ez a terület. A sporttudományi laboratórium történetében ez volt az első alkalom, amikor nemcsak passzívan figyeltük a sirtuinok szerepét, hanem megpróbáltuk befolyásolni is egy ismert aktivátorral: rezveratrollal.

PhD éveim alatt lehetőségem nyílt egy fél évet eltölteni a Texasi Egyetemen. Ez alatt elsajátítottam a sejtkultúrás munkavégzés szabályait, így kipróbálhattam feltételezéseimet egy sejtkultúrás modellen is. A patkányok agyszövetéből nyert eredmények alapján valószínű volt, hogy van kapcsolat a sirtuinok és az OGG1 enzim között, így utolsó hipotézisem is ennek szenteltem.

Hipotéziseim:

1. A testedzés és a rezveratrol adagolása javítja a kognitív funkciókat mindkét állatcsoport esetében.
2. Célom volt, hogy igazoljam, a kognitív funkciók javulása a sirtuinoknak köszönhető, neurotrofikus faktorok mennyiségének emelkedésén keresztül valósul meg és neurogenesisben is megnyilvánul.
3. A testedzés és/vagy a rezveratrol kezelés képes kiegyenlíteni az állatcsoportok közt fennálló genetikai eredetű különbségeket.
4. A sirtuinok képesek deacetylálni az OGG1 fehérjét, mely hatással van annak aktivitására.

Módszerek

Az állatházban alkalmazott módszerek

A patkánycsoport eredetileg Sprague-Dawley fajta. Az állatokat mesterségesen szelektáltak futási képességük alapján. A szelekciós program 2 hetet vett igénybe. Az első héten a patkányok megtanultak futni a számukra kialakított futópadon. A második hét során 5 egymást követő napon át megmérték minden példány futási kapacitását. Ezután összepároztatták a 13 legjobban futó nőtényt a 13 legjobban futó hímmel, illetve a 13 leggyengébb teljesítményű állatot szintén a 13 leggyengébbel. A 10 hetes utódoknál mindig megismételték az eljárást sok generáción keresztül. Lehetőségem nyílt kísérletet kezdeni 24 „inaktív” (lassú futási képességű LCR) és 24 „aktív” (gyors futási képességű HCR) patkánnyal a 22. generáció egyedei közül.

Az állatok 2008 szeptemberében érkeztek hozzánk, és kettesével kerültek ketrecekbe. Az első hét az új helyhez való adaptációval telt. A kísérlet lényegi része az egyetem etikai bizottságának jóváhagyásával 15 hetet vett igénybe, melynek során tartottuk magunkat az Európai Unióban elfogadott állattartási normákhoz. A patkányok 2 héten át gyakorolták a futópad használatát, melynek során 10 percig kellett futni 10m/min sebességgel 5^o-os lejtőn. Ez a terhelés olyan alacsony, hogy még nem okoz változást a példányok aerob kapacitásában. Ezt követően patkány-ergospirométer segítségével (Piston Medical Kft.) megmértük az állatok maximális oxigénfelvevő képességét. 10 perc nyugalom és 5 perc bemelegítés után minden harmadik percben 5m/perccel emeltük a futópad sebességét, miközben mértük a futópad kamrájának gázösszetételét. A mérés addig tartott, amíg 1: a VO₂ nem emelkedett tovább a sebesség emelése ellenére sem 2: a patkány nem tudta tartani a futópad tempóját 3: a respiratórikus kvóciens ($RQ = VCO_2/VO_2$) > 1. Ezt a teljesítménymérést minden második héten megismételtük, és az eredmények segítségével állítottuk be az edzés sebességét. Az edzés kezdetben 10m/perc sebességgel 30 percig tartott 5^o-os lejtőn. Később a sebességet és az időt a VO₂ 60%-ához mérten mindig emeltük.

Az edzés hetei alatt egyes állatcsoportok rezveratrolt is kaptak szájon át 100mg/_{testtömeg}kg mennyiségben minden másnap. A patkányok tömegét minden héten megmértük. Havonta meghatároztuk a vércukor szintjét is a farokvénából vett egy csepp vérből.

Az egyensúlyérzék vizsgálatához rotarod tesztet használtunk. Ennek során a patkányt egy egyre gyorsabban forgó felfüggesztett hengerre helyezzük, és megmérjük azt az időtartamot, amíg képes a hengeren egyensúlyozni. Ez az adat információt nyújt az egyensúlyérzékéről, a térbeli koordinációról, a fizikai állapotról és a motoros mozgások kisagyi tervezéséről.

