

# Az IGF-1 és a rendszeres testedzés hatása az öregedés molekuláris folyamataira: a sirtuinok szerepe

Doktori értekezés

**Koltai Erika**

Semmelweis Egyetem  
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Monos Emil professor emeritus, D.Sc.

Dr. Pósa Anikó tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tihanyi József egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: † Dr. Frenkl Róbert professor emeritus, D.Sc.

Dr. Pucsok József egyetemi tanár, D.Sc.

Dr. Szabó Tamás igazgató, C.Sc.

Budapest  
2011

„Az ember érzi, amint derengeni kezd az agyában, hogy önálló gondolkodás nélkül csak tudálékosságra vezet a tanulás, és hogy a világ minden felhalmozott tudása azért jut el hozzánk, hogy világosabban tudjunk gondolkozni... Magunknak kell elrendeznünk a dolgokat akkor is, ha közben sokszor tévedünk, és csak oly ritkán van igazunk.”

*Eric Knight*

## Tartalomjegyzék

Ábrák és táblázatok jegyzéke.....	5
Rövidítések jegyzéke.....	7
<b>1. Bevezetés, irodalmi áttekintés.....</b>	<b>9</b>
1.1. Az öregedés.....	9
1.1.1. A szabadgyökök szerepe .....	9
1.1.2. A fehérjék oxidatív modifikációja.....	11
1.1.2.1. A fehérje karboniláció .....	11
1.1.2.2. A(z) ubiquitin-proteaszóma rendszer.....	13
1.1.3. A DNS sérülés és javítás .....	15
1.2. A sirtuin enzim család.....	17
1.2.1. A sirtuinek és a DNS sérülés kapcsolata .....	21
1.3. Az Insulin-like growth factor-1 (IGF-1).....	24
1.4. A fizikai aktivitás szerepe az öregedés folyamatára .....	27
1.4.1. A testedzés hatása a vázizomra .....	28
1.4.2. A testedzés hatása az agyra .....	29
<b>2. Célkitűzések és korlátozó tényezők.....</b>	<b>31</b>
2.1. A vizsgálat célja.....	31
2.2. Korlátozó tényezők .....	33
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>35</b>
3.1. Állatok és edzés protokoll.....	35
3.2. BrdU és IGF-1 adagolás .....	37
3.2.1. Bromo-deoxyuridine (BrdU) adagolása .....	37

3.2.2.	Az IGF-1 adagolása .....	37
3.3.	Morris Maze teszt .....	38
3.4.	Fehérjék mennyiségi analízise Western blot-tal .....	39
3.5.	Karbonilált fehérjék kimutatása.....	41
3.6.	SIRT1 aktivitásmérés.....	42
3.7.	NAD <sup>+</sup> /NADH szint mérése.....	43
3.8.	DNS sérülés és javítás mérése .....	43
3.9.	A Proteaszóma kimotripszinhez hasonló aktivitásának mérése .....	44
3.10.	A vérplazma IGF-1 szintjének mérése.....	45
3.11.	Az idegsejt képződés immunhisztokémiai vizsgálata .....	46
3.12.	Intrahelikális 8-oxodG becslése .....	47
3.13.	Az OGG1 és az AcOGG1 szint mérése .....	48
3.14.	Statisztikai elemzés .....	49
<b>4.</b>	<b>Eredmények.....</b>	<b>50</b>
4.1.	Az (A) vizsgálatból született eredmények – változások a gastrocnemius izomszövetben .....	50
4.1.1.	Az öregedés és az edzés is hatással van a SIRT1-re.....	50
4.1.2.	Az életkor függő, SIRT1-hez kapcsolt folyamatok edzéssel befolyásolhatóak .....	53
4.1.3.	A fizikai aktivitás növeli az ellenállást az oxidatív stresszel szemben.....	58
4.2.	A (B) vizsgálatból született eredmények – változások a hippocampális agyszövetben.....	63
4.2.1.	Az agyfunkció és az idegsejt képződés paradoxonja.....	63
4.2.2.	A DNS sérülés és javítás folyamata a hippocampusban.....	67

4.2.3. Az öregedés, edzés és IGF-1 befolyásolta sirtuin-változások a hippocampusban.....	71
<b>5. Megbeszélés.....</b>	<b>76</b>
5.1. A gastrocnemius izomból született eredmények értékelése (A).....	76
5.2. A hippocampális agyi régióból született eredmények értékelése (B).....	83
<b>6. Következtetések.....</b>	<b>91</b>
<b>7. Összefoglalás.....</b>	<b>93</b>
<b>8. Summary.....</b>	<b>94</b>
<b>9. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>95</b>
<b>10. Saját publikációk jegyzéke.....</b>	<b>115</b>
10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények.....	115
10.2. Független közlemények.....	116
Köszönetnyilvánítás.....	117

## Ábrák és táblázatok jegyzéke

### Ábrák

<b>1. ábra:</b> A szabadgyökök képződési folyamata .....	9
<b>2. ábra:</b> A SIRT1-hez kapcsolt folyamatok .....	19
<b>3. ábra:</b> Az IGF-1 3D szerkezete (A) és az általa mediált szignalizációs útvonal (B) .....	25
<b>4. ábra:</b> A vizsgálatban részt vett edző állatok edzés programja a hat-hetes protokoll során .....	36
<b>5. ábra:</b> Alzet pumpa felépítése .....	38
<b>6. ábra:</b> A SIRT1 mennyiség és aktivitás változása a szarkoplazmában öregedés és fizikai edzés hatására. ....	51
<b>7. ábra:</b> A sejtmagban lévő SIRT1 mennyiségének és aktivitásának változása fiatal és idős állatok vázizmában. ....	52
<b>8. ábra:</b> A NAMPT és a NAD <sup>+</sup> mennyiség változása a gastrocnemius izomban .....	54
<b>9. ábra:</b> AMP-Kináz (A,B) és phospho-AMP-Kináz (C,D) változása öregedés és edzés hatására .....	55
<b>10. ábra:</b> PGC-1 $\alpha$ mennyiségének változása az egyes állat csoportokban .....	56
<b>11. ábra:</b> Az acetilált fehérjék mennyiségi változása az izom sejtmagjában .....	57
<b>12. ábra:</b> UCP3 szint változása a vizsgálati csoportokban. ....	58
<b>13. ábra:</b> Karbonilált fehérjék mennyiségi változása öregedés és edzés hatására .....	59
<b>14. ábra:</b> Az OGG1 és a SIRT6 mennyisége és aktivitása az inaktív és edző, fiatal és idős állatokban. ....	60
<b>15. ábra:</b> Az öregedés növeli a HIF-1 $\alpha$ és a VEGF szintet, melyet a fizikai edzés szignifikánsan csökkentett. ....	62
<b>16. ábra:</b> Az öregedés hatása a proteaszóma kimotripszinhez hasonló aktivitására .....	63
<b>17. ábra:</b> Az IGF-1 mennyisége a keringő vér plazmában .....	64
<b>18. ábra:</b> A Morris Maze teszt eredményei a fiatal és az idős állat csoportokban .....	65
<b>19. ábra:</b> A neurogenesis mértékének meghatározása a BrdU és a NeuN pozitív sejtek kimutatásával .....	66

<b>20. ábra:</b> A 8-oxoG mennyiség öregedés hatására növekszik az immunohisztokémiai mintaelemzések alapján.....	67
<b>21. ábra:</b> Az OGG1 mennyisége növekedést (A), acetiláltsága jelentős csökkenést (B) mutat öregedés hatására.....	69
<b>22. ábra:</b> A Ku70 javító enzim mennyiségi változása öregedés, edzés és IGF-1 kezelés hatására .....	70
<b>23. ábra:</b> A deacetilátor SIRT1 és az acetilált fehérjék változása a hippokampális agyszövetben .....	72
<b>24. ábra:</b> A SIRT3 fehérje mennyiségének változása a vizsgálati csoportokban.....	73
<b>25. ábra:</b> A PGC-1 $\alpha$ mennyisége nem mutat változást a vizsgálati kezelések hatására.....	74
<b>26. ábra:</b> A Laktát-dehidrogenáz enzim mennyisége nő öregedés hatására.....	75
<b>27. ábra:</b> A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása.....	82
<b>28. ábra:</b> A vázizomban lezajló változások hipotetikus modellje .....	83
<b>29. ábra:</b> A hippokampuszból született eredmények összefoglalása .....	89
<b>30. ábra:</b> Az agyban végbemenő folyamatok hipotetikus modellje .....	90

## Táblázatok

<b>1. táblázat:</b> Az (A) vizsgálatban alkalmazott elsődleges antitestek.....	40
<b>2. táblázat:</b> A (B) vizsgálatban alkalmazott elsődleges antitestek.....	41

## Rövidítések jegyzéke

8-oxoG	8-oxo-7,8 dihydroguanine
AcOGG1	Acetilált-8-oxoguanin DNA glikoziláz
AMPK	Adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
AP endonukleázok	Apurin/apirimidin endonukleázok
APE1	Humán AP endonukleáz 1
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BER	Base Excision Repair
BrdU	Bromo-deoxyuridine
CAT	Kataláz
CR	Kalória visszafogás (Caloric Restriction)
Cu,Zn-SOD	Réz-cink-SOD
DBS	Dupla szálú DNS törés (Double-strand break)
DNA-PK	DNS dupla szálú törést javító faktor (DNA-dependent protein kinase)
DNP	Dinitrophenylhydrazone
DNPH	Dinitrophenylhydrazine
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
G:C	Guanin-citozin bázispár
GPX	Glutation-peroxidáz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrogén-peroxid
HDAC	Hisztin deacetilázok (Histone deacetylases)
HIF-1 $\alpha$	Hipoxia indukálta faktor (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )
HRP	Horseradisch peroxidase
HSP	Hő sokk fehérje (Heat Shock Protein)
IGF-1	Inzulinhoz hasonló növekedési faktor 1 (Insulin-like growth factor 1)
IP	Intra peritoneális
IR	Inzulin receptor
KDAC	Lizin deacetilázok
LDH	Laktát-dehidrogenáz
Mn-SOD	Mangán-SOD
mtDNS	Mitokondriális DNS
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAMPT/PBEF/Visfatin	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NER	Nucleotide Excision Repair
NeuN	Neuronal Nuclei



NF-κB	Nuclear factor κB
NGF	Nerve growth factor
NO	Nitrogén-oxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Szuperoxid
OC	Öreg kontroll csoport (Old Control)
OE	Öreg edzett csoport (Old Exercised)
OEI	Öreg edzett+IGF-1 kezelt csoport (Old Exercised+IGF-1 treated)
OGG1	8-oxoguanin DNA glikoziláz
OH <sup>-</sup>	Hidroxil gyök
ONOO <sup>-</sup>	Peroxi-nitrit
PAR	Poly -ADP-ribose
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Foszfát puffer (Phosphate buffered saline)
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
(phosph/p-)AMPK	(foszfo-)Adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1a
PVDF membrane	Polyvinylidene Fluoride membrane
RNS	Ribonukleinsav
ROS	Reaktív oxigén gyökök (Reactive Oxygen Species)
SDS-PAGE	Sodium Dodecil Sulfate-polyacrilamide gel electroforesis
Sir2/sirtuin	Silent mating-type information regulation 2
SIRT1-7	Humán Sir2 homológok
SOD	Superoxid-dizmutáz
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween 20
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial
UCP3	Mitochondrial uncoupling protein 3
VEGF	Vaszkularizációt indukáló faktor (Vascular endothelial growth factor)
YC	Fiatal kontroll csoport (Young Control)
YE	Fiatal edzett csoport (Young Exercised)
YEI	Fiatal edzett+IGF-1 kezelt csoport (Young Exercised+IGF-1 treated)

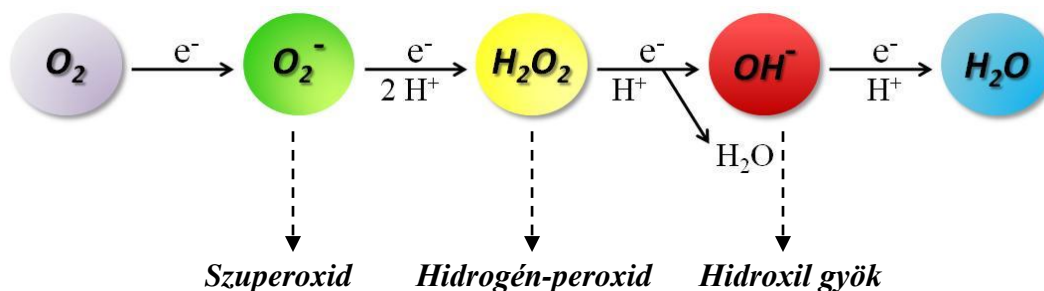
# 1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

## 1.1. Az öregedés

### 1.1.1. A szabadgyökök szerepe

Az öregedés egy olyan generalizált folyamat, mely a természetben előforduló összes élő szervezetnél megfigyelhető. Az életkor előrehaladtával a legtöbb szerv funkciója csökken, számos betegség előfordulása pedig fokozódik, sőt néhányukat egyenesen az öregedéssel együtt járó változások idéznek elő. Ezek következtében azonban az élet minősége is jelentős romlást mutat. Felmerül a kérdés, hogy ez vajon késleltethető, esetleg megelőzhető-e?

Többféle elmélet létezik az öregedési folyamat magyarázatára. Jelen dolgozatban azonban nem célunk valamennyit tárgyalni, csupán arra térünk ki, ami a témakörhöz szorosan kapcsolódik, s mely mindemellett az egyik legelfogadottabb feltételezés is, a szabadgyökös elmélet (Harman 1956). A szervezetben fiziológias körülmények között több helyen is termelődnek szabadgyökök. Termelődésük egyik fő helye a sejt energiatermelő központja, a mitokondrium, ahol a légzési lánc során, az oxigénből ATP termelődés mellett víz képződik (1. ábra). Ez a folyamat a következőképpen írható le:



1. ábra  
A szabadgyökök képződési folyamata

A reakció során a köztes termékek körülbelül 2%-a „megszökik” a rendszerből. Ezek a molekulák a szabadgyökök, melyeknek külső elektronhéja telítetlen és ez lehetővé teszi extra elektron belépését, ami a legfontosabb tulajdonságukat, a nagy reakciókészségüket kölcsönzi számukra. Nagy reaktivitásuk következtében keletkezési helyük közelében, a másodperc tört része alatt reakcióba lépnek a körülöttük lévő molekulákkal, a sejt alkotóelemeivel, a fehérjékkel, zsírokkal vagy akár a DNS-sel. Ez a találkozás a sejt alkotóelemei számára általában nem előnyös, mivel ezek a reaktív oxigén gyökök (ROS – Reactive Oxygen Species) a sejtalkotók funkcióját rontják, szélsőséges esetben pedig a sejt halálát okozhatják. Nagy reaktivitásuk révén oxidánsként hatnak környezetükre, így ha a mennyiségük felszaporodik, a fiziológiásan redukált állapotú sejt millió oxidált irányba tolódik el.

A sejt rendelkezik azonban antioxidáns rendszerrel, mely védelmet jelent a szervezet számára a szabadgyökök túlzott felszaporodásával szemben. Ez a rendszer egy belső, szervezeten belül termelődő, enzimatis, illetve egy külső, a táplálkozással bejuttatható, nem-enzimatis részből tevődik össze. Az enzimatis részhez tartozik a DNS-be kódolt antioxidáns enzim rendszer, mely olyan gyökfogó enzimeket foglal magába, mint a kataláz (CAT), a glutation peroxidáz (GPX), vagy a szuperoxid-dizmutáz (SOD), melyek a már ismert szabadgyök keletkezési folyamatban katalizátorként segítik elő a reaktív oxigén gyökök detoxifikálását. Ebben a folyamatban a szuperoxid-dizmutáz a szuperoxidot hidrogén peroxiddá, míg a kataláz és a glutation peroxidáz a  $H_2O_2$ -ot vízzé alakítja. A sejtben SOD enzimnek két típusa ismeretes, a SOD1, azaz a réz-cink-SOD (Cu,Zn-SOD) és a SOD2, a mangán-SOD (Mn-SOD) (McCord és Fridovich 1968). A Cu,Zn-SOD a sejt plazmában, míg az Mn-SOD a mitokondriumban alakítja a szuperoxidot hidrogén peroxiddá. A sejten kívül helyezkedik el az EC-SOD (Marklund 1990). A CAT és GPX a sejt plazmában és mitokondriumban is megtalálható. Az antioxidáns rendszer nem enzimatis részéhez különböző antioxidáns hatású anyagok tartoznak, mint a C-vitamin, az E-vitamin, a karotinoidok, vagy a húgysav, melyek az enzimatis résszel összhangban a szabadgyökök káros hatásaitól védik a szervezetet.

A szabadgyökök azonban nem csak kártékonyak, ahogy felfedezésük után sokáig gondolták. Ma már tudjuk, hogy kis mennyiségük szükséges bizonyos jelátviteli folyamatokhoz. Az oxidált milió aktiválhat több redox érzékeny transzkripció faktor és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelzőmolekulaként is működik. A gond akkor jelentkezik, ha felborul az egyensúly a szabadgyök mennyiség és a védekező mechanizmusok szintje között. Ezt az állapotot nevezzük oxidatív stressznek, melynek oka lehet a szabadgyökök túlzott termelődése, vagy az antioxidáns rendszer „mennyiségének” vagy aktivitásának nem kielégítő volta. Ez a zsírok, fehérjék és a DNS növekvő oxidatív módosulását eredményezi, ami csökkenő szintű fiziológiás funkciókkal jár együtt (Carney és mtsai 1991, Gredilla és mtsai 2010, Liu és mtsai 2011, Yang és mtsai 2010) és a szervezet leépülését eredményezi. Ez a megfigyelés jelenti az alapját a szabadgyökökhöz kapcsolódó öregedési elméletnek.

### *1.1.2. A fehérjék oxidatív modifikációja*

#### 1.1.2.1. A fehérje karboniláció

Az oxidatív sérülések a fehérjék esetében a karbonil kötések felszaporodásának formájában jelentkeznek, melyek a fehérjék funkcióját károsíthatják. Más oxidáns termékekhez viszonyítva a fehérjéken kialakuló karbonil csoportok mérése relatíve könnyű, mivel az oxidatív károsító folyamat korai szakaszában kialakulnak és a képződött karbonilált fehérjék viszonylagosan stabilak. A karbonil csoportok kimutatását 2-4-dinitrophenylhydrazine-nal (DNPH) végzett származékképzéssel történik, melyből a reakció során keletkező dinitrophenylhydrazone (DNP) termék spektrofotometriás eljárással, ELISA-val (Enzyme-linked immunosorbent assay), vagy Western blot módszerrel egyaránt detektálható. Mennyiségük felhalmozódása figyelhető meg olyan betegségekben is, mint az Alzheimer kór, a reumatoid arthritisz, a diabetes, a szepszis, a krónikus vese elégtelenség vagy a légzési distressz szindróma (Dalle-Donne és mtsai 2003).

A széles körben végzett humán és állatkísérletek során különböző szövetekben vizsgálták a fehérje oxidatív károsodásának mértékét. A karbonil csoport, mint jelentős oxidatív stresszt jelző biomarker mennyiségének változását írták le szuper marathón futóversenyt követően a vérben és a vizeletben egyaránt. Az extrém fizikai terhelés akut hatásaként a vizeletben jelentkező proteinuria mellett a vér és vizelet fehérjék magas karbonilációs és nitrotirozin szintjét figyelték meg a verseny első napját követően, mely szint platót ért el a második, harmadik és negyedik napon (Radak és mtsai 2003). Ugyan ez a munkacsoport rendszeres edzés hatására vázizomban bizonyos fehérjék karbonilációjának csökkenését találta, ami a fizikai aktivitás indukálta oxidatív stressz válasz adaptációjának bizonyítéka (Radak és mtsai 1999). Ugyancsak a rendszeres edzés oxidatív stressz-adaptációs képességét mutatja az a vizsgálat, melyben egy iszkémia-reperfúziót követően a rendszeresen fizikai aktivitást végző állatoknál a szív balkamrai fehérje karbonilációs szintje jelentősen alacsonyabb volt, mint a nem edző társaik esetében (Le Page és mtsai 2009).

Az öregedés hatására létrejövő változásoknál az irodalmi adatokat tanulmányozva a különböző szövettípusok esetében döntően növekedést tapasztalunk az oxidatív fehérje sérülés mértékében. Patkányok lábszár ináiban öregedés hatására az oxidatív sérülések felhalmozódásának jeleként növekvő karbonil koncentrációt mutattak ki, amit a diétás megkorlátások részben csökkenteni tudtak (Radak és mtsai 2002b). A szívizomban öregedés hatására szintén nagy növekedést figyeltek meg a karbonilációs szintben (Szczesny és mtsai 2010). A vázizom esetében a kép azonban vegyes. Néhány vizsgálat nem mutatott ki változást a vázizom karbonil szintjében öregedés hatására (Radak és mtsai 2002a, Radak és mtsai 2002b), míg mások, a többi szövethez hasonlóan a fiatalokhoz képest emelkedést írtak le idős patkányok gastrocnemius izmában (Breusing és mtsai 2009, Thomas és mtsai 2010). Le Page és munkatársai agyszövetből végzett vizsgálataik során nem találtak különbséget a fehérje karbonilációban az öreg és fiatal állatcsoportok között (Le Page és mtsai 2009). Ennek magyarázatát az agy szövettípusok közti speciális helyzete adhatja, mivel ismeretes, hogy az agyszövet vérellátása, oxigenizációja viszonylagos állandóságot mutat nyugalmi állapotban és fizikai terhelés alatt egyaránt.

### 1.1.2.2. A(z) ubiquitin-proteaszóma rendszer

Az oxidatív fehérje sérülés felhalmozódásának egyik oka a sérült fehérjék lebontásának csökkenése, melyet a proteaszóma rendszer aktivitása befolyásol. A fehérje degradáció központi szerepet játszik sok sejt funkcióban. A használhatatlanná vált, vagy sérült fehérjék eltávolítodnak a sejtől a toxicitás elkerülése érdekében. Eukarióta sejteknek két fő útvonala van a használhatatlanná vált, vagy toxikus fehérjék lebontására: a) a(z) ubiquitin-proteaszóma rendszer, mely a sejt plazmában, a sejtmagban és különböző sejtrégiókban egyaránt megtalálható, illetve b) az autofágiás-lizoszómális útvonal, mely csak a citoplazmában van jelen. A két rendszer közül az első a jelentősebb, amit az elhelyezkedése is bizonyít, illetve, hogy ez az a rendszer, mely a sejt irányító központjának, a sejtmag stabilitásának megőrzéséért is felelős (Li és Li 2010).

A proteaszóma legáltalánosabb megjelenési formája a 26S proteaszóma, mely egy 2.5 megadalton súlyú multiprotein komplex. Két funkcionális egységből tevődik össze. A „magját” képezi egy 20S alegység, melyhez egyik, vagy mindkét végén kapcsolódik a 19s szabályozó alegység. Három fajta proteolitikus aktivitással, kimotripsinhez hasonló, tripszinhez hasonló és kaszpázhoz hasonló aktivitással rendelkezik, melyek a 20S alegységben találhatóak. A lebontó folyamat során a lebontásra ítélt fehérjékhez először egy ubiquitin kapcsolódik, mely jelzőként szolgál a proteaszóma számára a lebontáshoz. A folyamat első lépéseként a(z) ubiquitin egy ATP-függő reakcióban aktiválódik a(z) ubiquitin-aktiváló enzim (E1) által. Ezt követően az aktivált ubiquitin a(z) ubiquitin konjugáló enzimhez (E2) kapcsolódik, majd elszállítódva egy ubiquitin protein ligáz (E3) kapcsolja a szubsztrát fehérjéhez, melynek során izopeptid kötés alakul ki a(z) ubiquitin C vége és a szubsztrát fehérje belső lizin gyöke között. Általában többszörös ubiquitináció (ubiquitin lánc) szükséges a lebontó folyamat megindításához. A felcsavarodott fehérje szerkezetek kiegyenesítését hő sokk fehérjék (HSP) végzik, így a proteaszóma képes bekebelezni a hosszú aminosav struktúrából álló fehérje láncokat is.

A proteaszóma tehát fő funkcióként a fehérje degradációért, s ezáltal a homeosztázis fenntartásáért felelős. Részt vesz a sejtciklus fehérjéinek, tumor szupresszoroknak,

transzkripciós faktoroknak, gátló, vagy sérült fehérjéknek az eltávolításában. Öregedéssel a mitokondrium funkciója fokozatos csökkenést mutat, ami együtt jár a mitokondriális DNS (mtDNS) növekvő mutációjával a szöveti sejtekben. Ez eredménytelen ATP képzéshez és növekvő ROS termeléshez vezet. Gyenge fokú oxidáció esetén a proteaszómális degradáció fokozódik, magasabb oxidáns szint azonban már gátlólag hat a proteaszóma lebontó funkciójára. Mivel az ATP-stimulált 26S proteaszóma érzékeny az oxidált miliőre, a proteaszóma maga is érintett az oxidatív stresszben. A nem degradált protein aggregátumok ugyanis képesek a proteaszómához kapcsolódni, ezáltal rontják a lebontásra váró fehérjék eliminálását (Li és Li 2010).

Az irodalmi adatokban általános tendenciát mutat a proteaszóma aktivitás öregedéssel együttjáró csökkenése a különböző szövetekben. Radák és munkatársai patkányok láb ináiban az öregedéssel növekvő karbonil mennyiség mellett proteaszóma aktivitás csökkenést írtak le, amire a diétás megszorítások preventív hatással voltak (Radak és mtsai 2002b). Az adatok a vázizomban is általánosságban csökkenést mutatnak az idős életkorban (Strucksberg és mtsai 2010), míg a fizikai aktivitás növekedést előidéző hatása fiatal és idős korban egyaránt bizonyítást nyert (Radak és mtsai 1999). A tüdő és májzsövetben mért proteaszóma aktivitás is követi az általános trendet, az öregedéssel csökkenő aktivitási szintet mutat (Breusing és mtsai 2009). Egy 2005-ben patkányokon, egereken és selyemmajmokon végzett vizsgálat szerint a patkányok és egerek agyának különböző régióiban csökkent proteaszóma aktivitás figyelhető meg, a selyemmajmok összes vizsgált agyi területén viszont egyöntetű az aktivitás életkorral együttjáró növekedése (Zeng és mtsai 2005). Ez a vizsgálat alátámasztja azt a feltételezést, hogy a proteaszómát érintő öregedés függő változások mégsem annyira homogének. Az életkorral együttjáró nagy mennyiségű izomtömeg vesztes (szarkopénia) általánosan elfogadott megfigyelés. Ezt a tényt azonban nagyon nehéz összeegyeztetni egy csökkenő proteolitikus tevékenységgel. Ezzel összhangban Altun és munkacsoportja öregedés hatására a vázizomban két-háromszoros növekedést talált a proteaszóma mennyiségében, és ennek a megnövekedett enzim mennyiségnek a(z) ubiquitin függő és független aktivitása is magasabb volt, így a várakozásokkal ellentétben az idős izomszövetben jelenlévő nagy

mennyiségű proteaszóma aktivitása megtartott. A megfigyelést az is alátámasztja, hogy a fiatal állatoknál mesterségesen előidézett izom atrófia esetén jelentős ubiquitinációs és proteaszómális növekedés tapasztalható (Altun és mtsai 2010).

Itt meg kell jegyezni, hogy a fehérjék karbonilációja önmagában marker lehet a proteaszóma számára a szubsztrát felismeréshez. Az aminosavak karbonilációja miatt megváltozik a fehérjék hidrofóbicitása, és ez önmagában, ubiquitináció nélkül is jelzést ad a lebontásra. Ez rendkívül fontos, hiszen ATP felhasználás nélkül is biztosítja az oxidált fehérjék mihamarabbi lebontását (Grune és mtsai 1997). Így a normálisan működő proteaszóma rendszer megakadályozhatja az oxidált fehérjék felszaporodását. Az öregedésre csökkenő proteaszóma aktivitás ezért veszélyes, mert együtt jár az oxidált fehérjék nagy mennyiségű felhalmozódásával.

### *1.1.3. A DNS sérülés és javítás*

Az örökítő anyag - szerepéből és funkciójából adódóan - integritásának és tisztaságának megőrzése jelenti a szervezet számára a prioritást. Ez olyannyira így van, hogy a sejt apoptózissal, azaz programozott sejthalállal elpusztítja önmagát, ha DNS-ét olyan mértékű sérülés érte, mely a replikáció révén továbbadva súlyos elváltozásokhoz vezetne,. A DNS-ben megmaradó sérülések azonban mutációhoz vagy a sejt halálához is vezethetnek. Irodalmi adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a védekező mechanizmusok ellenére egy nap körülbelül százezer sérülés éri egy sejt DNS-ét, így az antioxidáns rendszer mellett a szervezetnek szüksége van javító mechanizmusokra, melyek a már kialakult sérülések kijavításáért felelősek. A DNS esetében a javító mechanizmusokat működési elvük alapján két csoportra oszthatjuk. Azok az enzimek, melyek a DNS kettős  $\alpha$ -hélix láncából a sérült nukleotid egységet vágja ki, a NER (Nucleotide Excision Repair) csoportba tartoznak, míg csak a sérült bázis kivágásáért a BER (Base Excision Repair) enzim csoport tagjai felelősek. A javító enzimek hatásaként a napi százezer DNS sérülésből körülbelül egy marad meg. A megmaradó sérülések az idő előrehaladtával akkumulálódnak



és egyre inkább útját állják a fiziológias sejt mechanizmusoknak. A humán genom méretének ismeretében ez a szám nem lenne igazán jelentős, a teljes szervezetet felépítő sejt mennyiséget és az életünk végéig eltelt napokat számba véve azonban már belátható a szabadgyökös öregedési elmélet létjogosultsága.

