

A több évtizedes testedzés hatására végbemenő epigenetikai változások vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Aczél Dóra Tímea

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



**MAGYAR TESTNEVELÉSI
ÉS SPORTTUDOMÁNYI
EGYETEM**
BUDAPEST

Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Sydó Nóra, egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Atlasz Tamás, egyetemi docens, PhD

Budapest

2023

1. Bevezetés

1.1. Az öregedés

Az öregedés egy természetes és automatikus biológiai folyamat, az élet elkerülhetetlen következménye. Az öregedő szervezetet, a szövetek és szervek funkcióinak fokozatos hanyatlása, romló életminőség és a halálzási kockázat növekedése jellemzi. Napjainkban, köszönhetően a jobb életkörülményeknek és a javuló egészségügyi ellátásnak, a születéskor várható átlagéletkor drámaian kitolódik, és így nő az idősök aránya a populációban. Az öregedés, mindamelllett, hogy általános érvényű, jelentős egyedi sajátosságokat mutat. Az egyéni különbözőségekhöz a genetikai tényezők mellett, az életmódbeli eltérések járulhatnak hozzá jelentős mértékben. Életünk során különböző külső és belső hatások érik a szervezetünket, amelyek mutációk formájában halmozódhatnak fel, és hagyhatnak nyomot a DNS-ünkben. Az öregedés hatással van a génexpresszióra, méghozzá oly módon, hogy amikor a genetikai anyag öregedése elér egy bizonyos küszöbértéket, a génexpresszió leáll. Ezek a károsodások összességében egyre inkább hátráltatják az egészséges működést, tumoros-, szív- és érrendszeri- valamint, neurodegeneratív megbetegedések kialakulásához, majd végső soron halálhoz vezethetnek. Felmerül tehát a kérdés, hogy az öregedés behatóbb ismerete révén befolyásolható-e a folyamat? A legújabb kutatások azt sugallják, hogy az öregedés lassítható vagy akár vissza is fordítható a génaktivitás megváltoztatásával. Ehhez azonban pontosabban meg kell ismernünk az öregedési folyamatok kulcsszereplőit. Az emberi modelleken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy főként a genetikai különbségek, valamint az életünk során szerzett szomatikus mutációk állhatnak az eltérő öregedési folyamatok hátterében. Mindezek mellett, a „nem genetikai faktoroknak” is fontos szerepet tulajdoníthatunk, alátámasztva ezzel az „epi”-genetikai mechanizmusok jelentőségét a hosszú élettartam szabályozásában. Ilyen „faktorok” például a kalóriamegvonás, az alapanyagcsere sebességének csökkentése, a fokozott oxidatív stressz válasz, a mitonukleáris fehérjék egyensúlyának helyreállítása. A fent említett faktorok mind-mind összefüggésben állhatnak az élettartam hosszabbodásával.

1.2. Az öregedés jelátvitele

Az öregedés jelátvitele, ha úgy vesszük, egyben a hosszú életé is. Az úthoz kapcsolódó géneket öregedő („aging”) vagy hosszú élet („longevity”) géneknek is nevezzük. Ha az út hatékony működése megőrződik, vagy a hibák időben kiküszöbölésre kerülnek, úgy az öregedés, ha nem

is teljesen elkerülhetővé, de késleltethetővé válik. Ehhez azonban behatóbban kell ismernünk az öregedés jelátvitelét, és annak korral történő változásait. Az útba csatlakozó jelátviteli utak együttes, összehangolt, megőrződött működése szükséges a hosszú élethez. A „bemenő jelek” alapján megállapíthatjuk, hogy az öregedésre hatással lehetnek 1) különböző táplálkozási sajátosságok, 2) bizonyos hormonok, valamint 3) az oxidatív stressz is.

Hormonok az öregedés jelátvitelében, a KL: Az öregedés szerepet játszó hormonok közül kiemelten fontos szereppel bír az inzulin és a növekedési hormon. Az öregedés jelátvitelére, azonban egy harmadik hormon is hatással van, ez pedig Klotho. A fehérjét a hosszú élet jelentős biomarkereként tartják számon. A KL gén emberben a 13-as kromoszómán található. A gén promóter régiója rendkívül gazdag CpG szigetekben. Valószínűsíthető, hogy a promóter régió metilációs állapota összefügg a KL mRNS expressziójával. A tKL extracelluláris doménjét membránhoz kötött proteázok hasítják. Először szolubilis, majd egy szignál peptid ráhelyezése után, szekretált KL keletkezik, ami a vérbe, a vizeletbe, valamint a cerebrospinális folyadékba választódik ki. A sKL keringő hormonként funkcionál, számos sejtfelszínen lévő receptort és ioncsatornát szabályoz, emellett jótékony hatással van a gyulladásozó folyamatokra, és részt vesz az oxidatív stressz elleni védelemben is. Adódik tehát a kérdés, hogy a KL szintjének állandóan tartása, vagy a fehérje visszapótlása, elősegítheti az egészségesebb öregedést és kedvező hatással lehet a betegségek megelőzésében egyaránt?

Oxidatív stressz jelátviteli út: A bevitt tápanyag a biológiai oxidáció során alakul át a sejt számára hasznosítható energiává, vagyis ATP-vé, amelynek terminális lépése a mitokondriumokban zajlik. Ezek az organelumok központi szerepet játszanak az öregedésben. Amennyiben, a mitokondriumban zajló oxidációs reakciók károsodást szenvednek (ld. öregedés), úgy nem csak az energiatermelés csökken, hanem a folyamat melléktermékeként, reaktív oxigén származékok (ROS) szaporodnak fel. A felszabaduló szabadgyököket a redox háztartás enzimek eliminálják, amelyek megfelelő működése tehát elengedhetetlen az egészséges öregedéshez, és így a hosszú élethez. Ha a háztartás egyensúlya megborul, a feleslegben lévő szabadgyökök természetes affinitásuk miatt, spontán reakcióba lépnek bizonyos molekulákkal, köztük a DNS bázisaival is.