A magatartástereszték a patkány kognitív funkcióiba engednek bepillantást. Az Új tárgy felismerési teszt a ráismeréshez használt memóriáról ad információt. Kezdetben hagyjuk az állatokat szabadon mozogni az üres vizsgálati arénában. (Ennek során is nyerhetők adatok, ezt hívjuk „Open field” tesztnek.) 24 órával a habituáció után ismét az arénába helyezzük az állatot két, teljesen egyforma tárgy mellé. A következő napon ismét az arénába helyezzük, de ilyenkor az egyik régi tárgyat lecseréljük egy anyagában, alakjában eltérő új tárgyra. Mérjük az új és a régi tárgy vizsgálatával eltöltött időt.

A Passzív Elhárítás tesztje egy félelemérzethez kapcsolt teszt, melynek során a tanulást és a memóriát vizsgálhatjuk. A vizsgálat során az állatok megtanulják elkerülni a környezet azon részét, ahol számukra negatív élmény történt (például áram megcsípte a lábukat). Kezdetben az állat szabadon bejárhatja a ketrec világos és sötét oldalát. Ezt követően a sötét oldalon egy pillanatra megcsípjük a lábukat árammal, ilyenkor az állatok társítják az áramütést a sötét oldalhoz. A következő naptól mérjük az időintervallumot, amíg az állat rászánja magát, hogy ismét belépjen a sötétbe. Az intervallum hossza ad információt a rövid- (24 óra) és a hosszútávú (10 nap) memóriáról.

A kísérlet utolsó 4 hetében BrdU injekciót adtunk az állatoknak, hogy később megfigyelhessük az újonnan keletkezett sejteket. Végül 2 nappal az utolsó edzés után dekapitáltuk a patkányokat. Az agy egyik féltekéjét hisztokémiai vizsgálatokra tettük félre, a másik féltekéből pedig leválasztottuk a hippocampust és a frontális lebenyt, és folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk azokat.

A laboratóriumban használt módszerek

A fehérjevizsgálatokhoz a frontális lebenyt szeparáltuk. Felolvasztás nélkül jéghideg lízispufferben (NP40 detergens tartalmú) homogenizáltuk. A proteinkoncentrációt Bradford-módszerrel határoztuk meg egy kit segítségével (Bio-Rad DC #500-0002).

A western blotok során a szeparáló gélek 6-15%-osak voltak, a koncentráció gél 10%-os. Általában 20-50 μ g fehérje/zseb mennyiségben vittünk fel mintát. Az elektroforézis a Bio-Rad rendszerrel történt, majd a PVDF membránra való blotoláshoz szintén a Bio-Rad Mini Blotting rendszert használtuk. A membránokat ezt követően 1-12 órán át blokkoltuk sovány tejporos TBST oldatban. Az elsődleges antitestet a gyártó utasításai szerint szintén sovány tejporos vagy BSA-t tartalmazó TBST-ben oldottuk. Az elsődleges antitest oldatát 1-12 órán át tartottuk a membránon. Az ezt követő mosás után másodlagos antitest oldatot alkalmaztunk. Végül Pierce ECL Western Blotting Substrate segítségével jelenítettük meg a protein csíkokat, és röntgenfilmen rögzítettük az eredményt. A beszkenelt filmekről ImageJ

szoftver segítségével tudtunk kvantitatív adatot nyerni a keresett protein mennyiségéről. Minden esetben β -aktin mérést is végeztük, mint belső kontrollt vizsgálatainkhoz.

A SIRT1 aktivitást CycLex kittel (#CY-1551) határoztuk meg a kit előírásai szerint. Mikroplate lyukakba összemértünk az alábbi oldatokat: assay buffer, fluoro-deacetylated peptide, NAD, TSA, saját minta vagy rekobináns SIRT1, LEP. Az excitációt 340nm-en, az emissziót 440nm-en mértük minden 5. percben 3 órán át fluoriméterrel.

A PCR mérésekhez a hippocampust használtuk fel. Az RNS-t NucleoSpin kittel szeparáltuk (Macherey-Nagel #740955.50), cDNS-t pedig cDNA Synthesis kittel (BIOLINE #BIO-65026) készítettünk. A geNorm Housekeeping Gene Selection kit segítségével választottuk a β -aktint housekeeping génnek. A cDNS-eket hígítottuk {20 μ l cDNS+ 180 μ l DEPC-víz}, majd egységesre állítottuk be a koncentrációt a β AKT futtatások segítségével. Ezekhez és minden további reakcióhoz az alábbiakat mértük össze: 5 μ l cDNS+ 10 μ l Immomix (BIOLINE #BIO-25020)+ 1 μ l reverse-forward primer mix+ 1 μ l SYBR green (QIAGEN) + 3 μ l DEPC-víz. A ciklusokat Rotor-Gene 6000 real-time rendszerrel futtattuk (Corbett Life Sciences). Az expressziós szinteket a delta CT módszerrel számítottuk ki a Rotor-Gene szoftver segítségével. Beállításaink: 95°C 10 percig, 95°C 10 másodpercig, 60°C 15 másodpercig, 72°C 20 másodpercig. Minden esetben 35 ciklust futtattunk, a végén melt-analízissel.