A DNS nagymértékű sérülése pro-apoptotikus és DNS javító fehérjék aktivációjához vezet, majd a sérülés nagyságától és a javító mechanizmus sikerességétől függően a sejt vagy életben marad, vagy meghal (Lovell és Markesbery 2007, Rass és mtsai 2007, Yang és mtsai 2010). A 8-oxo-7,8 dihydroguanine (8-oxoG) az egyik legnagyobb mértékben keletkező ROS-függő DNS sérülés típus, ami a mutagenézisben is érintett (Damsma és Cramer 2009, Lu és Liu 2010, Thomas és mtsai 1997), és érintheti a genomiális, a mitokondriális vagy a telomerális DNS-t, illetve az RNS-t is. Ez a sérülés típus a DNS guanin bázisából képződik. Más DNS sérülésekhez viszonyított nagy számának oka lehet, hogy a guanin-citozin (G:C) bázispár előfordulási aránya az evolúció magasabb fokán álló, állandó testhőmérsékletű, döntően aerob energianyerésű élőlényeknél jóval magasabb, illetve, hogy a két bázis között fennálló háromszoros kötés az adenin-timin (A:T) bázispárhoz viszonyítva nagyobb stabilitást biztosít, ami előnyt jelent az élőlény számára (Naya és mtsai 2002, Sueoka 1962). A sérülésre való érzékenységet bizonyítja azonban, hogy a guaninnak a legalacsonyabb a redox potenciálja a DNS bázisok között, ami kiemelkedően nagy vonzó erőt jelent a szabadgyökökre. Emlősökben a 8-oxoguanin DNA glikoziláz (OGG1) az a specifikus javító enzim, mely egy BER reakció révén képes kivágni a 8-oxoG-t, hogy a sejt elkerülje a transzverziót, vagy a DNS sérülés indukálta apoptózist. A sérült bázis eltávolítása után a DNS-ben az abázikus hely alakul ki, ahol tehát sem purin, sem pirimidin bázis nem található. Ezen a helyen fejtik ki hatásukat a DNS sérülésjavító mechanizmus következő elemei, az AP (apurin/apirimidin) endonukleázok, melyek közül humánban csak egyetlen típust írtak le, az APE1-et. Ez az enzim, az abázikus helyen hasítja a DNS cukor-foszfát láncát, létrehozva egy 3' hidroxil-5' deoxiribózfoszfát véget, majd polimerázok és ligázok új nukleotidot/nukleotidokat szintetizálnak a javítandó területre. A javítatlan abázikus hely mutációt okozhat a szemikonzervatív replikáció révén. Megfigyelték azonban, hogy az OGG1 knockout állatok nagy mennyiségű 8-oxoG-t

halmoznak fel DNS-ükben, de nem élnek rövidebb ideig, mint vad típusú társaik, nem fejlesztenek ki patológiás elváltozásokat, tumort, sőt növekvő gyulladással rezisztenciával rendelkeznek. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a 8-oxoG optimális szintje a DNS-ben és az RNS-ben szükséges a normál fiziológiás működéshez, pufferként enyhíti az oxidatív stressz hatást a DNS-ben, valamint traszkripció és kromatin relaxációs funkciót is betölt (Radak és Boldogh 2010). A fokozódó oxidatív sejt metabolizmusnak így kedvező hatásai is lehetnek, mely egybevágh a fizikai aktivitás során kifejlődő oxidatív stressz állapot kedvező adaptációs hatásával. A 8-oxoG mennyiségének hatásmechanizmusában is megfigyelhetjük ezáltal a fordított U vagy J alakú hormézis görbét, mely sok, kizárólag káros hatású anyagként számon tartott tényező esetén bizonyított már. Igaz ez például a reaktív oxigén gyökök, vagy az aminosavak oxidatív sérülés során kialakuló karbonilációjának mennyiségére is. A 8-oxoG mennyisége az öregedéssel növekedést mutat, míg a javító enzim aktivitása hanyatlik (Radak és Boldogh 2010) A legújabb irodalmi adatok szerint az OGG1 aktivitásának változását a legtöbb enzimmel ellentétben nem a foszforiláció, hanem az acetiláció aktiválja. In vitro kísérletben bizonyították, hogy az OGG1 Lizin 338/341 gyök acetilációja a p300 fehérje révén indukálható, ami szignifikánsan megnövelte az enzim aktivitását. A vizsgálatból született eredmények alapján feltételezik, hogy az acetiláció *in vivo* körülmények között is képes az aktivitás növelésére. Embriónális fibroblaszt sejteken oxidatív stressz hatására 2,5-szörös növekedést tapasztaltak az OGG1 acetilációjában (Bhakat és mtsai 2006).

## **1.2. A sirtuin enzim család**

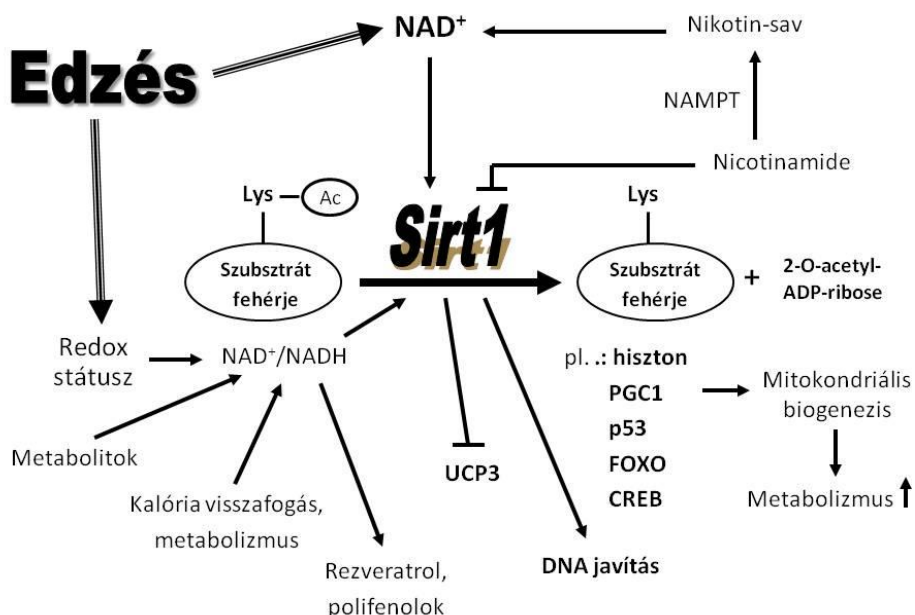
Tanulmányok olyan közös szabályozó mechanizmusokat tártak fel, melyek magukban foglalják a genetikai integritás megtartását, az inzulinhoz hasonló növekedési faktor-jelzőrendszer (IGF) és a silent information regulator (sirtuin) csoportot; melyek kölcsönösen hatnak egymásra, többszintű mechanizmusok révén hatással vannak a programozott sejthalálra, így felelősnek látszanak az élettartamért, és befolyásolnak olyan komplex mechanizmusokat, mint az öregedési folyamat. A legújabb kutatási eredmények

azt sugallják, hogy ezen faktorok között a sirtuinek kiemelkedően fontos szabályozói az öregedési folyamatnak az egysejtű organizmusoktól az emlősökig (Imai 2009).

A hiszton deacetilázok (HDAC), melyek a hiszton lizin aminosaván lévő acetyl csoportok eltávolítását végzik, négy csoportra oszthatók. A legfrissebb adatok alapján a hiszton deacetilázok elnevezése HDAC-ról lizin deacetilázra (KDAC) módosul, ami jelzi a szubsztrát csoport kibővülését számos nem-hiszton fehérjével. Ezek a deacetilázok szinte minden szövetben jelen vannak, normálban és a malignusban egyaránt, szövet specifikus expressziós mintázattal. A HDAC/KDAC csoport harmadik osztályát képezik a sirtuinek. Az élesztőben felfedezett Sir2 (silent mating-type information regulation 2) génnek hét homológját azonosították emlősök esetében (SIRT1-7), valamint kimutatták, hogy működésük nagyban függ a nikotinamid adenine dinucleotide-tól ( $NAD^+$ ), melynek révén szoros kapcsolatban állnak a metabolizmussal, az energia termeléssel és a DNS javító mechanizmusokkal (Imai és mtsai 2000, Lombard és mtsai 2008). Elhelyezkedésüket tekintve a SIRT1 és 2 a citoplazmában és a sejtmagban is megtalálható; a SIRT3, 4 és 5 a mitokondriumban van jelen, a SIRT6 és 7 pedig csak a sejtmagban lokalizálódik. Míg más fehérje deacetilázok csak hidrolizálják az acetyl lizin gyököt, addig a sirtuin vezérelte deacetilációnál a lizin deacetilációhoz  $NAD^+$  hidrolízise is társul. A folyamat során o-acetyl-ADP-ribose, nikotinamid és deacetylált szubsztrát keletkezik, amik végtermék gátlással hatnak a sirtuin aktivitására. A  $NAD^+$ -nak a sirtuin hatásmechanizmusában játszott fontos szerepét támasztja alá a nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT, más néven PBEF vagy Visfatin) mennyiség/aktivitási szintje, mely a  $NAD^+$  bioszintézisét végző enzim, ami megnöveli a vaszkuláris simaizom sejtek replikatív élettartamát a SIRT1 aktiválásán keresztül (van der Veer és mtsai 2007). A  $NAD^+/NADH$  arány is tükrözheti a sejt illetve szervezet redox státuszát. Bebizonyították, hogy a szabadgyökök (ROS) befolyásolják a sirtuinek aktivitását (Furukawa és mtsai 2007).

A SIRT1 tehát képes befolyásolni az öregedési folyamatot és sok, az öregedéssel együtt járó betegséget, beleértve metabolikus zavarokat, mint a diabetes, vagy olyan neurodegeneratív kórokat, mint az Alzheimer vagy a Parkinson betegség, illetve a rákot és az osteoporózist is. Az öregedési folyamat részben az erőteljes deacetyláló funkciót betöltő

SIRT-ek révén valósul meg (Porcu és Chiarugi 2005). Például a kromoszómák felépítésében résztvevő hisztonok lizin részének SIRT általi deacetilálása egy zárt kromatin alakzatot hoz létre, és ezáltal a transzkripciós folyamatok lecsendesítését (silent funkció) eredményezi (Shahbazian és Grunstein 2007). A hiszton deacetiláció mellett a SIRT1 számos transzkripciós faktort céloz meg, mint a nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a p53-as fehérje és a peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1a (PPAR- $\gamma$ ), amik szerepet játszanak a gyulladás, az apoptózis, a mitokondriális biogenezis és a vázizom differenciálódás folyamataiban (Fulco és mtsai 2003, Lavu és mtsai 2008, Radak és mtsai 2004) (2. ábra).



**2. ábra**  
*A SIRT1-hez kapcsolódó folyamatok*

A sejtek belső környezetében a redox állapot életkorral együtt járó oxidált milió felé tolódása jól jellemezhető a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  aránnyal, ami úgy tűnik, hatással van a  $\text{NAD}^+$  függő sirtuinek aktivitására. Így a megnövekedett szabadgyök szint befolyásolja a SIRT1

expresszióját (Fulco és mtsai 2003, Hipkiss 2008) és az életkorral együtt járó, szövetfüggő SIRT1 aktivitás változását (Kwon és Ott 2008). A SIRT1 a SIRT6-hoz hasonlóan a DNS javító mechanizmus szabályozója (Mostoslavsky és mtsai 2006, Oberdoerffer és mtsai 2008, Wang és mtsai 2008). SIRT6-deficiens egerek olyan degeneratív elváltozásokat mutatnak, amik megegyeznek az öregedéssel együtt járó abnormalitásokkal, mint amilyen a genetikai stabilitás megtartásának hiányossága (Mostoslavsky és mtsai 2006). A SIRT6 deficiencia emellett egerekben a DNS javító BER befolyásolása révén rövidebb élettartamhoz vezet, és az öregedéshez hasonló degeneratív fenotípus kialakításáért felelős. SIRT6 knockout sejt vonalon pedig a DNS sérülésre való hiperérzékenységet mutattak ki. Sérülés bekövetkezése esetén a SIRT6 makromolekuláris komplexet képez a DNS dupla szálú törést (DSB – double strand break) javító faktorról (DNA-PK – DNA-dependent protein kinase), és elősegíti a DSB javítását, valamint a kromatinhoz kapcsolódva akut csökkenést idéz elő a sejt teljes hiszton lizin acetilációjában. A SIRT6 DNS sérülés javításában játszott molekuláris mechanizmusai azonban még jórészt ismeretlenek (McCord és mtsai 2009).

A sirtuinek NAD-függő hiszton deacetilázok, melyek a sejt redox állapotát jelentősen képesek befolyásolni. Általánosságban anti-apoptotikus és sejt túlélést segítő hatással rendelkeznek (Jung-Hynes és Ahmad 2009, Puca és mtsai 2010). A SIRT1 és SIRT6 fehérjék szerepet játszanak a DNS sérülés javításában (Jeong és mtsai 2007, McCord és mtsai 2009, Michan és mtsai 2010, Rodgers és Puigserver 2006, Wang és mtsai 2008, Yamagata és Kitabayashi 2009, Yamamori és mtsai 2010). Több tudományos közlemény is leírta, hogy az acetiláció/deacetiláció *in vivo* körülmények között megváltoztatja az OGG1, a Ku70 és a human AP-endonuclease (APE1) aktivitását (Bhakat és mtsai 2003, Bhakat és mtsai 2004, Sundaresan és mtsai 2008, Szczeny és mtsai 2004), ami jelentősen befolyásolja a DNS javítást, s ezáltal a sejt sorsát.

A kalória visszafogás (CR) ismert, mint anti-apoptotikus hatású tényező, mely humán sejtekben a SIRT1 növekvő expressziójával társul, amit azonban az IGF-1 adagolás csökkent (Cohen és mtsai 2004). Leírták, hogy a Ku70 SIRT1 által előidézett deacetilációja csökkenti az apoptózist és elősegíti a sejt túlélést (Cohen és mtsai 2004). Jóllehet, széles

körben elfogadott, hogy a kalória visszafogással összefüggő inzulin/IGF-1 útvonal kontrolálás az egyik kulcs tényező, melynek révén a CR növelni képes a maximális és átlag életkort a rágcsálóknál (Fontana és mtsai 2010, Herrick 1991).

Másrésről úgy tűnik, hogy az agyra, arra a szervre, mely az egyik legmagasabb metabolikus rátával rendelkezik, az IGF-1 által közvetített szignalizációs útvonalak kedvező módon hatnak (Di Giulio és mtsai 2000, Llorens-Martin és mtsai 2009). Friss irodalmi adatok azt mutatták ki, hogy a SIRT1 nagymértékben részt vesz a memória folyamataiban, döntő szerepét SIRT1 knockout állatmodellben bizonyították (Gao és mtsai 2010, Michan és mtsai 2010). Jóllehet arra, hogy az életkor függő agy funkció hanyatlás hogy függ össze a SIRT1-el, még nem derült fény. A SIRT3 fehérjét kapcsolatba hozták a hosszú élettel, jóllehet ezen sirtuin mennyiségének és expressziójának változása az agyi öregedés során még ismeretlen. A SIRT3 a mitokondriumban lokalizálódik, de néhány kutató leírt kis mennyiségű sejtmagi SIRT3-at is. A mitokondriumból a sejtmagba történő transzlokációt az irodalmi adatok szerint különböző stresszorok indukálják (Scher és mtsai 2007), de megnövekszik citotoxinok hatására is, ami a DNS vég felismerő Ku70 fehérje deacetilációját és az apoptózis módosítását okozza (Pace és mtsai 2010, Sundaresan és mtsai 2008).

### *1.2.1. A sirtuinek és a DNS sérülés kapcsolata*

Az egy bázist, vagy nukleotidot ért DNS sérülés mellett létrejöhet a DNS kettős szálú törése is, melyet a környezetünkből érkező ionizáló sugárzás vagy az öregedés is indukálhat. A dupla szálú DNS törés hatására aktiválódó, és a 'nonhomologous end joining' DNS javító útvonalban szerepet játszó Ku70 javító faktor szintén a SIRT1 szubsztrátját képezi. A fehérje növekvő acetilációja széttöri a kapcsolatot a Ku70 és a Bax között, s ezáltal gátolja a Ku70-et, hogy csökkentse a DNS sérülés indukálta, Bax által kiváltott apoptózist. Deacetilációja viszont elősegíti a sejt túlélését a Bax mitokondriumon kívüli elszeparálása révén (Yuan és Seto 2007). A DNS az emlős sejtekben egy

foszforilációs kaszkádot is indukál, melynek során bizonyos faktorok foszforilációja késlelteti a sejtciklus folyamatát, amely időt hagy a DNS sérülés javítására. Ilyen molekula például az NBS1, melyet a Nijmegen breakage syndrome-ban azonosítottak. Az NBS1 részt vesz a DNS sérülés felismerésében, a jelző és javító mechanizmusban, foszforilációját viszont a fehérje acetilációs státusza befolyásolja, amit a SIRT1 deacetilátor fehérje képes módosítani. Az NBS1 SIRT általi hipoacetilált státuszának megőrzése döntő a DNS sérülés hatására létrejövő hatékony NBS1 foszforilációban, mivel a fehérje csak akkor tud foszforilálódni, ha deacetilált állapotban van. A SIRT1 így funkciója révén esszenciális módosítójává vált a DNS sérülési válaszreakciónak, s expressziója elősegíti a DNS sérülés javítási aktivitást. Lecsendesíti a kromatin aktivitását a hiszton deacetilálása révén és fontos szerepet játszik az öregedésben és a genomiális stabilitásban. Valószínűleg a genomiális instabilitás gátlása révén képes növelni az élettartamot is.

Az emlős sejtek három különböző útvonalon mehetnek végig a DNS sérülés következtében. Teljesen megújulhatnak a sérülés javítása révén; sérülés indukálta apoptózis következhet be; illetve a nem-javított DNS sérülés tolerálása révén mutáció jelentkezhethet (Yuan és Seto 2007). Arról, hogy az élő sejtek milyen válaszreakciót indítanak egy DNS sérülés bekövetkezése esetén, és hogy ebben a folyamatban milyen szerepet töltenek be a sirtuinek, ellentmondásosnak tűnő információkat találunk az irodalomban. Az igazság valószínűleg abban rejlik, hogy a leírt folyamatok mindegyike lejátszódik, csak a különböző események pillanataiban megfigyelhető arányuk változik. Így például egy apoptózis folyamatának gátlása a túlélés irányába mutathat, míg egy javíthatatlan sérülést szenvedett sejt apoptózisa a szervezet túlélését segítheti elő.

Emlős sejtekben a sirtuin két úton képes befolyásolni a DNS sérülésre adott válaszreakciókat. Módosítja a kromatin szerkezetét a sérült területen, amely befolyásolja a javító enzimek hozzáférését, vagy a p53 hiperacetilációjának prevenciója révén hat a p53-függő apoptózisra (Kruszewski és Szumiel 2005). Emellett azonban a DNS javító folyamatban részt vevő különböző fehérjék acetilációs státuszának változtatása további szabályozó funkciót biztosít.

Míg a hiszton deacetilálása a kromatin csendesítés irányába hat, az ellenkező irányú folyamat szerepére is vannak feltételezések. A szuperoxid szabadgyök nitrogén oxiddal (NO) való reakciója következtében egy citotoxikus, erős oxidálószer, peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) keletkezik. Ez a DNS egyszálú törését indukálja, mely a Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) aktiválódásához vezet. Az enzim a sérülés környékén  $\text{NAD}^+$  segítségével PAR polimereket állít elő, melyek meghajlítják a DNS-t, elősegítve a javító enzimek megfelelő pozícionálódását. A PARP enzim működését azonban nikotinamid termelődés kíséri, ami az egyik leghatékonyabb gátlója a sirtuin aktivitásnak. Így a SIRT1 deacetilációs funkciójának blokkolása révén lehetővé válik a hiszton acetilálása, amely tovább segít a kromatin kibontásában. A kalória visszafogás hatás mechanizmusában - mint a jelenleg ismert egyetlen lehetőség a maximális élettartam fokozására – szintén feltételezik a nikotinamid szerepét. Csökkent kalória bevitel esetén ugyanis a nikotinamidáz enzimet kódoló PNC1 gén aktiválódik, ami a nikotinamid koncentráció csökkenését, és ezzel együtt a Sir2 aktivitás növekedését okozza. Ezért szoros kapcsolatot feltételeznek a kalória-visszafogás következtében létrejövő hosszabb élettartam és a növekvő SIRT aktivitás között (Kruszewski és Szumiel 2005). Információk vannak arról is, hogy a hiszton deacetiláz inhibitorok növelik a tumorsejtek radioszenzitivitását, ugyanakkor bizonyos hiszton deacetilációk szükségesek a DNS javításhoz.

A p53 tumor gátló fehérjét, a „genom védelmezőjeként” tartja számon az irodalom. DNS károsodás esetén a javítás aktiválásával, a sejtciklus megállításával, mely időt enged a javító mechanizmusoknak, és javíthatatlan sérülés esetén apoptózis kiváltásával fontos szerepet tölt be a DNS sérülési reakcióban. Sérülés keletkezése a p53 acetilációját váltja ki, mely stabilizálódást, transzkripciós aktivitás fokozódást és proliferáció gátlást eredményez, majd a sérülés javítását vagy az apoptózist követően a sejtciklus folytatódik. A SIRT1 a deacetilálás révén gátolja a p53 aktivációját, s ezáltal az apoptózist (Yuan és Seto 2007). A korábban leírt, DNS sérülést követő PARP aktivációs folyamat során ugyanakkor a nikotinamid által gátolt SIRT aktivitás a p53 hiperacetilációját is előidézi, ami fokozza a pro-apoptotikus gén transzkripciót és apoptózist válthat ki. Így SIRT1 hiányában



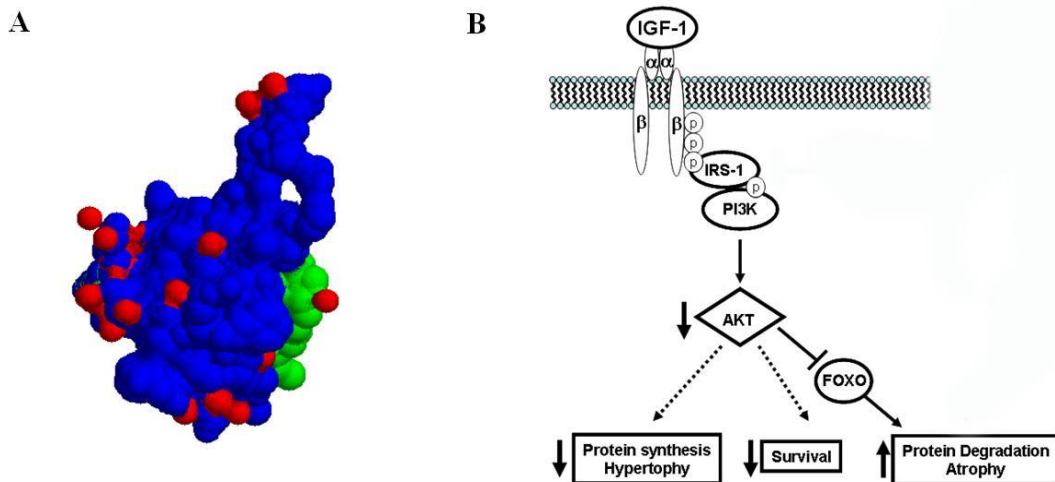
szignifikánsan magasabb a p53-függő  $\gamma$ -sugárzás indukálta apoptózis (Kruszewski és Szumiel 2005).

Az öregedés témaköre nemzetközi viszonylatban is jelenleg az egyik legtöbbet vizsgált terület. Világszerte egyre nagyobb megoldásra váró problémát jelent a népesség előregedése, mely egyben jelent egészségügyi, szociális és gazdasági nehézségeket az érintetteknek és a társadalomnak egyaránt. Éppen ezért a tudományos kutatások egyik fő csapásirányát jelenti az öregedési folyamat mikro- és makroszinten lejátszódó folyamatainak a minél részletesebb megismerése, hogy preventív és terápiás módszereket dolgozzanak ki az öregedést kísérő, leépüléssel és degeneratív elváltozásokkal együtt járó kórfolyamatok késleltetésére, lassítására vagy kezelésére.

Az öregedés nagyon összetett mechanizmus, tehát az ellene való küzdelemnek is összetettnek kell lennie. A tüneti kezelések csak szűk körű és átmeneti megoldást jelenthetnek. Mai tudásunk szerint mind a helyes táplálkozásnak, mind pedig a rendszeres, megfelelő intenzitással végzett fizikai aktivitásnak olyan kedvezőek a hatásai, hogy nincs gyógyszer, melynek hatása ehhez fogható lenne, és számos betegségben helyettesítheti vagy kiegészítheti a gyógyszeres kezelést, jelenlegi tudásunk szerint mellékhatások nélkül!

### **1.3. Az Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)**

Az IGF-1, más néven somatomedin C, vagy mechano growth factor szervezetre gyakorolt hatása nagyon sokrétű, az élő szervezetben történő termelődése fiziológias körülmények között is megfigyelhető (3. ábra). Elsődlegesen endokrin hormonnként a májban termelődik, valamint a célszervekben parakrin/autokrin módon. Mivel az IGF-1 a növekedési faktorok családjába tartozik, gyermekkorban a növekedésben, míg felnőttkorban anabolikus hatás kifejtésben játszik szerepet. Elsődleges hatását a speciális IGF-1 receptorokhoz való



### 3. ábra

Az IGF-1 3D szerkezete (A) és az általa mediált szignalizációs útvonal (B)

(Grounds és mtsai 2008, <http://en.wikipedia.org>) - módosított

kötődése révén közvetíti, melyek sok sejttípusban és sokféle szövetben jelen vannak. Ezek az IGF-1 fiziológiás kötődési helyei. Az inzulin receptorhoz az inzulinhoz viszonyítva csak 0.1-szeres affinitással kapcsolódik. Receptorához való kötődése esetén egy tirozin kináz által mediált szignalizációs útvonalat aktivál. Az IGF-1 az egyik legfontosabb természetes aktivátora az Akt-szignál útnak, mely a sejt növekedés és proliferáció stimulálásért valamint a programozott sejthalál gátlásáért felelős. Az inzulinhoz hasonló molekuláris struktúrájú IGF-1 tehát képes fokozni a különböző szervekben az új sejtek képződését, indukálni a szervezet folyamatos megújulását. A posztmitotikus szövetek, mint amilyen az izom vagy az agy, kialakulásuk után általában nem képesek további sejtosztódásra, így regenerációs képességük jelentősen korlátozott. Találhatók azonban ezekben a szövetekben is olyan őssejtek, melyek osztódva és differenciálódva új sejtállomány létrehozására képesek (Florini és mtsai 1996, Galvin és mtsai 2003, Perez-Martin és mtsai 2010). A folyamat ingere lehet izom esetében a szövet sérülése vagy az IGF-1 jelenléte, melyek következményesen fehérjeszintézis fokozódást, ezáltal pedig funkcionális hipertrófiát eredményeznek. Az IGF-1 hatására létrejövő izomhipertrófia esetén általában nem alakul ki a korfüggő izomatrófia, mivel az IGF-1 lelassíthatja az öregedési folyamatot. Emellett

képes fokozni a csontokban az oszteoblasztok (csontépítő sejtek) aktivitását, így preventív vagy terápiás hatású lehet a korfüggő csontleépülés, az oszteoporózis ellen is.

Az IGF-1 eddig megismert pozitív hatásai mellett a szisztémás funkciókat érintő kutatási eredmények némiképp meglepetést okoznak. *C. elegans*-ban végzett kísérletekkel kimutatták, hogy a közös inzulin/IGF-1 receptor génjének, a *daf-2*-nek a mutációja megduplázta a féreg élettartamát (Dorman és mtsai 1995). Hasonló felfedezéseket tettek kutatók a törzsfajlás magasabb szintjét képviselő rágcsálóknál is, ahol a növekedési hormon-IGF-1 tengely transzgenetikus gátlása révén élettartam növekedést értek el (Shimokawa és mtsai 2003). Emellett széles körben elfogadott tény, hogy a kalória visszafogás által gátolt inzulin/IGF-1 útvonal az egyik kulcstényezője a CR általi átlag és maximális élettartam növekedésnek (Fontana és mtsai 2010, Herrick 1991). Számos közlemény szerint az IGF-1 szignál útvonal a szabályozatlan sejt proliferáció révén szerepet játszik a rák kialakulásában is, így a növekvő IGF-1 szint, növekvő rák rizikóhoz vezet (Velcheti és Govindan 2006).

Az IGF-1 különböző szövetekre kifejtett morfológiai és funkcionális hatásaiban további paradoxonokat találunk. Több kutatócsoport az IGF-1 idegrendszerre kifejtett kedvező hatását publikálta, melyet a neurogenesis és a sérülés utáni reinnerváció révén hoz létre (Di Giulio és mtsai 2000, Llorens-Martin és mtsai 2009). Mindemellett friss irodalmi adatok kimutatták, hogy az agyi fejlődésre nézve az IGF-1-nek lehetnek kedvező és káros hatásai egyaránt (Pang és mtsai 2010), ami támogatja azt a korábbi megállapítást, miszerint az IGF-1 jelzőrendszer hiperaktiválása felgyorsított öregedéshez és béta-amiloid termeléshez vezet az agyban (Costantini és mtsai 2006). Muller és munkatársai kimutatták, hogy a fizikai edzés növeli a perifériás inzulin szenzitivitást, valamint javulást eredményez az egerek térbeli tanulási képességében, amit a hippocampusban az inzulin jelzőrendszer aktivációjával magyaráztak, mely az Akt ser473 foszforilációjának növekedése és az inzulin receptor szinaptikus membránokra történő transzlokációjának következtében jön létre. Azon állatok esetében azonban, akiknek az edzés mellett intrakraniálisan IGF-1-et injekciótak, memória funkciójuk a kontroll állatokkal azonos szintre esett vissza, melyet az inzulin szignálútvonal hiperaktivációjával, excitotoxicitással

magyaráztak (Muller és mtsai 2010). Ezért az edzés, az IGF-1 és a sirtuinek közti lehetséges kapcsolatok feltárása az öregedés során változó agyfunkcióban izgalmas kutatási területet jelent.

#### **1.4. A fizikai aktivitás szerepe az öregedés folyamatára**

Az öregedési folyamat rendkívüli komplexitása az ellene való küzdelemben olyan beavatkozást igényel, mely nem az egyes tüneti kezeléseket célozza meg, hanem generalizált mechanizmusok révén képes az egész szervezetben kifejteni hatását. A rendszeres mozgás alap biokémiai folyamatokra hatva, a különböző szervekben eltérő módon veszi fel a harcot az öregedéssel szemben. Hatékony a Magyarországon vezető halálozási arányt elért szív és keringési betegségekkel szemben, hiszen képes mérsékelni az életkorral együtt járó szív és érfunkció hanyatlást és befolyásolja az érlelmeszesedést. Az idősök jelentős részét érintő csontritkulásban képes lassítani a csontleépülés mértékét, a mozgás során javuló koordinációval és izom tömeg/izom erő megtartással pedig preventív lehet az esések, balesetek elkerülésében. Számos humán, illetve általunk is elvégzett állat kísérlet is bizonyította, hogy az inaktivitással és öregedéssel összefüggésbe hozott agyi funkcióromlást a testedzés megelőzi, illetve javítja a leromlott funkciót (Radak és mtsai 2001a, van Praag 2009). Így tehát a rendszeres mozgás az egészséges öregedés célját szolgálja, hogy képesek legyünk az életminőségünket minél hosszabb ideig, magas szinten megtartani.