1.3. Az évtizedeken át tartó testedzés szerepe az öregedésben

Régóta ismert a rendszeresen végzett fizikai aktivitás kiemelten fontos szerepe abban, hogy jó egészségünket és magas életminőségünket minél hosszabb tudjuk megtartani. Az autók és a tömegközlekedés megjelenésével, a kommunikáció leegyszerűsödésével, az ülő, és a túlterhelt,

stresszes életmód miatt egyre nagyobb szerephez jutnak a rekreációs irányzatok, a szabadidős testmozgás. Tudjuk, hogy a sport, nemcsak a fizikai teljesítőképességet javítja, hanem megalapozza az egészséges testi, szellemi és lelki működést is. Az öregedés során tapasztalható fizikai teljesítőképesség csökkenése mellett motoros és kognitív funkciók hanyatlása is. Ezek a diszfunkciók súlyos terhet jelentenek, mind az egyén szintjén, mind a családok, és általában véve a társadalom szintjén is. Ismert, hogy a rendszeres fizikai aktivitás ellensúlyozza az öregedéssel együtt járó negatív hatásokat, csökkenti a mortalitást és a morbiditást, nyújtja az aktív élettartamot. Az öregedés és a testedzés kapcsolatáról tudjuk például, hogy a maximális oxigénfelvétel (VO₂max) értéke 50 éves kor felett negatív korrelációt mutat a halálozással. A rendszeres testmozgás hatékony például az életkor növekedésével együtt járó szív- és érfunkció romlása ellen, amelyek Magyarországon a vezető halálozási okok közé tartoznak. A testedzés eredményesen veszi fel a harcot az időskori csontritkulással is, javítja a koordinációt és segít az izom tömeg megtartásában, ami pedig az esések, balesetek elkerülése esetén hasznos. Emellett, a korral összefüggésben, a vázizom egyre több oxidatív sérülést, szabadgyököt halmoz fel, amelyet a rendszeres testmozgás az antioxidáns kapacitás növelése által ellensúlyozni képes.

1.4. „Az öregedő telomerek”:

Az öregedés egyik fő kiváltó oka a telomerhosszak kritikus mértékű rövidülése. A telomerek a kromoszómák végén lévő, ismétlődő, TTAGGG-ben gazdag, nem kódoló nukleotid szakaszok, amelyek emberben jellemzően 3 és 20 kilobázis hosszúságúak. Feladatuk, hogy védik a DNS-t a sejtciklusonként bekövetkező rövidüléstől. Amíg ezek a körülbelül 100 bázispárnyi kiesések, kizárólag a géneket nem tartalmazó telomer régiót érintik, addig a DNS kódoló szakaszát nem éri károsodás. Bizonyos számú sejtosztódás után azonban, amikor a telomerek hosszának rövidülése már kritikus, az osztódó sejtek már nem tudnak megkettőződni, elérve így a celluláris öregedés állapotát. Ez az emberi sejtekben nagyjából 50 sejtosztódást jelent. Minél hosszabb tehát a telomer szakasz, annál több osztódásra képes a sejt anélkül, hogy génkészlete sérülne. Bár a telomeráz enzim képes de novo bázispárokat adni a telomer szakaszokhoz, a telomerek a folyamatos sejtosztódások miatt, az életkorral rövidülnek. Érdekes tény, hogy az öregedési folyamatokban jelentős oxidatív stressz például, felgyorsítja a telomerek rövidülését. Valójában szoros kapcsolat áll fenn a telomerek hossza és az életkorral összefüggő betegségek között. A telomerekről leírták, hogy hosszuk fordítottan korrelál számos életkorral összefüggő betegség kialakulásának kockázatával, amilyen például az érelmeszesedés, a stroke, az elhízás és a miokardiális infarktusz is. A telomerek „kopása” pozitív összefüggést mutat a cukorbetegséggel, és az ahhoz kapcsolódó szövődmények kialakulásával. Továbbá, több

kutatás is mutatott ki daganatokban, mint például vastagbél tumorok esetében is, csökkent leukocita telomerhosszt.

1.5. A rendszeres testedzés hatása a telomerek hosszára

Ismerjük, hogy a telomerek hosszára a testmozgás jótékony hatással bír. Már egy 12 hetes, alacsony gyakoriságú, mérsékelt intenzitású, rövid távú edzésprogram is pozitívan befolyásolta a telomerek hosszát, és pozitívan korrelált a redox homeosztázissal. A mozgás feltételezhetően, vagy a telomeráz aktivitásának befolyásolásával, vagy oxidatív stressz szabályozásával, vagy gyulladásszerű folyamatok elindításával/gátlásával, vagy a vázizom szatellita-sejt tartalmára hatva fejt ki hatását a telomerhosszra. A tanulmányok egy része szerint, a rendszeresebb, illetve az intenzívebb fizikai aktivitás, hosszabb telomerhosszhoz társul. Ez a különbség jobban kiütöközik az idősek esetén, ami arra utalhat, hogy a fizikai aktivitás pozitívan hat a telomerhossz életkorból adódó csökkenésére. Ehhez kapcsolódóan, a leukociták és a vázizomsejtek telomerhossza pozitív kapcsolatban áll az egészséges életmóddal. Másik oldalról, azonban szép számmal akadnak olyan közlemények, amelyek nem írnak le különbséget sportoló, illetve nem sportoló egyének között, a telomerhosszak tekintetében. Így tehát a kapcsolat a fizikai aktivitás és a telomerhosszak között továbbra is ellentmondásos.