A hisztokémiához és az immunfluoreszcens mikroszkópiához a fél agyat paraformaldehidben fixáltuk, paraffinba ágyztuk, és mikrotómmal 5 μ m-es szeletekre vágtuk.

A neurogenesis vizsgálatához a metszeteket deparaffináltuk xylollal, rehidráltuk etanol-sorozattal, majd mostuk PBS-ben. Ezt követően DNázos emésztést és citromsavas feltárást alkalmaztunk. A normál kecske szérumos blokkolás után egy éjszakára tettük rá a BrdU elsődleges ellenanyagot. Másnap Alexa Fluor 546 másodlagos ellenanyagot tettünk fel 30 percre, majd a mosást követően a NeuN Alexa 488-kötött ellenanyagot tettük fel egy éjszakára. Másnap a mosások után Hoechst 33342 festést alkalmaztunk. Végül a metszeteket GelMount oldattal lefedtük. A neurogenezist Zeiss Elyra mikroszkóppal kerestük a metszeten, amelyek kódolva voltak erre az időre. Újonnan keletkezett neuronnak fogadtuk el azt az esetet, amikor egyértelműen megfigyelhető volt a zöld, kék és vörös jel egybeesése.

Az acetilált OGG1 hisztokémiához egér HRP/DAB Abcam kittet használtunk. A metszeteket deparaffináltuk, rehidráltuk, hidrogén-peroxiddal blokkoltuk, majd citromsavval feltártuk. A kit protein blokkolója után tettük fel az acetilált OGG1 elsődleges antitestet (vagy OGG1 antitestet kontrollként) egy éjszakára. Másnap a mosások után a biotinos másodlagos ellenanyag következett, amit a sztreptavidin-peroxidáz kezelés követett. Végül DAB kromogénnel tettük láthatóvá az eredményeket, és hematoxilinnel finomítottuk a látott képet.

Végül glicerines desztillált víz segítségével lefedtük a metszeteket. A képeket ImageJ szoftverrel értékeltük ki.



A sejt kultúrák vizsgálatok módszerei

Sejt kultúrák vizsgálatainkhoz HCT116 sejt vonalat választottunk. Ez egy humán karcinóma sejt vonal, mely McCoy 5a médiumban tenyészthető 10% FBS és 1% antibiotikum oldat hozzáadásával. A western blotokhoz a sejteket 1x RIPA pufferben lizáltuk protein inhibitor koktél, NaF és 10% SDS detergens hozzáadásával. A blotok a már leírt módon készültek. A PCR reakciókhoz RLT pufferben (QIAGEN RNeasy kit) szeparáltuk az RNS-t. A cDNS-szintézist az Invitrogen SuperScript III kittel végeztük el. A housekeeping gén GAPDH volt. A SIRT1 deacetyláz aktivitásának igazolására siRNA segítségével ideiglenesen kikapcsoltuk a SIRT1-et a sejtekben (siSMART pool kit, INTERFERin transzfekció). 4 csoportot hoztunk létre: siRNA nélkül, Kontroll siRNA, siSIRT1, siSIRT3. Petri-csészéket arattunk 48 óra és 72 óra után is, hogy biztosan lássuk a csendesítés eredményét.

Az OGG1 acetylázit ezen kívül meghatároztuk SIRT1 aktivátor és inhibitor hozzáadása mellett is. Az alábbi kezeléseket alkalmaztuk: 100µM rezveratrol, 10mM nikotinamid, 100nM Trichostatin-A (HDAC I-II inhibitor.) Az eredményeket western blotokkal nyertük.

Statisztika

A kísérlet kezdetén az állatokból random válogattunk össze csoportokat: Kontroll „inaktív” (CL), Edzett „inaktív” (TrL), Rezveratrollal kezelt „inaktív” (RsvL), Edzett és rezveratrollal kezelt „inaktív” (TrRsvL), Kontroll „aktív” (CH), Edzett „aktív” (TrH), Rezveratrollal kezelt „aktív” (RsvH), Edzett és rezveratrollal kezelt „aktív” (TrRsvH).

A normál eloszlás vizsgálatát Shapiro Wilk W-tesztel végeztük. A paraméteres adatok értékeléséhez ANOVA tesztet használtunk Tukey-féle posthoc analízissel. A szignifikancia szintjét mindenhol $p < 0,05$ fogadtuk el. A nem-paraméteres adatoknál Mann-Whitney U tesztet használtunk. A statisztikai kiértékelésnél a Statistica 9.1 szoftver volt segítségünkre. A csoportok közti eltérést a „” jellel jelöltük meg, ahol ez az eltérés szignifikáns volt, akkor a „” jel mellett „*” jelet is tettünk.