Az öregedést befolyásoló tényezők között a szabadgyökök mellett, a legújabb kutatások feltárták a NAD<sup>+</sup> függő, III. típusú hiszton deacetylázok, a sirtuinek (SIRT1-7) szerepét. Az régóta ismert, hogy az alacsony szintű inzulin-függő jelzőrendszer együtt jár a hosszabb élettartammal, például kalória visszafogás alatt jelentősen csökken az IGF-1 jelző rendszer aktivitása. Érdekes azonban, hogy az agyban, ugyanakkor az IGF-1 neuroprotektív hatású. A testedzés befolyásolhatja a szabadgyökök, a sirtuinek és az IGF-1 mennyiségét és ezzel az öregedés folyamatát is (Hipkiss 2008).

### *1.4.1. A testedzés hatása a vázizomra*

Az öregedés szervenként eltérő módon zajlik, melyben a vázizom különös helyet foglal el. A vázizom más szövetekhez hasonlóan megnövekedett mennyiségű oxidatív sérülést halmoz fel öregedéssel (Radak és mtsai 2007, Radak és mtsai 2008). A rendszeres edzés csökkenti az oxidatív sérülés mértékét az izom növekvő antioxidáns potenciálja révén, mely változást módosíthatja a SIRT1 mennyisége és aktivitása (Ferrara és mtsai 2008, Radak és mtsai 2008, Suwa és mtsai 2008). Oxigénhiányos körülmények között növekvő mennyiségű reaktív oxigén gyökök alakulhatnak ki az izomban, mely a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) nagyobb mennyiségű termelődését eredményezi. Ez az expresszió fontos a vázizomban a fiziológias redox környezet megtartásához, különösen az idős emlős élőlények esetében (Clanton 2007, Mayr és mtsai 2008, Moller és mtsai 2001, O'Hagan és mtsai 2009). A rendszeres állóképességi edzés indukálta HIF-1 $\alpha$  szint megváltozása mitokondriális biogenezissel és angiogenezissel társul, mely utóbbi a vascular endothelial growth factor (VEGF) részvételével együtt valósul meg (O'Hagan és mtsai 2009).

Az életkor előrehaladtával a különböző szövetekben mitokondriális funkció csökkenés figyelhető meg, mely erős korrelációt mutat a zsír metabolikus zavarral és az inzulin rezisztenciával. Mivel az AMP-aktiválta protein kináz (AMPK) fontos szabályozója a sejten belüli zsír oxidációnak és a mitokondriális biogenezisnek (Reznick és mtsai 2007), ezért a sejtek energia homeosztázisát jól jellemző mutató. Számtalan szövetben expresszálódik, így a májban, az agyban és a vázizomban is. Stimulálja a vázizom zsírsav oxidációját és cukorfelvételét, továbbá szabályozza a GLUT4 cukor-transzportert és a mitokondriális biogenezist. Aktivációja során növeli a sejt energia szintjét, gátolva az anabolikus energia-felhasználó utakat, stimulálva az energiatermelést. Hosszantartó edzés hatására az AMPK elősegíti a kontraktilis izom adaptációját, segítve az oxidatív energia metabolizmusba történő átmenetet, mely folyamatokban aktiválja a Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-t (PGC-1), a(z) UCP3 (Mitochondrial uncoupling protein 3), a cytochrome C és TFAM (Transcription factor A, mitochondrial)

fehérjéket (Ojuka 2004, Stoppani és mtsai 2002). Az AMPK aktivitása edzés hatására növekedést, öregedés hatására pedig csökkenést mutat a vázizomban, emellett az aktivált enzimforma (phospho-AMPK, p-AMPK) mennyisége is jóval alacsonyabb az idős izomszövetben (Qiang és mtsai 2007).

Az AMPK aktiválta UCP3 egy mitokondriális membrán transzporter, mely elsődlegesen a vázizomban expresszálódik. Csökkenti a mitokondriális membrán potenciált, védi az izomsejtet a túlzott zsírsav felvételtől illetve valószínűsítik, hogy csökkenti a túlzott ROS termelést. Az AMPK mellett a(z) UCP3 fontos szabályozója a SIRT1, mely a(z) UCP3 promóter régiójában hiszton deacetilálás révén gátolja a gén átírását (Amat és mtsai 2007).

Az edzés hatására létrejövő mitokondriális biogenezis folyamata igényli az AMPK aktivációja mellett a PGC-1 $\alpha$  aktivációját is, mely számos transzkripciós faktorhoz kapcsolódva nagyszámú mitokondriális és sejtmagi fehérje expressziójának koordinálását végzi (Ojuka 2004). A SIRT1 deacetiláció révén aktiválja a PGC-1 $\alpha$ -t (Rodgers és mtsai 2008), így a SIRT1-PGC-1 $\alpha$  útvonal fontos szabályozója az edzés adaptációnak és szerepe lehet az életkorral kialakuló mitokondriális diszfunkció prevenciójában.

#### *1.4.2. A testedzés hatása az agyra*

A testedzés hatására létrejövő metabolikus változások nem jelentenek meglepetést a vázizom esetében. A fizikai aktivitás és az agyfunkció változás közti kapcsolat tényleges biokémiája azonban még ismeretlen. A folyamat egyik kulcstényező lehet azonban a tejsav. A laktát termelés teljes nyugalmi/aerob körülmények között is folyamatos a különböző szövetekben. Alternatív energiaforrása az agynak, melyet kimerítő körülmények között használ. Növekvő tejsav termelés során azonban - ilyen folyamat az edzés is - megnövekszik az agyban a vér-laktát energiaforrásként való felhasználása a vér-glükózzal szemben (Ross és mtsai 2010). Az öregedés során kialakuló, az agyat sem kímélő mitokondriális diszfunkció, mely a károsodott idegi funkciók alapja is lehet, az aerob

respirációtól a glikolitikus metabolizmus felé való eltolódást eredményez. Ez a piruvát-laktát átalakulásban a tejsav képződés irányába való eltolódást feltételez, ami a laktát-dehidrogenáz A (LDH-A – M alegység dominancia) génjének fokozott expresszióját teszi szükségessé. Ross és munkatársai egerek agyában öregedés hatására kétszeresére emelkedett laktát szintet detektáltak, amit így az öregedés egyik jelző molekulájaként publikáltak (Ross és mtsai 2010).

Jól dokumentált tény, hogy a rendszeres edzés kedvezően hat az agy funkcióra olyan soktényezős mechanizmus révén, mely magában foglalja a neurogenezist (Fabel és Kempermann 2008, van Praag 2009), a növekvő Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Nerve growth factor (NGF) és Vascular endothelial growth factor termelést (Cotman és mtsai 2007, Duman 2005, During és Cao 2006, Gomez-Pinilla és mtsai 2008) és a csökkenő oxidatív stresszt (Radak és mtsai 2010). Rendszeres edzés hatására a hippocampus gyurus dentatus területén bizonyítottan új idegsejtek képződnek, melyek funkcionálisan is hasznosnak tűnnek, ezért az aktív életmódnak szerepe lehet az életkorral vagy a neurodegeneratív elváltozásokkal együtt járó kognitív funkció hanyatlás megelőzésében vagy csökkentésében (van Praag 2009). Az oxidatív stresszel kapcsolatos változások társulhatnak a sirtuinekhez, mivel az oxidatív kihívások módosíthatják őket (Arunachalam és mtsai 2010, Nakamaru és mtsai 2009, Yu és mtsai 2009). Az aerob edzés, melyet gyakran használnak a fizikailag aktív életforma agyfunkcióra gyakorolt hatásának tesztelésére, mérsékelt intenzitása és hosszú időtartama révén ezen kívül csökkenti a keringő IGF-1 mennyiségét (Matsakas és mtsai 2004).

## ***2. Célkitűzések és korlátozó tényezők***

### **2.1. A vizsgálat célja**

Doktori disszertációmban foglalt vizsgálataim célja a sirtuin-függő öregedés sejtszintű változásainak tanulmányozása, melynek során két szövettípusra, a vázizomra és az agyra koncentrálok. Feltételezéseink szerint a sirtuinek és az általuk befolyásolt reakció utak öregedés hatására változást mutatnak, és a szervezetet általánosságban sújtó szervfunkció-csökkenés mögött felfedezhetünk olyan molekuláris tényezőket, melyek aztán az általunk alkalmazott rendszeres fizikai aktivitás és IGF-1 kezelés által pozitív irányba befolyásolhatók.

Jelen vizsgálatomat ennek megfelelően két részre osztottuk. Az első fejezetben a gastrocnemius izomszövetből született mérési eredmények találhatók. A vázizom emlősök esetében a testtömeg jelentős százalékát teszi ki, embernél mintegy 40% a részesedése a testtömegből. Ebből adódóan is a vázizomban bekövetkező, életkorral együtt járó változások feltételezhetően szinte az egész szervezetre kifejtik hatásukat. Ismert tény, hogy például az öregedés függő izomtömeg csökkenés, a cachexia következtében az izomrostok elvesztése az őket ellátó nagy mennyiségű kapilláris érhálózat vesztésével párosul, ami ezáltal, az össze-ér keresztmetszet csökkenése révén hozzájárul az időskori perifériás ellenállás növekedéséhez. Másrészről az izom, mint az egyik legjelentősebb cukor felvevő szervünk, tömegcsökkenése révén időskorban már nem tud olyan mértékű szerepet vállalni a cukor felhasználásban, így az életkor előrehaladtával kialakuló inzulin-rezisztencia mellett tovább fokozza a cukor homeosztázis instabilitását. Mindemellett az általunk tesztelni kívánt fizikai aktivitás hatásai várhatóan először a vázizomban jelentkeznek. A sirtuineknek, mint az öregedés legfrissebben leírt szabályozóinak kulcsszerepét feltételezzük az öregedési folyamat befolyásolásában, ezért célunk a sirtuinek öregedési folyamatban, illetve az edzés indukálta alkalmazkodásban játszott szerepének vizsgálata.

Jelen vizsgálatot azon hipotézis tesztelésére terveztük, hogy:



- A.1. A rendszeres fizikai aktivitás befolyásolja a SIRT1 mennyiségét/aktivitását és az ehhez kapcsolódó mechanizmusokat.
- A.2. A rendszeres edzés SIRT1-függő utak révén lelassítja a vázizom öregedési folyamatát.
- A.3. Az általunk alkalmazott fizikai edzés preventív hatású az életkorral együtt járó energiatermelő folyamatokat érintő elégtelenséggel szemben.
- A.4. Az öregedés során oxidatív stressz állapot fejlődik ki, melynek mértékét a rendszeresen végzett fizikai aktivitás képes mérsékelni.

Vizsgálatunk második részében ugyan ezeken az állatokon az agyi öregedés vizsgálatát céloztuk meg. Az agynak azon részét választottuk a vizsgálatunkhoz, melyről már ismert, hogy olyan agyi tevékenységekért felelős, mint a memória, vagy a tanulás, és olyan öregedés függő betegségekben, mint amilyen az Alzheimer-kór is, ezen agyi terület érintettsége kifejezett. A rendszeres mozgás agyra kifejtett kedvező hatása már jó néhány kutató által bizonyított, a sirtuinek esetleges szerepének bizonyítása azonban még csak részleteiben feltárt.

Ezért a hippokampális agyi területet érintő vizsgálatainkat annak a hipotézisnek a tesztelésére terveztük, hogy:

- B.1. A rendszeres edzés javítja az agyfunkciót, ezen belül is az állatok térbeli tanulási képességét.
- B.2. Az IGF-1 adagolás és/vagy a fizikai aktivitás pozitív hatással van neurogenesisre és az agy funkcióra.
- B.3. Kapcsolatot találunk az életkor-függő oxidatív DNS sérülés és az agyfunkció között, különös tekintettel az OGG1 és a Ku70 javító enzimekre.
- B.4. A DNS javításhoz társuló sirtuinek szerepet játszanak az öregedési folyamatban.
- B.5. Kapcsolatot találunk az agyfunkció, a mért biokémiai változók és a neurogenesis között.

## 2.2. Korlátozó tényezők

Vizsgálataink során természetesen számolnunk kellett néhány limitáló tényezővel, melyek a vizsgálati lehetőségeinkből adódtak, s melyek reményeink szerint nem korlátozzák jelentősen a messzebbmenő következtetések levonását, de mindenképp óvatosabb becslésekre intenek.

Kutatásom korlátozó tényezője, hogy finansziális okokból nem volt lehetőségem olyan állatcsoport vizsgálatára, ahol önállóan értékelhettem volna az IGF-1 kezelés hatását. Az irodalmi adatokat tanulmányozva naponta, testtömeg kilógrammonként 5 mikrogramm mennyiségű IGF-1 adagolás mellett döntöttünk (Lynch és mtsai 2001). Ez az általánosan alkalmazott mennyiségi tartomány alsó felébe tartozik, így a kísérlet megtervezésekor úgy ítéltük, hogy ez a mennyiség valószínűleg kevés ahhoz, hogy önállóan jelentős hatásokat váltson ki, viszont alkalmas lehet arra, hogy a rendszeres edzés hatására meginduló pozitív változásokat tovább javítsa vagy az esetleges negatív hatásokat enyhítse. Vizsgálataim alapján remélem, hogy képet kapok arról, az IGF-1 okoz-e bármilyen jellegű elváltozást az általam vizsgált biokémiai szabályozó rendszerekben, ami alapot adhat a hatásmechanizmusok későbbi részletes tanulmányozására.

A vizsgálataim kezdetén a gastrocnemius izomszövetből elvégzett előkísérletek során, azt tapasztaltuk, hogy az általunk mért biokémiai paraméterekre az alkalmazott IGF-1 adagolás nem volt jelentős hatással, ezért úgy döntöttünk, hogy jelen kutatómunkában a vázizom tanulmányozásakor az IGF-1 kezelés hatásvizsgálatát mellőzzük, s a figyelmünket inkább az öregedés és a fizikai aktivitás szerepe felé fordítjuk. Az agy hippokampális régiójához köthető tanulási képesség vizsgálatakor az agyterület érzékenységet mutatott az IGF-1 kezelésre, hatására változást figyeltünk meg a funkcióban, ezért az agyszövet vizsgálatakor a funkció-változás magyarázatához molekuláris szintű eltéréseket kerestünk. Az izomszövet esetében azonban funkciós vizsgálatára nem volt lehetőségünk, így az előkísérlet eredményeit összegezve a fókuszváltás mellett döntöttünk. Így lehetőségünk nyílt nagyobb számú változó vizsgálatára is, amivel eredményeinket az oxidatív és metabolikus

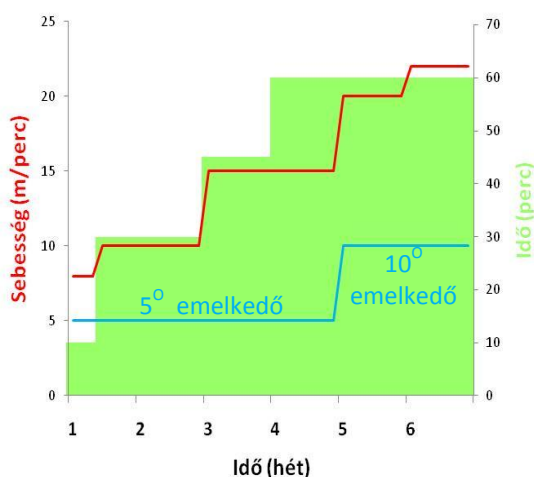
változások szemszögéből értékelve reményeink szerint egy teljesebb képet kaptunk az öregedés és edzés összefüggéseiről.

### ***3. Anyagok és módszerek***

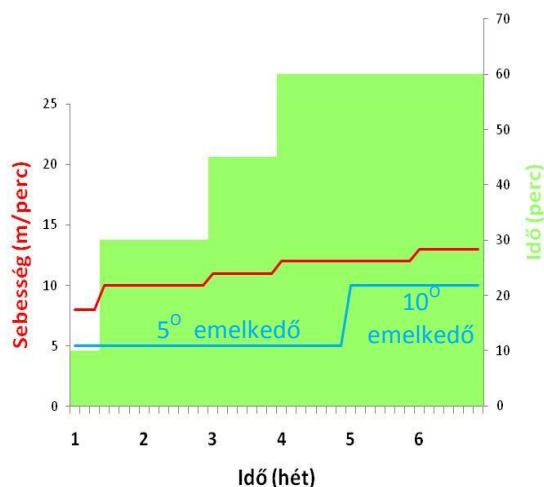
#### **3.1. Állatok és edzés protokoll**

Tizenkét fiatal (3 hónapos) és 12 idős (26 hónapos) hím Wistar patkányt használtunk a vizsgálatokhoz, melyeket fiatal kontrol (YC – young control), fiatal edzett (YE – young exercise), öreg kontrol (OC – old control) és öreg edzett (OE - old exercise) csoportokba soroltunk. Az agyszöveti vizsgálatok esetében a 24 fős vizsgálati létszámot további hat fiatal és hat idős állattal bővítettük, akik a csak edzésében részt vevő, megfelelő életkori csoportokkal azonos fizikai terhelésben részesültek, az edzés mellett azonban IGF-1 adagolást kaptak (YEI - fiatal edzett+IGF-1 kezelt, OEI – idős edzett+IGF-1 kezelt). A kísérletet a hatályos állatkísérletekre vonatkozó előírásoknak ('The Guiding Principles for Care and Use of Animals, EU') megfelelően és a helyi etikai bizottság jóváhagyásával végeztük. Az edzett állatokat 3 napon át szoktattuk a futószalagos edzéshez, majd a következő 2 hétben a futószalag sebességét 10m/perc-re, meredekségét 5°-ra állítottuk, mely paraméterek mellett az állatok 30 percet futottak. A futási sebességet és az időtartamot fokozatosan emeltük, így a 6 hetes edzésprogram utolsó hetében a fiatal állatok 22m/perces sebességgel, 10 %-os meredekséggel egy óráig, míg az idős állatok 13m/perccel, 10%-os meredekségen szintén egy óráig edzettek (4. ábra).

### *Fiatalkorú állatok*



### *Öreg állatok*



#### **4. ábra**

*A vizsgálatban részt vett edző állatok edzés programja a hat-hetes protokoll során*

Célunk volt, hogy az edzés az állatok állóképességének fejlesztésére irányuljon. Vizsgálataim során korábbi kutatásaink eredményeit illetve irodalmi adatokat használtam fel az edzésprogram kialakításához (Radak és mtsai 2002a, Radak és mtsai 2004). Az általunk alkalmazott idő és futási sebesség a 60-70%-os VO<sub>2</sub>max. intenzitást célozta meg. Feltételezéseink tehát részben korábbi vizsgálatainkon alapulnak, részben pedig azon, hogy a patkány VO<sub>2</sub>max. értékek számszerűleg is nagyon hasonlóak az emberekéhez (Kemi és mtsai 2005).

Az állatokat intraperitoneális (IP) ketamine (50 mg/kg) injekcióval elaltattuk, 4% foszfát pufferben oldott paraformaldehide-del perfundáltuk (PBS, pH 7,4), majd dekapitáltuk. Annak érdekében, hogy elkerüljük az utolsó edzésből adódó akut metabolikus hatásokat, a beavatkozást az utolsó edzést követő 2. napon végeztük. A gastrocnemius izmot és a nagyagy hippokampusz területét körültekintően eltávolítottuk, folyékony nitrogénbe helyeztük, majd a minta elemzéséig -80 °C-on tároltuk. Ezt követően a szövetek egy részét lízis pufferben homogenizáltuk. A SIRT1 enzim aktivitás, illetve a NAD<sup>+</sup> mennyiségének méréshez szükséges speciális sejt komponensek szeparálásának módját az

érintett fejezetekben részletesen tárgyalom. Az össze-fehérje koncentráció mérését a homogenizáló pufferekben felhasznált detergenseknek megfelelően Bradford módszeren alapuló Bio-Rad Protein Assay Kittel (Bio-Rad #600-005) végeztem.

## **3.2. BrdU és IGF-1 adagolás**

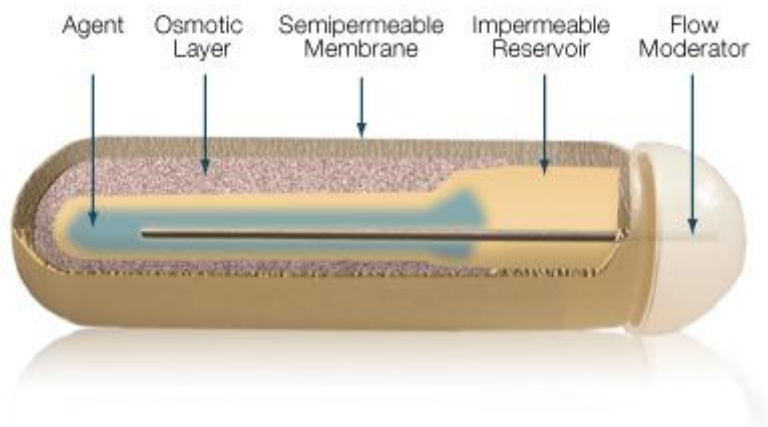
### *3.2.1. Bromo-deoxyuridine (BrdU) adagolása*

Ahhoz, hogy a különböző szövetekben nyomon tudjuk követni az új sejtek képződését, a kísérletben részt vett összes állatnak az edzésprogram utolsó négy hetében, heti egy alkalommal 5-Bromo-2'-deoxyuridine-t (BrdU) adtunk. Az adagolás során testtömeg kilógrammonként, hetente 50 mg BrdU-t kaptak az állatok IP injekcióval. Ezen anyag sajátossága, hogy szelektíven beépül az újonnan képződött sejtek DNS-ébe a sejtosztódás S-fázisa során. A későbbiekben az adott szövetből készült metszeteket BrdU-ellenes antitestekkel kezeltük, melynek révén lehetővé vált az újonnan képződött sejtek fluoreszcens technikával történő vizualizálása.

### *3.2.2. Az IGF-1 adagolása*

Az IGF-1 adagolását Alzet pumpa segítségével végeztem (Alzet mini-osmotic pump-model 2002., Durect Corporation #0000296) (5. ábra), melyet a 4. edzés hét végén az állatok hátbőre alá ültettem. Az IGF-1 adagolásban nem részesülő állatok a pumpán keresztül fiziológiás sóoldatot kaptak, míg a fiatal és öreg kezelt csoportban az adagolt IGF-1 mennyisége 5 µg volt testtömeg kilógrammonként naponta. A pumpákat a beültetés előtt steril desztillált vízben feloldott IGF-1-el töltöttem fel (Sigma #I3769), melyet a pumpa két hét alatt folyamatosan adagolva 0.5 µl/óra sebességgel juttatott az állat

szervezetébe. A kísérlet végén vérből az IGF-1 kezelés sikerességének ellenőrzésére IGF-1 relatív mennyiség meghatározást végeztem.



**5. ábra**  
*Alzet pumpa felépítése*

(www.alzet.com)

### **3.3. Morris Maze teszt**

Az agy funkciót a kísérlet végén Morris Maze teszttel vizsgáltam. A teszt elvégzésére az utolsó négy egymást követő edzésnapon, minden esetben a napi edzést megelőzően került sor, mialatt minden nap négy ismétlést végeztem. A teszt során egy 6 cm átmérőjű platformot helyeztem el egy kör alakú, fekete medence észak-nyugati negyednek közepére, egy cm-rel a víz felszíne alá. A medence átmérője 100 cm, magassága 60 cm, a víz hőmérséklete 22-23 °C volt a vizsgálat során. Miután az állatokkal megismerttettem a medencében elhelyezett „pihenő” szigetet, a patkányokat behelyeztem a medencébe a lehetséges négy kezdőpont (észak, dél, kelet, nyugat) egyikébe, miután 90 másodperc állt az állatok rendelkezésére, hogy megtalálják a platformot. Ha az állat nem talált rá a pihenő pontra a másfél perc alatt, manuálisan ráhelyeztem a platformra 30 másodpercre. A második, a harmadik és a negyedik kísérlet kezdőpontja az előzőekben nem alkalmazott

irány valamelyike volt. A kezdőpontok sorrendjét minden állat esetében azonosan, pszeudorandom módon változtattam minden nap. Mértem a platform megtalálásához szükséges időt, a napi négy ismétlés idejét átlagoltam, majd a négy nap során tapasztalt változásokat statisztikai módszerekkel értékeltem.

### **3.4. Fehérjék mennyiségi analízise Western blot-tal**

A Western blot eljárás egy szemi-quantitatív módszer, mely egy immunreakcióval alkalmas a különböző szövetmintákban lévő speciális fehérjék kimutatására, és azok különböző hatásokra történő esetleges mennyiségi változásának mérésére. Az eljárás során a szövetminták homogenizálását izomszövet esetén politronnal, míg agyszövet esetén potterrel végeztem. A 10-szeres mennyiségben alkalmazott lízis puffer a következő összetevőket tartalmazta: 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 2% NP40, 10% glicerol és proteáz inhibitorok (PMSF, aprotinin, leupeptin, orto-vanadát). A mintákat ezt követően 30 percig rázattam jégen, majd 15 000xg sebességgel centrifugáltam 15 percig, 4 °C-on. A pipettával szeparált felülúszót a további felhasználásig -80 °C-on tároltam. Az izom illetve agy homogenátumokból 50 µg fehérjét töltöttem fel 8-12%-os (v/v) töménységű poliakrilamid géltre (SDS-PAGE – Sodium Dodecil Sulfate-polyacrilamide gel electroforesis), melyben elektromos áram hatására a mintában lévő fehérjék molekulasúlyuknak megfelelően szeparálódnak. Ezt követően a fehérjéket a gélből egy Transzfer-eljárás során elektromos árammal PVDF (Polyvinylidene Fluoride) membránra juttattam. A PVDF membránt ez után 5%-os TBS-T-zsírmentes tejpor oldattal (blokkoló puffer) blokkoltam a nem specifikus antitest kötések elkerüléséért, majd szobahőmérsékleten a kimutatni kívánt fehérje ellen termeltetett speciális antitestet tartalmazó oldattal inkubáltam (1-2. táblázat).



**1. táblázat***Az (A) vizsgálatban alkalmazott elsődleges antitestek*

Antitest/antigén	Hígítási arány	Gyártó	Katalógus szám
SIRT1	1:500	Abcam	ab53517
SIRT6	1:500	Sigma-Aldrich	S4322
NAMPT (PBEF)	1:500	Abcam	ab37299
AMPK $\alpha$	1:1400	Cell Signaling	2532
Phospho-AMPK $\alpha$	1:500	Cell Signaling	2535
Acetylated protein	1:1000	Abcam	ab193
UCP3	1:200	Sigma	U7757
HIF-1alpha	1:4000	Sigma	H 6536
VEGF	1:500	Chemicon	MAB1665
Cytochrome C	1:200	Santa Cruz	sc-7159
DNP	1:150	Chemicon	S7150
OGG1	1:500	Abcam	ab204
alpha-tubulin	1:15000	Sigma	T6199

**2. táblázat**  
*A (B) vizsgálatban alkalmazott elsődleges antitestek*

Antitest/antigén	Hígítási arány	Gyártó	Katalógus szám
SIRT1	1:500	Millipore, Upstate	07-131
Ku70	1:1000	Sigma-Aldrich	K4763
SIRT3	1:2000	Abcam	ab40006
Acetylated-Lysine	1:500	Cell Signaling	9441
SIRT4	1:1000	Abcam	ab10140
PGC-1 (H-300)	1:500	Santa Cruz	sc-13067
LDH	1:1000	Santa Cruz	sc-33781
alpha-tubulin	1:15000	Sigma	T6199

Az elsődleges antitesttel történt inkubálás után a membránt 3x10 percig mostam TBS-Tween 20 mosó oldatban, majd horseradisch peroxidase-zal (HRP) konjugált másodlagos antitest oldattal 4°C-on 1 órán át inkubáltam. Ezt követően a membránt újra mostam, majd a HRP-vel reagáló szubsztrát oldatba helyeztem (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific #34080). A kemilumineszcens reakció révén keletkező fényt röntgen filmen detektáltam. A fehérje csíkok intenzitását ImageJ programmal kvantifikáltam, majd a belső kontrollként használt  $\alpha$ -tubulinhoz normalizáltam.

### 3.5. Karbonilált fehérjék kimutatása

Az oxidált fehérjék mennyiségi változásának meghatározásához Oxyblot Kitted (Chemicon/Millipore) használtam, melyet a gyári leírásnak megfelelően használtam. A fehérjék szerkezetét 4-dinitrophenylhydrazine-nal (DNPH) történő 15 perces kezeléssel

átalakítottam, majd szobahőmérsékleten inkubáltam az elegyet neutralizáló pufferrel. Az átalakított fehérjéket 10%-os SDS-PAGE-en futtattam, majd PVDF membránra transzferáltam. A membránt 5% zsírmentes tejport tartalmazó Dulbecco-PBS-T-ben (PBS+0,5% Tween 20) blokkoltam 3 óráig, majd DNP-ellenes antitesttel inkubáltam egy éjszakán keresztül 4°C-on. PBS-T-ben történő háromszori mosás után a membránt 1 órán át, szobahőmérsékleten HRP-konjugált másodlagos antitesttel kezeltem. Az immun komplexet kemilumineszcens szubsztrát hozzáadásával röntgenfilmen vizualizáltam.

### **3.6. SIRT1 aktivitásmérés**

A SIRT1 fehérje deacetiláz aktivitásának mérésére Cyclex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit-et (Cyclex, CY-1151) használtam. A sejtmag és a citoszól szétválasztását a gyári leírásnak megfelelően végeztem. Az izomszövetet mintákat (100 mg) lízis pufferben (10mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM Sucrose, 0,5% NP-40, 0,1 mM EGTA) homogenizáltam, majd 15 percig jégen inkubáltam. Az homogenátot 4 ml Sucrose oldaton (30% Sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) átcentrifugáltam, majd a felülúszót (sejtplazma) a mérésig -80°C-on tároltam, a nukleáris csapadékot pedig hűtött, 10 mM-os Tris-HCl-el (pH 7,5) és 10 mM-os NaCl-al mostam. Ezt követően a sejtmagi csapadékot 100 µl extrakciós pufferben (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 420 mM NaCl, 0,5 mM EDTA Na<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 10% Glycerol) felszuszpendáltam. A mintát 30 másodpercig szonikáltam, majd 30 percig jégen tároltam és 15000 rpm sebességgel 10 percig centrifugáltam. A felülúszót (nyers nukleáris extrakt) a mérésig -80°C-on tároltam. Mikrolemezen 10 µl sejtplazma illetve sejtmag kivonatot 40 µl reakció keverékkel elegyítettem, melynek összetétele: 50 mM Tris-HCl pH 8,8, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT, 0,25 mAU/ml Lysyl endpeptidase, 1 mM Trichostatin A, 20 mM Fluoro-Substrate Peptide és 200 mM NAD<sup>+</sup>. A keveréket szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltam, majd a fluoreszcens intenzitást (ex. 355 nm, em. 460 nm) két órán át 10 percenként leolvastam (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL) és normalizáltam a fehérje koncentrációval.