1.6. Az epigenetika

Bár már régóta tudjuk, hogy a génműködést, nem kizárólag a gének szekvenciájában bekövetkező változások módosíthatják, a figyelem mégis leginkább csak az elmúlt húsz évben fordult az epigenetika felé. Waddington már 1942-ben bevezette az „epigenetika” fogalmát. A szóban a „felett” jelentésű ógörög „epi” előtag arra utal, hogy a genetikai információ átadása, a DNS-szekvencia megváltozása nélkül történik. Az epigenetika tárgykörébe tehát olyan, mitotikusan és/vagy meiotikusan is átörökíthető folyamatok, környezeti hatások, táplálkozás-, edzés-, és öregedés általi DNS változások sorolhatók, amelyek oly módon vezetnek a fenotípust meghatározó gének expressziójának változásához, hogy közben a DNS-nukleotid sorrendjében nem történik módosítás. Az epigenetikai folyamatok természetesek és nélkülözhetetlenek a szervezet megfelelő működéséhez. Probléma akkor van, ha ezek a folyamatok nem megfelelően mennek végbe, és így súlyos egészségügyi és viselkedési zavarokat okoznak. A genetikai változásokkal ellentétben az epigenetikai folyamatok reverzibilisek. Bár a metilációs mintázatok jelentős részét szüleinktől kaptuk örökölni, hatással lehetnek rájuk különböző külső és belső tényezők egyaránt. A szervezetet, fejlődése során, számos külső inger éri, mint amilyen például az elfogyasztott táplálék, a fizikai aktivitás és a stressz. Emellett, az epigenetikai

folyamatokat, különböző környezeti ágensek is befolyásolhatják: nehézfémek, peszticidek, kipufogógázok, dohányfüst, policiklusos aromás szénhidrogének, a radioaktivitás, vírusok és baktériumok is. Továbbá, ilyen belső faktor még maga az öregedés is. Az öregedéssel kialakuló globális hipometiláció genetikai instabilitást és spontán mutációk kialakulását okozza. Napjainkban már ismert az is, hogy a legtöbb betegség hátterében, beleértve a daganatos megbetegedéseket, a kognitív diszfunkciókat, valamint különböző légzőszervi, szív- és érrendszeri, reprodukív és autoimmun megbetegedéseket, epigenetikai változások állnak.

1.7. A DNS – metiláció

A DNS-en történő módosulások közül az egyik legjelentősebb, és ezért az egyik leggyakrabban kutatott is, a DNS-metiláció. Népszerűségét az adja, hogy a meglévő technológiákkal igen könnyen tanulmányozható: a PCR-hez kapcsolt biszulfít konverzió, a pirosekvenálás, a microarray-ek és a mély szekvenálás egyaránt alkalmas lehet a DNS-metiláció vizsgálatára. A minta-előkészítés egyszerűsége, valamint a költséghatékony technikák miatt lehetővé válik nagyszabású vizsgálatok elvégzése is. A DNS-metiláció, a DNS „építőköveit” jelentő nukleotidok, metilcsoporttal történő módosítását jelenti. Emberben a metiláció során kiemelten fontos szerephez jutnak azok a citozin bázisok, amelyek, foszfát csoportokon keresztül, guanin nukleotidokhoz képesek kötni, úgynevezett CpG dinukleotidokat eredményezve. Ezek a CpG-dinukleotid egységek a genomban egyenetlenül oszlanak el, zömmel az úgynevezett CpG-szigetek területén fordulnak elő. A CpG-szigetek jellemzően a különböző gének promóter, illetve regulátor régióban találhatóak meg nagy számban. A humán szövetek egészséges testi sejtjeiben a CpG-dinukleotidok több mint, 70-80%-a metilált állapotban van, amely a teljes genom majdnem 1%-át jelenti. Legjellemzőbb metilált bázis az eukarióták genomjában az 5-metilcitozin (5mc), ami azt jelenti, hogy a citozin ötödik szénatomjára kerül metilcsoport. A metilációs változások egyaránt vezethetnek a génexpresszió fokozásához vagy az adott gén csendesítéséhez. Alapvetően, a felhelyezett metilcsoportok, fizikailag gátolják a TF kötődését a DNS kettős spiráljához. Ebből következik, hogy míg az alacsony mértékben vagy teljesen metilálatlan DNS promóter szakaszokon a sejtmagba érkező TF-ok akadálytalanul elindíthatják a génátírást, addig a magas szinten DNS-metilált régiókban a TF-ok kötése a DNS szálhoz lehetetlenné válik, ami jellemzően a transzkripció gátlását eredményezi.

1.8. Az epigenetikai órák

Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy bizonyos DNS-metilációs biomarkerek alapján meghatározható a szövetek biológiai kora. Az epigenetikai életkor szoros összefüggést mutat a

kronológiai öregedéssel, de számításba veszi a környezeti és életmódbeli hatásokat is. Az úgynevezett második generációs órák, mint amilyen például a DNAmPhenoAge és a DNAmGrimAge. Ezek a halálozási kockázat érzékenyebb markerei, és számos, az életkorral összefüggő betegség előrejelzésében is pontosabbnak bizonyultak:

- A PhenoAge a biológiai életkor egyik olyan mérőszáma, amit kilenc klinikai jellemző, valamint a kronológiai életkor alapján alkottak meg. Ezt a „fenotípusos kort” sikerült prediktálni 513 CpG-t metilációs státusza alapján Levine-nek és mtsai-nak. Az óra alapján megbecsülhető, hogy a vizsgált egyén fiatalabb, vagy idősebb-e a kronológiai életkoránál (DNAmPhenoAge akcelerációja/AgeAccelPheno), azaz gyorsult (negatív előjelű) vagy lassult (pozitív előjelű) az öregedése, valamint azt is, hogy mennyi esélye van a halálra az elkövetkező 10 évben.
- A DNAmGrimAge megalkotása esetén, azzal a különbséggel, hogy ők a morbiditással vagy mortalitással összefüggő plazmafehérjék metilációját és a dohányzást vették számításba. A „GrimAge gyorsulása” (DNAmGrimAge akcelerációja/AgeAccelGrim), hasonlóan a DNAmPhenoAge akcelerációjához, a kronológia életkorra illesztett regresszió „maradéka”, vagyis a kronológiai és a Grim-kor különbsége.
- A telomer hosszának DNS-metiláción alapuló becslése, a DNAmTL, is felülmúlja a mért telomerhosszt, a halálig hátralévő idő és az életkorral összefüggő betegségek előrejelzésének tekintetében.

2. Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk:

1. Milyen hatással van sport a KL gén promóter régiójának metilációjára?
2. Milyen hatással van a edzés a “fiatalság fehérjéjének” szintjére master sportolóknak? A sKL fehérje szintje mutat-e összefüggést antropometriai, terhelésélettani és kognitív paraméterekkel?
3. Fennáll-e kapcsolat a keringő sKL és a DNS-metiláción alapuló epigenetikai órák között master sportolóknak?
4. Milyen kapcsolat áll fenn a fiziológiai teszteredmények, valamint a RT-PCR módszerrel mért (TL), és a DNS-metiláción alapuló becsléssel meghatározott TL (DNAmTL) értékek között?
5. Van-e kapcsolat a mért és becsült telomerhosszak és az epigenetikai órák között?

Hipotéziseinket a következőképpen fogalmaztuk meg.

1. A „fiatalság fehérjét” vizsgálva feltételeztük, hogy:

1.1. Kapcsolat áll fent szenior sportolók “fiatalság fehérjének” szintje és a szervezet redox egyensúlya között.

1.2. Az évtizedeken át végzett edzés módosítja a KL gén promóter régiójának metilációját, valamint szerepe van a sKL és a fizikai fittség kapcsolatában.

1.3. Kapcsolat áll fenn a KL szintje és az epigenetikai órák között, és így a hormon szintje befolyásolhatja az epigenetikai öregedés gyorsaságát.

2. A szenior korú sportolók telomerhosszát vizsgálva feltételeztük, hogy:

2.1. Az évtizedeken át tartó testedzés változást okoz a telomerek mért (TL) és becsült (DNAmTL) hosszában.

2.2. A fizikai erőnlét/fittség szintje befolyásolja a telomer hosszakat.

2.3. A kapcsolat módosul a telomerhosszak és epigenetikai órák között master sportolók esetében a kontroll csoporthoz képest.

3. Anyag és módszer

3.1. Kutatásban részt vevő személyek

A tanulmányt az Országos Népegészségügyi Központ, a Helsinki Nyilatkozatnak és a Magyarországon érvényes szabályozásnak megfelelően hagyta jóvá, TUKEB etikai engedélyünk száma 25167-6/2019/EÜIG. Vizsgálatunkhoz a 2019-ben megrendezésre kerülő, velencei Evezős Masters Világbajnokságon történt mintavétel. A 194 szenior versenyzőtől vettünk mintát, amelyet egy 109 főből álló kontroll csoport mintavétele követett Budapesten. Összesen 303 fő vett részt a vizsgálatokban. Az résztvevők életkora 37-85 év között volt. A kutatásban való részvétel önkéntes volt, a résztvevők írásos beleegyező nyilatkozatot tölthettek ki. Minden résztvevő kérdőívet töltött ki az egészségi állapotára és életmódjára, táplálkozási szokásaira vonatkozóan, és természetesen a testmozgási szokásaikra vonatkozóan. A szenior evezős csoport nagyon heterogénnek bizonyult; sok sportolónak csak heti egy vagy két edzése volt, míg mások napi szinten végeztek edzőmunkát. A résztvevők közül 267 fő normál táplálkozást folytatott, 19 fő volt vegetáriánus és 17 fő egyéb típusú diétát követett (gluténmentes, paleo, laktózmentes, DM diéta). A vizsgálatunkban résztvevő, közép-és időskorú személyeket master sportoló férfi (MF), master sportoló nő (EN), illetve kontroll (kontroll férfi (KF), kontroll nő (KN) csoportokba soroltuk.

3.2. Antropometriai, terhelésélettani és kognitív vizsgálatok

Mintagyűjtésünk egy többlépcsős tesztsorozat előzte meg. Az antropometriai vizsgálat során testtömeg és testmagasság mérést végeztünk, majd, az alanyok testtömeg-indexét is meghatároztuk. A terhelésélettani tesztsorozat négy vizsgálatból állt; egy maximális kézi szorítóerő mérésből, egy maximális felugrás mérésből, egy Chester- step tesztből és egy kognitív tesztből.

3.3. Vérmintavétel, hematológia és biokémiai vizsgálatok

A vérvételt az alanyok könyökvénájából, K2-EDTA, ACDA alvadás gátlót tartalmazó, valamint CAT (Serum Sep Clot Activator Tubes) szérumos vérvételi csövekbe végeztük, az antropometriai, terhelésélettani és kognitív tesztek elvégzése után, a Chester-step teszt elvégzése előtt. Az EDTA-s véralvadásgátlót tartalmazó és a CAT szérumos csövek hűtve, 2 órán belül a helyszínről elszállítva, laborunkban kerültek feldolgozásra. Az ACDA alvadásgátlót tartalmazó vérvételi csöveket pedig a helyszínen fugáltuk és szárazjégen tartva, nap végén kerültek laborunk -70 fokos hűtőjébe. A K2-EDTA alvadás gátlóval, valamint az ACDA alvadásgátlóval kezelt vérmintákat 1600g sebességgel, 15 percig, 4 Celsius fokon centrifugáltuk (Sigma 1-16K (Refrigerated Microfuge) Osterode am Harz, Németország), majd a vérplazma komponensét eppendorf csövekbe pipettáztuk. Az így nyert plazma mintákat, valamint a maradék sejtes elemeket -70 Celsius fokon tároltuk. A CAT szérumos vérvételi csövek tartalmát centrifugálás (3000 rpm, 10 perc, szobahőmérséklet, SERVOSpin Plus centrifuga, Németország) után két részre osztottuk. Egyik részéből 8 vérkémiai paramétert (glükóz, koleszterin, LDL, HDL, triglicerid, májenzimek (GOT, GPT, gamma GT)) határoztunk meg.

3.4. DNS izolálás

Ezt követően laborunkban, a K2-EDTA alvadásgátlóval kezelt minták sejtes elemeiből, azon belül is a fehérvérsejteket tartalmazó „buffy coat” részből, DNS-t izoláltunk, DNS izoláló kit segítségével (Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). A kitet a gyártó utasításainak megfelelően alkalmaztuk.

3.5. Metilációs vizsgálatok

A metilációs vizsgálat első lépése egy biszulfid konverzió. A folyamat lényege, hogy a metilált citozin bázisok, a metil-csoport jelenléte miatt, “változatlanul maradnak”. Míg, a nem-metilált citozin nukleotidok, a biszulfid konverzió hatására uracillá, majd későbbi lépésben timinné

alakulnak. Attól függően, hogy a vizsgálni kívánt citozin metilált vagy nem-metilált, különbség adódik a DNS nukleotid sorrendjében. Az eljáráshoz kiindulásként 500 ng genomiális DNS-t hidrogén-szulfittal átalakítunk, amihez EZ-96 DNS-metilációs MagPrep Kit-et (Zymo Research, Irvine, CA, USA) és KingFisher Flex robot-ot (Thermo Fisher Scientific, Breda, Hollandia) használtunk. A mintákat véletlenszerű sorrendben szélesztettük. A biszulfít konverziót a gyártó protokollja szerint végeztük, a következő módosításokkal: a DNS megkötésére 15 µl MagBinding Beads-et használtunk. A konverziós reagens inkubálása a következő ciklus-protokoll szerint történt: 16 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, majd 50 °C-on 1 órán át. A ciklus után a DNS-t tíz percig 4 °C-on inkubáltuk. Ezután termék DNS-mintákat hibridizáltunk 850K Infinium MethylationEPIC BeadChip-re (Illumina Inc., San Diego, CA), a gyártó protokollja szerint, azzal a módosítással, hogy 8 µl biszulfittal kezelt DNS-t használtunk kiindulási anyagként. Ez a chip, több mint 850.000 ponton képes a CpG szigetek metilációját meghatározni. Lényegében, a különböző színű flouorórral jelölt metilált, illetve nem metilált DNS-hez kötni képes primerek segítségével meghatározható az adott citozin metilációs státusza. A DNS-metilációs adatok minőség-ellenőrzését Meffil és Ewastools csomagokkal, R verzió 4.0.0-val végeztük. Azokat a mintákat, amik az Illumina által felállított minőségi kritériumoknak nem feleltek meg (beleértve a hosszabbítást, a hibridizációt és a biszulfít átalakítást is) kizártuk a vizsgálatból. A metilációs szint meghatározásához R-ben "Noob" normalizációt használtunk. A metilációs adatok feldolgozásához és az öregedés ütemének kiszámításához Horvath online korekalkulátorát alkalmaztuk.

3.6. A sKL fehérje plazmaszintjének meghatározása

A sKL plazma szintjét ACDA alvadásgátlóval kezelt mintákból határoztuk meg. A vérmintákat 6000xg sebességgel, 15 percig, 4 Celsius fokon centrifugáltuk (Sigma 1-16K (Refrigerated Microfuge) Osterode am Harz, Németország), majd a vérplazma komponensét pipettával szeparáltuk, és a mérésig -80 Celsius fokon tároltuk. A mintákat és a reagenseket a protokollban leírtak szerint készítettük elő. A fehérjeszint méréséhez enzimhez kötött immunszorbens próbát (ELISA), ezen belül Human Klotho ELISA kit-et használtunk, a gyártó utasításai szerint (R&D Systems, DuoSet ELISA, Cat #DY5334-05, Minneapolis, MN, USA). A méréseket 96 lyukú mikrolemezen végeztük, amelyre duplikátumban mértük fel a standard sort, valamint egy példányban a mintákat. A vizsgálati standard görbe tartománya 70-7000 pg/ml volt. Az optikai denzitást ELISA leolvasóval (Thermo Labsystems Multiskan EX, Vantaa, Finnország) 450 nm-en, illetve 595 nm-en olvastuk le, majd a háttér (595 nm) levonása után, a sKL mennyiségét

pg/ml-ben kalkuláltuk. Az így kapott értékeknek a természetes alapú logaritmusát (ln) vettük a további analízisekhez.

3.7. Telomerhossz-meghatározás

Vizsgálatunkban a telomerek hosszát kétféle módszerrel határoztuk meg:

3.7.1. A RT-PCR alapú telomerhossz-meghatározás

A teljes vérből származó genomiális DNS-minták átlagos telomerhosszát (TL) Cawthon-féle PCR-alapú módszerrel határoztuk meg, kereskedelemben kapható PCR kit segítségével (ScienCell Research Laboratories inc., San Diego CA Catalog no. #8908). A kitet a gyártó ajánlásai szerint használtuk. A PCR reakció során a telomer specifikus primerek felismerik és felszorzozzák a telomer szekvenciákat. Minden DNS-mintánál, két egymást követő reakciót hajtottunk végre. Az első reakció egykópiás referencia (SCR) gén amplifikálására szolgált. Az itt alkalmazott primerpár egy 100 bp hosszúságú régiót ismer és sokszorosít fel a 17-es humán kromoszómán, és referenciaként szolgál a cél minták telomerhosszának kiszámításakor. A második reakció pedig már a telomer szekvenciára irányult. A PCR reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük, 5 ng referencia/genomiális DNS mintát (végső koncentráció = 0,625 ng/µl), 1-1 µl telomer primert, és 10 µl 2x Master Mixet használtunk. A PCR reakciókat PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) készüléken végeztük, a következő környezetben: először 95 °C 10 percig, majd 32 ciklus 95 °C-on 20 másodpercig, 52 °C 20 másodpercig, végül 72 °C 45 másodpercig. Ugyanazon mintán minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

3.7.2. A telomer hosszának becslése

A mérés mellett, a telomerek hosszát meg is becsülhetjük. Ehhez Lu és mtsai által kifejlesztett szoftver állt rendelkezésre, amely a metiláción alapuló telomerhossz (DNAmTL) becslésére szolgál.

3.8. A redox homeosztázis meghatározása

A vérben lévő hidrogén-peroxid (H₂O₂) mennyiséget spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, d-Roms (reaktív oxigén metabolitok származékai) teszt segítségével, a korábban leírtak szerint. A d-Roms teszthez FREE Carpe Diem analizátort (Wismerll Co., Ltd., Tokyo, Japán) használtuk. Az így meghatározott koncentrációkat hagyományos egységekben (Carratelli-egységekben; UCarr) fejeztük ki, ahol 1 UCarr 0,8 mg/l H₂O₂-nek felel meg. A plazma vas-

redukáló képességét, vagyis a redox háztartást, a biológiai antioxidáns erő (BAP) teszt segítségével becsültük. Ezen teszt során, a vas-kloridot egy speciális kromogén szubsztráttal, egy tiocianát-származékkal összekeverve, a vérplazma mintákhoz (10 µl), és 37 °C-on 5 percig inkubáljuk. A vasion redukációjára az 505 nm-en mért abszorbanciából lehet következtetni. A BAP-méréseket is FREE Carpe Diem analizátorral végeztük. A redox egyensúlyt a BAP/dROM arány (µmmol/l/UCarr) alapján becsültük meg.

3.9. Statisztikai analízis

Az eredményeket statisztikai próbáknak vetettük alá. Az elemzések során Statistica 13 programot (TIBCO) alkalmaztuk. Először a változók normalitás vizsgálatát végeztük el Shapiro-Wilk teszttel, hogy a megfelelő paraméteres, illetve nem paraméteres próbákat alkalmazhassuk. Vizsgálataink során a csoportok közötti különbség kimutatására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A kapcsolatok kimutatására Pearson-féle korrelációt végeztünk, ahol a KL szintek, valamint a telomer hosszak voltak a függő változók. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. A sKL szint vizsgálata master sportolóknál

A sKL fehérje szintjét 202 személyben határoztuk meg. A férfiak esetében a master sportoló csoport, illetve a kontroll csoport átlagéletkora nem különbözött szignifikánsan egymástól (MF vs. KF; $p = 0,5297$). Nőknél ellenben, a kontroll csoport szignifikánsan idősebbnek bizonyult (MN vs. KN; $p < 0,0001$). Kohorszunkban a sKL fehérje szérumszintje az életkor előrehaladtával csökkenést mutatott, vagyis negatívan korrelált az életkorral (parciális $r = -0,14$; $p = 0,0439$). Szignifikáns negatív kapcsolat áll fent az evezős Masters Világbajnokságon részt vevők életkora és a sKL szérumszintje között is (parciális $r = -0,19$; $p = 0,0295$). Ellenben nem volt kimutatható összefüggés a sKL és az életkor között a kontroll csoport esetében (parciális $r = -0,065$; $p = 0,5925$).

A nemek közötti különbséget vizsgálva, a férfi nemhez szignifikánsan magasabb sKL értékek társultak (férfi: $6,05 \pm 0,12$ pg/ml; nő: $5,55 \pm 0,11$ pg/ml; $p = 0,002^*$). A master sportoló és kontroll

csoporthoz között nem adódott szignifikáns különbség a sKL szintek tekintetében egyik nem esetében sem (férfi master sportoló: $5,92 \pm 0,09$ pg/ml; férfi kontroll: $6,13 \pm 0,23$ pg/ml; $p=0,4080$; nő master sportoló: $5,39 \pm 0,15$ pg/ml; nő kontroll: $5,71 \pm 0,15$ pg/ml; $p=0,1459$).

Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok a következőképpen mutattak összefüggést a sKL szintjével: nagyobb maximális kézi szorító erő magasabb sKL szinttel társult a master sportoló csoportot vizsgálva (parciális $r= 0,24$; $p=0,0058$). Ellenben nem mutatott összefüggést a kontroll csoport maximális kézi szorító ereje a sKL szinttel (parciális $r= 0,19$; $p=0,1142$). Nem áll fent kapcsolat a kognitív teszt eredményei, a vertikális felugrási teszt eredményei, valamint a Chester-step teszttel becsült VO₂max értékek és a sKL szintek között, egyik csoport esetében sem.

A cukorháztartás (random vércukorszint) és a sKL kapcsolatát vizsgálva, szignifikáns kapcsolatot nem, csak negatív tendenciát találtunk a master sportoló csoport esetében (parciális $r= -0,15$; $p= 0,0900$).

A sKL szint, és a DNAmPhenoAge, valamint a DNAmGrimAge közötti összefüggést vizsgálva az adatok azt mutatták, hogy a sKL összefüggésben áll a PhenoAge-gel, méghozzá úgy, hogy a magasabb sKL szint, lassult DNAmPhenoAge akcelerációval társult a master sportoló csoportban (parciális $r= -0,21$; $p=0,0192$). Ez az összefüggés azonban nem állt fent a kontroll csoport esetében (parciális $r= -0,17$; $p=0,1587$). A DNAmGrimAge és a sKL kapcsolatát vizsgálva, negatív tendencia látható a master sportoló csoportban (master sportoló csoport: parciális $r= -0,16$; $p=0,0740$; kontroll csoport: parciális $r= -0,06$; $p=0,6370$). A DNAmGrimAge akcelerációja azonban semmilyen kapcsolatot nem mutatott a sKL szintjével, egyik csoport esetében sem (master sportoló csoport: parciális $r= 0,02$; $p=0,8133$; kontroll csoport: $r= 0,02$; $p=0,8580$).

Az általunk mért redox egyensúly, és a sKL szintje szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a master sportoló csoportot vizsgálva (parciális $r=0,28$; $p=0,0115$). Azonban a kontroll csoport esetében nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a redox egyensúly és sKL szintje között ($r=0,17$; $p=0,1497$). Master sportolóknál a H₂O₂ szint minél magasabb, a sKL szintje annál alacsonyabb volt (parciális $r= -0,25$; $p=0,0242$), ám az összefüggés nem mutatkozott a kontroll csoportnál (parciális $r= -0,21$; $p=0,0802$).

A KL gén promóter régiójában 13 CpG-t metilációs szintjét (béta-érték) határoztuk meg. Ezek alapján azt találtuk, hogy a sKL szint életkorral összefüggő csökkenése, a KL gén promóter

régiójának magasabb metilációjához társult. Férfiak esetén pedig, a korrall történő korrigálás után, eltérő régió specifikus metilációs mintázatot találtunk a master sportoló, illetve a kontroll csoport között, amely a női nem esetében nem állt fent.

4.2. Szenior korú sportolók mért és becsült telomerhosszának vizsgálata

A továbbiakban a szenior korú sportolók, illetve a kontroll csoport mért (TL), illetve DNAmTL metiláció alapján becsült (DNAmTL) értékeit vizsgáltuk. A teljes vérben lévő genomban mért átlagos telomerhosszak összevetését 241 főn végeztük el.

Az egész kohorszot nézve, a mért telomerhosszak (TL) negatív korrelációt mutattak az életkorral (parciális $r = -0,23$ $p = 0,0003$). Azonban a TL és az életkor kapcsolata a szenior sportolók esetén már nem volt kimutatható (parciális $r = -0,03$; $p = 0,7142$), míg a kontroll csoportban továbbra is fennállt a negatív korreláció (parciális $r = -0,35$; $p = 0,0004$). Vizsgálatunkban a becsült telomerhossz (DNAmTL) és az életkor között szintén erős, negatív korrelációt találtunk (parciális $r = -0,75$; $p < 0,0001$). Ez a kapcsolat az egyes csoportok esetén, külön-külön is megmaradt (DNAmTL szenior sportolók: parciális $r = -0,74$; $p < 0,0001$; *I2C. ábra*; DNAmTL kontroll: parciális $r = -0,77$; $p < 0,0001$).

Nemek tekintetében, a mért és a becsült telomerhosszak, valamint az életkor közötti összefüggés mindkét esetben, erősebbnek bizonyult a nők esetében: TL nők: parciális $r = -0,73$; $p < 0,05$; TL férfiak: parciális $r = -0,66$; $p < 0,05$; valamint DNAmTL nők: parciális $r = -0,78$; $p < 0,0001$; DNAmTL férfiak: parciális $r = -0,76$; $p < 0,0001$. Férfiak és nők mért telomerhosszainak átlagai megegyeztek egymással (TL nők: 8,56; TL férfiak: 8,57; $p = 0,8168$), míg szignifikánsan hosszabbnak bizonyultak a becsült telomerhosszak a nők esetében (DNAmTL nők: 6,9; DNAmTL férfiak: 6,7; $p = 0,0002$).

Férfiak és nők esetében az alábbi különbségek adódtak az szenior sportolók és a kontroll csoportok között: master sportolóknál mindkét nem esetében majdnem minden esetben hosszabb telomerhosszt mértünk. Kivétel a mért telomerhosszak a női kontroll csoportban voltak hosszabbak.

Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok, valamint a DNAmTL között az alábbi összefüggéseket mutattuk ki: pozitív kapcsolatot láttunk a becsült telomerhosszak és a maximális felugrási magasság között a master és a kontroll csoportban egyaránt. A szorítóerő /testsúly hányadosa, valamint a kognitív teszt eredménye a kontroll csoportban mutatott pozitív

kapcsolatot a telomerhosszal, ami a master csoportban nem állt fent. Nem volt kimutatható kapcsolat a telomerhossz és a testtömegindex között.

A maximális oxigén felvételi kapacitás, vagyis a VO_{2max} , sem a master sportoló, (parciális $r = -0,1$; $p = 0,2286$) sem pedig a kontroll csoport (parciális $r = 0,12$; $p = 0,2488$) mért TL-aival nem mutatott kapcsolatot. Azonban, a becsült VO_{2max} értékek pozitívan korreláltak a DNAmTL-szal a kontroll csoport esetében (parciális $r = 0,29$; $p = 0,0067$), amely pozitív kapcsolat, a master sportoló csoportnál már nem állt fent (parciális $r = 0,08$; $p = 0,3414$).

Nem volt kimutatható kapcsolat master sportolók mért TL-ai és az epigenetikai órák között (DNAmPhenoAge: TL master sportoló: parciális $r = -0,11$ $p = 0,2014$; DNAmGrimAge: TL master sportoló: parciális $r = -0,12$ $p = 0,1574$). Ezzel ellentétben, a kontroll csoportnál, negatív kapcsolatot állapítottunk meg a TL-ak és az epigenetikai öregedés markerei között (DNAmPhenoAge: TL kontroll: $r = -0,34$; $p = 0,0007$; DNAmGrimAge: TL kontroll: parciális $r = -0,36$, $p = 0,0004$). A DNS alapú TL becslés valamint, a DNAmPhenoAge és DNAmGrimAge között erős kapcsolatot találtunk, ami nem változott a master sportolóknál sem. A DNAmPhenoAge gyorsulása és DNAmTL kapcsolata a szenior sportolók esetében nem bizonyult szignifikánsnak. A DNAmGrimAge gyorsulásának kapcsolatát vizsgálva a DNAmTL-lel, az eredmények azt mutatták, hogy a hosszabb telomerek lassult, öregedéssel társultak, mind a master sportolók, mind a kontrollok esetében.

A redox háztartás, valamint a telomerhosszak kapcsolata a következőképpen alakult: A mért TL hosszak pozitív kapcsolatot mutattak a redox háztartással sportolók esetében (parciális $r = 0,26$; $p = 0,0106$), míg a kontroll csoport esetében nem állt fent kapcsolat (parciális $r = 0,17$; $p = 0,0925$). A TL és H_2O_2 kapcsolata szenior sportolóknál szignifikánsan negatívnak bizonyult (parciális $r = -0,23$; $p = 0,0213$), míg nem a sportolóknál csak pozitív tendenciát láthatunk (parciális $r = 0,20$; $p = 0,0517$).

5. Következtetések

Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az évtizedeken át tartó testedzés hatását az öregedés molekuláris folyamataira. Az öregedés tág témaköréhez a „fiatalság génjének” és telomerhosszak vizsgálata felől közelítettünk. Vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a sport a „fiatalság génjére”, ezen belül is a KL gén promóter régió metilációjának változásaira master sportolóknál. Azonban nemcsak a promóter régió metilációjában, hanem az általunk szintén mért, átíródott/transzlálódott fehérje szintekben is adódtak különbségek évtizedes edzés

hatására. Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív paraméterek jól mutathatják az egyén aktuális állapotát minden tekintetben, ezért vizsgáltuk sKL-val való kapcsolatukat. Ezen vizsgálat összefüggést mutatott ki szenior sportolók maximális kézi szorító ereje és a „fiatalság fehérjéje” között. A master sportoló csoportban, a sKL szintjének életkorral történő csökkenése mellett, a DNAmPhenoAge gyorsulásával negatív kapcsolatot, a DNAmGrimAge esetében pedig, ugyanolyan irányú tendenciát láttunk. A biológiai életkor ezen mutatói és sKL szintje között kimutatott összefüggés egy új mozaikdarab beillesztését teszi lehetővé a „nagy egészbe”, ami az öregedési kutatásokat illeti. Továbbiakban az öregedés egy másik markerét, a telomerhosszt vizsgáltuk master sportolóknál. Eredményeink alapján látható, hogy a telomer hosszának DNS metiláció alapján történő becslése érzékenyebb módszer, a telomer hossza és a fizikai fittség közötti kapcsolat vizsgálatára, mint az RT-PCR alapú TL hossz mérés. A telomerek hosszának az életkor előrehaladtával történő csökkenése a sport hatására „eltűnik”, vagyis feltételezésünk szerint a sport felülírja ezt. Ugyanez a hatás érvényesül a maximális kézi szorító erő, a VO₂max, a kognitív teszt eredményei, valamint az epigenetikai órák, a DNAmPhenoAge, és DNAmGrimAge, esetében is.

Hipotéziseinket megvizsgálva a következőket állapíthatjuk meg:

1. A „fiatalság fehérjét” vizsgálva feltételeztük, hogy:

1.1. Kapcsolat áll fent szenior sportolók “fiatalság fehérjéjének” szintje és a szervezet redox egyensúlya között. MEGTARTJUK

1.2. Az évtizedeken át végzett edzés módosítja a KL gén promóter régiójának metilációját, valamint szerepe van a sKL és a fizikai fittség kapcsolatában. RÉSZBEN MEGTARTJUK

1.3. Kapcsolat áll fenn a KL szintje és az epigenetikai órák között, és így a hormon szintje befolyásolhatja az epigenetikai öregedés gyorsaságát. RÉSZBEN MEGTARTJUK

2. A szenior korú sportolók telomerhosszát vizsgálva feltételeztük, hogy:

2.1. Az évtizedeken át tartó testedzés változást okoz a telomerek mért (TL) és becsült (DNAmTL) hosszában. MEGTARTJUK

2.2. A fizikai erőnlét/fittség szintje befolyásolja a telomer hosszakat. MEGTARTJUK

2.3. A kapcsolat módosul a telomerhosszak és epigenetikai órák között master sportolók esetében a kontroll csoporthoz képest. MEGTARTJUK

6. Saját publikáció jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Dora, Aczel ; Ferenc, Torma ; Matyas, Jokai ; Kristen, McGreevy ; Anita, Boros ; Yasuhiro, Seki ; Istvan, Boldogh ; Steve, Horvath ; Zsolt, Radak, 2023, The Circulating Level of Klotho Is Not Dependent upon Physical Fitness and Age-Associated Methylation Increases at the Promoter Region of the Klotho Gene, GENES 14 : 2 Paper: 525 , 12 p.

Seki, Yasuhiro ; Aczel, Dora ; Torma, Ferenc ; Jokai, Matyas ; Boros, Anita ; Suzuki, Katsuhiko ; Higuchi, Mitsuru ; Tanisawa, Kumpei ; Boldogh, Istvan ; Horvath, Steve et al., 2023, No strong association among epigenetic modifications by DNA methylation, telomere length, and physical fitness in biological aging., BIOGERONTOLOGY 24 : 2 pp. 245-255. , 11 p.

Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Jokai, Matyas ; Torma, Ferenc ; McGreevy, Kristen M. ; Koltai, Erika ; Bori, Zoltan ; Babszki, Gergely ; Bakonyi, Peter ; Gombos, Zoltan ; Gyorgy, Bernadett ; Aczel, Dora et al, (2023) DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation GEROSCIENCE: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN AGING ASSOCIATION (AGE) 45 : 5 pp. 2805-2817. , 13 p.

Bakonyi, Peter ; Kolonics, Attila ; Aczel, Dora ; Zhou, Lei ; Mozaffaritarab, Soroosh ; Molnár, Kinga ; László, Lajos ; Kutasi, Balazs ; Tanisawa, Kumpei ; Park, Jonguk et al 2023., Voluntary exercise does not increase gastrointestinal motility but increases spatial memory, intestinal eNOS, Akt levels, and Bifidobacteria abundance in the microbiome , FRONTIERS IN PHYSIOLOGY 14 Paper: 1173636

Aczel, Dora ; Gyorgy, Bernadett ; Bakonyi, Peter ; BukhAri, RehAn ; Pinho, Ricardo ; Boldogh, Istvan ; Yaodong, Gu ; Radak, Zsolt, 2022, The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer's Disease, ANTIOXIDANTS 11 : 5 Paper: 1028 , 16 p.

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

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

Takács, Ferenc ; Kardos, Ilona ; Czeti, Ágnes ; Aczél, Dóra ; Illés, Sarolta ; Balogh, Alexandra ; Gaál-Weisinger, Júlia ; Szalóki, Gábor ; Barna, Gábor, 2020, A minimális reziduális betegség vizsgálata krónikus limfoid leukémiában, HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 53 : 1 pp. 17-22. , 6 p.

Gángó, Ambrus ; Alpár, Donát* ; Galik, Bence* ; Marosvári, Dóra ; Kiss, Richárd ; Fésüs, Viktória ; Aczél, Dóra ; Eyüpoglu, Ediz ; Nagy, Noémi ; Nagy, Ákos et al., 2020, Dissection of Subclonal Evolution by Temporal Mutation Profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated With Ibrutinib, INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 146 : 1 pp. 85-93. , 9 p.

Aczél, Dóra ; Mátrai, Zoltán ; Kiss, Richárd ; Balogh, Alexandra ; Illés, Sarolta ; Bödör, Csaba; Alpár, Donát, 2019, Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában, HEMATOLÓGIA-TRANSZFUZIOLÓGIA 52 : 2 pp. 136-148. , 13 p.

Gango, Ambrus ; Alpar, Donat ; Galik, Bence ; Marosvari, Dora ; Kiss, Richard ; Fesus, Viktoria ; Aczel, Dora ; Nagy, Noemi ; Nagy, Akos ; Krizsan, Szilvia et al., 2019, Dissection of Subclonal Evolution by Temporal Mutation Profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated with Ibrutinib, CLINICAL LYMPHOMA MYELOMA & LEUKEMIA 19 pp. S279-S279. , 1 p.

Kiss, Richárd ; Alpár, D ; Gángó, Ambrus ; Nagy, Noémi ; Eyupoglu, Ediz ; Aczél, Dóra ; Matolcsy, András ; Csomor, Judit ; Mátrai, Zoltán ; Bödör, Csaba, 2019, Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia., HAEMATOLOGICA 104 : 1 pp. E38-E41.