Eredmények

Eredményeink az állatházi mérésekből

A maximális futási kapacitást azért mértük, hogy ennek fényében tudjuk növelni az edzés intenzitását. Ha összehasonlítjuk az első VO_2 adatokat az utolsó mérések eredményével, látszik, hogyan fejlődtek az edzést végző csoportok a többihez képest. Például a TrL 40%-kal jobb eredményt ért el végül, mint a CL. A javulás az „inaktív” csoportokban statisztikailag is szignifikáns, az „aktív” állatoknál inkább csak tendencia. Nem meglepő, hogy az „inaktív” állatoknál látványosabb a fejlődés, hiszen az „aktív” állatok eleve fittebbek voltak genetikájukból eredendően.

A testtömeg mérésénél a TrL csoport ($470\pm 47g$) jóval alacsonyabb értéket ért el, mint a CL ($595\pm 38g$). Ez a változás a TrH ($433\pm 1g$) és a CH ($403\pm 39g$) között is megfigyelhető. A rezveratrol nem befolyásolta a testtömeget.

A vércukorszint értékeknél elmondható, hogy az LCR csoportok vércukorszintje magasabb, mint a HCR csoportoké. A szakirodalom tanulsága szerint az edzés pozitív hatással van a vércukor szabályzására, csökkenti az inzulin-rezisztenciát. A mi esetünkben is látható volt, hogy a TrL csoportok vércukorszintje a HCR állatokéhoz süllyedt.

A rotarod teszt azt mutatta, hogy a rezveratrol kezelés hatására szignifikánsan javult az egyensúlyozás, míg az edzés is hasonló tendenciát ért el. A két kezelés együttes alkalmazásakor teljesítettek legjobban az állatok.

Az idegrendszer vizsgálatához a magatartástesztek ideális eszközök. Normális esetben új környezetben minden állat a környezet vizsgálatát részesíti előnyben például a táplálkozással szemben. Ennek során mérhető a látenciaidő, a vonalátlépések, a felágaskodások száma... stb. Az LCR állatoknál hosszabb látenciaidő figyelhető meg az Open field teszt során. A HCR állatok gyorsabban kezdik meg az új környezet felfedezését, és ennek során magasabb az explorációs rátájuk is (a mozgások kvantifikálásából adódó érték). Ez a különbség a rezveratrollal kezelt csoportoknál szignifikáns.

A HCR állatok több időt töltenek az új tárgy vizsgálatával, könnyebben ismerik fel a régi tárgyat, mint LCR társaik.

A passzív elhárítás tesztjével jól mérhető a rövidtávú és a hosszútávú memória is. Általánosságban minden állat hosszabb időt töltött a világos kamrában a kis áramütés után, mint előtte. A HCR patkányok kismértékben jobb eredményeket értek el a rövidtávú memória esetében, mint az LCR csoportok. A rezveratrollal kezelt példányok érték el a legjobb

eredményeket. A hosszútávú memória esetében látványosabb, hogy a HCR csoportok jobb eredményekkel rendelkeznek, mint inaktív társaik. Egyedül a TrRsvL állatcsoport eredményei mérhetőek az „aktív” állatok jó teljesítményéhez.

Eredmények az agy vizsgálatából

A hosszútávú memória tesztje alapján elsőként immunfluoreszcens úton kerestük a feltételezett új neuronokat a hippocampus gyurus dentatus régiójában. A rezveratrol kezelés hatására új sejtek keletkeztek. Edzés hatására ugyanezt csak az „aktív” állatoknál tudtuk megfigyelni. Az új sejtek között a legtöbb új neuront szintén a rezveratrol kezelés eredményezte, az edzéshatás itt is csak a HCR csoportokban okozott neurogenézist.

Következő lépésben megmértük a közismertebb sirtuinok mRNS szintjét.

A SIRT1 legnagyobb mennyiségben a nukleuszban található, deacetiláz aktivitással bír és aktivitását a rezveratrol növeli a szakirodalom szerint. A SIRT1 mRNS szintekben nem láttunk mennyiségi különbséget. Egyedül a RsvL-RsvH csoportok között volt szignifikáns eltérés.

A SIRT3 a mitokondriumban található enzim, szintén deacetiláz aktivitással bír. Irodalmi adatok alapján a rezveratrol nincsen hatással az aktivitására, és mi sem találtunk különbséget az mRNS szintekben.

A SIRT4 szintén mitokondriális sirtuin, leginkább ADP-ribosziltranszferáz aktivitása van. Sem a testedzés, sem a rezveratrol nem változtatta a SIRT4 mRNS mennyiségét.

A SIRT6 is a sejtmagban található, és szintén ADP-ribosziltranszferáz funkciója van. Csökkent mRNS szintet találtunk edzés hatására, viszont az antioxidáns kezelés nem változtatta a SIRT6 expresszióját.