### 3.7. NAD<sup>+</sup>/NADH szint mérése

A gastrocnemius izommintákat (20 mg) homogenizáltam NADH/NAD extrakciós pufferben, majd a keletkezett homogenátot átszűrtem 10 kDa-os Microcon cut-off szűrőn. A mérés kivitelezéséhez NAD<sup>+</sup>/NADH Quantification Kit-et (Bio Vision, K337-100) használtam a megadott protokollnak megfelelően. Először a minta NADH mennyiségét határoztam meg, majd a mintában lévő NAD<sup>+</sup>-ot 60°C-ra történő melegítéssel (30 perc) és lehűtéssel NADH-vá redukáltam. Ezt követően a megnövekedett, teljes NADH mennyiséget (NADt) 10 µl NADH előhívó folyadék hozzáadása után 450 nm-es hullámhosszon ELISA leolvasóval (Thermo Labsystems Multiskan EX) detektáltam a színreakció kifejlődése alatt 30 percenként, 5 órán át. A NAD<sup>+</sup> mennyiséget a NADt-NADH különbségéből becsültem.

### 3.8. DNS sérülés és javítás mérése

Az 8-hydroxy-20-guanine (8-oxo-Gua) mennyiségének mérését a korábbiakban leírtak szerint végeztünk (Radak és mtsai 2002a). Az OGG1 szint meghatározása Radak és mtsai. (Radak és mtsai 2007) által leírt módon történt. 20 pmol 8-oxo-Gua-t (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) tartalmazó szintetikus szubsztrátot <sup>32</sup>P izotóppal jelöltünk az 5' végen polynucleotide T4 kinase-t (Boeringer Mannheim, Germany) használva. A jelölő reakcióhoz a fehérje kivonatot (2 µg) 20 µl reakció keverékkel elegyítettünk, amely 0,5 M N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[ethanesulfonic acid]-ot, 0,1 M EDTA-t, 5 mM of dithiothreitol-t, 400 mM KCl-ot, tisztított BSA-t és a jelölt anyagot tartalmazott (kb. 2000 cpm). A reakció 30°C-on 15 percig zajlott, majd az elegy jégre helyezésével állt le. Ezt követően 30 µl chloroform-ot adtunk hozzá, majd a mintát lecentrifugáltuk és a vizes fázisból 15 µl 90%-os formamide-ot, 10 mM NaOH-ot és kék-narancs festéket tartalmazó loading pufferrel kevertük. 95°C-on történő 3 perces melegítést követően a mintát lehűtöttük és 7 M urea-val és 1xTBE-vel 20%-os polyacrilamide géltre vittük fel, majd 400 mV-on futtattuk 2 órán át. A jelölt szubsztrát lehasított termékének radioaktív jelét STORM

Bioimaging Analyzer-rel (Molecular Dynamics, USA) kvantifikáltuk. A szeparált, lehasított termékben és az sértetlen oligo csíkokban megfigyelt radioaktivitást PhosphoImager-t tartalmazó (Molecular Dynamics) Image Quant software-rel számszerűsítettük. A 8-oxo-Gua sérülést javító aktivitását a szubsztrát lehasított termékének százalékos arányában határoztuk meg (Radak és mtsai 2007).

### **3.9. A Proteaszóma kimotripszinhez hasonló aktivitásának mérése**

A gastrocnemius izomban a proteaszóma kimotripszinhez hasonló aktivitásának mérésére luminometriás módszeren alapuló Proteasome-Glo Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay Kittet használtam (Promega #G8660). 100 mg-nyi szövetmintát gyári ajánlások és irodalmi adatok alapján (Hepple és mtsai 2008) 10-szeres mennyiségű pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 5% glycerol, 5mM ATP) homogenizáltam. A homogenátot 10 000xg sebességgel, 30 percen át, 4°C-on centrifugáltam majd pipettával szeparáltam a felülúszót. Ezt követően fehérje mennyiség meghatározást végeztem Bradford módszerrel, majd az azonos fehérje koncentrációra hígított mintákból a gyári leírásnak megfelelően végeztem a proteaszóma speciális aktivitásának mérését. 96 lyukú fehér mikrolemezre 94 µl desztillált vizet töltöttem. A mikrolemez első felében a duplikátumokban felvitt 5 µl mintához 1 µl DMSO-t adtam, mely a nem proteaszómához kötött proteáz aktivitást is méri. A mikrolemez másik felében 5 µl mintához 1µl 1mM epoxomicint (DMSO-ban oldva), specifikus proteaszóma gátlót adtam. Ez az oldal a proteaszómán kívüli proteáz aktivitást méri. A mérés végén a két mintasor aktivitás különbsége adja a proteaszóma szubsztrát-specifikus aktivitását.

A reakció oldat létrehozásához egy üveg Luciferin Detection Reagent-hez 10 ml Cell-Based Buffert-t adtam, majd szobahőmérsékleten 50 µl, a kimotripszinhez hasonló aktivitás méréséhez specifikus Suc-LLVY-aminoluciferin (Succinyl-leucine-leucine-valine-tyrosine-aminoluciferin) szubsztrátot kevertem az oldatba. Az így elkészült Proteasome-Glo Cell-Based Reagent-ből 30 perc inkubálás után - a mikrolemez szobahőmérsékleten

történő 15 perces inkubálása után - minden mintához 100 µl-t adagoltam. A mikrolemezen lévő elegyet 1 percig 250 rpm sebességgel rázattam, majd 10 perc inkubálás után lemértem a reakció során létrejött lumineszcenciát (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent FL).

### **3.10. A vérplazma IGF-1 szintjének mérése**

Az állatok dekapitálása után az aortából vért gyűjtöttem, majd a véralvadás megakadályozására tútelített EDTA-t adtam hozzá. A vérmintákat 3000xg sebességgel, 10 percig, 4°C-on centrifugáltam, majd a vérplazma komponensét pipettával szeparáltam és a mérésig -80°C-on tároltam. Quantikine Mouse/Rat IGF-1 Assay Kit-et (R&D System, #MG100) használtam a vér IGF-1 szintjének, IGF-1 adagolásra feltételezett változásának meghatározására. A mérést a vérminta és a reagensek a megadott protokollban leírtak szerinti előkészítése után 96 lyukú mikrolemezen végeztem. Egér illetve patkány IGF-1 ellenes monoklonális antitesttel bevont mikrolemezre 96x50 µl kalibrátor oldatot mértem. Ezt követően duplikátumban 50 µl standard-et, kontrollt és mintát töltöttem a megfelelő lyukakba. A lemezt ezt követően lefedtem, majd rázatás mellett két órát inkubáltam szobahőmérsékleten. A lyukak kiürítése után a lemezt mosó pufferral mostam ötször. Ezután 100 µl HRP-vel konjugált egér/patkány ellenes poliklonális antitestet adtam a mintákhoz, mellyel két órán át inkubáltam szobahőmérsékleten. A mosási lépés ismétlése után 100 µl hidrogén-peroxidot és kromogént tartalmazó szubsztrát oldatot kevertem a mintákhoz, majd az elegyet szobahőmérsékleten fénytől védve 30 percig inkubáltam. Az optikai denzitást ELISA leolvasóval (Thermo Labsystems Multiskan EX) 450 nm-en olvastam le, majd az IGF-1 mennyiséget ng/ml-ben kalkuláltam.

### 3.11. Az idegsejt képződés immunhisztokémiai vizsgálata

Az állatok dekapitalását követően formalinos fixáció és 70% etanolos kezelés után az állatok fél nagyagy szövetét paraffinba ágyasztuk. A szövetmintákból 5 µm vastag szeleteket vágunk, majd xylen-nel és etanollal történt deparaffinálás után a metszeteket 3x10 percig PBS-ben mostam. A mintákat ezt követően DNAase pufferben és 96%-os etanolban mostam, majd DNAase I-et (Sigma Aldrich #DN-25) használtam a DNS emésztéshez. Az antigén citrát pufferrel (pH 6,0) történő feltárása után a mintákat 15 percre 95°C-ig melegítettem, majd hagytam lassan szobahőmérsékletre visszahűlni. 3x5 perces PBS-sel történt mosás után a mintákat kecske szérummal blokkoltam (Vector #S-1000) egy órán át szobahőmérsékleten. Az elsődleges BrdU ellenes egér antitestet (BD Pharmingen #555627) blokkoló szérumban oldottam fel, majd az újonnan képződött sejtek vizsgálatára 1:200-as hígításban a metszetekre tettem, egy éjszakára, 4°C-on. Miután a metszeteket 0,2% Triton X-PBS-ben mostam, Alexa Fluor 546 festékkel konjugált, kecskéből származó, egér ellenes másodlagos antitestet használtam a kötődés kimutatására (30 perc, szobahőmérséklet, 1:200, Molecular Probes #A11001). Mosás után a metszeteket idegsejtmag (NeuN) ellenes, Alexa Fluor 488-al konjugált monoklonális antitest oldattal inkubáltam (Millipore #MAB377X) egy éjszakán át, 4°C-on, az idegsejtek vizualizálására. 0,2% Triton X-PBS-ben történő mosás után Hoechst 33342 festéket (Molecular Probes #H3570) alkalmaztam a sejtmagok megjelenítésére (10 perc, szobahőmérséklet). A metszetek Gel Mount-tal (Sigma #G0918) történő fedése előtt a mintákat desztillált vízben mostam.

A metszeten az agy hippokampális területén a gyrus dentatus és a hilus CA4-es régiójának granuláris sejtrétegében vizsgáltuk a változásokat. A megfestett szövetelemek vizualizálásához Axiovert 200M inverz mikroszkóppal és 63x-os Plan APOCHROMAT olaj immerziós differenciál interferencia kontraszt objektívvel (DIC) (NA/numerikus apertúra=1,4) felszerelt Zeiss LSM 510 Meta konfokális lézer szkennings mikroszkópot használtunk (Carl Zeiss, Jena, Németország). A Hoechst magfestést 405-30 dióda lézerrel (excitáció: 405 nm) gerjesztettük, majd a fluoreszcenciát 420-480 nm hullámhossz

tartományban detektáltuk. A NeuN jel vizualizálására 488 nm-es argon lézert használtunk, az emissziót 505-570 nm között detektáltuk. A BrdU jelet 543 nm-es HeNe lézerrel gerjesztettük, az emittált fluoreszcens jelet 560-615 nm között detektáltuk.

### **3.12. Intrahelikális 8-oxodG becslése**

Optimális vágási hőmérsékleten fixált, paraffinba ágyazott izom mintákból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezen fixált metszeteket deparaffináltuk, PBS-ben mostuk, levegőn megszárítottuk, majd a zsírokat acetone-metanol keverékével (1:1 arány) eltávolítottuk. Ezt követően a metszeteket PBS oldatban 15 percig rehidráltuk és korlátozott proteáz emésztésnek vetettük alá (100 mg/ml pepsin, Sigma Biochemicals) 0,1 N HCl-ban (15 perc, 37°C – előzetes kísérletek alapján meghatározva) (Boldogh és mtsai 2001). Ezt a preparátumot 0,1 µg/ml, nem-immunis IgG-vel inkubáltuk 30 percig, majd 0,5% BSA-t és 0,1% Tween-20-at tartalmazó PBS oldatban mostuk. A 8-desoxoguanine antitesttel (Trevigen Inc.) történt egy órás inkubálást követően (1:300) a mintákat PBS-T oldatban mostuk 3x15 percig. Ezután fluoreszcein-konjugált (F(ab')<sub>2</sub>) másodlagos antitestet (Santa Cruz Biotechnology) alkalmaztunk 60 percig. PBS-T-vel történt háromszori mosás után a DNS-t 10 ng/ml DAPI-val (4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) jelenítettük meg. A metszeteket ezután halványulást gátló médiummal (Dako Inc. Carpinteria, CA) fedtük.

Zeiss LSM 510 META konfokális mikroszkóp rendszert használtunk, a fluoreszceint 488 nm-es lézerrel gerjesztettük. A mikroszkópos képeket 60X-os, olaj immerziós objektívvel (NA=1,4) készítettük. A fluoreszcencia intenzitást metszetenként minimum 40 egységnyi területen (kb. 300 sejt) MetaMorph szoftverrel (Version 9.0r, Universal Imaging Corp) elemeztük (Bacsi és mtsai 2007, Bhakat és mtsai 2006).



### 3.13. Az OGG1 és az AcOGG1 szint mérése

A mikroszkóp tárgylemezen elhelyezett 5  $\mu\text{m}$  vastagságú metszeteket deparaffináltuk és PBS-ben mostuk, levegőn megszárítottuk, majd a zsírokat acetone-methanol keverékkel (1:1 arány) távolítottuk el. A mintákat pre-immun heterológ szérummal 30 percig blokkoltuk (1:10 hígítás PBS-T-ben, mely 0,5% BSA-t, 0,1% Tween-20-at tartalmazott), majd inkubáltuk az elsődleges antitestekkel. 1.) A reakcióhoz egy szintetikus peptid (C-DLRQSRHAQEPPAK) - mely az OGG1 C-végződését reprezentálja - ellen termeltetett tisztított OGG1 ellenes egér antitestet (humán OGG1 reaktív) használtunk (Antibodies-Online GmbH, Atlanta, GA, USA). 2.) Az OGG1 acetilált formájának kimutatására acetil K338 + K341 tisztított humán reaktív nyúl poliklonális OGG1 ellenes antitestet (Abcam, #ab93670) alkalmaztunk. Egy órás, 37<sup>o</sup>C-on történt inkubálást követően a mintákat 3x15 percig PBS-T-ben mostuk. Tisztított másodlagos antitest oldattal (kecske ellenes F(ab')<sub>2</sub>-fluoreszcein-konjugált és nyúl ellenes F(ab')<sub>2</sub>-rodamin-konjugált, Santa Cruz Biotechnology) egy órán át kezeltük a metszeteket, majd háromszor mostuk őket PBS-T-ben. Ezt követően a DNS-t DAPI-val (10 ng/ml) jelöltük. A mintákat halványulást gátló fedőanyaggal fedtük.

A jelölt sejtelemek vizualizálására Zeiss LSM 510 META konfokális mikroszkóp rendszert használtunk. A fluoreszceint 488 nm-en argon lézerrel, míg a rodamint 543 nm-en HeNe lézerrel gerjesztettük. A megfelelő dikroikus tükrökkel és az emittált fluoreszcencia detektálására alkalmas szűrőkkel felszerelt mikroszkóppal így elkülöníthető volt a zöld és a vörös fluoreszcens jel. A képeket 60x-os nagyítással készítettük. A két jel közti kolokalizációt a zöld és vörös képek egymásra helyezésével, MetaMorph szoftver (version 9.0r, Universal Imaging Corp, Sunnyvale, CA) segítségével vizsgáltuk (Bacsi és mtsai 2007, Bhakat és mtsai 2006).

### **3.14. Statisztikai elemzés**

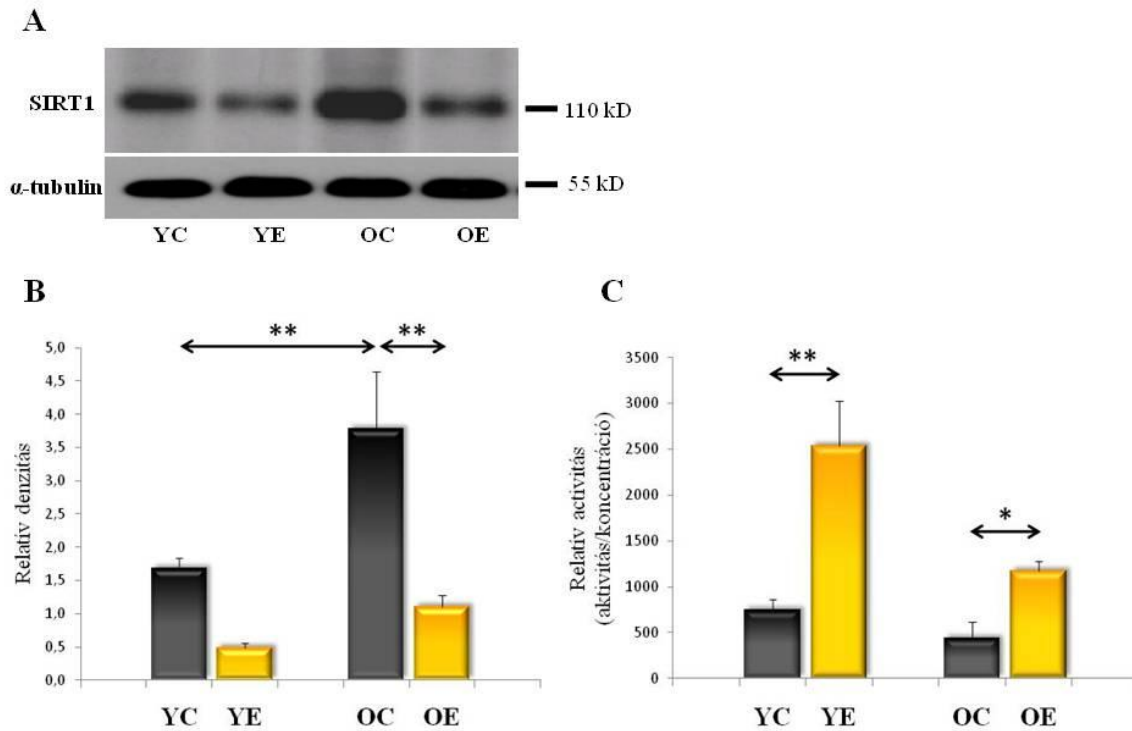
A statisztikailag szignifikáns eltéréseket illetve összefüggéseket normalitás vizsgálatot követően Statisztika 8.0 programmal vizsgáltam. A paraméteres adatsorok esetén a csoportok közötti különbségek kimutatására egy-utas ANOVA-t használtam, míg az összefüggéseket Korrelációs mátrix-al vizsgáltam. A nem-paraméteres adatok elemzésére Kruskal-Wallis ANOVA-t alkalmaztam. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -ben határoztam meg.

## ***4. Eredmények***

### **4.1. Az (A) vizsgálatból született eredmények – változások a gastrocnemius izomszövetben**

#### *4.1.1. Az öregedés és az edzés is hatással van a SIRT1-re*

A SIRT1 a sejt plazmájában és sejtmagjában is megtalálható, így mennyiségét és aktivitását mindkét sejt komponensben megmértem. Az öregedés szignifikánsan ( $p < 0.01$ ) növelte a SIRT1 mennyiségét a sejtplazmában (6. ábra A és B), míg az enzim specifikus aktivitása nem változott öregedéssel (6. ábra C). Az edzés következtében azonban az öregedés hatására megemelkedett SIRT1 mennyiség a fiatalokhoz hasonló szintre csökkent (6. ábra A és B,  $p < 0.01$ ), míg a rendszeres mozgás az enzim relatív aktivitását mindkét életkori csoportban megnövelte (6. ábra C,  $p < 0.01$  – fiatal,  $p < 0.05$  - öreg).



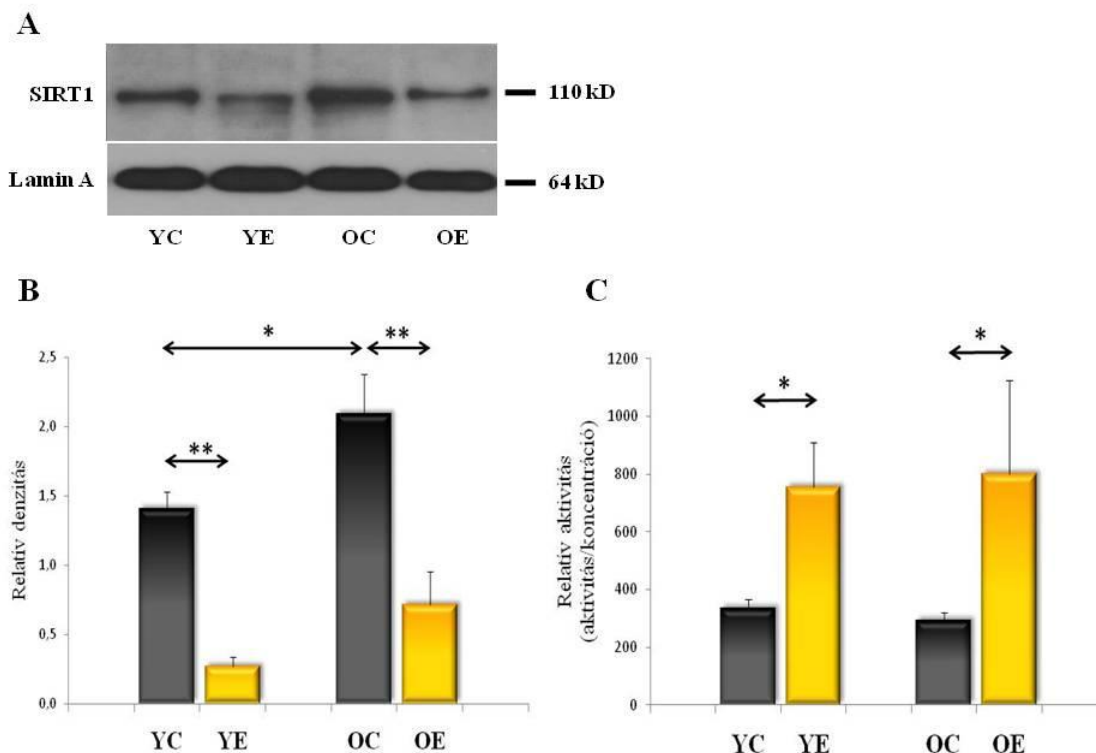
## 6. ábra

### A SIRT1 mennyiség és aktivitás változása a szarkoplazmában öregedés és fizikai edzés hatására.

A SIRT1 fehérje mennyiségének auto-radiogramja a szarkoplazmában. (A) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. A SIRT1 öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. (B) A SIRT1 relatív aktivitásának grafikai reprezentációja. (C) Az (A)-(C) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

A sejtmagban a szarkoplazmához hasonló képet találtam, azaz életkor függő növekedést az enzim fehérje mennyiségében ( $p < 0.05$ ), változatlan relatív aktivitás mellett (7. ábra A-C). A fiatal és idős, fizikailag inaktív életmódot folytató csoportokban megfigyelt SIRT1 mennyiség edzés hatására mindkét csoportban jelentős csökkenést

mutatott (7. ábra B,  $p < 0.01$ ). Mindemellett az edzés növelte a SIRT1 relatív aktivitását a sejtmagban is minkét életkori csoportban (7. ábra C,  $p < 0.05$ ).



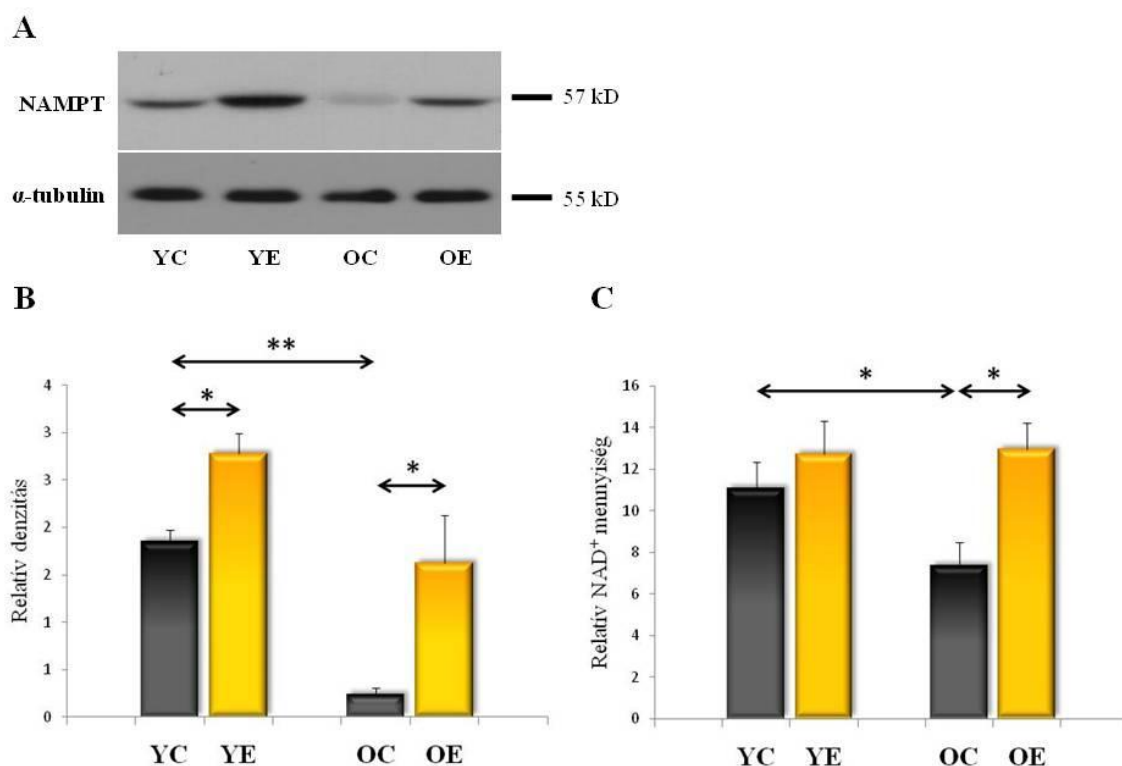
### 7. ábra

A sejtmagban lévő SIRT1 mennyiségének és aktivitásának változása fiatal és idős állatok vázizmában.

A SIRT1 fehérje auto-radiogramja a vázizom sejtmagjában (A). A csíkok denzitásának normalizálása a lamin A-hoz történt, mely belső kontrollként szerepel a sejtmagban. A SIRT1 öregedés és edzés hatására létrejövő mennyiségi változása. (B) A SIRT1 relatív aktivitásának grafikai reprezentációja az egyes csoportokban. (C) Az (A)-(C) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### *4.1.2. Az életkor függő, SIRT1-hez kapcsolt folyamatok edzéssel befolyásolhatóak*

A NAMPT mennyisége, mely az egyik  $\text{NAD}^+$  bioszintézis mértékét limitáló enzim, a fiatalokhoz képest csökkenést mutatott az idős állatcsoportokban (8. ábra A és B;  $p < 0.01$ ). Ezzel összhangban a  $\text{NAD}^+$  mennyisége szignifikánsan csökkent az idős állatok vázizmában (8. ábra C,  $p < 0.05$ ). Az edzés mind a fiatal mind pedig az idős csoportok esetén szignifikánsan növelte a NAMPT mennyiségét (8. ábra A és B;  $p < 0.05$ ). Figyelemreméltó, hogy az öreg edzett állatok esetében a NAMPT szintje elég széles tartományban változott, de a csoport átlagértéke közel azonos volt a fiatal kontroll állatokban tapasztalt értékkel. A  $\text{NAD}^+$  mennyisége esetében a fizikai aktivitás szignifikánsan megnövelte az idős korban megfigyelhető csökkent szintet (8. ábra C,  $p < 0.05$ ). Ezek az adatok azt mutatják, hogy az életkorral együtt járó  $\text{NAD}^+$  és NAMPT mennyiség csökkenése edzéssel megfordítható volt, ami hozzájárulhatott a SIRT1 specifikus aktivitásának változásához.



### 8. ábra

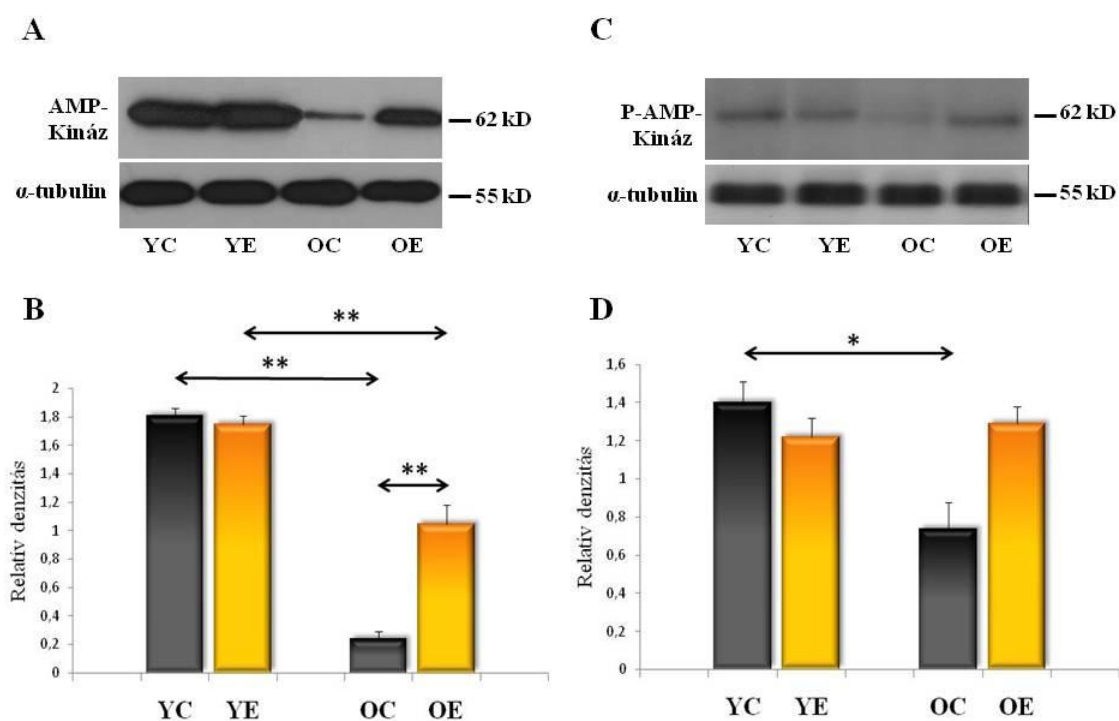
#### A NAMPT és a NAD<sup>+</sup> mennyiség változása a gastrocnemius izomban

A NAD<sup>+</sup>-bioszintetizáló enzim, a NAMPT mennyiségének auto-radiogramja. (A) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. A

NAMPT enzim mennyiségének változása öregedés és edzés hatására. (B) A fizikai aktivitásnak idős kori NAD<sup>+</sup> szint változásában mutatkozó kedvező hatása. (C) Az (A)-(C) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

A zsír metabolizmusban és a mitokondriális biogenezisben fontos szerepet játszó AMP-Kináz (AMPK), mely a sejt energia homeosztázisát jól jellemző mutató, szignifikáns csökkenést mutatott öregedés hatására (9. ábra A és B,  $p$ <0.01). A rendszeres fizikai aktivitás hatására a fiatal kontrol csoportnál megfigyelhető magas szint tovább már nem

növelhető. Jelentős eredmény viszont, hogy az idős állatok esetében, ahol a mitokondriális diszfunkció fontos tényező az öregedési folyamatban, mintegy 500 %-os növekedést sikerült elérni az energia egyensúlyt szabályozó AMPK mennyiségében (9. ábra B,  $p < 0.01$ ). Az AMPK aktivált formájaként ismert phospho-AMP-Kináz a teljes AMPK mennyiséghez hasonlóan szignifikáns csökkenést mutatott öregedés hatására (9. ábra C és D,  $p < 0.05$ ). Az edzés pozitív hatásaként növekvő tendenciát látunk az idős állatoknál a p-AMPK mennyiségében, a változás azonban nem érte el a szignifikáns szintet (9. ábra D).