Természetesen az mRNS mennyisége nem feltétlenül egyezik meg a fehérje tényleges sejten belüli mennyiségével, így a SIRT1 fehérje relatív denzitását inkább meghatároztuk western blotlalt. Az edzett aktív és edzett inaktív állatok között volt a legszembetűnőbb a különbség. A rezveratrol kezeléshatására az RsvL állatok SIRT1 mennyisége kissé növekedett, de ez az RsvH csoportban nem volt megfigyelhető. Hogy pontosabb képet kapjunk a SIRT1-ről, meghatároztuk annak aktivitását minden minta esetében. A SIRT1 aktivitása a western blotthoz hasonló eredményt adott. Szignifikáns különbséget leginkább a TrL és TrH között találtunk. Mi nem tapasztaltuk azt sem, hogy a rezveratrol kezelés jelentősen befolyásolná a SIRT1 aktivitását.

A sirtuinok a sejtkben számos más fehérjét deacetilálnak. Egy acetilált lizin antitest segítségével képet kaphattam az általános acetiláltságról a sejtkben a kezelésekek hatására.

Mind a rezveratrol, mind a testedzés csökkentette az acetiláltság mértékét, tehát valamilyen módon elősegítette a deacetilázok működését.

Az acetiláció befolyásolja egyes fehérjék aktivitását, életidejük végét azonban a karboniláció jobban mutatja. Általánosan elfogadott, hogy a karbonilált fehérjék mennyisége egyfajta jelzés az oxidatív stressz (tehát a fehérje roncsolódás) mértékéről. Az edzés hatására emelkedést figyeltünk meg a karbonilált fehérjék mennyiségében (ROS felszaporodása), a rezveratrol hatására azonban csökkenés látszott.

A sirtuinok NAD^+ felhasználásával végzik a deacetilációt. A reakció terméke nikotinamid, amit a NAMPT enzim alakít vissza NAD^+ -dá. A rezveratrollal kezelt csoportokban a NAMPT mennyiségének növekedését láttuk. Lehetséges, hogy ez szükséges a deacetiláció révén fellépő NAD^+ -éhség kompenzálásához.

A CREB transzkripció faktor, mely hatással van többek között a BDNF átírására is. Éppen ezért fontos szerepet játszik az idegrendszer fejlődésében, és olyan folyamatokban is, mint a hosszútávú memória működése. Edzés hatására jelentősen megemelkedett a CREB mRNS mennyisége méréseinkben.

A BDNF mind a központi, mind a perifériás idegrendszerben fontos faktor. Elősegíti a meglévő neuronok túlélését, serkenti a neurogenézist és az idegsejtek arborizációját. Az LCR csoportoknál mindkét kezelés emelte a BDNF szintjét. Hasonló tendencia az „aktív” állatoknál is megfigyelhető volt, de szignifikáns változást csak az edzett csoportnál láttunk.

A poly-ADP-ribózt a PARP enzim állítja elő a DNS javítása során. Így a PAR mennyiségének meghatározása információt ad a DNS sérüléseinek mennyiségéről. A rezveratrollal kezelt csoportoknál alacsonyabb volt a PAR szintje. Azoknál az állatoknál azonban, ahol a rezveratrol mellett edzés is volt nem figyeltünk meg csökkenést a kontroll állatokhoz képest.

Ezt követően vizsgáltuk meg először egy másik repair enzim, az OGG1 mennyiségét. Az OGG1 működése során kivágja az 8-oxoG-t, viszont ezzel száltörést hoz létre. Rezveratrol hatására csökkent OGG1 szintet találtunk a kontroll csoportokhoz képest. Az edzés összetettebb eredményt adott. Az „inaktív” állatoknál nem okozott változást a kontrollcsoporthoz képest, viszont jelentős különbséget találtunk az „aktív” és az „inaktív” csoportok között. A HCR állatokban pedig azt tapasztaltuk, hogy edzés hatására nőtt az OGG1 szintje a HCR kontrollhoz viszonyítva. Kíváncsiak voltunk, vajon az acetilált OGG1 szintje hogyan változott a kezelések hatására. A hisztokémiai mérések alapján elmondható, hogy jóval magasabb az AcOGG1 szint az „inaktív” csoportokban, mint az „aktív” állatoknál. Ez az eredmény éppen a fordítottja a hosszútávú memória eredményének.

Eredmények a sejt kultúrákból

Az állatházi adatok alapján arra következtettünk, hogy kapcsolat lehet az OGG1 DNS-javító enzim és a SIRT1 deacetyláz között. Megmértük, hogy változik-e az AcOGG1 mennyisége, ha SIRT1 aktivátort/inhibítort adunk a médiumhoz. Rezveratrol hatására csökkent az AcOGG1 mennyisége (változatlan OGG1 szint mellett), nikotinamid hatására viszont emelkedett a kontrollcsoportéhoz képest. (A TSA kezelés nem hozott változást, tehát HDAC I-II enzimek nem befolyásolják az eredményt.) Ezt az eredményt megmagyarázza, ha feltételezzük, hogy a SIRT1 képes deacetylálni az OGG1-et.