### 9. ábra

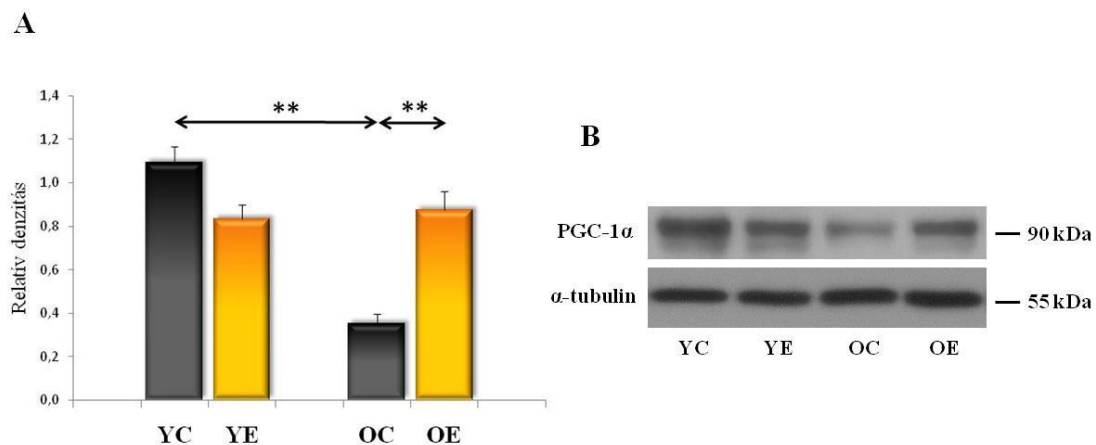
AMPK-kináz (A,B) és phospho-AMP-kináz (C,D) változása öregedés és edzés hatására

Az AMPK auto-radiogramja. (A) Az AMPK mennyiségének változása öregedés és edzés hatására. (B) A p-AMPK auto-radiogramja. (C) A p-AMPK mennyiségének változása a vizsgálati csoportokban. (D) Az (A)-(D) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett;



OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

A mitokondriális biogenezis és az energia metabolizmus fontos eleme, a PGC-1 $\alpha$  mennyiségében a gastrocnemius izomban öregedés hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (10. ábra A és B,  $p < 0.01$ ). A fiatal csoportok között mozgás hatására változás nem következett be, az időskori mitokondriális deficitet csökkentve azonban a rendszeres mozgásnak a preventív hatása mutatkozik, hiszen az edzés következtében a PGC-1 $\alpha$  mennyisége a fiatalkorhoz hasonló szintre emelkedett (10. ábra A,  $p < 0.01$ ).

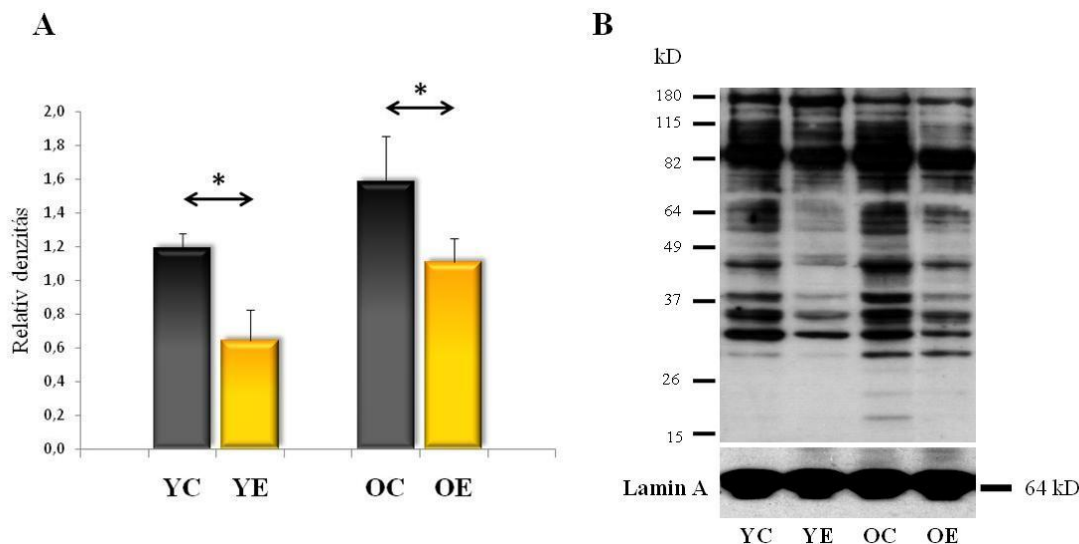


**10. ábra**  
PGC-1 $\alpha$  mennyiségének változása az egyes állat csoportokban

A PGC-1 $\alpha$  gastrocnemius izomban létrejövő változását mutató hisztogram. (A) A fehérje mennyiségi változását reprezentáló röntgen-kép. (B) Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*\* $p < 0.01$ .

A sejtmagi frakcióban a teljes acetilációs szintet Western blot analízissel vizsgáltam. Az acetilált lizin gyökök mennyisége szignifikáns különbséget ( $p < 0.05$ ) mutat

a kontroll és edzett állatok között mind a fiatal, mind pedig az idős csoportok esetében (11. ábra A és B). Általánosságban, az edzés csökkentette a teljes fehérje acetilációs szintet, mely adatok összhangban vannak az edzés hatására növekvő SIRT1 aktivitással (7. ábra C). Az öreg edzett állatok sejtmagi fehérjéinek acetilációs képe így a fiatal kontroll állatokéhoz hasonlóvá vált (11. ábra A és B).



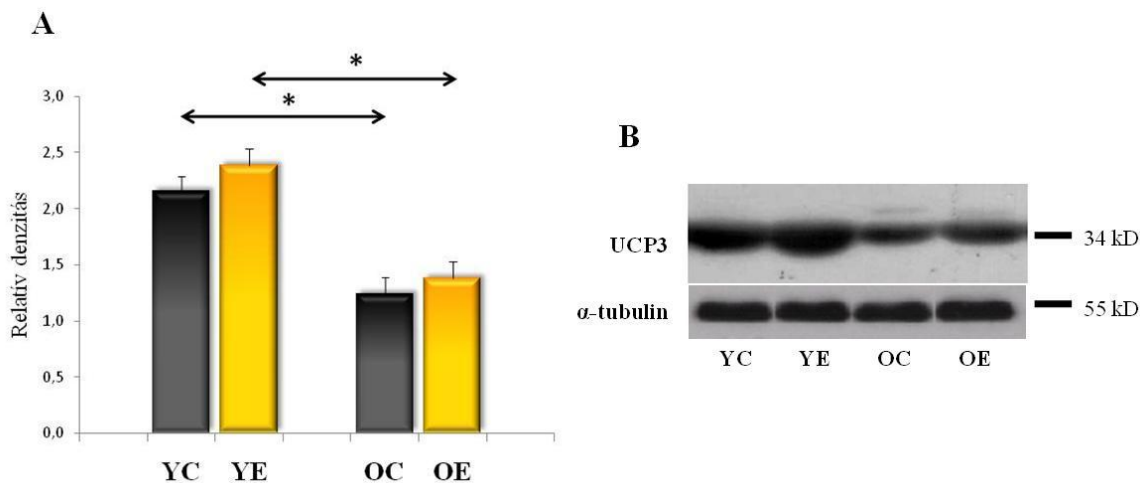
**11. ábra**

*Az acetilált fehérjék mennyiségi változása az izom sejtmagjában*

*Az acetilált fehérjék mennyiségének grafikus megjelenése a vizsgálati csoportokban. (A) Acetilált fehérjék mennyiségi változása a sejtmagi lizátumban (auto-radiogram). (B). A csíkok denzitásának normalizálása a lamin A-hoz történt, mely belső kontrollként szerepel a sejtmagban. Az (A) és (B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p < 0.05$ .*

Az intracelluláris ROS legnagyobb része a mitokondriális respirációs mechanizmus mellékterméke. Irodalmi adatok szerint a(z) UCP3 fehérje csökkenti a reaktív oxigén gyökök keletkezését (Jiang és mtsai 2009). Továbbá a(z) UCP3 nagy mennyiségben keletkezik a vázizomban és aktivitását a SIRT1 képes szabályozni (Amat és mtsai 2007). A

12. A és B ábrán látszik, hogy a vázizomban öregedésre a(z) UCP3 mennyisége csökkent ( $p < 0.05$ ). Kontroll vizsgálat során a cytochrome c (Cyto c) mitokondriális szintje nem mutatott szignifikáns különbséget az életkor tekintetében és az edzés sem befolyásolta a Cyto c mennyiséget (nem közölt adatok). Edzés hatására mindkét életkori csoportban növekvő tendenciát tapasztaltam a(z) UCP3 mennyiségében, a különbségek azonban nem érték el a szignifikáns szintet (12. ábra A és B).



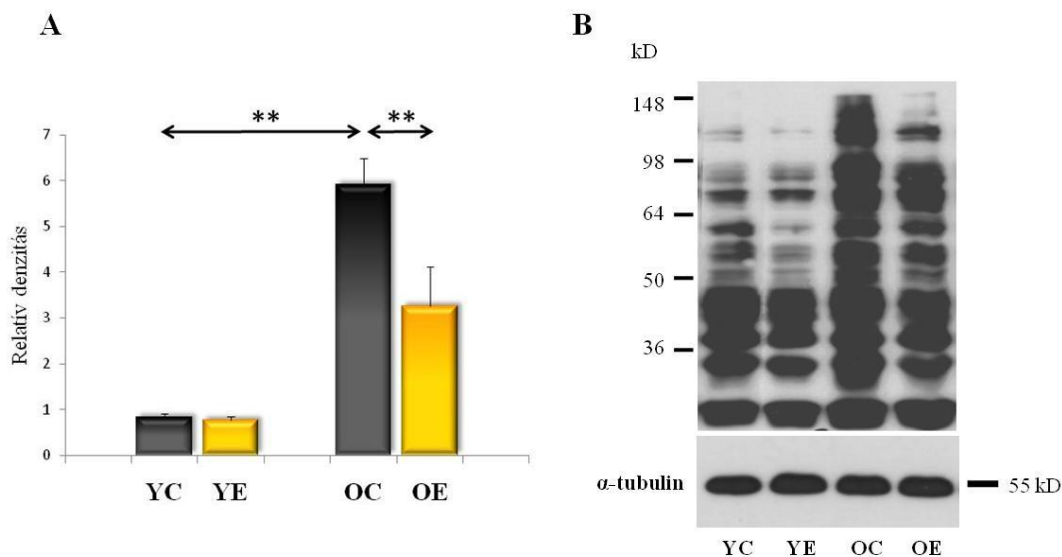
**12. ábra**  
UCP3 szint változása a vizsgálati csoportokban.

*A változás grafikai illusztrációja. (A) A UCP3 fehérje szint változása kontroll és edzett állat csoportok vázizmában. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A) és (B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \* $p < 0.05$ .*

#### 4.1.3. A fizikai aktivitás növeli az ellenállást az oxidatív stresszel szemben

A sejtekben és szövetekben lévő fehérjéket ért oxidatív stresszt általában a reaktív karbonil származékok mennyiségével becsülhetjük, azzal a szinttel, amely az életkor előrehaladtával növekedést mutat (Figueiredo és mtsai 2009, Kayali és mtsai 2007). Ennek

megfelelően szignifikáns növekedést tapasztaltunk a fehérje karbonilációs szintben az idős állatok vázizmában (13. ábra A és B,  $p < 0.01$ ). A fiatal állatok esetén az edzésnek nem volt szignifikáns hatása a fehérjék karbonilációjára. Fontos azonban, hogy az öreg állatoknál az edzés szignifikánsan ( $p < 0.01$ ) csökkentette az oxidatíván sérült fehérjék mennyiségét (13. ábra A és B).



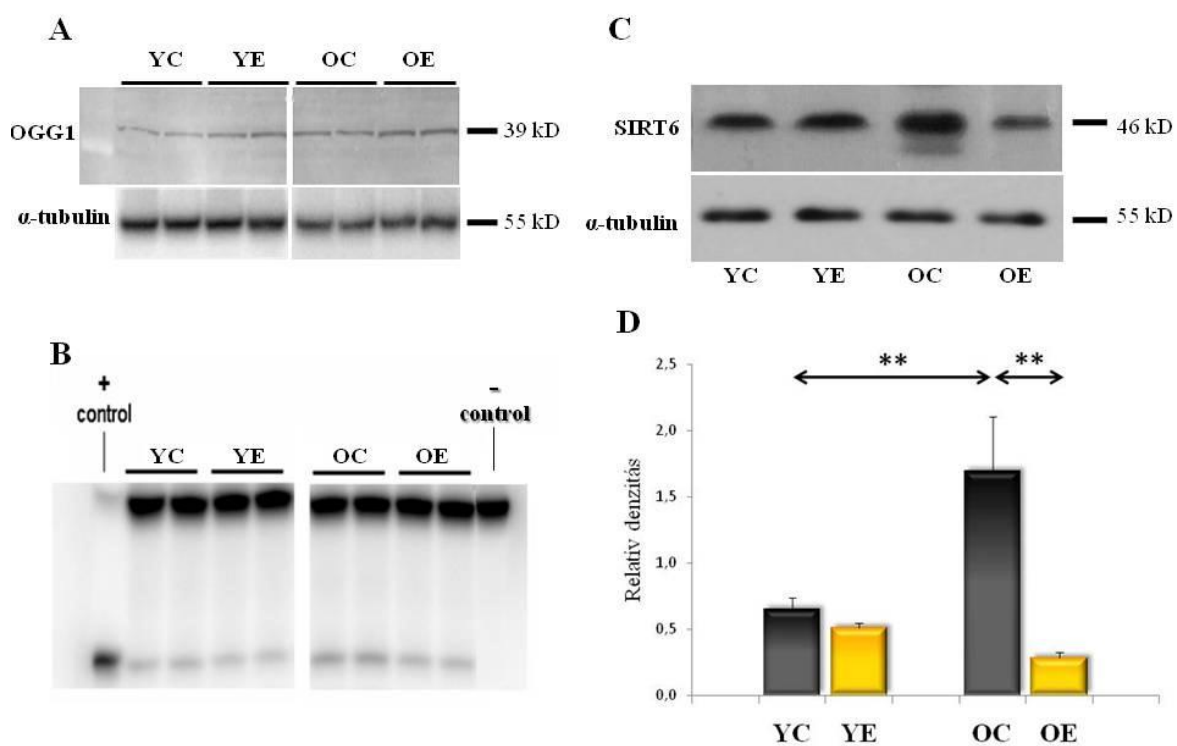
**13. ábra**

Karbonilált fehérjék mennyiségi változása öregedés és edzés hatására.

Az intenzitásmérés eredményeinek grafikus illusztrációja. (A) A csoportokat reprezentáló karbonilált fehérje auto-radiogram kontroll és edzett állatok vázizmából. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A) és (B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként;  $**p < 0.01$ .

Habár szignifikáns különbséget találtunk a fiatal és öreg állatok között a fehérje karbonilációs szintben, a DNS-ben lévő 8-oxo-Guanin mennyiségben szignifikáns csökkenést nem tapasztaltunk. Az 8-oxo-Guanin szintek a következők voltak: YC:  $0.87 \pm 0.23$ , YE:  $0.79 \pm 0.17$ , OC:  $0.76 \pm 0.15$ , OE:  $0.77 \pm 0.27$  (8-oxo-Gua/ $10^5$  guanin bázis). Ezt a DNS sérülést elsősorban az OGG1 enzim javítja (Bohr és mtsai 2002, Hazra és mtsai

2002), melynek a fehérje mennyisége növekvő tendenciát mutat a fiatal és öreg edzett állatok izmának sejtanyag lizátumában (relatív csík intenzitás: YC:  $100 \pm 8$ , YE:  $143 \pm 16$ , OC:  $138 \pm 19$ , OE:  $182 \pm 25$ ; 13. ábra A). Az OGG1 javító enzim aktivitásában létrejövő változások nem érték el a szignifikáns szintet (14. ábra B). Erős funkcionális kapcsolat nem mutatkozott az OGG1 és a SIRT6 között a jelen mintában, bár mind az OGG1, mind a SIRT6 mennyisége növekedett az öregedés hatására, mely növekedést az edzés szignifikánsan csökkentett (14. ábra C és D).



#### 14. ábra

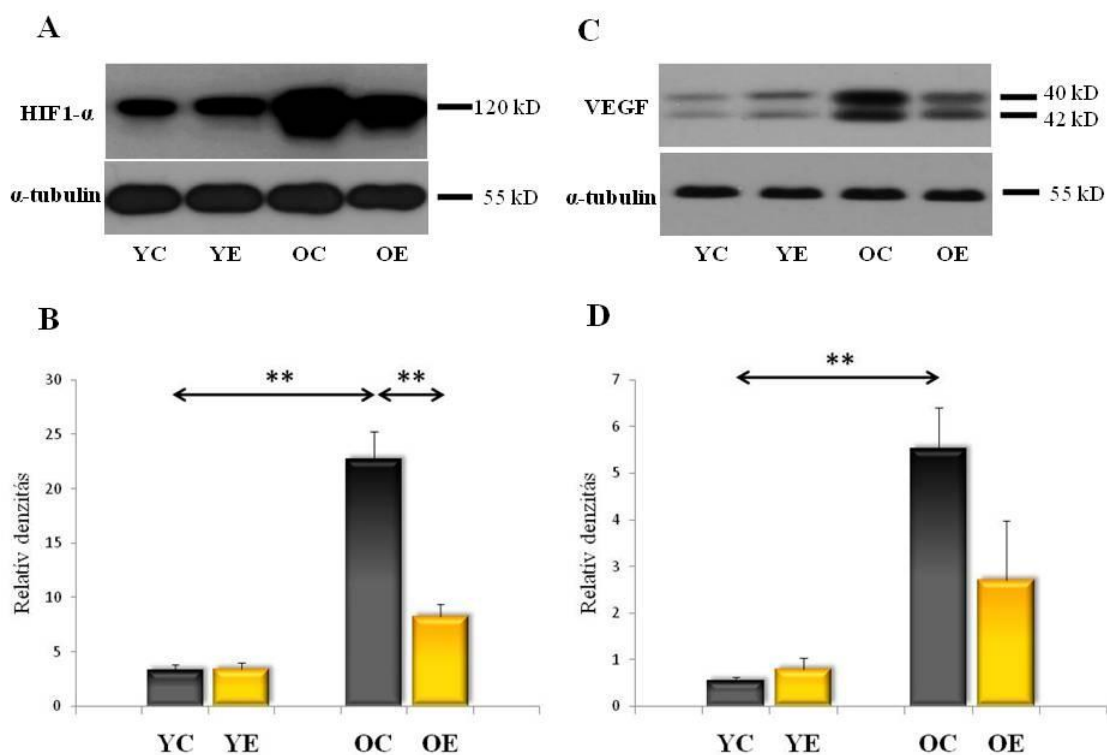
Az OGG1 és a SIRT6 mennyisége és aktivitása az inaktív és edző, fiatal és idős állatokban.

A csoportokat reprezentáló OGG1 szint auto-radiogramja. (A) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az OGG1 aktivitását reprezentáló auto-radiogram. (B) A csoportokat reprezentáló SIRT6 auto-radiogram. (C) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső

*kontrollként szerepel. A SIRT6 mennyiség intenzitás elemzésének grafikai illusztrációja. (D)*

*Az (A)-(D) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*\* $p < 0.01$ .*

A fizikai edzés számos adaptációs mechanizmust indukál, ami növeli a vázizom oxidatív és metabolikus kapacitását, melyek közül a HIF-1 $\alpha$  expresszió növekedése az egyik fontos faktor (Mason és mtsai 2007). Jelen modellben, a redox egyensúly életkor függő eltolódása (amit a karbonilált fehérjék növekvő szintje mutat 13. ábra A és B) jelentősen növeli a HIF-1 $\alpha$  mennyiségét az idős állatok izommintáiban (15. ábra A és B,  $p < 0.01$ ). A HIF-1 $\alpha$  mennyisége azonos volt a fiatal kontroll és edzett állatokban. A HIF-1 $\alpha$  a VEGF-en keresztül vaszkularizációt vált ki, mely utóbbi mindkét életkorban pozitív korrelációt mutat a HIF-1 $\alpha$ -val ( $r = 0.815$ ; 15. ábra C és D). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a fizikai edzés az oxidatív stressz markereit tekintve csökkenti a fiatal és idős patkányok közötti különbséget.



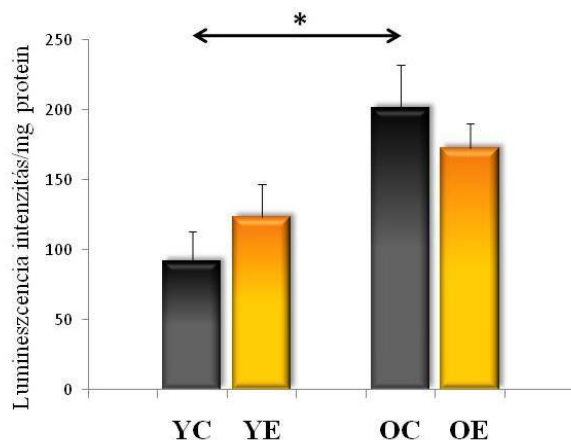
### 15. ábra

Az öregedés növeli a HIF-1 $\alpha$  és a VEGF szintet, melyet a fizikai edzés szignifikánsan csökkentett.

A HIF-1 $\alpha$  fehérje mennyiségi változásának auto-radiogramja. (A) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. A HIF-1 $\alpha$  változásának grafikai illusztrációja. (B) A VEGF öregedés és edzés hatására létrejövő változás. (C) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. A VEGF változásának grafikai megjelenítése. (D) Az (A)-(D) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*\* $p < 0.01$ .

Az oxidatíván sérült és elhasználódott fehérjék lebontási folyamatában döntő szerepet játszó proteaszóma komplex aktivitását vizsgálva a karbonilált fehérjék életkorral együttjáró növekedéséhez hasonlóan emelkedett aktivitást tapasztaltam öregedés hatására

(16. ábra,  $p < 0.05$ ). A fizikai aktivitásnak jelen vizsgálatban nem volt szignifikáns hatása az enzim aktivitására.



**16. ábra**

Az öregedés hatása a proteaszóma kimotripszinhez hasonló aktivitására

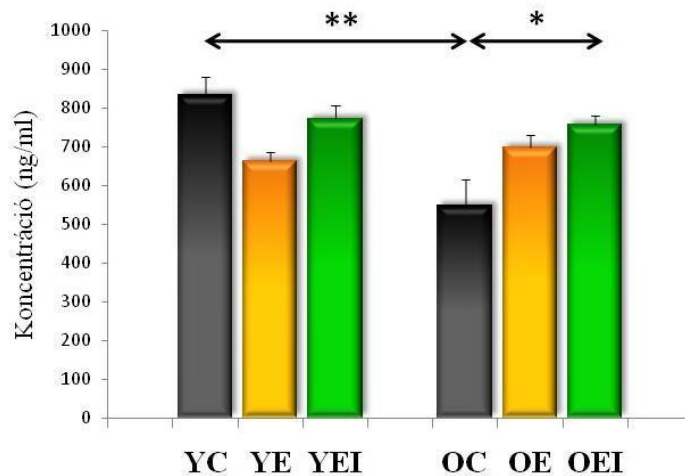
A proteaszóma luminometriás módszerrel becsült kimotripszinhez hasonló aktivitásának változása az életkorral. Az ábrán alkalmazott rövidítések: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ .

## 4.2. A (B) vizsgálatból született eredmények – változások a hippokampális agyszövetben

### 4.2.1. Az agyfunkció és az idegsejt képződés paradoxonja

A vérben a keringő IGF-1 mennyisége csökkent az életkorral (17. ábra,  $p < 0.01$ ). Az edzés nem okozott szignifikáns változást a mennyiségében, jóllehet csökkenő tendenciát mutat a fiatal csoportoknál. Két hetes IGF-1 adagolás megnövelte a vérben keringő IGF-1 mennyiségét az idős, edzett csoportban, a fiatal csoportban azonban nem (17. ábra,  $p < 0.05$ ).





**17. ábra**

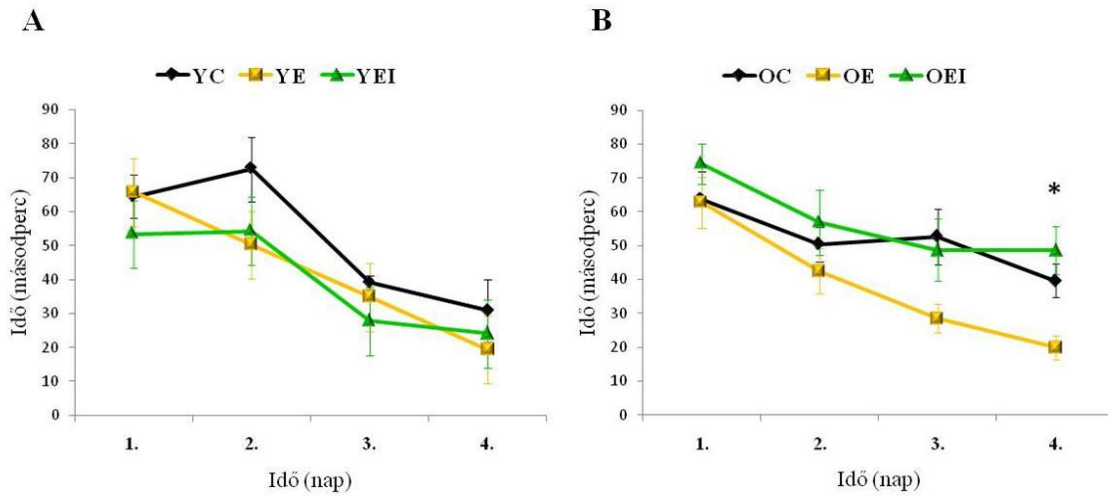
Az IGF-1 mennyisége a keringő vér plazmában

*Az IGF-1 fehérje vér plazmában mért koncentrációját bemutató hisztogram. Az ábrán feltüntetett rövidítések: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .*

Emellett az állatok térbeli tanulási képessége is csökkenést mutatott, mivel különbséget találtunk a fiatal és idős kontroll csoportok között a Morris Maze teszt 4. napján (18. ábra A és B,  $p < 0.05$ ). A futószalagos edzés javította a térbeli memóriáját az idős állatoknak ( $p < 0.05$ ), míg szignifikáns különbség a fiatal csoportok között nem volt megfigyelhető. Meglepő módon az edzés térbeli memóriára kifejtett kedvező hatását az IGF-1 adagolás eliminálta ( $p < 0.01$ ) így a kontroll és edzett-IGF-1 kezelt csoport teljesítménye közel megegyezett a Morris Maze tesztben (18. ábra A és B).

## Fiatal állatok

## Öreg állatok



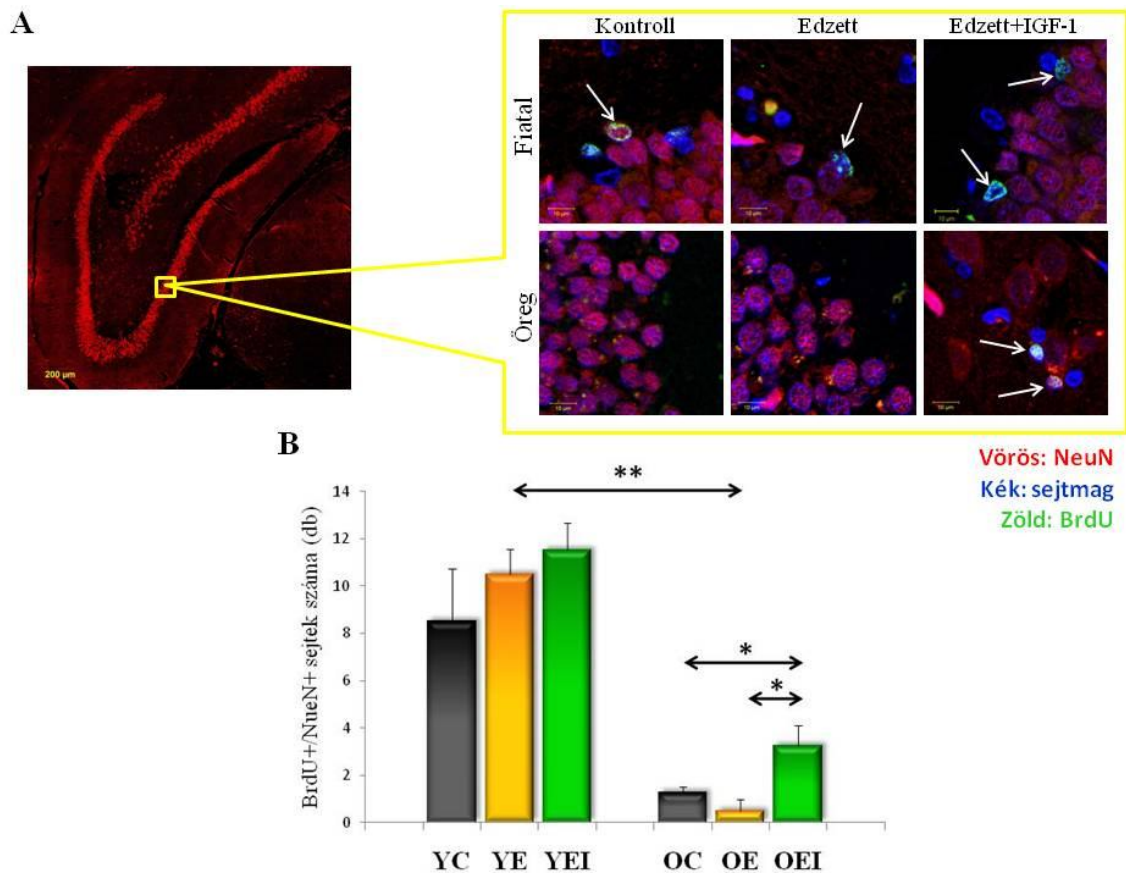
### 18. ábra

#### A Morris Maze teszt eredményei a fiatal és az idős állat csoportokban

A térbeli tanulási teszt során a víz felszíne alatt elhelyezett platform megtalálásához szükséges idő 4 egymást követő napon történt feladat ismétlés során a fiatal csoportokban.

(A) A platform megtalálásához szükséges idő az idős állatok esetén. (B) Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ .

Amikor a neurogenesis jelenlétét vizsgáltuk a BrdU újonnan képződött idegsejtek DNS-ébe történő beépülésén keresztül, adataink azt mutatták, hogy az öregedés szignifikánsan csökkentette az új idegsejtek képződésének mértékét (19. ábra A és B,  $p < 0.01$ ). Tehát nagy különbséget találtunk a fiatal és öreg állatok között, a fiatalok hippocampusában jóval nagyobb mennyiségű új idegsejt képződött. Másrészt az IGF-1 kezelés az edzéssel együtt a kontroll csoporthoz képest növelte a neurogenesis mértékét az öreg állatok esetében (19. ábra B,  $p < 0.05$ ).



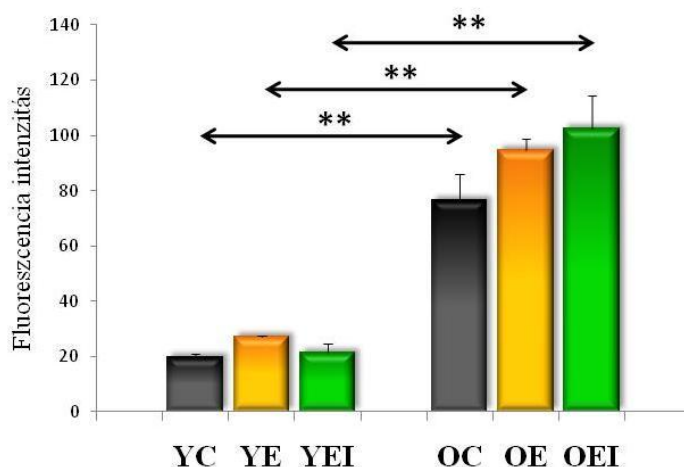
### 19. ábra

A neurogenesis mértékének meghatározása a BrdU és a NeuN pozitív sejtek kimutatásával

A bal nagyagy féltekéből készült szagittális irányú metszet hippocampális területe (5-szörös nagyítás), illetve a csoportok közti különbségeket reprezentáló metszetek 63-szoros nagyított képe (A). A sejtmag, a BrdU és a NeuN festés tripla kolokalizációját mutató sejtek száma a hippocampusz gyrus dentatus és hilus CA4-es régiójában. (B) Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

#### 4.2.2. A DNS sérülés és javítás folyamata a hippocampusban

Az öregedés elfogadott oxidatív stressz elméletének megfelelően a 8-oxoG mennyisége a fiatal állatokhoz viszonyítva szignifikánsan növekedett öregedés hatására ( $p < 0.01$ ), de jelentős változást nem mutatott edzés hatására. Az IGF-1 kezelés nem befolyásolta az 8-oxoG mennyiségét (20. ábra).



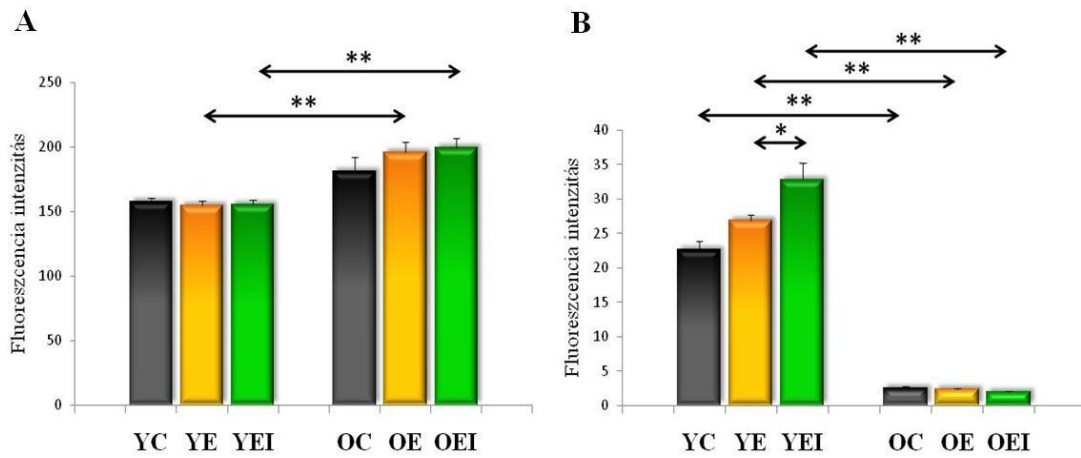
**20. ábra**

A 8-oxoG mennyiség öregedés hatására növekszik az immunohisztokémiai mintaelemzések alapján

A 8-oxoG-specifikus fluoreszcencia intenzitás átlagértékei az egyes vizsgálati csoportokban. Az ábrán alkalmazott rövidítések: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*\* $p < 0.01$ .

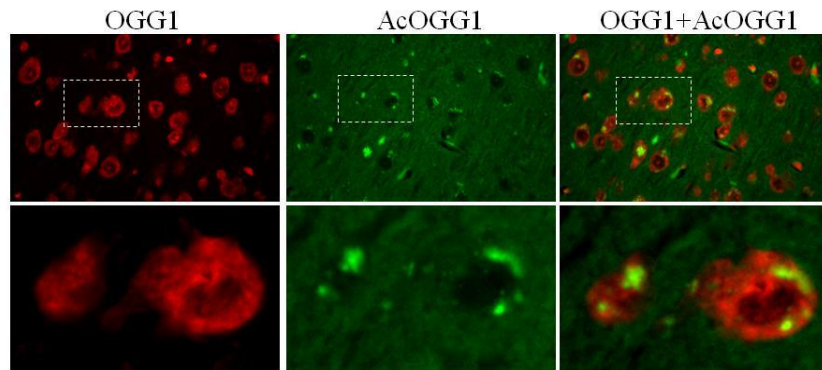
Az OGG1 javító enzim mennyiségében az öregedés növekedést idézett elő az edző és IGF-1 kezelt fiatal és idős csoportok között ( $p < 0.01$ ), az edzés és az IGF-1 azonban nem okozott változást az OGG1 mennyiségében (21. ábra A). Jelen vizsgálat lehet az OGG1

acetilációjának első *in vivo* detektálása, ami azt mutatja, hogy az öregedés csökkenti az OGG1 acetiláltságát, így valószínűleg az aktivitását, mivel a 15-28 %-os mennyiség növekedés mellett az acetiláltság csökkenése mintegy 90-94 %-os (21. ábra B,  $p < 0.01$ ). A 6 hetes edzésprogram nem befolyásolta sem a javító enzim mennyiségét, sem az acetiláltságát. Az IGF-1 kezelés szignifikáns növekedést mutatott az OGG1 acetilációjában a fiatal állatok esetén ( $p < 0.05$ ), az idős csoportokban azonban nem volt változás (21. ábra B).



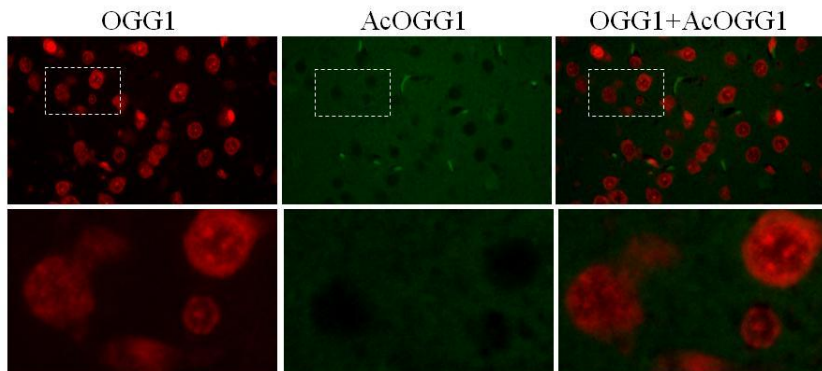
**C**

**Fiatal**



**D**

**Öreg**

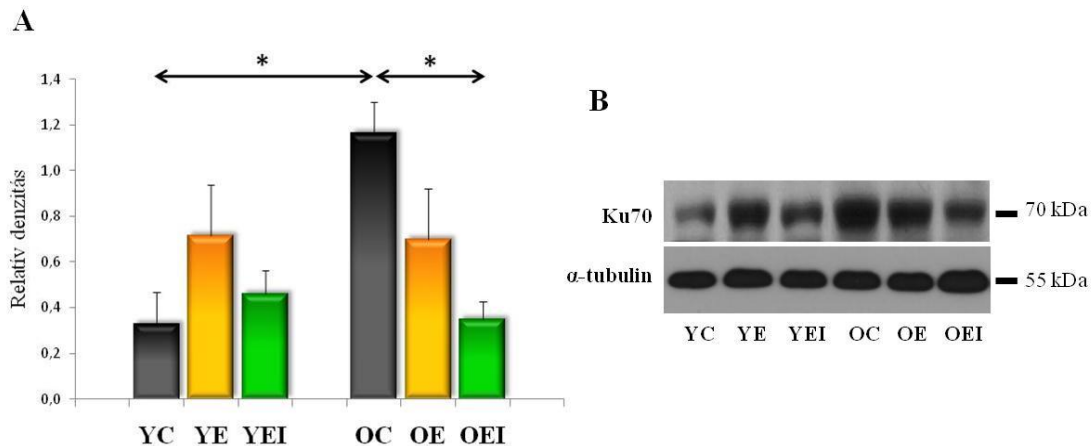


**21. ábra**

*Az OGG1 mennyisége növekedést (A), acetiláltsága jelentős csökkenést (B) mutat öregedés hatására*

Az OGG1-specifikus fluoreszcencia intenzitását reprezentáló grafikon. (A) Az AcOGG1 mintákon mért mennyiségének grafikai illusztrációja. (B) Példa az OGG1 acetiláció megjelenésére a fiatal állatokban. (C) Példa az OGG1 acetiláció hiányára az idős állatok esetében. (D) Az (A)-(D) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Másrészt a DNS kettős szál törés javításáért felelős Ku70 mennyisége növekedett a fiatal csoportokhoz viszonyítva az öregedő hippocampusban (22. ábra A és B,  $p < 0.05$ ). A Ku70 fehérje mennyisége az edzésprogram hatására csökkenő tendenciát mutatott az idős csoportoknál, az IGF-1 adagolása pedig tovább növelte a különbséget a kontroll és az OEI állatok között átlépvé ezzel a szignifikáns különbség statisztikai értékét (22. ábra A,  $p < 0.05$ ).



**22. ábra**

A Ku70 javító enzim mennyiségi változása öregedés, edzés és IGF-1 kezelés hatására

A Ku70 különböző csoportokban Western blottal mért mennyiségét bemutató hisztogram.

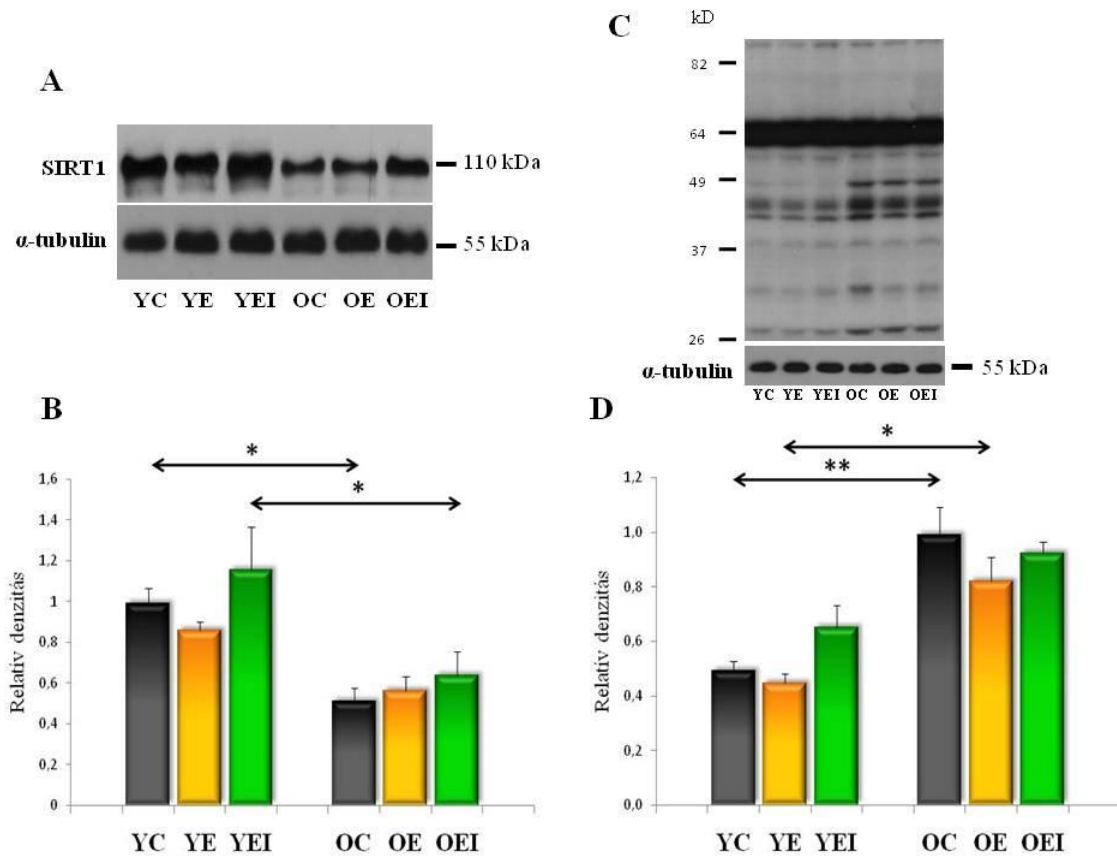
(A) A Ku70 vizsgálati csoportokat reprezentáló auto-radiogramja. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az

(A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ .

#### 4.2.3. Az öregedés, edzés és IGF-1 befolyásolta sirtuin-változások a hippocampuszban

Mivel az OGG1 és a Ku70 aktivitása is változtatható acetilációval, megvizsgáltuk a SIRT1 és SIRT3 NAD<sup>+</sup> függő deacetilázok változását. A SIRT1 mennyisége csökkent öregedésre (23. ábra A és B,  $p < 0.05$ ), amihez a sejt fehérjék acetilációjának növekedése társult (23. ábra C és D,  $p < 0.01$ ). A fizikai aktivitás és az IGF-1 kezelés nem volt hatással sem a SIRT1 koncentrációjára, sem az acetilált fehérjék mennyiségére (23. ábra).





### 23. ábra

#### A deacetilátor SIRT1 és az acetilált fehérjék változása a hippocampális agyszövetben

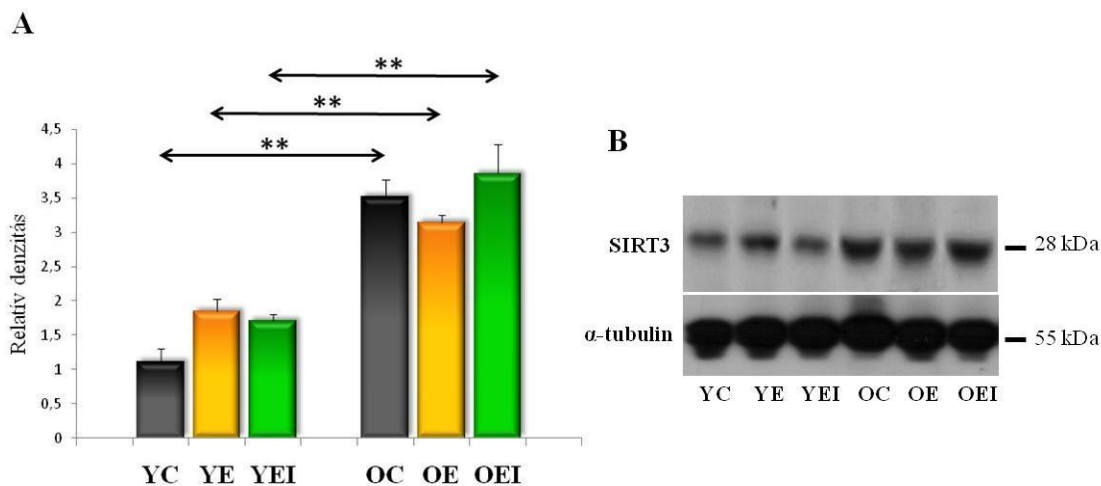
A SIRT1 fehérje vizsgálati csoportokban megfigyelt változását mutató auto-radiogram. (A)

A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. A SIRT1 koncentrációt reprezentáló grafikon. (B) A sejt fehérjék acetiláltsági állapotát mutató auto-radiogram. (C) Az össz-acetiláció változását bemutató hisztogram.

(D) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A)-(D) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*  $p < 0.05$ , \*\*

$p < 0.01$ .

Másrésről a SIRT3 koncentrációja növekedett öregedésre ( $p < 0.01$ ), míg az edzés és IGF-1 jelentős hatását nem tudtuk kimutatni a fehérje mennyiségében (24. ábra).



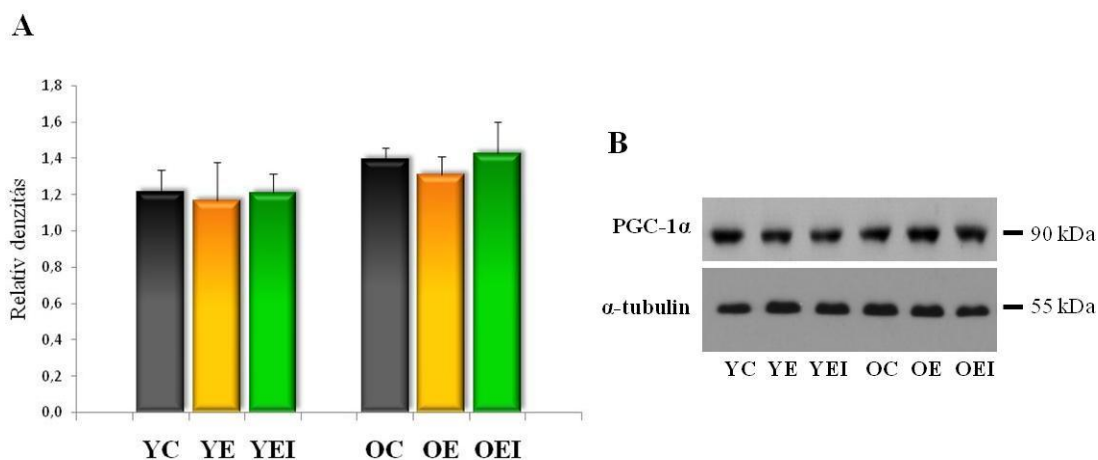
**24. ábra**

A SIRT3 fehérje mennyiségének változása a vizsgálati csoportokban

A SIRT3 öregedés hatására megfigyelhető felszaporodása a hippocampális agyi régióban.

(A) A SIRT3 mennyiségével arányos kép az auto-radiogramon. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek:  $\text{átlag} \pm SE$ , hat állat esetében csoportonként; \*\*  $p < 0.01$ .

Megvizsgáltuk a SIRT1 fehérje egyik fontos célpontját, a PGC-1 $\alpha$ -t, ami fontos szerepet játszik a mitokondrium biogenezisében, azonban sem öregedés, sem edzés, sem az IGF-1 hatására nem találtunk szignifikáns módosulást a fehérje mennyiségében az agy hippocampusz szövetében (25. ábra A és B).

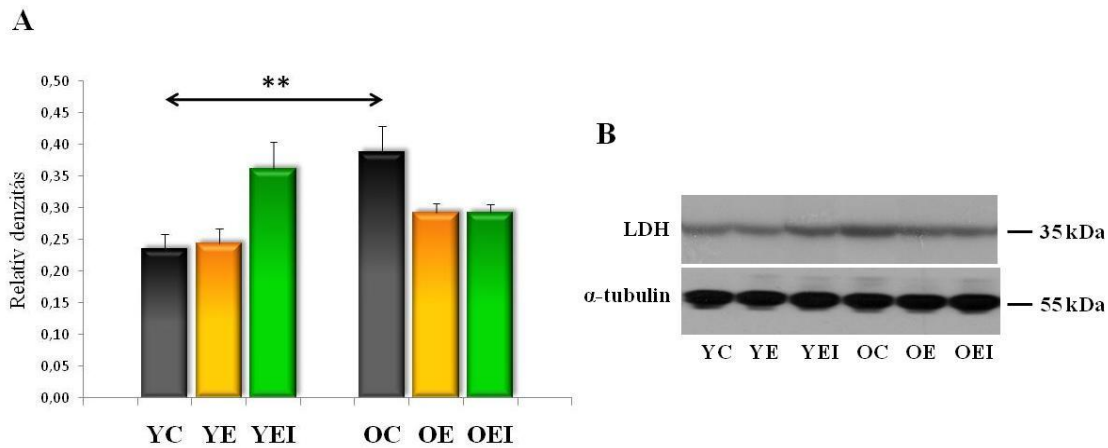


### 25. ábra

#### A PGC-1α mennyisége nem mutat változást a vizsgálati kezelések hatására

A PGC-1α koncentrációját mutató grafikon. (A) Az egyes állat csoportoknál megfigyelt intenzitásokat reprezentáló auto-radiogram. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként.

A normál öregedési folyamat során az agyban megfigyelhető tejsav szint növekedés a laktát dehidrogenáz által katalizált folyamat eredményeként alakul ki. Öregedés során a vizsgálati állataink hippocampális agyi régiójában megnövekedett mennyiségű LDH enzim mennyiséget tapasztaltunk ( $p < 0.01$ ). Rendszeres edzés hatására csökkenő tendenciát látunk az enzim mennyiségében, a változás azonban nem szignifikáns (26. ábra A és B).



## 26. ábra

### A Laktát-dehidrogenáz enzim mennyisége nő öregedés hatására

A Laktát-dehidrogenáz - mint öregedési marker – mennyiségi változása. (A) Az LDH autoradiogramja a vizsgált hat csoportban. (B) A csíkok denzitásának normalizálása az  $\alpha$ -tubulinhoz történt, mely belső kontrollként szerepel. Az (A)-(B) panelekben: YC - fiatal kontroll; YE - fiatal edzett; YEI – fiatal edzett+IGF-1 kezelt; OC - öreg kontroll; OE - öreg edzett; OEI – öreg edzett+IGF-1 kezelt. A feltüntetett értékek: átlag  $\pm$  SE, hat állat esetében csoportonként; \*\*  $p < 0.01$ .

## **5. Megbeszélés**

### **5.1. A gastrocnemius izomból született eredmények értékelése (A)**

A SIRT1 egy egyedülálló deacetilátor, mely a  $\text{NAD}^+$ -tól való függése miatt szorosan kapcsolódik a sejt metabolikus folyamataihoz (Bhakat és mtsai 2006, Canto és mtsai 2009, Sakamoto és mtsai 2009). Így a SIRT1 aktivitásának különböző faktorok általi növekedése - mint a kalória visszafogás, a rezveratrol vagy az SRT501 - megnövekedett élettartamot mutat. A mechanizmusok sokrétűek, melyek magukban foglalják az apoptózist és a gyulladás gátlását, vagy a fokozott DNS javítást (Pallas és mtsai 2009, Porcu és Chiarugi 2005). Bár a sirtuin aktivátorok kedvező hatásai az emlősök esetében még ismeretlenek, néhány adat azt mutatja, hogy a sirtuinek protektív és öregedést-segítő szerepet is játszhatnak (Li és mtsai 2008). A SIRT1 öregedésben játszott szerepe iránti nagy érdeklődés ellenére, csak kevéssé ismert a fizikai aktivitás és az öregedés hatása a SIRT1-közvetítette folyamatokban, a különböző szövetekben és különösen a vázizomban.

Jelen eredmények azt mutatják, hogy az öregedés növeli a SIRT1 mennyiségét, de csökkenő tendenciát eredményez a relatív aktivitás esetén a vázizom sejtplazmájában és a sejtmagjában egyaránt. Ezért úgy tűnik, hogy az aktivitás/SIRT1 molekula arány alacsonyabb az idős patkányok vázizmában azt mutatva, hogy ezekben az állatokban több inaktív, vagy kevesebb aktív fehérje van jelen. Fontos megjegyezni, hogy az öregedés eltérő módon hat a SIRT1 szintre a különböző szövetekben (Kwon és Ott 2008). Ez a megfigyelés párhuzamban van azzal az irodalmi adattal, miszerint humán vázizom sejtekben a sejtplazmában történt SIRT1 felhalmozódás mellett a sejtmagban SIRT1 mennyiség csökkenést tapasztaltak s-IBM-es (sporadic inclusion-body myositis) személyek esetén (Nogalska és mtsai 2010). Továbbá, a SIRT1 túltermelődése növelte, míg az alacsony vagy közepes expressziója csökkentette transz genetikusan egér szívben a kardiális hipertrófia, az apoptózis/fibrózis, a kardiális diszfunkció és az öregedés markereinek életkorral együtt járó növekedést (Alcendor és mtsai 2007). Az is lehetséges, hogy az

életkor-függő csökkenés a  $\text{NAD}^+$  koncentrációban, ami a csökkent NAMPT mennyiség következménye lehet, kompenzációs folyamatot eredményez a sejtben belül, ami növekvő SIRT1 termelődéshez vezet. A pontos mechanizmust nem ismerve az öregedés egy életkor függő SIRT1 növekedéshez vezet, az azonban világos, hogy a rendszeres edzés szignifikánsan növeli a vázizomban a SIRT1 relatív aktivitását öreg és fiatal állatok esetében egyaránt.

Jelen vizsgálati adatok szintén azt mutatják, hogy az öregedés csökkenti a  $\text{NAD}^+$  termelés egyik kulcsenzimének, a NAMPT-nak a mennyiségét (Yang és Sauve 2006). A csökkent  $\text{NAD}^+$  termelődés a sejtben azonnali metabolikus változásokat eredményezhet, az energiatermelés kimerülését eredményezve (Breen és mtsai 2008, Skokowa és mtsai 2009). Általánosan elfogadott ismeret, hogy a genotoxikus stressz a nukleáris és citoplazmikus  $\text{NAD}^+$  tartalék felhasználásával megöli a sejteket (Burkle 2005), a  $\text{NAD}^+$  DNS javító mechanizmushoz történő nagymértékű felhasználásával. Jelen adatok azt mutatják, hogy az öregedés a  $\text{NAD}^+$  mennyiség csökkenésével jár együtt, ami csökkenti a sejt túlélő képességét a különböző stresszorok hatására (Burkle 2005). Másrészt a megnövekedett NAMPT mennyiség a sejthalállal szemben szignifikánsan nagyobb ellenállást mutat (Yang és mtsai 2007), megegyezően a fizikai edzéssel kapcsolatos megfigyeléseinkkel, miszerint ez kedvező a sejt metabolizmus számára. Ezért ennek a munkának az egyik újszerű megállapítása, hogy az öreg állatok vázizmában a SIRT1 aktivitás megtartása érdekében a fizikai edzés preventív lehet az életkorral együtt járó  $\text{NAD}^+$  és NAMPT mennyiség csökkenésével szemben.

A SIRT1 fő funkciójaként a sejtmagban és a sejtplazmában fehérjék deacetilálását végzi. Az acetiláció egy olyan poszt-transzlációs változás mely képes befolyásolni a fehérjék/enzimek aktivitását és stabilitását. Bizonyos fehérjéket az acetiláció, míg másokat a deacetiláció aktivál, mindazonáltal a foszforilációhoz hasonlóan az acetiláció is általánosságban aktivációt indukál. Kimutatták már azonban, hogy a túlfoszforilálás már ellenkező hatást eredményez, melyet jól példáz az Alzheimer-kór oki tényezői között számon tartott hiperfoszforilált tau fehérjék. Azonban mivel az acetiláció hatásmechanizmusaival kapcsolatos ismereteink jóval rövidebb időre nyúlnak vissza, a

hiperacetiláció következményei jelenleg ismeretlenek. Feltételezzük azonban, hogy a foszforiláció mintájára az acetiláció bizonyos helyen és lizin csoportokon aktiválhat, míg ha túlzott, inaktiválhat is. Feltételezhető tehát az aktiváció és az acetilációs szint között is a harang alakú görbével leírható kapcsolat. A gastrocnemius izomban detektált acetilált fehérje szint a sejt fehérjék általános acetiláltsági állapotát tükrözi. Természetesen egy sejt acetiláltsági státuszát nem csupán a SIRT1 befolyásolhatja, hanem az aktívan működő acetilálók és deacetilálók közti egyensúly határozza meg. Fontos azonban megemlíteni, hogy a SIRT1 edzés hatására létrejövő relatív aktivitásának mindkét életkorban megfigyelt növekedése egybeesik a mintákban mozgás hatására létrejövő acetilált fehérje mennyiség csökkenéssel. Az öregedés hatására növekvő tendenciát mutató acetiláltsági állapot összefüggésben lehet a romló élettani funkciókkal, melyet a SIRT1 aktiválódás a kalória visszafogás hatásához hasonlóan meggátolhat.

A fehérje karboniláció mértéke szignifikánsan magasabb volt az öreg állatokban. Ez az oxidatív sérülés több más fehérjéhez hasonlóan részben gátolhatja a SIRT1 aktivitást (Radak és mtsai 2008). Érdekesség az is, hogy mind a fehérje oxidáció (karboniláció), mind az acetiláció esetében a lizin gyökök nagy mértékben érintettek azt sugallva, hogy a magasabb karbonilációs szint csökkentheti bizonyos gyökök acetilációját, potenciálisan befolyásolva a módosított fehérjék aktivitását (Nakamura A., személyes kommunikáció). A fizikai aktivitás kedvező hatása az életkorral együttjáró redox egyensúly oxidált irányba történő eltolódásának normalizálásában mutatkozik, hiszen képes volt mintegy 50 %-al csökkenteni az oxidatív károsodott fehérjék mennyiségét. Így az edzés, annak ellenére, hogy ROS termelést fokozó tevékenység, az adaptációs folyamat révén védi a fehérjéket a túlzott oxidatív károsodástól.

A protein oxidáció az aerob élet természetes következménye, túlzott mértéke azonban a fehérje funkció/enzimikus aktivitás csökkenéséhez vezet. A proteaszóma rendszer felelősnek látszik az oldható intracelluláris fehérje degradációért, amely a legtöbb sejtben ATP és ubiquitináció független úton is létrejön (Grune és mtsai 1997). A folyamat során a proteaszóma felismeri az oxidatív modifikáció révén kialakuló hidrofóbicitás változást az aminosavakon, mely ingert jelent a lebontásra. A redox sejt milió öregedés

hatására megfigyelhető oxidált irányba tolódása, a nagymértékű oxidatíván károsodott fehérje kompenzációs mechanizmusként az elimináló-rendszer, a proteaszóma komplex aktivitásának növekedését indukálja. Az öregedés során megfigyelt, általánosságban csökkenést mutató proteaszóma aktivitás elmélete több kutatási eredmény alapján is megkérdőjeleződik. Az idős életkorra jellemző jelentős izomtömeg veszteséget ugyanis nem képzelhető el alacsony proteolitikus aktivitás mellett (Altun és mtsai 2010), ami természetesen nem jelenti, hogy az óriási mértékű sérült fehérje felhalmozódást képes preventíven befolyásolni. Az edzés hatására az oxidatíván sérült fehérjék szignifikáns csökkenése mellett a proteaszóma aktivitása jelentősen nem változik, melynek hátterében alkalmazkodás révén hatékonyabbá váló lebontó folyamat kialakulását feltételezzük.