Hogy bizonyítsuk ezt a feltételezést siRNS segítségével elcsendesítettük néhány kultúrában a SIRT1-et. A silencing után magasabb acetilált OGG1 szintet találtunk összehasonlítva a kontroll siRNS csoporttal, vagy akár a siSIRT3 csoporttal, ahol nem volt különbség az acetiláció mértékében.

Következtetések

Habár a VO₂ mérések praktikus okokból készültek, (hogy az adatok segítségével állítsuk be az edzés intenzitását) mégis érdekes eredményeket nyertünk. A különböző genetikájú kontroll csoportok között 152%-os teljesítménykülönbséget mértünk. Ez összhangban van Koch és Britton eredményeivel, miszerint az „aktív” állatok genetikai különbségekből adódóan jobb teljesítményre képesek „inaktív” társaiknál. Az edzés hatékonyságát mutatja, hogy a majdnem 4 hónapos program végére az edzett csoportok VO₂max értéke messze felülmúlta a kontroll csoportokat. Ez az eredmény a LCR állatoknál statisztikailag szignifikáns, míg a HCR csoportoknál tendencia. Természetes, hogy az „inaktív” patkányok mutatták a kiugró javulást, hiszen az „aktív” példányok eleve fittebbek voltak, náluk kevésbé látványos a fejlődés.

Ugyanez az elv érvényesül a testtömeg és vércukor adatoknál is. Koch, Britton és Wisløff leírták, hogy az „inaktív” állatok a metabolikus szindróma jeleit viselik magukon. Ezzel összhangban jóval nagyobb testtömegük, és rosszabb a testösszetételük, mint HCR társaiknak. Nem határoztunk meg zsír : izom arányt, de a boncolási tapasztalatok alapján elmondható, hogy az LCR állatok jóval több hasi zsírral rendelkeznek. Szintén érdekes volt megfigyelni, hogy az edzésben részt vett LCR állatokon viszont már jóval kevesebb a hasi zsír, mint a kontroll példányokon. A testedzés tehát már 15 hét alatt látványos változást okozott. Az „inaktív” állatok magasabb vércukor szintje is a metabolikus szindróma tünete. Az izomzat cukorraktározása nem működik tökéletesen és valószínűleg inzulinrezisztencia is fennáll. Ezt az állapotot is képes volt pozitívan változtatni a testedzés. A rezveratrol nem okozott változást.

Az egyensúlyozó tesztben azonban mind a rezveratrollal kezelt példányok, mind az edzésben részt vett példányok jobban teljesítettek, mint a kontroll társak. Az egyensúlyozás és térbeli koordináció fontos központjai a vestibuláris magvak és a kisagy. Ezeket a régiókat ebben a kísérletben most nem vizsgáltuk, de 2011-ben Steiner és mtsai. igazolták, hogy például a kisagyban edzés hatására mitokondriumok biogenezise indul a SIRT1 és PGC-1 α enzimek közreműködésével, ami javította az agy említett funkcióit. Szintén érdekes egészében vizsgálni a magatartástereszték eredményeit. A HCR állatok mindenben jobban teljesítettek. Rövidebb látenciaidővel és magasabb explorációs rátával az open field tesztben, tovább vizsgálták az új tárgyat és hosszabb ideig emlékeztek a megtanult dolgokra. Sajnos úgy tűnik, hogy az LCR állatok hátrányát ezekben a vizsgálatokban sem a rezveratrol sem az edzés nem tudta lefaragni. A szakirodalom szerint az edzés javítja a kognitív funkciókat, de úgy tűnik ebben az esetben a 15 hét nem volt elegendő, hogy versenyre keljen az öröklött képességekkel.

A jobb kognitív funkció háttérben valamilyen sejttani változás sejthető. A legtöbb esetben ez a változás neurogenesis. Kísérletünkben az új neuronok keletkezését a HCR csoportokban minden kezelés hatására ki tudtuk mutatni, az LCR állatoknál azonban csak a rezveratrollal kezelt példányoknál. A neurogenesis és a kognitív tesztek eredménye nincs teljesen összhangban egymással. Lehetséges, hogy a NeuN által megjelölt neuronok egy része még éretlen, így még nem látjuk, hogy javítanak a képességeket. A szakirodalom szerint a BDNF egy érzékeny mutatója a testedzés kognitív funkciókra gyakorolt jó hatásának (kismértékben invazív humán vizsgálatok is alátámasztják). Éppen ezért meghatároztuk a BDNF szintjét is. Leolvasható, hogy magasabb a BDNF koncentrációja az edzésben részt vett patkányoknál, és a rezveratrol kezelés is emelte kissé. Nem teljesen tisztázott azonban, hogy a SIRT1 hogyan képes hatni a BDNF mennyiségére. 2011-ben Jeong és munkatársai publikáltak egy lehetséges magyarázatot. Méréseik szerint a SIRT1 képes deacetylálni és ezzel együtt aktiválni a TORC-1 fehérjét, ami a CREB-en keresztül emeli a BDNF expresszióját. Az általunk végzett CREB mennyiségének mérése alátámasztja ezt az elméletet.

Ellenőrizni akartuk, hogy a SIRT1 szintén emelkedik-e a várakozások szerint. Két jel is utalt erre. Az acetylált lizinek száma csökkent minden állatcsoportban mindkét kezelésre. Mivel a rezveratrol közismert aktivátora a SIRT1-nek, ezért úgy gondoltuk, hogy emelte annak deacetyláz aktivitását. Másrészt a NAMPT mennyisége szintén magasabb volt a rezveratrollal kezelt csoportok esetében. A NAMPT felelős a nikotinamid NAD^+ -dá való átalakításáért. Úgy gondoltuk, hogy a NAD^+ -szükséglet ilyen mértékű változása is a megnövekedett sirtuin deacetyláz aktivitás jele lehet.

Mindezekkel ellentétben a SIRT1 mRNS, protein és aktivitás tesztei nem támasztották alá az előbbieket. A SIRT1 aktivitásának növekedését csak edzés hatására és csak a HCR állatokban láttuk. A rezveratrol méréseink szerint nem változtatta a SIRT1 aktivitását látványosan. Egyes cikkek szerint a rezveratrol önmagában, mint antioxidáns vált ki jelentős hatásokat, nem pedig a SIRT1 aktivátoraként. Ennek eldöntése nem szerepelt a kutatási terveinkben. Véleményem szerint egyszerre lehetséges a két dolog. A rezveratrol aktiválhatja a SIRT1-et, (mely folyamat pontos körülményei még nem tisztázottak), de emellett antioxidáns hatásokat is kifejthet a sejtben, amint ez például a karbonilált fehérjék mennyisége alapján valószínű.

A karbonilált fehérjék mennyisége az oxidatív stressz általánosan elfogadott indikátora. Méréseinkben a rezveratrol kezelés ennek szintjét csökkentette, az edzés viszont emelte. Ez leginkább a HCR állatok esetében látszott jól. Nem világos, hogyan teljesíthettek ezek az állatok jobban a kognitív tesztekben, ha magasabb a roncsolt fehérjék mennyisége a testükben. 2011-ben Radák és kollégái adtak erre egy lehetséges magyarázatot. Az elmélet szerint egyes karbonilcsoportok kulcsfontosságúak a fehérje turnover hibátlan működéséhez.

A reaktív oxigénradikálok számos DNS-sérülést okoznak a sejtben. Oxidálhatják a bázisokat, a purinokat, ezáltal rövid úton egyszálú törést hozhatnak létre. A HCR állatokban az edzés hatására emelkedett a BrdU beépülése a sejtekbe, viszont ez nem volt összhangban a neurogenesis ütemével. Lehetséges, hogy nemcsak az újonnan keletkezett sejteknél látható a BrdU festés, hanem a DNS-sérülések javításakor is beépült a sejtekbe. (A PAR és OGG1 eredmények alátámasztják ezt az elképzelést.) A 8-oxoG sérüléseket az OGG1 javítja a báziskivágó repair során. A várakozásokkal ellentétben a HCR állatok esetében alacsonyabb kontroll OGG1 szintet találtunk mind az mRNS-t, mind a proteinek vizsgálatával. Sőt, az OGG1 acetilációja, ami növelné aktivitását is kevésbé volt kimutatható a HCR csoportoknál az LCR állatokhoz képest. Ezek az eredmények szöges ellentétben állnak a szakirodalomban eddig uralkodó nézettel, miszerint a DNS sérüléseinek javítása kiemelten fontos a sejtben, minél gyorsabban meg kell történnie.

Egy sejt vonal segítségével próbáltuk igazolni, hogy a SIRT1 deacetilálja az OGG1-et. A nikotinamid kezelés hatására (ami a SIRT1 inhibitora), megnőtt az acetilált OGG1 mennyisége a sejtekben. Resveratrol hatására viszont csökkenést tapasztaltunk. A Trichostatin-A kezelés (mely HDAC I-II inhibitor) nem hozott változást az AcOGG1 mennyiségében. A SIRT1 siRNA-sel történő csendesítése szintén emelte az acetilált OGG1 szintet. Elmondható, hogy a HCR patkányoknál edzés hatására emelkedhetett a SIRT1 aktivitása, ez csökkentette az acetilált OGG1 mennyiségét, ami miatt csökkent a DNS-javítás intenzitása az agyban. Korábbi cikkek tapasztalatai szerint edzés hatására emelkedik az OGG1 repair aktivitása fiatalok izomszövetében. Nem kizárt, hogy az OGG1 eltérő módon szabályozódik edzés hatására a két szövetben. Kedvező lehet az izomszövetben az aktivitás fokozása, emellett az agy régióiban a repair csökkentése. Lehetséges, hogy kisebb problémát okoznak aktuálisan az 8-oxoG bázisok az agy működésében, mint a repair során keletkező lyukak a DNS-szálon. Amint azt a korábban említett irodalom is írja az OGG1 knock out egér nagy mennyiségben akumulált DNS-ében 8-oxoG bázisokat, és emellett is normál fenotípust mutatott. Sőt, ellenállóbbnak bizonyult a gyulladásos folyamatokkal szemben. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a repair során szabaddá váló 8-oxoG bázisoknak nagyobb a fiziológias/patológias jelentősége az agyszövetben, mint az izomszövetben. 2012-ben Boldogh és kollégái több bizonyítékkal is alátámasztották, hogy az OGG1 kötődik a kivágás során keletkezett 8-oxoG bázishoz. Ez a komplex pedig érintkezésbe lép a Ras fehérjecsaláddal. Az aktivált Ras ezt követően a Raf1-MEK1,2/ERK1,2 transzkripciós útvonalon át végül apoptózist indukál a neuron pusztulását okozva. Ezt a logikát követve az OGG1 „kikapcsolása” a SIRT1 deacetiláló aktivitása folytán, tehát a DNS repair csökkentése, voltaképpen apoptózist gátló esemény.

A célkitűzés fejezetben felállítottam négy hipotézist. A kísérleti eredmények tükrében az alábbiakkal kell módosítanom az állításokat:

1. A testedzés és a rezveratrol adagolása javítja a kognitív funkciókat mindkét állatcsoport esetében. NEM IGAZ A testedzés kognitív funkciókra gyakorolt hatását csak az „aktív” állatok esetében lehetett megfigyelni. A rezveratrol nem befolyásolta a kognitív funkciókat.
2. Célom volt, hogy igazoljam, a kognitív funkciók javulása a sirtuinoknak köszönhető, neurotrofikus faktorok mennyiségének emelkedésén keresztül valósul meg és neurogenesisben is megnyilvánul. RÉSZBEN IGAZ Az „aktív” állatok esetében tudtunk csak megfigyelni emelkedett SIRT1 aktivitást, megnövekedett BDNF szintet és CREB szintet, ami a neurogenesis jele lehet.
3. A testedzés és/vagy a rezveratrol kezelés képes kiegyenlíteni az állatcsoportok közt fennálló genetikai eredetű különbségeket. RÉSZBEN IGAZ A testedzés valóban csökkentette a metabolikus szindróma tüneteit az „inaktív” állatok esetében, de nem mutatkozott meg a kognitív funkciók javításában. A rezveratrolnál szintén nem láttunk egységes hatást, amely a genetikai különbségeket hozta volna azonos szintre.
4. A sirtuinok képesek deacetylálni az OGG1 fehérjét, mely hatással van annak aktivitására. IGAZ A SIRT1 tényleg képes deacetylálni az OGG1-et, hiszen csendesítéskor nő az AcOGG1 szint a sejt kultúrák vizsgálatokban. A SIRT1 inhibitorát alkalmazva kezelésképp szintén emelkedik az AcOGG1, míg a SIRT1 aktivátorát használva csökkent mennyiségben találunk AcOGG1-et.

Az eredmények tükrében érdemes volna további vizsgálatokat végezni, hogy közvetlenül is igazolható legyen a SIRT1 és az OGG1 közti molekuláris kapcsolat. (Például sejt kultúrák vizsgálatok indítása SIRT1 knock out egér sejtekkel.)

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

- **Sárga L**, Hart N, Koch LG, Britton SL, Hajas G, Boldogh I, Ba X, Radák Z (2013) Aerobic endurance capacity affects spatial memory and SIRT1 is a potent modulator of 8-oxoguanine repair. *Neuroscience* 252:326-336.
IF: 3.122
- Radák Z, Hart N, **Sárga L**, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I (2010) Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20(3):777-783.
IF: 4.174

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

- Hart N, **Sárga L**, Csende Z, Koltai E, Koch LG, Britton SL, Davies KJ, Kouretas D, Wessner B, Radák Z (2013) Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. *Food Chem Toxicol.* 61:53-59.
IF: 3.010
- Marosi K, Bori Z, Hart N, **Sárga L**, Koltai E, Radák Z, Nyakas C Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience.* 226:21-28.
IF: 3.122