Az öregedés változást okoz a mitokondriális funkciókban, különösen az elektron transzport láncban, szabadgyökök keletkezését eredményezve (Figueiredo és mtsai 2009). A UCP3 csökkenti a mitokondrium membrán potenciálját, védi az izomsejteket a túlzott zsírsav felhalmozástól és csökkenti a ROS túlzott termelődését (Jiang és mtsai 2009). Jelen eredményeim azt mutatják, hogy az öregedés eredményeként létrejövő UCP3 szint csökkenés, ahogy azt korábban mások is leírták (Hoeks és mtsai 2006, Kontani és mtsai 2002), az egyik oka lehet az életkorral együtt járó ROS termelés növekedésének. A vizsgálatomban életkor függő SIRT1 növekedést és UCP3 szint csökkenést figyeltem meg, ami támogatja Amat és munkatársai (Amat és mtsai 2007) azon megfigyelését, hogy a SIRT1 gátolja a(z) UCP3 gén expresszióját. A fizikai terhelés mimikálja a kalória visszafogás hatását, miszerint mindkettő UCP3 fehérje koncentráció növekedést eredményez (Bevilacqua és mtsai 2005).

A mitokondriális funkció és az energia homeosztázis károsodás ismert mechanizmus az életkorral együttjáró biokémiai változások között. Eredményeink alátámasztják ezt a megfigyelést, hiszen mind az AMPK, mind az aktivált formát jelentő phospho-AMPK mennyisége csökkent öregedés hatására. Mivel az AMPK fontos szabályozója a sejten belüli zsír oxidációnak, így hozzájárulhat az életkor-függő inzulin rezisztencia kialakulásához is (Qiang és mtsai 2007). A rendszeres fizikai aktivitás jótékony, preventív hatásának bizonyítékát látjuk az AMPK-PGC-1-SIRT1 tengely edzés



hatására létrejövő aktivációjában, mely döntő fontosságú szerepet játszik a mitokondriális biogenezis létrejöttében.

A mitokondriális biogenezis igényli ezen kívül a mitokondriális és a sejtmagi fehérjék expressziójának koordinálását. A mitokondrium mintegy 1000-1300 fehérjét tartalmaz, melyek közül csak 13 fehérjét képes kódolni az mtDNS, a többi a sejtmagból kiinduló transzport folyamattal jut el a mitokondriumba. Ezen folyamat összehangolásában van nagy szerepe a PGC-1-nek. A fehérje aktiválható foszforilációval és deacetilációval egyaránt, így a mitokondrium biogenezisében a SIRT1 általi szabályozásnak fontos szerepe lehet. Eredményeink megegyeznek az irodalmi adatokkal, miszerint a mitokondriális biogenezis mértéke, így a PGC-1 is az életkorral csökkenést mutat (Bratcic és Trifunovic 2010). Az edzés hatására az izomban megnövekvő mitokondrium szám és az ezzel együttjáró PGC-1 aktiváció Holloszy és munkatársai kutatása révén ismeretes (Holloszy 2008), ami alátámasztja a saját eredményeinket, ami így az idős életkorban is javítható, hatékony mitokondrium funkciót feltételez.

A SIRT6 deficiencia okozza a legkézzelfoghatóbb fenotípust az összes sirtuin knockout modell közül, lassú növekedési ütem és a genotoxikus ágensek iránti érzékenység jellemzi (Lombard és mtsai 2008). A SIRT6-ot kromatinhoz kötött fehérjeként határozták meg, ami befolyásolja a DNS sérülés javítás hatékonyságát, valószínűleg a DNS polimeráz bétával való kapcsolatán keresztül (Mostoslavsky és mtsai 2006), ami betölti a DNS láncban az üresen maradó helyet az 5'-deoxiribóz-foszfát eltávolítása után, mielőtt a DNS ligáz által a BER utolsó lépése befejeződne. 8-oxoG az egyik legjellemzőbb DNS sérülés, ami elsősorban az OGG1 által javítódik. Egy korábbi méréstől eltérően (Radak és mtsai 2002a) a jelen vizsgálatban nem tapasztaltam életkorral együtt járó 8-oxoG szint növekedést a gastrocnemius izomban. A két vizsgálatban használt patkányok eltérő megterhelése és életkora magyarázhatja a különböző eredményeket. Másrésztől életkor függő SIRT6 és OGG1 fehérje szint növekedést figyeltem meg, ami nem zárja ki, hogy a SIRT6 képes szabályozni az OGG1-et.

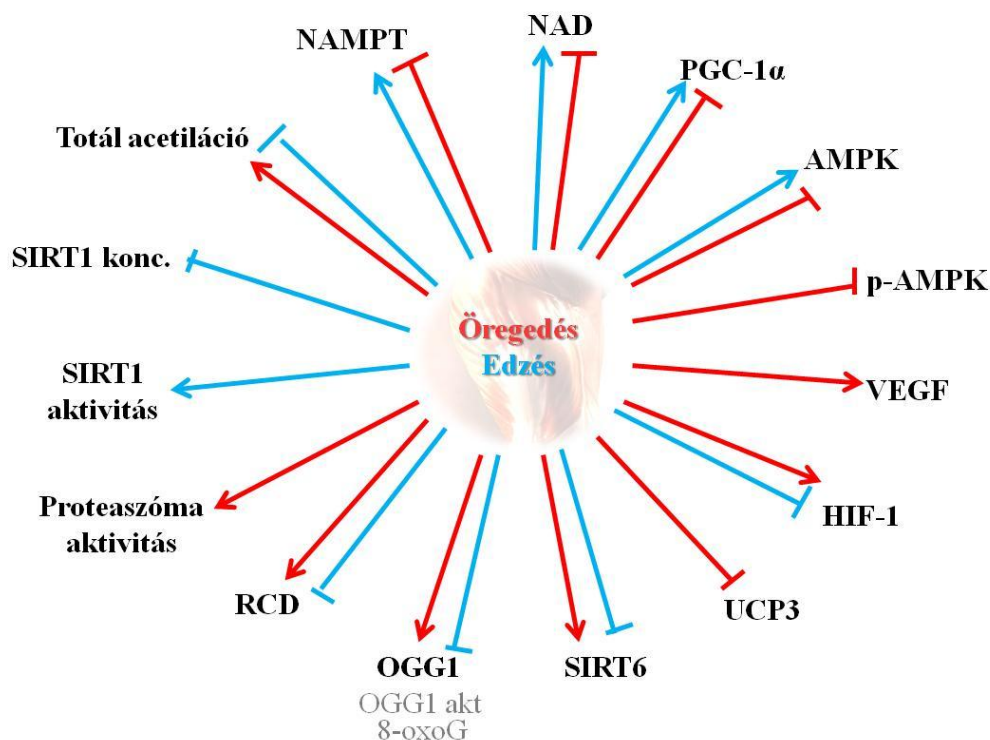
Az OGG1 sérülést kivágó aktivitása az acetilálódással szignifikánsan nő (Bhakat és mtsai 2006). Jelen vizsgálat eredményeiből nem következtethetünk egyértelműen a SIRT1 vagy a SIRT6 pontos szerepére az OGG1 szabályozásában.

Vizsgálatom másik újszerű megállapítása, a HIF-1 $\alpha$  és a VEGF szint életkorral együtt járó növekedése. Érdekes módon az edzés csökkentette a HIF-1 $\alpha$  mennyiségét az öreg csoportban, ami ellentétesnek látszik azzal a felfogással, hogy a HIF-1 $\alpha$  irányítja a vázizom edzés-indukálta oxidatív adaptációját (Freysenet 2007). Mindazonáltal friss irodalmi adatok a HIF-1 $\alpha$  mitokondriális adaptációra gyakorolt negatív hatását feltételezik (Mason és mtsai 2007). Azonkívül a jelen adatokkal összhangban mások is megfigyelték, hogy a fizikai aktivitás csökkenti a vázizom HIF-1 $\alpha$  expresszióját (Lundby és mtsai 2006). Kimutatták, hogy az oxigén szint változása és a HIF-1 $\alpha$  indukálása függ a mitokondriálisan keletkező ROS-tól, de független az oxidatív foszforilációtól (Brunelle és mtsai 2005). Ezért a redox szenzitív HIF-1 $\alpha$  mennyiség növekedett az idős állatok vázizmában, jelezve a nem megfelelő oxigén ellátást. Ez a megfigyelés jól korrelál a növekvő VEGF mennyiséggel, ami transzkripciós szinten függ a HIF-1 $\alpha$ -tól. Az edzés egyaránt preventív volt az életkorral együttjáró HIF-1 $\alpha$  és a VEGF növekedéssel szemben.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük a gastrocnemius izom vizsgálathoz felállított hipotéziseinkről:

- A.1. A rendszeres fizikai aktivitás befolyásolja a SIRT1 mennyiségét/aktivitását és az ehhez kapcsolódó mechanizmusokat: **IGAZ.**
- A.2. A rendszeres edzés SIRT1-függő utak révén lelassítja a vázizom öregedési folyamatát: **IGAZ.**
- A.3. Az általunk alkalmazott fizikai edzés preventív hatású az életkorral együtt járó energiatermelő folyamatokat érintő elégtelenséggel szemben: **IGAZ.**
- A.4. Az öregedés során oxidatív stressz állapot fejlődik ki, melynek mértékét a rendszeresen végzett fizikai aktivitás képes mérsékelni: **IGAZ.**

A gastrocnemius izomból született mérési eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze (27. ábra).

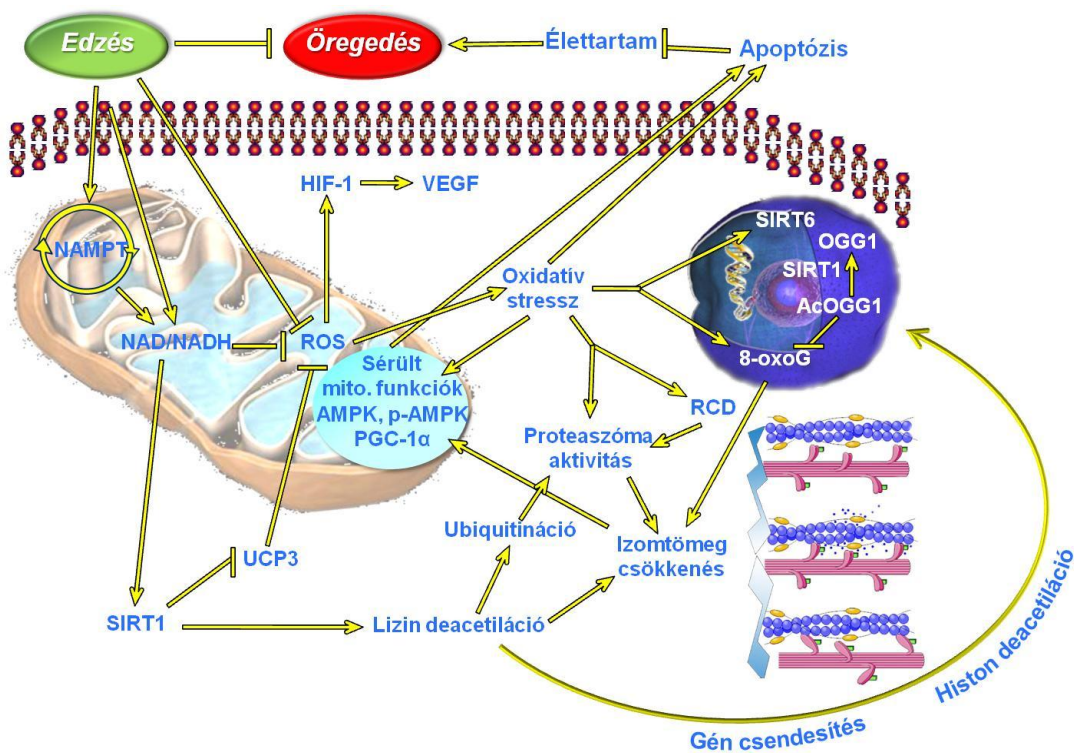


**27. ábra**

A gastrocnemius izomból született eredmények összefoglalása

→ növelés, aktiváció; ┘ csökkenés, gátlás.

Eredményeink alapján a következő hipotetikus elképzelésünk van a vázizomban lezajló, SIRT1-el összefüggő változásokról. Természetesen a folyamatokban minden koncentráció és aktivitás függő, így alacsony vagy magas szint esetében más és más irányú kapcsolatok vannak a lenti szabályozó rendszerben (28. ábra).



28. ábra

*A vázizomban lezajló változások hipotetikus modellje*

Egy vázizom sejt részlet sematikus képe. → aktiváció, | gátlás.

## 5.2. A hippokampális agyi régióból született eredmények értékelése

### (B)

A vérben keringő IGF-1 mennyiségét detektálva elsődlegesen az alkalmazott kezelés ellenőrzését kívántuk megtenni. Az öregedéssel együtt létrejövő általános tendenciát, tehát az anabolikus folyamatok háttérbe szorulását és a katabolikus folyamatok tényerését tükrözi az életkorral együttjáró IGF-1 szint csökkenése. A fiatal állatcsoportok esetében a fiziológiásan magas IGF-1 szintet a kívülről bejuttatott mennyiség nem befolyásolta, viszont az öregedéssel lecsökkent mennyiség jelentősen növelhető volt, mely a felépítő folyamatok aktivációját szolgálhatja.

Van Praag és munkatársai (van Praag és mtsai 1999) által publikált korszakalkotó cikk leírta, hogy az edzés nem csak javítja a térbeli memóriát, hanem neurogenezist is eredményez, amit mások is bizonyítottak (Holmes és mtsai 2004). Később azt is kimutatták, hogy ezek az újonnan képződött idegsejtek funkcionálisak (van Praag és mtsai 2002). Ezáltal az újonnan képződött idegsejtek és az edzés funkcióra kifejtett kedvező hatása közötti kapcsolat bizonyítást nyert. Jóllehet, a mi adataink szerint is az edzés indukálta neurogenesis és az edzés indukálta javuló agyfunkció párhuzamos folyamatok, azonban nem feltétlenül függenek össze. Az azonban már eddig is ismeretes volt, hogy az edzés nagyon sokrétű hatással van az agyra, így a vaszkularizációra, a metabolikus jelátviteli folyamatokra, a neurotrofin szabályozásra vagy az oxidatív pre-kondicionálásra (Radak és mtsai 2001a, Radak és mtsai 2010).

Az IGF-1 adagolása edzéssel együtt növelte az új idegsejtek képződését az öreg állatok esetében, de nem várt módon eliminálta az edzés térbeli tanulási képességre kifejtett kedvező hatását. Friss irodalmi adatok azt mutatják, hogy IGF-1 ellenes antitestek adagolása, mely blokkolja az IGF-1 funkciót, egerek esetén nem befolyásolta az elrejtett platform megtalálásának idejét a Morris Maze teszt során (Llorens-Martin és mtsai 2010). Azt is leírták, hogy az edzés általi neurogenesis és az agyi plaszticitás lehet IGF-1 függő és független folyamat egyaránt (Llorens-Martin és mtsai 2010), illetve, hogy az edzés agyfunkcióra kifejtett kedvező hatásai csak részben függenek az IGF-1-től (Trejo és mtsai 2008). Adataink részben megfelelnek ezeknek a megállapításoknak, míg a különbségeket az edzésintenzitásbeli eltérések, illetve az állatok közti fajta különbségek okozhatják. Friss irodalmi adatok szerint azonban, míg az edzésnek pozitív hatása van az agy funkcióra (Morris Maze teszt), addig az edzéssel együttesen, az agyba lokálisan bejuttatott IGF-1 adagolás felejtést idéz elő, ahol az edzett+IGF-1 kezelt csoport memória teljesítménye a nem mozgó állatokéhoz hasonlóvá vált. A javuló kognitív folyamatok magyarázataként az edzésre javuló inzulin érzékenységet, a növekvő inzulin receptor (IR) aktivációt, illetve az IR szinaptikus membránokra történő transzlokációját, tehát az inzulin jelzőrendszer fokozódását nevezik meg. Az edzés hatására kialakult aktivált inzulin jelzőrendszer esetében azonban külső IGF-1 adagolás hatására hiperaktiváció következik be, mely már

excitotoxikus hatású és gátlólag hat az agyi funkcióra (Muller és mtsai 2010). Muller és munkatársainak IGF-el kapcsolatos megállapítása újszerű, melyet saját eredményeink is megerősítenek, ugyanakkor általános tény, hogy az IGF-1 neuroprotektív hatású. A funkció csökkenés kialakulhatott tehát az inzulin jelzőrendszeren keresztül, a neurogenesis, azonban más útvonal aktivációjának eredménye. Így tehát az új idegsejt képződés nem mindig jár együtt a jobb agyi funkcióval.

Eredményeink kimutatták, hogy az öreg agyban az edzés IGF-1 adagolással együtt képes volt neurogenesis előidézni, így nem zárhatjuk ki, hogy hasonló jelenség a humán agyszövetben is lejátszódhat. Természetesen nem az összes megfigyelésünk ültethető át az emberi fajra, habár távolabbi célunk humán betegségekben és rendellenességekben is alkalmazható terápiás eszközök megtalálása lenne. Adataink tehát felhívják a figyelmet az edzés és IGF-1 kezelés komplex hatásának további tesztelésére, hiszen az új idegsejt képződés jelentős szerepet kaphat betegségekben való felépülésben.

Az edzés egyik agyra kifejtett figyelemreméltó hatása a reaktív oxigén gyökök termelésének, a redox jelzőfolyamatoknak és az oxidatív sérüléseknek a befolyásolása, ami könnyedén képes a funkciókba beavatkozni (Foster 2006, Navarro és Boveris 2007, Radak és mtsai 2001b). A DNS oxidatív modifikációja könnyedén növekvő apoptózist eredményezhet, a gátolt funkciókat és a DNS sérülés idegsejtekben történő felhalmozódását pedig az agyi öregedés és a neurodegeneratív betegségek egyik fő faktorának tartják (Bohr és mtsai 1998, Schmitz és mtsai 1999).

Eredményeink azt mutatták, hogy öregedés hatására növekszik a patkányok hippocampusának 8-oxoG szintje, ami potenciálisan veszélyeztetheti az agyfunkciót (Pastoriza Gallego és Sarasin 2003, Wong és mtsai 2008), ezért a 8-oxoG típusú DNS sérülés javítása a sejt túlélése szempontjából az egyik legfőbb prioritás. Az OGG1 fehérje mennyisége növekedett az idős patkányok agyában, ami egy kísérlet lehet a sejt részéről, hogy küzdjön a megnövekedett mennyiségű 8-oxoG-vel, ebben az esetben azonban sikertelenül. Ennek az eredménytelenségnek az egyik oka az a tényező lehet, hogy az OGG1 acetilációs szintje nagyon alacsony marad az idős állatok hippocampusában. Az

OGG1 javító enzim acetilációja az enzim funkciójának, tehát a hibás DNS rész kivágásának aktivációját jeleníti (Bhakat és mtsai 2006, Szczeny és mtsai 2004). Másrészt a fiatal csoportokban az edzés, különösen az IGF-1 adagolással együtt növelte az OGG1 acetilálását. Elsőként mutattuk itt ki, hogy az OGG1 enzim acetilációja *in vivo* körülmények között végbemegy. Ez a megállapítás azt sugallhatja, hogy olyan farmakológiai manipuláció, amely az OGG1 acetilációját idézi elő, kedvező hatású lehet öregedés illetve olyan betegségek során, ahol a 8-oxoG kiváltotta apoptózis és a mutációk jelentősen fokozottak. Edzés hatására jelen vizsgálatunkban nem sikerült csökkenést kimutatni az öregedés során megnövekedett 8-oxoG mennyiségében. Ez azonban a legfrissebb, még bírálat alatt lévő kutatási eredmények szerint nem biztos, hogy baj. A DNS hélixéből kivágott szabadon keringő 8-oxoG nagy mennyiségben apoptózist indukálhat, szabadgyök termelődés növekedését eredményezhet, így öregedést indukálhat (Boldogh I, Sárga L. szóbeli kommunikáció).

A Ku70 fontos DNS javító fehérje, ami acetilálódva apoptózist indukál (Subramanian és mtsai 2005). Irodalmi adatok alapján úgy tűnik, mind a SIRT1, mind a SIRT3 deacetilálja a Ku70-et (Jeong és mtsai 2007, Sundaresan és mtsai 2008) és növeli a sejt túlélését. Az OGG1-hez hasonlóan a Ku70 öregedés hatására történő mennyiségi növekedése az öregedéssel együttjáró dupla szálú DNS törés gyakoribb előfordulásának hatására létrejövő kompenzációs mechanizmus lehet. Edzés és IGF-1 kezelés hatásaként jelentkező csökkenése pedig az adaptációs mechanizmusok következtében kialakuló kisebb mértékű sérüléssel magyarázható. Jelen vizsgálatunkban nem nyílt lehetőség a Ku70 és a sirtuinek közti kapcsolat tesztelésére, de a fehérjék koncentrációjában mért változások nem zárják ki a SIRT1-Ku70 közti kölcsönhatás lehetőségét az agyban, különösen öregedés és edzés során.

Sirtuinek jelenleg úgy ismertek, mint az öregedési folyamatban oki szerepet játszó tényezők (Bordone és Guarente 2005, Guarente és Picard 2005). A SIRT1 knockout egereknél károsodott agyfunkciót figyeltek meg (Gao és mtsai 2010, Michan és mtsai 2010). Jelen kutatásunkban megfigyeltük, hogy az öregedés csökkenti SIRT1-et, és növekvő SIRT3 koncentrációt eredményez, ami a sirtuinek különböző szabályozási mechanizmusát

feltételezi. A SIRT1 koncentráció szignifikáns csökkenése együtt járt a hippokampális fehérjék acetilációjának jelentős változásával, ami hatással lehet a fehérje stabilitásra (Marton és mtsai 2010). A lizin oldalláncok acetilációja preventív hatású lehet ugyanazon gyök ubiquitinációjával szemben, így az acetiláció hatással lehet a fehérjék stabilitására és felezési idejére (Harting és Knoll 2010, Li és mtsai 2010, Mateo és mtsai 2010). Így az öregedő agy fehérjei acetilációjának növekedése valószínűleg hatással van bizonyos agyfunkciókra, ezért a fehérjék funkciója acetilálással könnyedén változtatható.

Az öregedés mitokondriális elmélete szerint a mitokondriális DNS sérülése az idővel lassan akkumulálódik és öregedést okoz a bioenergetikai homeosztázis gátlása révén. Az agyban létrejövő mitokondriális diszfunkció az aerob respirációtól a glikolitikus metabolizmus felé történő eltolódást eredményez és alapja lehet az életkor-függő idegi funkciók megváltozásának (Ross és mtsai 2010). Ismert tény, miszerint a mozgás tejsavat termel. A képződése során a piruvát-laktát átalakulást katalizáló Laktát-dehidrogenáz enzim a sirtuinekhez és a PARP enzimhez hasonlóan  $\text{NAD}^+$  függő, ami versenyhelyzetet hoz létre a három molekula között az energiaforrásért. Ross és munkatársai idős rágesálók hippokampuszában megnövekedett mennyiségű laktátot mutattak ki (Ross és mtsai 2010), ami savas kémhatása révén pH változást okozhat, ami nem igazán kedvező folyamat a pH-függő enzimek számára. Agyszöveti tejsav mérési lehetőség hiányában a vizsgálatomban meghatározott LDH szint öregedéssel együttjáró növekedése alátámasztani látszik Ross és munkatársai megállapítását. Állóképességi edzés hatására a javuló oxigenizáció, a pH egyensúly normalizálódása és az aerob energiatermelési folyamatok hatékonyság növekedése következtében a mozgás kedvező hatása mutatkozik az edzésre csökkenő tendenciát mutató LDH szintben.

Az életkorral csökkenő SIRT1 koncentráció mellett, a PGC-1 $\alpha$  szintjének változásában is hasonló tendenciát feltételeztünk, hiszen a SIRT1 jól ismert stimulátora a PGC-1 $\alpha$ -nak (Rodgers és mtsai 2008). Jelen eredményeink azt sugallják, hogy a PGC-1 $\alpha$  nem a legfontosabb szabályozója a metabolikus folyamatoknak és a mitokondriális biogenezisnek az agyban, de fontos szerepe lehet az antioxidáns enzimek expressziójában (St-Pierre és mtsai 2006). Így feltételezhetjük, hogy a csökkenő SIRT1 koncentráció

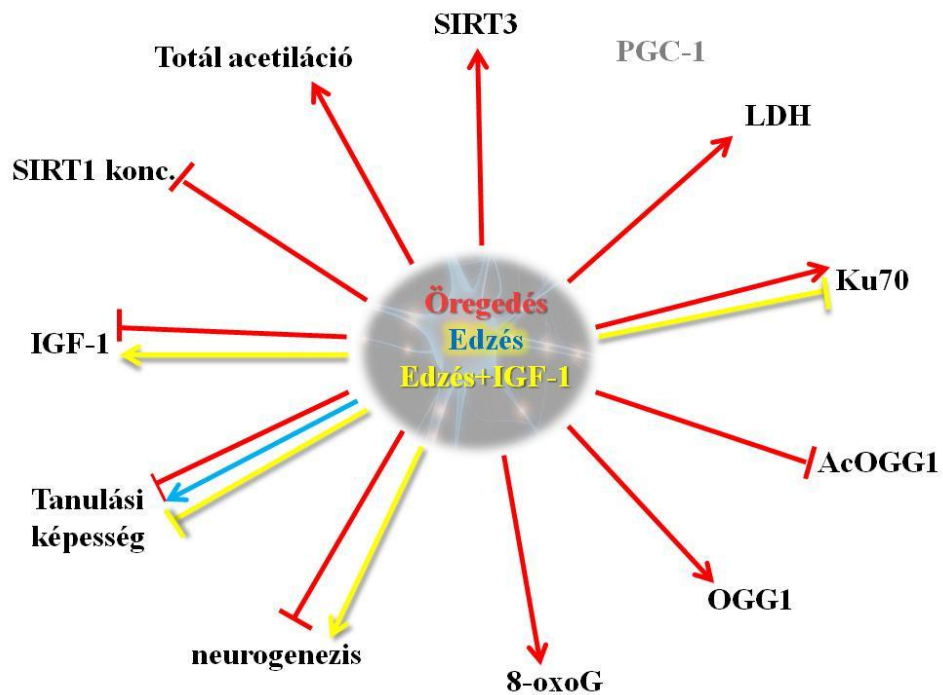


ellenére az idegsejtek sikeresen szinten tartják a PGC-1 $\alpha$  mennyiségét, megbirkózva az életkor indukálta oxidatív stresszel.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük a hippocampális agy vizsgálatához felállított hipotéziseinkről:

- B.1. A rendszeres edzés javítja az agyfunkciót, ezen belül is az állatok térbeli tanulási képességét: **IGAZ.**
- B.2. Az IGF-1 adagolás és/vagy a fizikai aktivitás pozitív hatással van neurogenesisre és az agyfunkcióra – A két kezelés együttes alkalmazása pozitív hatása a neurogenesisre: **IGAZ**, pozitív hatása a funkcióra: **NEM IGAZ.**
- B.3. Kapcsolatot találunk az életkor-függő oxidatív DNS sérülés és az agyfunkció között, különös tekintettel az OGG1 és a Ku70 javító enzimekre: **IGAZ.**
- B.4. A DNS javításhoz társuló sirtuinek szerepet játszanak az öregedési folyamatban: **IGAZ.**
- B.5. Kapcsolatot találunk az agyfunkció, a mért biokémiai változók és a neurogenesis között: **IGAZ.**

A hippocampális agyi régió vizsgálatából született eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze (29. ábra):

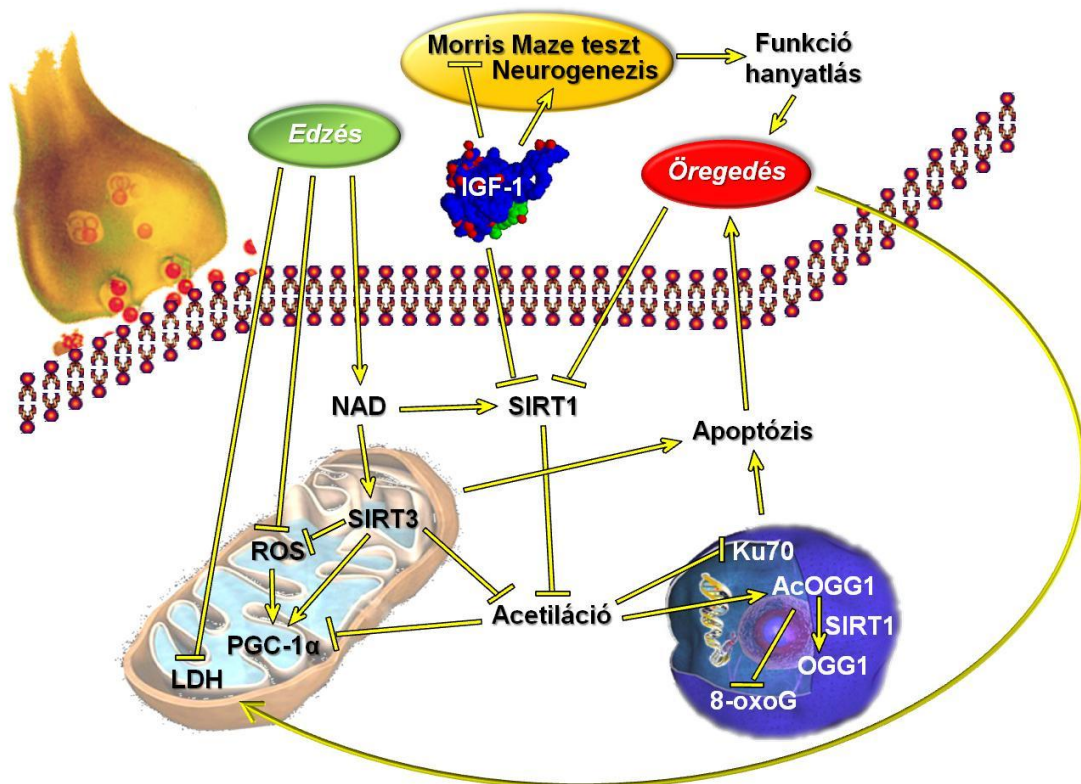


**29. ábra**

*A hippocampusból született eredmények összefoglalása*

→ növelés, aktiváció; ⊥ csökkentés, gátlás.

Eredményeink alapján a következő hipotetikus elképzelésünk van a hippocampusban végbemenő biokémiai változásokról. Természetesen a folyamatokban minden koncentráció és aktivitás függő, így alacsony vagy magas szint esetében más és más irányú kapcsolatok vannak a lenti szabályozó rendszerben (30. ábra).



**30. ábra**

*Az agyban végbemenő folyamatok hipotetikus modellje*

*Egy idegsejt részlet sematikus képe. → aktiváció, ⊥ gátlás.*

## 6. Következtetések

Következtetésként elmondható, hogy az edzés terhelés a fiatal és idős állatok vázizmában növelte a SIRT1 aktivitását. Az öregedés csökkenő  $\text{NAD}^+$  és NAMPT koncentrációt eredményezett, mely folyamatokat a fizikai aktivitás, a növekvő SIRT1 aktivitás lehetséges magyarázatát szolgáltatva, képes volt szignifikánsan csökkenteni. A sejt fehérjék acetiláltsági állapota a SIRT1 aktivitásának megfelelő képet mutat, ami bizonyíthatja a sirtuinek döntő szerepét az acetiláció révén megvalósuló alap biokémiai szabályozó rendszerekben. Az oxidatív fehérje sérülés mértéke, a károsodott fehérjéket lebontó enzim aktivitása, valamint a hipoxia indukálta faktor és a vaszkularizációs faktor változásai jól példázzák az öregedés hatására oxidált irányba tolódott sejt homeosztázis, az oxidatív stressz állapotát, amelyben a rendszeres fizikai aktivitás kedvező, preventív, a redox miliőt helyreállító hatása mutatható ki. Az öregedéssel együttjáró degeneratív folyamatok következményeként kialakuló mitokondriális diszfunkció esetében az AMP-Kinázok, a PGC-1 $\alpha$  és a(z) UCP3 mérési eredmények alapján az edzés kiemelten pozitív hatására következtetünk. Az öregedés SIRT6 és OGG1 növekedéssel járt, ahol edzés hatására ellentétes folyamat indukálható. A vázizom esetében adataim az sugallják, hogy a rendszeres edzés visszafogja a vázizom öregedési folyamatát a NAMPT- $\text{NAD}^+$ -SIRT1 rendszeren keresztül.

Az agy esetében elmondhatjuk, hogy az edzés indukálta jobb teljesítmény a térbeli tanulási képességben egy komplex mechanizmus eredménye, mely független a neurogenezistől. A rendszeres fizikai aktivitás és az IGF-1 együttes hatásaként új idegsejt képződés idézhető elő patkányok hippocampuszában, az edzés és IGF-1 indukálta neurogenesis azonban nem feltétlenül eredményez jobb agyi funkciót. Adatainkból arra következtetünk, hogy az életkor-függő DNS sérülés (8-oxoG) növekedés a javító enzim (OGG1) acetilációjának öregedés hatására létrejövő csökkenésével magyarázható. Jelen vizsgálatban először mutattuk ki *in vivo* körülmények között az AcOGG1 jelenlétét. Kimutattuk, hogy az öregedés - valószínűsíthetően a SIRT1 mennyiség csökkenése révén - növeli a fehérjék acetilációs szintjét a hippocampusban, ami alátámasztja a SIRT1 fontos

szerepét az agyfunkció szabályozásában. Megfigyeltük, hogy a mitokondriumhoz kötődő metabolikus változások a hippokampusz esetében nem olyan kifejezettek, mint a vázizomban, melyet a viszonylagosan stabil energia és oxigén ellátás magyarázhat. Összességében megállapítottuk, a testedzés kedvező hatásait az vázizom és agy öregedésére.

## 7. Összefoglalás

Az öregedés együtt jár az agy, a vázizom és más szervek fiziológiás funkciójának hanyatlásával. Silent information regulator-ok fontos  $\text{NAD}^+$  függő fehérje deacetilálók, amik szabályozzák az öregedési folyamatot. Jelen vizsgálatban a sirtuin 1 (SIRT1) hat hetes edzés hatására kialakuló mennyiségi és aktivitás változását vizsgáltuk fiatal (3 hó) és idős (26 hó) patkányok gastrocnemius izmában. Életkor függő SIRT1 mennyiség növekedést találtunk, míg a testedzés szignifikánsan növelte a SIRT1 relatív aktivitását. Az öregedés jelentősen nem emelte a DNS sérülés szintjét, ami összhangban volt az OGG1 aktivitásával. A rendszeres edzés SIRT1 függő útvonalak révén lassítja az öregedési folyamatot a NAMPT általi  $\text{NAD}^+$  bioszintézis stimulálása révén.

Továbbiakban vizsgáltuk két hetes IGF-1 adagolás ( $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{nap}$ ) és az edzés hatását a neurogenesisre. A testedzés javította az idős állatok térbeli memóriáját, de az IGF-1 adagolás megszüntette ezt a hatást. Az életkor függő neurogenesis csökkenést az edzés és az IGF-1 kezelés együttesen képes volt mérsékelni. Az öregedés növelte a 8-oxoG és a Ku70 koncentrációját, jelezve a DNS sérülés szerepét az időskori neuropatológiákban. Az OGG1 acetilációját elsőként detektáltuk *in vivo* körülmények között, ami csökkenést mutatott az öregedéssel. Adataink azt mutatják, hogy az életkorral együttjáró 8-oxoG szint növekedés a csökkenő OGG1 acetiláció következménye. A fiatal csoportban azonban a testedzés és az IGF-1 kezelés növelte az AcOGG1 mennyiségét. A SIRT1-et és a SIRT3-at, mint a DNS sérüléshez kapcsolódó lizin deacetilázokat mértük, ahol a SIRT1 mennyisége csökkent öregedéssel, ami jelentős növekedést eredményezett az acetilált lizin gyökök mennyiségében a hippocampusban. A hippocampusban az életkorral együttjáró SIRT1 csökkenésnek és az ehhez társuló lizin acetiláció növekedésnek jelentős hatása lehet a funkcióra és terápiás célpontot jelenthet. Jelen vizsgálat tehát az sugallja, hogy a testedzés hatása a DNS javításra és a sirtuinekre az IGF-1-el együtt szerepet játszanak az edzés és IGF-1 neuroprotektív hatásában.

## 8. Summary

Aging is associated with decline in physiological function in brain, skeletal muscle and other organs as well. Silent information regulators are potent NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylases, which have been shown to regulate aging process. Here, changes in the level and activity of sirtuin 1 (SIRT1) in response to 6 wk of exercise in groups of young (3 mo) and old (26 mo) rats were studied in the gastrocnemius muscle. There was an age-related increase in SIRT1 level, while exercise training significantly increased the relative activity of SIRT1. Aging did not significantly increase the level of DNA damage, which was in line with the activity of 8-oxoguanin DNA glikoziláz. Regular exercise decelerates the deleterious effects of the aging process via SIRT1-dependent pathways through the stimulation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis by NAMPT.

Furthermore we have investigated the effects of two wk of IGF-1 supplementation (5µg/kg/day) and exercise training on neurogenesis, Exercise improved the spatial memory of the old group, but IGF-1 supplementation eliminated this effect. An aging associated decrease in neurogenesis was attenuated by exercise and IGF-1 treatment. Aging increased the level of 8-oxoG and Ku70 content, indicating the role of DNA damage in age related neuropathology. Acetylation of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) was detected for the first time *in vivo*, and this decreased with aging. Data revealed that the age-associated increase in 8-oxoG level is due to decreased acetylation of OGG1. However, in young groups, exercise and IGF-1 treatment increased AcOGG1 level. SIRT1 and SIRT3, as DNA damage associated lysine deacetylases, were measured, and SIRT1 level decreased with aging, resulting in a large increase in acetylated lysine residues in the hippocampus. Age associated decreases in SIRT1 and the associated increase in lysine acetylation in the hippocampus could have significant impact on function and could suggest a therapeutic target. The present study reveals that the effects of exercise on DNA repair and on sirtuins with IGF-1 are involved in the neuroprotective roles of exercise and IGF-1.

## ***9. Irodalomjegyzék***

- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J. (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res*, 100: 1512-1521.
- Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, Goldberg AL, Ulfhake B. (2010) Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem*, 285: 39597-39608.
- Amat R, Solanes G, Giralt M, Villarroya F. (2007) SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription. *J Biol Chem*, 282: 34066-34076.
- Arunachalam G, Yao H, Sundar IK, Caito S, Rahman I. (2010) SIRT1 regulates oxidant- and cigarette smoke-induced eNOS acetylation in endothelial cells: Role of resveratrol. *Biochem Biophys Res Commun*, 393: 66-72.
- Bacsi A, Chodaczek G, Hazra TK, Konkel D, Boldogh I. (2007) Increased ROS generation in subsets of OGG1 knockout fibroblast cells. *Mech Ageing Dev*, 128: 637-649.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. (2005) Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289: E429-438.
- Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, Hazra TK, Mitra S. (2003) Role of acetylated human AP-1 endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J*, 22: 6299-6309.



- Bhakat KK, Hazra TK Mitra S. (2004) Acetylation of the human DNA glycosylase NEIL2 and inhibition of its activity. *Nucleic Acids Res*, 32: 3033-3039.
- Bhakat KK, Mokkaapati SK, Boldogh I, Hazra TK Mitra S. (2006) Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol*, 26: 1654-1665.
- Bohr V, Anson RM, Mazur S Dianov G. (1998) Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett*, 102-103: 47-52.
- Bohr VA, Stevnsner T de Souza-Pinto NC. (2002) Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286: 127-134.
- Boldogh I, Milligan D, Lee MS, Bassett H, Lloyd RS McCullough AK. (2001) hMYH cell cycle-dependent expression, subcellular localization and association with replication foci: evidence suggesting replication-coupled repair of adenine:8-oxoguanine mispairs. *Nucleic Acids Res*, 29: 2802-2809.
- Bordone L Guarente L. (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 298-305.
- Bratic I Trifunovic A. (2010) Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta*, 1797: 961-967.
- Breen DM, Sanli T, Giacca A Tsiani E. (2008) Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun*, 374: 117-122.

- Breusing N, Arndt J, Voss P, Bresgen N, Wiswedel I, Gardemann A, Siems W Grune T. (2009) Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. *Mech Ageing Dev*, 130: 748-753.
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC Chandel NS. (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 1: 409-414.
- Burkle A. (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *FEBS J*, 272: 4576-4589.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P Auwerx J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458: 1056-1060.
- Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Landum RW, Cheng MS, Wu JF Floyd RA. (1991) Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 3633-3636.
- Clanton TL. (2007) Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102: 2379-2388.
- 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.

- Costantini C, Scrabble H, Puglielli L. (2006) An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*, 25: 1997-2006.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*, 30: 464-472.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329: 23-38.
- Damsma GE, Cramer P. (2009) Molecular basis of transcriptional mutagenesis at 8-oxoguanine. *J Biol Chem*, 284: 31658-31663.
- Di Giulio AM, Germani E, Lesma E, Muller E, Gorio A. (2000) Glycosaminoglycans co-administration enhance insulin-like growth factor-I neuroprotective and neuroregenerative activity in traumatic and genetic models of motor neuron disease: a review. *Int J Dev Neurosci*, 18: 339-346.
- Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. (1995) The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 141: 1399-1406.
- Duman RS. (2005) Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol Aging*, 26 Suppl 1: 88-93.
- During MJ, Cao L. (2006) VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis. *Curr Alzheimer Res*, 3: 29-33.
- Fabel K, Kempermann G. (2008) Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Med*, 10: 59-66.

- Ferrara N, Rinaldi B, Corbi G, Conti V, Stiuso P, Boccuti S, Rengo G, Rossi F, Filippelli A. (2008) Exercise training promotes SIRT1 activity in aged rats. *Rejuvenation Res*, 11: 139-150.
- Figueiredo PA, Powers SK, Ferreira RM, Appell HJ, Duarte JA. (2009) Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64: 21-33.
- Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, 17: 481-517.
- Fontana L, Klein S, Holloszy JO. (2010) Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*, 32: 97-108.
- Foster TC. (2006) Biological markers of age-related memory deficits: treatment of senescent physiology. *CNS Drugs*, 20: 153-166.
- Freyssenet D. (2007) Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 102: 529-540.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, 12: 51-62.
- Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S. (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD<sup>+</sup> depletion. *Cell Physiol Biochem*, 20: 45-54.

- Galvin CD, Hardiman O Nolan CM. (2003) IGF-1 receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol Cell Endocrinol*, 200: 19-29.
- Gao J, Wang WY, Mao YW, Graff J, Guan JS, Pan L, Mak G, Kim D, Su SC Tsai LH. (2010) A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature*, 466: 1105-1109.
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S Ying Z. (2008) Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci*, 28: 2278-2287.
- Gredilla R, Weissman L, Yang JL, Bohr VA Stevnsner T. (2010) Mitochondrial base excision repair in mouse synaptosomes during normal aging and in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, PMID: 20708822.
- Grounds MD, Radley HG, Gebiski BL, Bogoyevitch MA Shavlakadze T. (2008) Implications of cross-talk between tumour necrosis factor and insulin-like growth factor-1 signalling in skeletal muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35: 846-851.
- Grune T, Reinheckel T Davies KJ. (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*, 11: 526-534.
- Guarente L Picard F. (2005) Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell*, 120: 473-482.
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11: 298-300.
- Harting K Knoll B. (2010) SIRT2-mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Eur J Cell Biol*, 89: 262-269.

Hazra TK, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow YW, Jaruga P, Dizdaroglu M, Mitra S. (2002) Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 3523-3528.

Hepple RT, Qin M, Nakamoto H, Goto S. (2008) Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle: implications for sarcopenia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295: R1231-1237.

Herrick JB. (1991) Farm bills do affect food animal practitioners. *J Am Vet Med Assoc*, 198: 1738.

Hipkiss AR. (2008) Energy metabolism, altered proteins, sirtuins and ageing: converging mechanisms? *Biogerontology*, 9: 49-55.

Hoeks J, Hesselink MK, Schrauwen P. (2006) Involvement of UCP3 in mild uncoupling and lipotoxicity. *Exp Gerontol*, 41: 658-662.

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

Holmes MM, Galea LA, Mistlberger RE, Kempermann G. (2004) Adult hippocampal neurogenesis and voluntary running activity: circadian and dose-dependent effects. *J Neurosci Res*, 76: 216-222.

<http://en.wikipedia.org/wiki/IGF-1>

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.

- Imai S. (2009) From heterochromatin islands to the NAD World: a hierarchical view of aging through the functions of mammalian Sirt1 and systemic NAD biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1790: 997-1004.
- 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.
- Jiang N, Zhang G, Bo H, Qu J, Ma G, Cao D, Wen L, Liu S, Ji LL Zhang Y. (2009) Upregulation of uncoupling protein-3 in skeletal muscle during exercise: a potential antioxidant function. *Free Radic Biol Med*, 46: 138-145.
- Jung-Hynes B Ahmad N. (2009) SIRT1 controls circadian clock circuitry and promotes cell survival: a connection with age-related neoplasms. *FASEB J*, 23: 2803-2809.
- Kayali R, Cakatay U, Uzun H Genc H. (2007) Gender difference as regards myocardial protein oxidation in aged rats: male rats have increased oxidative protein damage. *Biogerontology*, 8: 653-661.
- Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisloff U Ellingsen O. (2005) Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res*, 67: 161-172.
- Kontani Y, Wang Z, Furuyama T, Sato Y, Mori N Yamashita H. (2002) Effects of aging and denervation on the expression of uncoupling proteins in slow- and fast-twitch muscles of rats. *J Biochem*, 132: 309-315.
- Kruszewski M Szumiel I. (2005) Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage--facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)*, 4: 1306-1313.

- Kwon HS Ott M. (2008) The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci*, 33: 517-525.
- 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.
- Le Page C, Noirez P, Courty J, Riou B, Swynghedauw B Besse S. (2009) Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Exp Gerontol*, 44: 177-182.
- Li K, Wang R, Lozada E, Fan W, Orren DK Luo J. (2010) Acetylation of WRN protein regulates its stability by inhibiting ubiquitination. *PLoS One*, 5: e10341.
- Li XJ Li S. (2010) Proteasomal dysfunction in aging and Huntington disease. *Neurobiol Dis*, PMID: 21145396.
- 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.
- Liu D, Croteau DL, Souza-Pinto N, Pitta M, Tian J, Wu C, Jiang H, Mustafa K, Keijzers G, Bohr VA Mattson MP. (2011) Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31: 680-692.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I Trejo JL. (2009) Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist*, 15: 134-148.
- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I Trejo JL. (2010) Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci*, 44: 109-117.



- Lombard DB, Schwer B, Alt FW Mostoslavsky R. (2008) SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing. *J Intern Med*, 263: 128-141.
- Lovell MA Markesbery WR. (2007) Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*, 35: 7497-7504.
- Lu J Liu Y. (2010) Deletion of Ogg1 DNA glycosylase results in telomere base damage and length alteration in yeast. *EMBO J*, 29: 398-409.
- Lundby C, Gassmann M Pilegaard H. (2006) Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol*, 96: 363-369.
- Lynch CD, Lyons D, Khan A, Bennett SA Sonntag WE. (2001) Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals. *Endocrinology*, 142: 506-509.
- Marklund SL. (1990) Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J*, 266: 213-219.
- Marton O, Koltai E, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S Radak Z. (2010) Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology*, 11: 679-686.
- Mason SD, Rundqvist H, Papandreou I, Duh R, McNulty WJ, Howlett RA, Olfert IM, Sundberg CJ, Denko NC, Poellinger L Johnson RS. (2007) HIF-1alpha in endurance training: suppression of oxidative metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R2059-2069.

- Mateo F, Vidal-Laliena M, Pujol MJ Bachs O. (2010) Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism. *Biochem Soc Trans*, 38: 83-86.
- Matsakas A, Nikolaidis MG, Kokalas N, Mougios V Diel P. (2004) Effect of voluntary exercise on the expression of IGF-I and androgen receptor in three rat skeletal muscles and on serum IGF-I and testosterone levels. *Int J Sports Med*, 25: 502-508.
- Mayr M, Sidibe A Zampetaki A. (2008) The paradox of hypoxic and oxidative stress in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 51: 1266-1267.
- McCord JM Fridovich I. (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 243: 5753-5760.
- McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, Guan S, Shi X, Gozani O, Burlingame AL, Bohr VA Chua KF. (2009) SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY)*, 1: 109-121.
- Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W, Mervis RF, Chen J, Guerin KI, Smith LE, McBurney MW, Sinclair DA, Baudry M, de Cabo R Longo VD. (2010) SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 30: 9695-9707.
- Moller P, Loft S, Lundby C Olsen NV. (2001) Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB J*, 15: 1181-1186.
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frenthewey D, Auerbach W,

- Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW. (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124: 315-329.
- Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV. (2010) Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: Physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus*, PMID: 20824731.
- Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, Elliot M, Hogg J, Kharitonov S, Goto H, Bemis JE, Elliott P, Barnes PJ, Ito K. (2009) A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9. *FASEB J*, 23: 2810-2819.
- Navarro A, Boveris A. (2007) The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C670-686.
- Naya H, Romero H, Zavala A, Alvarez B, Musto H. (2002) Aerobiosis increases the genomic guanine plus cytosine content (GC%) in prokaryotes. *J Mol Evol*, 55: 260-264.
- Nogalska A, D'Agostino C, Engel WK, Davies KJ, Askanas V. (2010) Decreased SIRT1 deacetylase activity in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Neurobiol Aging*, 31: 1637-1648.
- O'Hagan KA, Cocchiglia S, Zhdanov AV, Tambuwala MM, Cummins EP, Monfared M, Agbor TA, Garvey JF, Papkovsky DB, Taylor CT, Allan BB. (2009) PGC-1alpha is coupled to HIF-1alpha-dependent gene expression by increasing mitochondrial

oxygen consumption in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 2188-2193.

Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P, Wright SM, Mills KD, Bonni A, Yankner BA, Scully R, Prolla TA, Alt FW Sinclair DA. (2008) SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*, 135: 907-918.

Ojuka EO. (2004) Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc Nutr Soc*, 63: 275-278.

Pace P, Mosedale G, Hodkinson MR, Rosado IV, Sivasubramaniam M Patel KJ. (2010) Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science*, 329: 219-223.

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.

Pang Y, Zheng B, Campbell LR, Fan LW, Cai Z Rhodes PG. (2010) IGF-1 can either protect against or increase LPS-induced damage in the developing rat brain. *Pediatr Res*, 67: 579-584.

Pastoriza Gallego M Sarasin A. (2003) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. *Biochimie*, 85: 1073-1082.

- Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Lopez-Avalos MD, Gomez-Pinedo U, Garcia-Verdugo JM Fernandez-Llebrez P. (2010) IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci*, 31: 1533-1548.
- Porcu M Chiarugi A. (2005) The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci*, 26: 94-103.
- Puca R, Nardinocchi L, Starace G, Rechavi G, Sacchi A, Givol D D'Orazi G. (2010) Nox1 is involved in p53 deacetylation and suppression of its transcriptional activity and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48: 1338-1346.
- Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z Yi L. (2007) Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPKalpha. *Exp Mol Med*, 39: 535-543.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C Goto S. (1999) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*, 27: 69-74.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvari M, Nyakas C Goto S. (2001a) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*, 38: 17-23.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H Goto S. (2001b) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, 7: 90-107.
- Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F Goto S. (2002a) Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and

resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 445: 273-278.

Radak Z, Takahashi R, Kumiyama A, Nakamoto H, Ohno H, Ookawara T Goto S. (2002b) Effect of aging and late onset dietary restriction on antioxidant enzymes and proteasome activities, and protein carbonylation of rat skeletal muscle and tendon. *Exp Gerontol*, 37: 1423-1430.

Radak Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucsok J, Berkes I, Csont T Ferdinandy P. (2003) Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur J Clin Invest*, 33: 726-730.

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

Radak Z, Kumagai S, Nakamoto H Goto S. (2007) 8-Oxoguanosine and uracil repair of nuclear and mitochondrial DNA in red and white skeletal muscle of exercise-trained old rats. *J Appl Physiol*, 102: 1696-1701.

Radak Z, Chung HY Goto S. (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44: 153-159.

Radak Z Boldogh I. (2010) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 49: 587-596.

Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H Boldogh I. (2010) Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20: 777-783.

- Rass U, Ahel I West SC. (2007) Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*, 130: 991-1004.
- Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, Befroy D, Pypaert M, Hardie DG, Young LH Shulman GI. (2007) Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*, 5: 151-156.
- Rodgers JT Puigserver P. (2006) Certainly can't live without this: SIRT6. *Cell Metab*, 3: 77-78.
- Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z Puigserver P. (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett*, 582: 46-53.
- Ross JM, Oberg J, Brene S, Coppotelli G, Terzioglu M, Pernold K, Goiny M, Sitnikov R, Kehr J, Trifunovic A, Larsson NG, Hoffer BJ Olson L. (2010) High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 20087-20092.
- Sakamoto K, Iwasaki K, Sugiyama H Tsuji Y. (2009) Role of the tumor suppressor PTEN in antioxidant responsive element-mediated transcription and associated histone modifications. *Mol Biol Cell*, 20: 1606-1617.
- Scher MB, Vaquero A Reinberg D. (2007) SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*, 21: 920-928.
- Schmitz C, Axmacher B, Zunker U Korr H. (1999) Age-related changes of DNA repair and mitochondrial DNA synthesis in the mouse brain. *Acta Neuropathol*, 97: 71-81.

- Shahbazian MD Grunstein M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*, 76: 75-100.
- Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T Yamaza H. (2003) Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *FASEB J*, 17: 1108-1109.
- Skokowa J, Lan D, Thakur BK, Wang F, Gupta K, Cario G, Brechlin AM, Schambach A, Hinrichsen L, Meyer G, Gaestel M, Stanulla M, Tong Q Welte K. (2009) NAMPT is essential for the G-CSF-induced myeloid differentiation via a NAD(+)-sirtuin-1-dependent pathway. *Nat Med*, 15: 151-158.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R Spiegelman BM. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127: 397-408.
- Stoppani J, Hildebrandt AL, Sakamoto K, Cameron-Smith D, Goodyear LJ Neuffer PD. (2002) AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283: E1239-1248.
- Strucksberg KH, Tangavelou K, Schroder R Clemen CS. (2010) Proteasomal activity in skeletal muscle: a matter of assay design, muscle type, and age. *Anal Biochem*, 399: 225-229.
- Subramanian C, Opirari AW, Jr., Bian X, Castle VP Kwok RP. (2005) Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 4842-4847.



- Sueoka N. (1962) On the genetic basis of variation and heterogeneity of DNA base composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48: 582-592.
- Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB Gupta MP. (2008) SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol*, 28: 6384-6401.
- Suwa M, Nakano H, Radak Z Kumagai S. (2008) Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism*, 57: 986-998.
- Szczesny B, Bhakat KK, Mitra S Boldogh I. (2004) Age-dependent modulation of DNA repair enzymes by covalent modification and subcellular distribution. *Mech Ageing Dev*, 125: 755-765.
- Szczesny B, Tann AW Mitra S. (2010) Age- and tissue-specific changes in mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: Susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury. *Mech Ageing Dev*, 131: 330-337.
- Thomas D, Scot AD, Barbey R, Padula M Boiteux S. (1997) Inactivation of OGG1 increases the incidence of G . C-->T . A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet*, 254: 171-178.
- Thomas MM, Khan W, Betik AC, Wright KJ Hepple RT. (2010) Initiating exercise training in late middle age minimally protects muscle contractile function and increases myocyte oxidative damage in senescent rats. *Exp Gerontol*, 45: 856-867.

- Trejo JL, Llorens-Martin MV, Torres-Aleman I. (2008) The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*, 37: 402-411.
- van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, Pickering JG. (2007) Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem*, 282: 10841-10845.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2: 266-270.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415: 1030-1034.
- van Praag H. (2009) Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci*, 32: 283-290.
- Velcheti V, Govindan R. (2006) Insulin-like growth factor and lung cancer. *J Thorac Oncol*, 1: 607-610.
- Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. (2008) Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, 14: 312-323.
- Wong AW, McCallum GP, Jeng W, Wells PG. (2008) Oxoguanine glycosylase 1 protects against methamphetamine-enhanced fetal brain oxidative DNA damage and neurodevelopmental deficits. *J Neurosci*, 28: 9047-9054.

[www.alzet.com/products/ALZET\\_Pumps/howdoesitwork.html](http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwork.html)

- Yamagata K Kitabayashi I. (2009) Sirt1 physically interacts with Tip60 and negatively regulates Tip60-mediated acetylation of H2AX. *Biochem Biophys Res Commun*, 390: 1355-1360.
- Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, Hoffman TA, Mattagajasingh I, Kasuno K, Jung SB, Kim CS Irani K. (2010) SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res*, 38: 832-845.
- Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, Lamming DW, Souza-Pinto NC, Bohr VA, Rosenzweig A, de Cabo R, Sauve AA Sinclair DA. (2007) Nutrient-sensitive mitochondrial NAD<sup>+</sup> levels dictate cell survival. *Cell*, 130: 1095-1107.
- Yang JL, Tadokoro T, Keijzers G, Mattson MP Bohr VA. (2010) Neurons efficiently repair glutamate-induced oxidative DNA damage by a process involving CREB-mediated up-regulation of apurinic endonuclease 1. *J Biol Chem*, 285: 28191-28199.
- Yang T Sauve AA. (2006) NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J*, 8: E632-643.
- Yu W, Fu YC, Zhou XH, Chen CJ, Wang X, Lin RB Wang W. (2009) Effects of resveratrol on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and expression of SIRT1 in H9c2 cells. *J Cell Biochem*, 107: 741-747.
- Yuan Z Seto E. (2007) A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response. *Cell Cycle*, 6: 2869-2871.
- Zeng BY, Medhurst AD, Jackson M, Rose S Jenner P. (2005) Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech Ageing Dev*, 126: 760-766.

## **10. Saját publikációk jegyzéke**

### **10.1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

- **Koltai E**, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, Nyakas C, Radak Z. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev.* 2010 Jan; 131(1):21-8. Epub 2009 Nov 12. **IF: 4,179**
- **Koltai E**, Zhao Z, Lacza L, Cselenyak A, Vacz G, Nyakas C, Boldogh I, Ichinoseki-Sekine N, Radak Z. Combined Exercise and IGF-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. *Rejuvenation Res.* 2011. doi: 10.1089/rej.2011.1178 **IF: 4,138**
- Radak Z, Bori Z, **Koltai E**, Fatouros I, Jamurtas A, Douroudos I, Terzis G, Nikolaidis M, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Kumagai S, Naito H, Boldogh I. Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med.* 2011 Apr 15. [Epub ahead of print] **IF: 6,081**
- Marton O, **Koltai E**, Nyakas C, Bakonyi T, Zenteno-Savin T, Kumagai S, Goto S, Radak Z. Aging and exercise affect the level of protein acetylation and SIRT1 activity in cerebellum of male rats. *Biogerontology.* 2010 Dec; 11(6):679-86. Epub 2010 May 14. **IF: 2,816**

## 10.2. Független közlemények

- Radak Z, Hart N, Sarga L, **Koltai E**, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2010;20(3):777-83. **IF: 3,832**
- Radak Z, Chung HY, **Koltai E**, Taylor AW, Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. Ageing Res Rev. 2008 Jan;7(1):34-42. Epub 2007 Aug 2. **IF: 6,209**
- Muscle Plasticity – Advances in Biochemical and Physiological Research, 2009: ISBN: 978-81-308-0322-7-6 Editors: José Magalhães and António Ascensão. The role of reactive oxygen and nitrogen species in skeletal muscle. Zsolt Radak, Erika Koltai, Nikolette Hart and Zsafia Szabo

## Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Radák Zsoltnak, hogy lehetőséget látott bennem, hogy tudását átadva mindenben segítségemre volt, hogy választ adott a kérdéseimre, hogy emberi és szakmai támogatást nyújtott a kutatómunka sokszor kudarcokat hozó időszakában. Ha egyszer véletlenül igazi kutató válna belőlem, azt neki köszönhetném. Büszke vagyok rá, hogy ezen munka megszületésében is együtt dolgozhattam Vele!

Köszönet illeti továbbá a Semmelweis Egyetem Sporttudományi Kutatóintézet egykori és jelenlegi munkatársait, akikkel egy csapatban munkálkodva semmi sem tűnt lehetetlennek. Támogatásuk, szakmai útmutatásuk és humoruk átsegített a nehézségeken.

Köszönet Prof. Hisashi Naitonak és Prof. Sataro Gotonak, hogy lehetővé tették, hogy a japán Juntendo Egyetemen eltöltött két hónap alatt tudásomat bővítsem, és olyan tapasztalatokat szerezhsek, amik segítenek a tudományos fejlődésemben.

Köszönet Dr. Lacza Zsombornak és a Semmelweis Egyetem Humán Élettani és Klinikai Kísérleti Kutatóintézet munkatársainak, hogy lehetőséget adtak, és segítségemre voltak a metszetfestésekben és a konfokális mikroszkópos mérések elvégzésében.

Köszönet Dr. Boldogh Istvánnak és a University of Texas Medical Branch, Cell Biology Core Laboratory munkatársainak, hogy az OGG1-hez kapcsolódó mérések elvégzésében nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak.