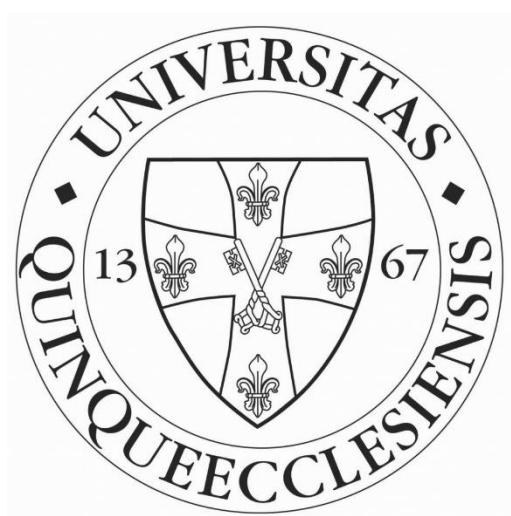


36. OTDK Biológia Szekció

A H₂S Gáztranszmitter Hatásai Az Öregedés Biokémiai Folyamataira



Pécsi Tudományegyetem

Készítette

Hampuch Ádám harmadéves biológia BSc hallgató

Témavezetők

Dr. Veres Balázs egyetemi docens, tanszékvezető

Kőszegi Balázs egyetemi tanársegéd

Tartalom

Bevezetés:.....	3
Általános öregedés elméletek.....	3
D257A egérmodell	4
H2S.....	6
AP39.....	8
Célkitűzés	10
Anyag és módszer	11
Felhasznált állatok.....	11
Felhasznált anyagok	11
Kezelés	11
Minták előkészítése	11
Hematológiai analízis	12
qPCR analízis	12
Statisztikai analízis	14
Eredmények.....	15
Hematológiai analízis	15
Kezeletlen állatok génexpressziójának összehasonlítása	16
Az AP39 kezelés hatása	17
Diskusszió.....	19

Bevezetés:

Általános öregedés elméletek

Az élő szervezetek talán egyik legáltalánosabb jelensége az öregedés. Általánossága abban rejlik, hogy nincs élőlény, amelyben ne zajlana le. Bár ez a probléma a filozófusokat is nagymértékben foglalkoztatja, jelen dolgozatomban a jelenség biológiai megközelítésével foglalkozom. A jelenség magyarázatára több mint 300 elméletet dolgoztak ki (Medvedev, 1990). Megfigyelhetünk a jelenség programozott mivoltáról, a hibák megjelenéséről, valamint a kettejük kombinációjáról tanúskodó elméleteket (da Costa és mtsai., 2016). A különböző elméletek akár egymással rendkívül ellentmondásosak is lehetnek. A folyamat genetikai hátterének vizsgálatát *Caenorhabditis elegans* modellben sikerült elvégezni, mutáció létrehozásával az *age-1* génben, ami az átlagos élettartam 65%-os, míg a maximális élettartam 110% megnövekedését eredményezte (Johnson, 1990.). Az öregedés kialakításában az endokrin rendszer is rendkívül fontos szerepet játszhat. A növekedési hormon és azzal kapcsolatban álló inzulin-szerű növekedési faktor szintjének az öregedés közbeni csökkenését sikerült egér modellben kimutatni (Ho és mtsai., 1997; Rudman, 1985). A növekedési hormon alul működése (loss-of function mutáció a Pit-1-lókuszban) az élettartam megnövekedését valamint, az immunrendszer késleltetett öregedését eredményezte (Flurkey és mtsai., 2001). A legtöbbek által támogatott genomikus instabilitáson alapuló öregedési elmélet, a telomer régió rövidülését teszi felelőssé (Kruk és mtsai., 1995). A telomerek a kromoszómák végén található ismétlődő szekvenciák, amiket a DNS polimeráz nem képes teljes mértékben replikálni, így minden osztódás során rövidülnek (da Costa és mtsai., 2016). Egy időután a sejt kimeríti osztódási kapacitását, elérve az úgynevezett Hayflick limitet (Hayflick & Moorhead, 1961).

Hogyha azokat az elméleteket vesszük alapul, amik a szervezetben megjelenő károkozást teszik felelőssé, talán mind közül az egyik legmeghatározóbb a reaktív oxigén gyökök (ROS) által okozott sérülés (Harman, 1981). Ezek megjelenése a biomolekulák felgyülemelő sérülését eredményezheti, indukálva azok elégtelen működését vagy negatívan befolyásolva fiziológias szerepüket (Piedrafita és mtsai., 2015). A három legfőbb intracelluláris ROS forrásnak a mitokondriális elektron transzport láncot, a nikotin-adenin-dinukleotid-foszfát oxidázt, és a lipoxigenázt tartják (Novo & Parola, 2008). Könnyű belátni, hogy a reaktív gyökök a nukleuszba kerülve, nagy mértékű, a genetikai információt befolyásoló kár okozására képesek. A ROS-ok hisztionok modifikációját vagy a DNS hipometilálódását eredményezhetik ezzel járulva hozzá az öregedéshez (Afanas'ev, 2014). *Drosophila melanogaster* modellben

bizonyították, hogy a ROS-ok eliminálásában kulcsszerepet játszó antioxidáns enzimek, mint szuperoxid-diszmutáz (SOD), valamint a kataláz túlexpresszáltatásával az állatok élettartama növekedett, bizonyítva a megemelkedett ROS szint öregedésben játszott szerepét (Orr & Sohal, 1994). Emlősök esetében a ROS-ok számára leginkább kitett szövetek azok, melyek éretten posztmitotikus állapotban fordulnak elő (da Costa és mtsai., 2016). Ezek közül is a legsebezhetőbbnek a szívizom, az idegszövet, és a vázizom bizonyultak. Kitettségük jelentős része, hatalmas energia igényükben rejlik, lévén, hogy ennek az energia igénynek a kielégítése érdekében a sejtek magasabb mitokondrium sűrűséget, nagyobb mértékű oxidatív foszforilációt mutatnak, ami növeli annak a kockázatát, hogy ennek elégtelen működése következtében szabadgyökök keletkezhetnek (da Costa és mtsai., 2016). A ROS-ok a fehérjékben is irreverzibilis károkat okoznak. A kor előre haladtával a fehérjék elbontásának határfoka csökkeni, kezd. A hibás térszerkezetű fehérjék agregoszómaiba állhatnak össze, amik felhalmozódnak a lizoszómaiban, lévén, hogy itt sem lehet ezeket elbontani. Ez mikroszkópos felvételeken kitűnően megfigyelhető (Moreno-García és mtsai., 2018). Ezen jelenségek összessége nagy mértékben hozzájárulhat számos neurodegeneratív kórképek kialakulásához (David, 2012).

Viszont a legtöbb természetben előforduló jelenséghez hasonlóan a reaktív oxigén gyökök megítélése sem ennyire fekete fehér. Számos tanulmány szól a ROS-ok szignálként betöltött funkcióiról. Emiatt felvetődik a kérdés, hogy az öregedés a ROS-on alapuló szignál útvonalak alulreguláltságából is következhet (Miki & Funato, 2012). Az oxidatív károkozáshoz hasonlóan, leírtak reaktív-nitrogén-gyököket is (RNS), amik szintén hozzá járulhatnak az öregedéssel kapcsolatos kórképek kialakításához (Abdelmegeed és mtsai., 2016). Ezek részletes megismerése még várat magára.

D257A egérmodell

Könnyű belátni, hogy az előbb említett káros molekulák felhalmozódásában, a mitokondrium milyen jelentős szerepet tölthet be, az ebben a sejtorganellumban zajló oxido redukzív folyamatok miatt. Jelen dolgozatomban vizsgálódásunk során ezért a mitokondriális DNS-ben (mtDNS) megjelenő pontmutációkat helyeztük középpontba. Ennél a modellnél, nem csupán a ROS felhalmozódás hordozhat veszélyt magában a szervezetre nézve. Mivel a mtDNS-en az elektron transzport lánc génjei vannak kódolva, könnyű belátni, hogy ha ezek a struktúrák sérülnek a sejt energia háztartása könnyedén felborulhat, ami apoptózis indukálásához vezethet (Park & Larsson, 2011).

Az öregedés ennek a válfajának a bizonyítását a D257A egér modellen végezték el. Az ilyen egér sajátossága, hogy pontmutációt idéztek elő a mitokondriális DNS-polimeráz *proofreading* aktivitásáért felelős alegységét kódoló *polgA* génben, ami a mitokondriális DNS-ben mutációk felhalmozódását eredményezi, kialakítva az öregedő fenotípust. Az egereket, melyek, homozigóták a mutáns génre nézve D257A egereknek hívjuk. Ez a mutáció, a random pontmutációk felhalmozódása mellett, a mtDNS-ben történő deléciók megjelenését is jelentheti. A deléciók kialakulásában a szabadgyökök is szerepet játszanak. Ennek jelentőségét igazolták a kataláz túlexpresszállatásával, oly módon, hogy a nagyobb mértékű H₂O₂ hasítás következtében, csökkent deléciós frekvenciát lehetett megfigyelni (Vermulst és mtsai., 2008). A vad típusú és a heterozigóta egerek esetében a deléciók homológ repetitív szekvenciákat érintettek. Ezzel szemben a homozigóta, öregedésszerű fenotípussal rendelkező D257A egereknél a nem homológ szekvenciák esetében lehetett legnagyobb mértékben deléciókat megfigyelni. Ez arra enged következtetni, hogy a mitokondriális DNS-polimeráz PolgA alegysége rendelkezik egy olyan aktivitással, amely során a nem homológ szekvenciák közti átrendeződéseket képes visszaszorítani, így ez által csökkenteni az itt fellépő deléciók esélyét. Leírták, hogy a korai öregedés a D257A egerekre jellemző volt, de a heterozigóta egerekre nem, akárcsak a nem homológ szekvenciák közt megjelenő deléciók. Ez alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a mtDNS-ben megjelenő nem homológ szekvenciák deléciója hozzájárul az öregedő fenotípus kialakításához.

A molekuláris biológiai elemzésen felül hisztokémiai vizsgálatokat is végeztek, amelyek során a citokróm oxidáz (COX) aktivitását mérték. Ez azért volt fontos, mert így igazolhatták, a mitokondriális génátíródás épségét. A COX aktivitás a vad típusúhoz képest mind a heterozigóta, mind a D257A egerekben csökkent és ez a csökkenés, a homozigóta egerek esetén nagyobb mértékű volt. Ez a mtDNS-ben megjelenő pontmutációk frekvenciájának emelkedésre utalt (Vermulst és mtsai., 2008).

A mutáció jelenléte ROS-ok felszaporodását nem okozta, viszont az apoptózis nagyobb mértékű megjelenését eredményezte, ami a mitokondriális diszfunkció következtében jöhetett létre. A fent említett sejttani változások eredménye képpen, a homozigóta egerekben az élettartam drasztikus lecsökkenését, valamint az egerek öregedésére jellemző fenotipikus változások korai megjelenését lehetett megfigyelni. Ilyen volt például az izom tömeg csökkenése, a halláskárosodás, a csonttömeg veszteség, a bélkripták számának csökkenése, a herék sorvadása, amellyel együtt járt a spermatogenezis mértékének csökkenése, a vér sejtselemeinek számbeli csökkenése, valamint a testtömeg csökkenése. (Kujoth és mtsai.,

2005; Trifunovic és mtsai., 2004) Ezzel bebizonyítva, hogy ez a sejttani jelenség minden bizonnyal szerepet játszik az öregedés kialakulásában.

H₂S

A hidrogén-szulfid számos biológiai hatással rendelkezik, melyből legismertebb nagy koncentrációban toxikus mivolta. Természetes körülmények közt endogén módon keletkezik, valamint fontos szignálútvonalak alkotóeleme. A molekula endogén előállítása enzimatis és nem enzimatis úton is végbe mehet. Az endogén előállítás sérülése a szervezet számára káros állapot kialakulásáért tehető felelőssé. A nem enzimatis út kevésbé ismert, annyit azonban tudni, hogy szerepet játszanak benne a kén tartalmú aminosavak, a vas, valamint a B₆ vitamin (Yang és mtsai., 2019). Az enzimatis, *in vivo* előállítási mód ezzel szemben jobban ismert, három enzimhez köthető. Ezek a cisztation-béta-szintáz (CBS), a cisztation-gamma-liáz (CSE) és a 3-merkaptopiruvát-szulfurtranszferáz (3-MST). Az enzimek különböző szövetekben és sejtorganelumokban más mértékben reprezentáltak. Normál körülmények közt a 3-MST mind a citoszólban, mind a mitokondriumban előfordul, ezzel ellentétben a CSE és CBS elsősorban citoszólikus fehérjék, bár daganat képződés és egyéb stressz hatások következtében ezek is kimutathatók a mitokondriumból (Donnarumma és mtsai., 2017). Intracelluláris körülmények között a H₂S a jelenleg elterjedt módszerekkel detektálhatatlan és a µM-os tartomány között fordul elő, bár legtöbb esetben a nanomoláris tartomány a leginkább jellemző rá (Furne és mtsai., 2008). A H₂S viszonylag rövid időn belül oxidálódik, amely során S₂O₃⁻ és SO₄²⁻ keletkezik. A molekula ezen módon történő eliminálása enzimatis szabályozás alatt áll, melyben szerepet játszik az elektron-transzport-lánc III-as komplexe is. Az eltávolításnak ez a változata azért érdekes, mert ezek a fehérjék szerepet játszanak más gáztranszmitterek, mint a CO vagy a NO eliminálásában is. Így ha valamelyik telíti ezt a rendszert az a többi koncentrációját is befolyásolhatja (Kabil & Banerjee, 2014).

A H₂S legjellemzőbben három útvonalon képes kifejteni a hatását. Működhet antioxidánsként, vagyis képes szabadgyökök eliminálására. Poszttranszlációs módosításokat hajthat végre fehérjéken, ez legtöbb esetben perszulfidálást jelent. Illetve direkt módon kapcsolódhat metalloproteinek hem-részéhez, vagy redukálhatja azt (Murphy és mtsai., 2019). Bár egyértelmű eredmények bizonyítják, az exogén bejuttatás ROS/RNS elimináló, valamint citoprotektív szerepét, antioxidáns szerepe vitatott, mivel a többi antioxidánséhoz képest rendkívül alacsony koncentrációban fordul elő. Sok kutató által támogatott elmélet, mi szerint a H₂S nem direkt módon funkcionál antioxidánsként, hanem serkentő hatással van más

antioxidánsok expressziójára és aktivitására (pl. glutation), valamint a potenciálisan ROS képző enzimek gátlását végzi el (Olas, 2017). Bár a molekula képes a ROS-okkal direkt módon kapcsolatba lépni, számos jelenségről, melyet eddig hozzá társítottak kiderült, hogy csak regulátor szerepe van és poliszulfid molekulákon megy keresztül. Erre azért van szükség, mert termodinamikai okok miatt a H_2S nem képes direkt módon polipeptidláncokkal kapcsolódni, de egy poliszulfid igen (Kimura, 2015; Nagy & Winterbourn, 2010).

A H_2S egy további fontos tulajdonsága, hogy redukálhatja metalloproteinek hem-részt, vagy direkt módon kapcsolódhat ezekhez. Ennek egy jelentős példája az ETC egy strukturális eleme a citokróm-C-oxidáz (COX). Kötődése ennek a molekula hem-részéhez két féle változást eredményezhet. Alacsony koncentrációban serkentheti, míg magas koncentrációban teljesen leállíthatja annak működését (Murphy és mtsai., 2019). Könnyű belátni, hogy a H_2S most bemutatott aktivitása, mekkora mértékben képes befolyásolni egy sejt energia háztartását.

A harmadik fontos regulátor szerepe az előzőekben már említett perszulfidáció. Viszonylag kevésbé ismert, hogy hogyan és mely fehérjéken megy végbe ez a folyamat. A kutatók először azt feltételezték, hogy a H_2S direkt módon lép reakcióba a fehérjékkel, de mint azt fentebb is említettem ez termodinamikai okok miatt nem lehetséges, így köztes lépésként poliszulfidokra van szükség. Ennek egy lehetséges útja az S-szulfonálás, ami során, a ciszteinen található tiol csoporthoz további kénvegyület adódik. Ez egy fontos poszttranszlacionális módosítás, mely során szulfon savak képződhetnek. Ezek tiol-csoportokkal diszulfid hidak kialakítására képesek, így befolyásolva a fehérje harmadlagos szerkezetét (Yang és mtsai., 2014). Az S-nitroziláció, egy másik lehetséges út a folyamat lezajlására, mely során a cisztein tiol csoportjához egy $-\text{NO}$ csoport kapcsolódott. Ennek során a H_2S direkt módon reagál S-nitrozotiolokkal. Ez az $-\text{NO}$ csoport felszabadulását eredményezi, ami a sejtben eldiffundálva, további szignál szerepét töltheti be. Ez a jelenség viszonylag kedvezőtlen termodinamikailag, így ezt eddig csak in silico modellben sikerült kimutatni (Talipov & Timerghazin, 2013). Továbbá bizonyos mértékben elvégezték a jelenség enzimatisz szabályzásának vizsgálatát, mely során kitudták mutatni, hogy thioredoxin és glutation rendszerek célzott kiütése a perszulfidáció mértékének emelkedéséhez vezet. Ezzel szemben a molekulát termelő CBS, CSE fehérjéknél az ellenkező hatást figyelhették meg (Dóka és mtsai., 2016).

Az öregedési folyamatok vizsgálói számára kifejezetten érdekesnek bizonyulhat a H_2S mitokondriumban játszott szerepe. Egy bizonyos koncentráció fölött toxikus molekulának tekinthető, míg ez alatt antiapoptótikus hatást mutat. A mitokondriális K_{ATP} csatornák perszulfidálása csökkenti azok aktivitását, így előzve meg a posztapoptótikus MAPK útvonal

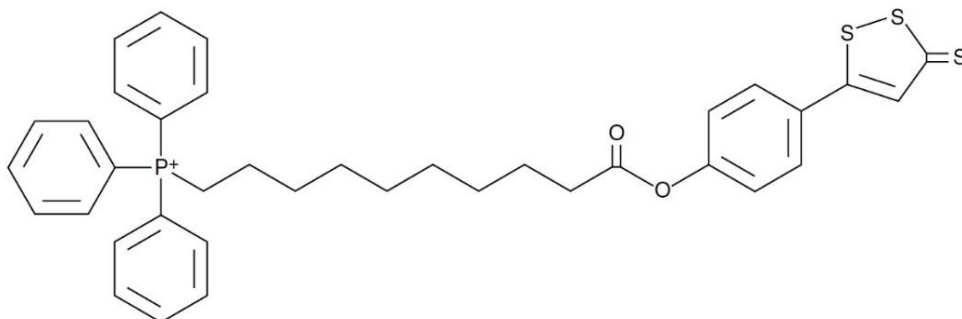
aktiválódását (Hu és mtsai., 2009). A H₂S szerepet játszhat a mitokondriumok biogenezisének szabályozásában. Ezt a peroxiszóma-proliferátor-aktivációs γ 1 α receptoron keresztül teszi meg, ami koaktiválja mitokondriumok jellemző transzkripciós faktorait az *Nrf2*-t és a *Tfam*-t, hogy rajtuk keresztül serkentse a nukleárisan kódolt mitokondriális fehérjéket, hogy azok végbe vihessék annak biogenezisét (Untereiner és mtsai., 2016). A H₂S végül képes a mitokondriumok morfogenezisének befolyásolására. A folyamat szabályzását a GTP-ázok egy családjához, dynamin-kötött-fehérjékhez (Drp) társítják. A H₂S csökkenti a mitokondriális fragmentációt, a ROS-ok felhalmozódásának mértékét, valamint az apoptózis indukálódását. Ezt egy Drp fehérje downstream módon történő regulálásával, valamint a sirtuin-3 -as útvonal upstream módon történő regulálásával éri el (Meng és mtsai., 2018).

AP39

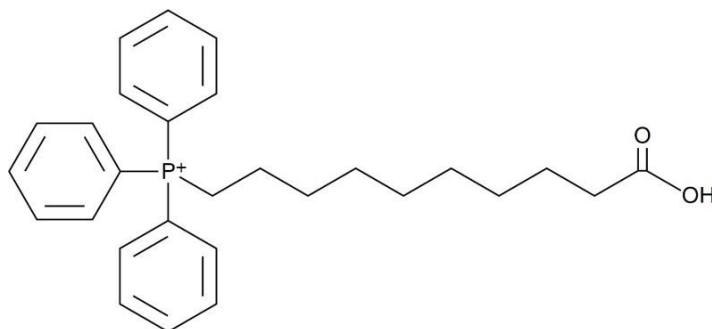
A fentebb taglaltak, és még sok más biológiai problémakör fényében igény mutatkozott olyan molekulákra, amelyek képesek a mitokondrium targetált transzportra. Erre a célra alkalmasak például a lipofil kationok, mint például a sokak által használt trifenil-foszfónium (TPP⁺). A mitokondriumban uralkodó magas negatív membránpotenciál következtében itt halmozódik fel a molekula, hiszen lipofil természetéből adódóan képes biológiai membránokon átmenni. Annak érdekében, hogy ez a molekula képes legyen H₂S felszabadítására kémiai reakciókkal egy H₂S donor molekulát az 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol3-etion-t kapcsolták hozzá. Így hozták létre az AP39-et, mely egy mitokondrium targetált H₂S-donor molekula (Le Trionnaire és mtsai., 2014). Későbbi vizsgálatok endothél sejtekben, a mitokondriális elektron transzportra, valamint a sejt energia háztartására gyakorolt hatásának vizsgálatai bizonyították, hogy a molekula harang görbe alakú hatással rendelkezik. Alacsonyabb koncentrációban (30 és 100 nM) serkentő, míg ennél magasabb koncentrációban csökkentő hatása van, ami gátló hatásba alakul át. A molekula összességében citoprotektív hatással rendelkezett, továbbá védte a sejtet a mitokondriális diszfunkciótól (Szczesny és mtsai., 2014). További előnye az AP39-nek, hogy fokozatos H₂S felszabadítást tesz lehetővé, szemben a korábban elterjedten alkalmazott nátrium-hidroszulfiddal vagy 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tionnal. Így a sejteket érő H₂S koncentrációja nem emelkedik robbanásszerűen és hatása hosszabb ideig tarthat. (Ikeda és mtsai., 2015). Szakirodalmilag elfogadott kontrollmolekulájának bizonyult az AP219, ami nem tartalmazza a molekula 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol3-etion részét, vagyis nem képes a H₂S felszabadítására, így az eddig leírtak szerint nem rendelkezik biológiai

hatással nanomoláris, vagy mikromoláris koncentrációban (Karwi és mtsai., 2017; Szczesny és mtsai., 2014). Az AP39 és az AP219 szerkezeti képletét az 1. Ábra mutatja.

AP39



AP219



1.Ábra Az AP39 és az AP219 szerkezeti képlete. (Szczesny és mtsai., 2014)

Célkitűzés

Bár az öregedés folyamatának leállítása vagy legalább lassítása, jogosan sok vitát szül a tudományos közvéleményben, abban mindenki megegyezik, hogy azokat a betegségeket, amelyek ezen a biológiai jelenségen alapszanak szükséges kezelni. Több eljárást kidolgoztak, hogy ehhez a célhoz közelebb kerülhessenek. Ilyen volt a bevitt kalória mennyiség korlátozása (Kim és mtsai., 2015), az összejt terápia (Nazari és mtsai., 2015), különböző hormonokon alapuló terápia (GH, IGF)(Anisimov & Bartke, 2013), antioxidánsok bevetése a keletkező szabadgyökök eliminálására (de Magalhães, 2014) vagy a telomer meghosszabbításán alapuló elméletek(Ramunas és mtsai., 2015).

Kutatásunk során, egy még ki nem próbált terápiát alkalmaztunk, aminek a segítségével potenciálisan kezelhetnénk, esetleg megelőzhetnénk az öregedéssel fenotípuson alapuló kórképek kialakulását.

Feltételeztük, hogy a H₂S számos citoprotektív hatása, elsősorban a sejt energiaháztartására gyakorolt hatásai, lassíthatják az öregedést kialakító biológiai folyamatokat.

Ezért exogén H₂S-t szabadítottunk fel a mitokondriumban az AP39 molekula segítségével a D257A egerekben.

Feltételezzük, hogy ez a folyamat kimutatható változást indukál az öregedés jelenségével összefonódó gének átíródásában.

- Célunk volt, a homozigóta, korai öregedést mutató D257A, és a vad típusú egerek közötti génexpressziós változások detektálása az öregedéssel összefüggő gének tekintetében.
- Továbbá az AP39 molekula e gének átíródására gyakorolt hatásának vizsgálata

Anyag és módszer

Felhasznált állatok

A kísérletekhez a Pécsi Tudományegyetem (PTE) Általános Orvosi Karának Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetének állatházában szaporított (engedélyszám: TMF/27/2016) hím D257A KO egereket és azok homozigótavadtípusú alomtársait használtunk. Az állatokat standard körülmények között tartottuk a National Institute of Health által meghatározott szabályoknak megfelelően. A víz és táp adagolása *ad libitum* történt. Az állatkísérleteket a PTE Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának engedélyével végeztük (engedélyszám: BA02/2000-23/2019). A kísérletekben kutató csoportunk egy engedéllyel rendelkező tagja felügyelete mellett vettem részt.

Felhasznált anyagok

H₂S donorként a (10-oxo-10-(4-(3-tioxo-3H-1,2-ditiol-5-il)fenoxi)decil)trifenilfoszfónium (AP39) molekulát használtuk (Le Trionnaire és mtsai., 2014), 0.5 V/V% etanol:fiziológiás sóoldatban feloldva. Kontrollként egy, az AP39 H₂S donáló molekularészét nem tartalmazó, (9-karboxinonil)trifenil-foszfónium (AP219) molekulát használtunk, szintén 0.5 V/V% etanol: fiziológiás sóoldatban oldva. Emellett vivőanyag kontrollként, illetve az oltás okozta változások elkülönítéséhez 0.5 V/V% etanol:fiziológiás sóoldatot használtunk.

Kezelés

Az állatokat 2 hónapos koruktól kezdve hetente kétszer 0.5 mg/tkg hatóanyaggal *i.p.* oltottuk 7 hónapon keresztül. Hat kezelési csoportot alakítottunk ki: vivőanyag kontrollal kezelt vad típusú (WT) és D257A homozigóta (KO) egerek, AP219-el kezelt WT és KO egerek, illetve AP39-el kezelt WT és KO egerek. Minden csoport egyedszáma legalább n=5 volt.

Minták előkészítése

A kezelési időtartam letelte után az állatokat 5 V/V% izofluránnal történő altatás mellett felboncoltuk, majd vért vettünk a bal kamrából, ezután kiemeltük a májat, szívet, veséket, lépét és a combizom egy darabját. A vért EDTA tartalmú csövekbe (BD) gyűjtöttük, a szervekből egy, megközelítőleg 0,5x0,5 cm-es darabot 500 µl TRI reagensbe (Zymo Research) tettünk, majd felhasználásig -20°C-on tároltuk. A maradék szerveket azonnal folyékony nitrogénbe tettük, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

Hematológiai analízis

A levett vér vizsgálatát a PTE ÁOK Laboratóriumi Medicina Intézetében végezték el Sysmex XN-1000-V Multispecies Hematology Analyzer műszerrel.

qPCR analízis

A TRI reagensben eltett szöveteket homogenizáltuk, majd 100 µl kloroform hozzáadása után állni hagytuk. Ezután a mintákat centrifugáltuk (12000xg) 15 percig 4°C-on. A vizes fázist különválasztottuk, majd 250 µl izorpoanollal összekevertük. Ezt a keveréket 10 percig hagytuk állni, ezután 10 percig centrifugáltuk (12000xg) 4°C-on. A felülúszó eltávolítása után a pellethez 500 µl 75%-os etanolt adtunk. Keverés után a mintákat centrifugáltuk (12000xg) 5 percig, 4°C-on. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet először beszárítottuk, majd RNáz mentes vízben feloldottuk.

Az izolált totál RNS mennyiségét és tisztaságát Nanodrop készülékkel határoztuk meg. Ezután RNáz inhibitor (RiboLock) jelenlétében DNáz kezelést végeztünk, majd az RNS minőségét újra ellenőriztük. Az eredmények alapján megfelelő mennyiségű RNS-t írtunk át cDNS-sé 65°C-on, 30 percig, 20 µl végtérfogatban. Ehhez a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kitet használtuk (Thermo Scientific). A qPCR analízishez felhasznált primereket az Integrated DNA Technologies-től rendeltük. A vizsgált gének listája az 1. táblázatban látható

1.Táblázat Az általunk vizsgált gének neve, és az általunk használt rövidítésük

Apex1	Apurin/Apirimidin endodeoxi-ribonukleáz 1
Bcl-2	BCL2 Apoptózis regulátor
Cdkn1a	Ciklin dependens-kináz inhibitor 1A
Fen1	Flap struktúra-specifikus endonukleáz 1
Foxo3	Forkhead Box O3
Hmox1	Hem-oxigenáz 1
Hprt	Hipoxantin-foszforiboziltranszferáz 1
Parp1	Poli(ADP-Ribóz)-polimeráz 1
Pten	Foszfataz és tenzin homológ
Sdhb	Szukcinát-dehidrogenáz komplex vas-kén B alegység
Shc1	SHC Adaptor Protein 1
Sirt1	Szirtuin 1
Sirt3	Szirtuin 3
Sirt6	Szirtuin 6
Tfam	Mitokondriális transzkripció faktor A
Tfb1m	Mitokondriális transzkripció faktor B1
Trp53	Tumor Protein 53

A mintákban jelenlévő mRNS mennyiséggel elméletileg egyenesen arányos az átírt cDNS mennyiség. A jelöléshez SYBR Green I nevű fluoreszcens kettősszálú-DNS festéket (Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-Rox kit, Institute of Applied Biotechnologies) használtunk. A detektáláshoz és a PCR reakcióhoz a CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System

(Bio-Rad) készüléket használtuk. Az amplifikációhoz 1 μ l cDNS-ből indultunk ki, emellett a gyártó utasításai szerint jártunk el. Az eredmények kiértékelése komparatív Δ Ct-módszerrel történt, melyhez előzetesen meghatároztuk az amplifikációs hatékonyságot. Referencia génként a gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenázt (GAPDH) használtuk. A PCR specificitását olvadáspont analízissel ellenőriztük.

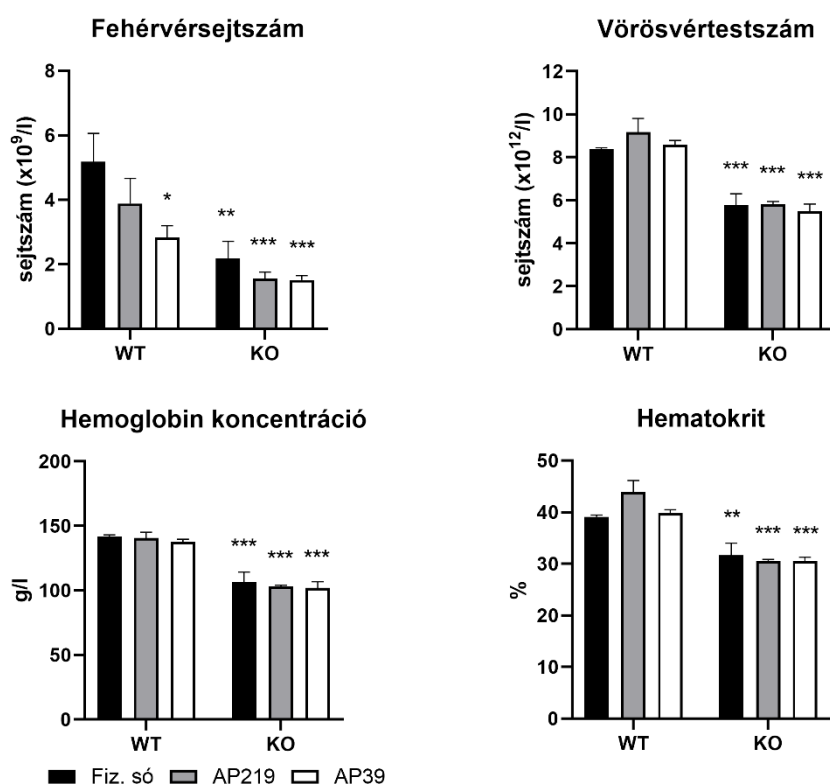
Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai elemzését GraphPad Prism szoftverrel végeztük el. A csoportok összehasonlításához ANOVA, és Tukey's *post hoc* módszert használtunk. Az ábrákon az átlagokat $\pm$ SEM jelenítettük meg. Szignifikánsnak tekintettük a különbséget $p < 0,05$ értékeknél. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Eredmények

Hematológiai analízis

Az állatok boncolása során vett vért hematológiai analízisnek vetettük alá. Az így kapott eredmények jelentős különbséget mutattak a vivőanyaggal kezelt vad típusú és D257A egerek között a vörösvértestszám, fehérvérsejtszám, hematokrit és hemoglobin koncentráció tekintetében. Minden esetben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a D257A állatoknál, ami a kezelés hatására nem módosult. Emellett az AP39 kezelés szignifikánsan csökkentette fehérvérsejtszámot a vad típusú egereknél, a vivőanyag kontrollal kezelt csoporthoz képest (2. ábra).

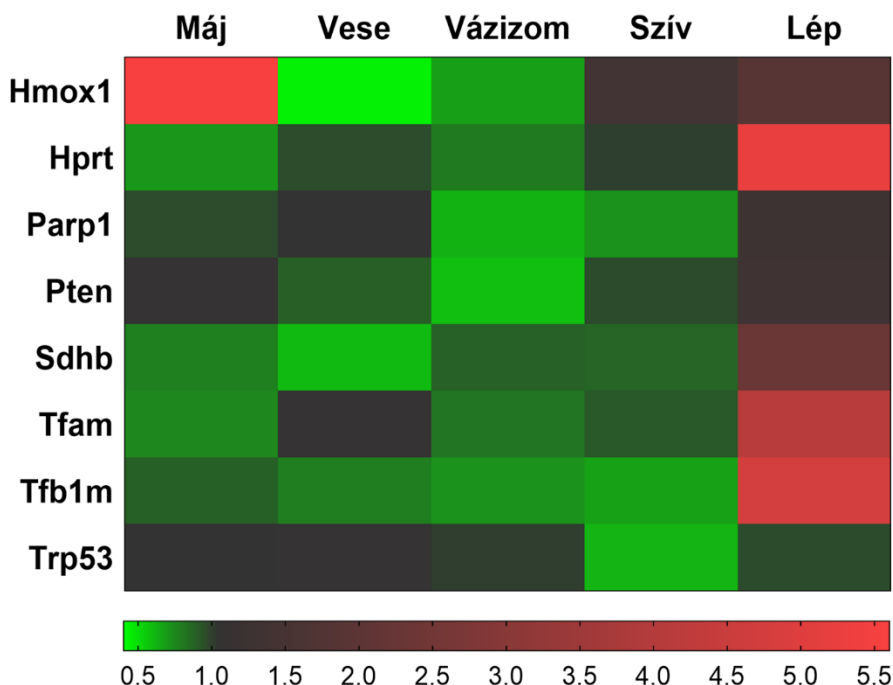


2.Ábra a vér sejtjes elemeinek száma WT és KO egerekben, külön feltüntetve a kezelési csoportokat. Az adatokat átlag $\pm$ SEM jelenítettük meg. $n=5-7$ * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ (WT kontrollhoz képest)

Kezeletlen állatok génexpressziójának összehasonlítása

A vad típusú kontrollhoz képest, a KO kontroll csoport állataiban az általunk vizsgált 17 gén átíródásának változását összevetve 8 esetben detektáltunk olyan szignifikáns változást, amely legalább az egyik szervet érintette. A vad típusú egérhez képest, a legtöbb szerv esetében a génexpresszió mértékének csökkenését figyelhetjük meg ezeknél a géneknél. A csökkenés mértékét tekintve kiemelkedőnek lehet tekinteni a vesét a *Hmox1* génre nézve (kontroll érték 0,44-szerese).

Említésre méltó, hogy a lép esetében a kiemelt 8 génből 6 (*Hmox1*, *Hprt*, *Pten*, *Sdhb*, *Tfam*, *Tfb1m*) emelkedett génexpressziót mutatott. Emellett a máj *Hmox1* génje, ahol a génexpresszió növekedése mutatkozik meg, itt mértük a legnagyobb mértékű növekedést is (5,6-szoros emelkedés), emellett szintén jelentős növekedést mutatott a *Hprt* gén expressziója a lépben (5,21-szeres emelkedés). A leginkább érintett szervek a máj és a lép. A kiemelt 8 gén közül nem mértünk szignifikáns eltérést a májban a *Parp1*, *Pten*, *Tfb1m* és *Trp53* géneknél, illetve a lépben a *Parp1* és *Trp53* géneknél. A vese esetén csak a *Hmox1* gén expressziója mutatott szignifikáns eltérést. Izom esetén szignifikáns csökkenést mértünk a *Hmox1*, *Parp1* és *Pten* gének átíródásában, míg szívben a *Tfam*, *Tfb1m* és a *Trp53* expressziója csökkent szignifikánsan. (3. ábra)



3. Ábra WT és KO kontroll génexpressziójának összehasonlítása, az általunk vizsgált génekre. Az ábrán azokat a géneket tüntettük fel, amelyeknél legalább egy szervben szignifikáns változást lehetett kimutatni. WT kontroll génexpressziós értéke=1, az ábrán a KO kontrollban megjelenő eltérés van feltüntetve, arányosítva.

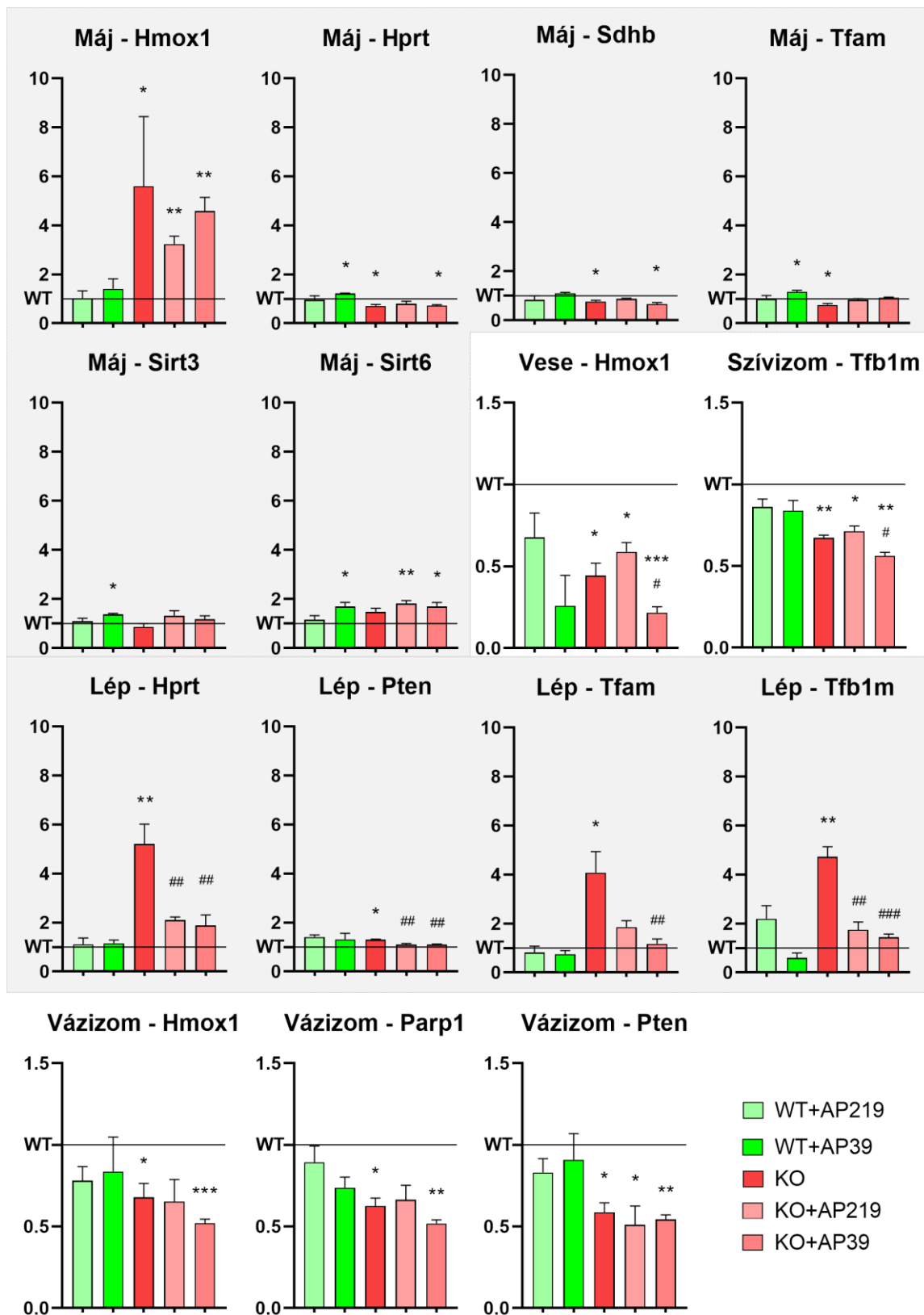
Az AP39 kezelés hatása

Az AP39 kezelés mindössze néhány gén esetében eredményezett szignifikáns változást a hatóanyaggal kezelt és kontroll KO állatok összevetésében. Feltűnő a tendencia, mi szerint ahol szignifikáns különbség mutatkozott a kezelés hatására, az a génexpresszió mértékének csökkenését eredményezte.

Nem várt eredménynek bizonyult, hogy a kontrollmolekulaként szolgáló AP219 is sok esetben hatással rendelkezett. Ez a legsarkalatosabban a lép esetében mutatkozik, ahol mind a *Hprt*, *Pten* és *Tfb1m* gének esetében ugyanúgy csökkenést mutatott a KO kontrollhoz képest, mint az AP39. Sőt a máj *Hprt* és *Sdhd*, valamint a vázizom *Hmox1* és *Parp1* génjei esetében, az AP219-el kezelt csoport értékei még közelebb is állnak a vad típusú kontroll értékéhez.

Ennek ellenére több esetet is ki lehet emelni, ahol csak az AP39-el kezelt csoport esetében lehet változást észlelni. Ilyen volt például a vese *Hmox1*, a szívizom *Tfb1m* és a lép *Tfam* génjei.

Ki lehet jelteni továbbá, hogy ugyanazon génekre eltérő szervekben eltérő módon hathatott a kezelés. A *Tfb1m* gént tekintve szívizomban csak az AP39 eredményezett szignifikáns csökkenést a KO kontrollhoz képest, míg a lépben ezt az AP219 is megtette. A *Tfam* gén esetén a génexpressziós értékek bár mind a májban mind a lépben a kezelés hatására közelebb kerültek a WT kontroll által mutatott értékekhez, ez a lépben a génexpresszió mértékének csökkenését, míg a májban ennek növekedését eredményezte. Emellett a lépben elvált egymástól a kontrollmolekula és az AP39 hatása, míg ez a májban nem történt meg. Különbséget mutat továbbá a *Hmox1* gén eltérő szervekben. Ennél a génnél a kezelés minden esetben a génexpresszió mértékének csökkenéséhez vezetett. Ez egyedül a vesében mutatott szignifikáns különbséget a KO kontrollhoz viszonyítva, valamint itt lehet felfigyelni az AP219 és az AP39 közti eltérő hatásra.



4. Ábra A kezelés hatása a génexpresszióra. A kezelt csoportok génexpressziós változása (átlag $\pm$ SEM) van feltüntetve a WT kontroll=1 értékéhez viszonyítva. Referencia gén: GAPDH. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (WT kontrollhoz képest) # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,0001$ (KO kontrollhoz képest) $n = 5-7$

Diszkusszió

Munkánk során az öregedéssel összefüggő gének expressziójának változását vizsgáltuk AP39 kezelés hatására egy korai öregedést mutató egérmodellt felhasználva. Elemzésünk 17 célgénrt érintett. A génexpressziós analízis mellett hematológiai analízist is végeztünk, ami bár megerősítette a vad típusú és KO állatok közötti, már korábban is leírt különbségeket, az eredmények alapján az általunk alkalmazott kezelés nem befolyásolta mért paramétereket a KO egerek esetén.

Az egyes gének tekintetében több különbséget detektáltunk a vivőanyaggal kezelt WT és KO állatok mintáiban. Kiemelendő a *Hmox1* gén expressziójának jelentős indukciója májban és lépben, illetve a lépben tapasztalt, az általunk vizsgált gének közül hatot érintő gén átíródás növekedés. A *Hmox1* gén, a hem-oxigenázok egyetlen indukálható formáját kódolja, korábban leírták anti-inflammatorikus, antiapoptotikus, antioxidáns és kardioprotektív hatását (Shan és mtsai., 2019). Expressziójának növekedését az öregedéssel összefüggésben is vizsgálták korábban HepG2 sejtekben, mint az oxidatív stressz okozta kompenzatorikus mechanizmust (Lavrovsky és mtsai., 2000). Ezen adatok a mi eredményeinket is megerősítik. Továbbá a hem elbontásában játszott kulcs szerepe is magyarázhatja, alátámaszthatja a hematológiai analízisünk eredményét.

A *Hprt* fontos szerepet játszik, a purin bázisok normál módon zajló anyagcseréjében (Duan és mtsai., 2004). A *Parp1* poli-ADP-ribóz molekulák szintézisét végzi el, ez által fontos regulátor szerepet tölt be a DNS repair, a tumor képződés és a sejtosztódás folyamataiban (Ferraris, 2010). A *Pten* szabályzó szerepet tölthet be számos szignál útra tekintve, mint például a tumor képződés, a sejtciklus vagy a sejt energia háztartása (Stiles, 2009). A *Trp53* egy tumorszupresszor fehérjét kódol transzkripciós faktor aktivitással. Különböző stressz hatásokra a sejtciklust szabályozva, a sejt anyagcseréjében történő változások és az apoptózis indukálása felé tereli a sejtet. Számos tumor képződése alapszik a génben ejtett mutáción. (Soussi & Wiman, 2015) Könnyű belátni, hogy ezen gének, milyen fontos szerepet töltenek be a DNS integritásának megtartásában, tumor képződés megakadályozásában és az apoptózis kialakulásában. Ezen folyamatok az öregedés folyamata során zavart szenvednek, ami ugyan magyarázhatja a megváltozott génexpressziós mintázatot, de további vizsgálatok szükségesek, az általunk tapasztalt eltérések pontos felderítésére.

A *Sdhb* az ETC II. komplexének alegysége. A génben történő mutációk mitokondriális diszfunkcióhoz és tumor genezishez vezethetnek (Kim és mtsai., 2015). Mind a *Tfam* mind a

Tfb1m rendkívül fontos regulátor szerepet játszik a mitokondriális génexpresszió folyamataiban. A Tfam transzkripció faktor szerepén felül az mtDNS tömörítésében is fontos szerepet játszik. Ezzel szemben a Tfb1m inkább a mitokondriális transzláció folyamatait tekintve mondható jelentősnek, mivel rRNS-metiltranszferáz aktivitással rendelkezik, ami a riboszóma kis alegységének összeszerelése szempontjából elengedhetetlen. A lépet leszámítva az összes általunk vizsgált szervben csökkenő tendenciát lehet megfigyelni ezekre a génekre. egyedül a vese Tfam szintje nem változott a D257A egérben. Az, hogy a lépben megnőtt ezen három gén expressziója, arról árulkodhat, hogy ez a szerv a többivel ellentétben megnövekedett mitokondriális aktivitással rendelkezik. Ez energiaigényes folyamatok zajlását sejteti. Későbbi vizsgálataink egyik következő tárgyát képezheti a folyamatok feltárása.

Bár kezelésünk a KO egerekben vizsgált gének expressziójára néhány esetben fejtett csak ki hatást, viszonylag meglepő eredmények tárulkoztak elénk. Rendkívül meglepő eredményül szolgált, hogy a kontroll molekula AP219, amely nem tartalmazta a H₂S felszabadítására képes 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditio13-etion csoportot, szintén rendelkezett hatással. Sok esetben az AP39 és az AP219 hatása nem különült el. Kiemelném a lép Hprt, Pten és Tfb1m génjeit, amelyek expresszióját a két molekula közel azonos mértékben csökkentette. Amint azt a bevezetésben is taglaltam a korábban ezzel foglalkozó kutató csoportok vizsgálódásai során nano- és mikromoláris tartományban nem eredményezett változást az AP219 (Karwi és mtsai., 2017; Szczesny és mtsai., 2014). Lévéen, hogy i.p. oltottunk nem tudjuk pontosan, hogy az adott szervek, sejtek mekkora koncentrációban vehették fel a molekulát. Ennek ellenére több esetben is megfigyelhető, hogy az AP39 hatása elválik a kontroll molekuláétól. Ezekben az esetekben a felmutatott hatást csak H₂S-nak tudhatjuk be. Erre példák a vese Hmox1 génje, a szívizom Tfb1m génje valamint a lép Tfam génje.

Ahol a KO kontrollhoz viszonyítva szignifikáns változást produkált bármelyik kezelés, az a génexpresszió mértékének csökkenését jelentette. Jelentek meg cikkek, amik egy bizonyos koncentráció felett a H₂S-nak DNS károsító és a génexpresszió csökkenését eredményező hatást társítottak (Baskar és mtsai., 2007; Roberts és mtsai., 2008). Ez összefügghet a következtetéssel, ami szerint az egyes szervek túl magas koncentrációban vehették fel a hatóanyagokat. Bár ennek ellentmond, hogy a májban a Tfam, a Sirt3, Sirt6 és vad típusú AP39el kezelt vad típusú csoport esetén a Hprt gének WT kontrollhoz képesti emelkedését lehet megfigyelni. Ez vagy azt jelenti, hogy eltérő szövetek eltérő mértékben képesek a molekula felvételére, vagy pedig azt hogy eltérő szövetekben, eltérő hatásmechanizmussal rendelkezhet.

Ezt a hipotézist támogatja a tény, hogy ugyanazokat géneket nézve a kezelés eltérő hatást fejthet ki. Erre példák a Tfb1m, a Tfam vagy Hmox1.

Célkitűzésemre reflektálva, a kijelentést, hogy a hatóanyag alkalmas az öregedési fenotípus lassítására, egyértelműen se nem cáfolhatjuk meg, se nem támaszthatjuk alá, az általunk kapott adatok alapján. Hiszen tudunk példát hozni arra, hogy a kezelés hatására, az öregedés következtében kialakult génexpressziós különbség tovább nőtt, valamint arra is, hogy a kezelés csökkentette ezt a különbséget.

Későbbi kutatási terv

Folytatnánk a kiemelt szervek génexpressziós vizsgálatát fehérje szinten western blott keretein belül, hogy még alaposabb képet kaphassunk a génátíródásban bekövetkező változásokról. Ezen vizsgálatok már elkezdődtek jelen dolgozat írása közben, de kiértékelésük sajnos még várat magára. Elvégeznénk ugyanezen génexpressziós vizsgálatokat speciálisan tumor markerekre, lévén hogy az öregedéssel nagymértékben összefonódó folyamatról beszélünk. *In vitro* körülményekben vizsgálnánk külön az AP219 és külön az AP39 molekula hatásmechanizmusát, valamint koncentráció függését első sorban egér lép és máj sejtenyészeten, lévén hogy ezekben a szervekben eredményezett legsarkalatosabban különbséget a kezelésünk. További *in vitro* kísérletek tárgyát képezhetné, a különböző gének lépben megfigyelt eltérő expressziója a D257A egérben. Továbbá megismételnénk kísérletünket alacsonyabb koncentrációban bevitt hatóanyaggal, vagy esetleg más oltásmóddal.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Veres Balázsnak és Kőszegi Balázsnak a rengeteg tanításért, segítségért és támogatásért. Az intézetigazgató Gallyas Ferenc professzor úrnak, hogy lehetővé tette az itt folyó munkámat. A Labormedicinának a hematológiai analíziséért. Továbbá szeretnék még köszönetet mondani belsőkonzulemsemnek Pollák Editnek a segítségért útmutatásért, Kálmán Nikolettának kutatásunkban való részvételéért, tanításaiért. Ezen felül szeretném megköszönni a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet összes kedves munkatársának a munkáját és erőfeszítéseit. Valamint szeretném tiszteletemet tenni kutatásunk során elhunyt egerek áldozatának.

Hivatkozások

- Abdelmegeed, M. A., Choi, Y., Ha, S.-K., & Song, B.-J. (2016). Cytochrome P450-2E1 promotes aging-related hepatic steatosis, apoptosis and fibrosis through increased nitroxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 91, 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.016>
- Afanas'ev, I. (2014). New Nucleophilic Mechanisms of Ros-Dependent Epigenetic Modifications: Comparison of Aging and Cancer. *Aging and Disease*. <https://doi.org/10.14336/ad.2014.050052>
- Anisimov, V. N., & Bartke, A. (2013). The key role of growth hormone–insulin–IGF-1 signaling in aging and cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 87(3), 201–223. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.005>
- Baskar, R., Li, L., & Moore, P. K. (2007). Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *The FASEB Journal*, 21(1), 247–255. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6255com>
- da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Research Reviews*, 29, 90–112. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>
- David, D. C. (2012). Aging and the aggregating proteome. *Frontiers in Genetics*, 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00247>
- de Magalhães, J. P. (2014). The Scientific Quest for Lasting Youth: Prospects for Curing Aging. *Rejuvenation Research*, 17(5), 458–467. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1580>
- Dóka, É., Pader, I., Bíró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J. R., Pastor-Flores, D., Dick, T. P., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J., & Nagy, P. (2016). A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Science Advances*, 2(1), e1500968. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500968>

- Donnarumma, E., Trivedi, R. K., & Lefer, D. J. (2017). Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. In R. Terjung (Szerk.), *Comprehensive Physiology* (1. kiad., o. 583–602). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160023>
- Duan, J., Nilsson, L., & Lambert, B. (2004). Structural and functional analysis of mutations at the human hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT1) locus. *Human Mutation*, 23(6), 599–611. <https://doi.org/10.1002/humu.20047>
- Ferraris, D. V. (2010). Evolution of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors. From Concept to Clinic. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(12), 4561–4584. <https://doi.org/10.1021/jm100012m>
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R. A., & Harrison, D. E. (2001). Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6736–6741. <https://doi.org/10.1073/pnas.111158898>
- Furne, J., Saeed, A., & Levitt, M. D. (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1479–R1485. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90566.2008>
- Harman, D. (1981). The aging process. *Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.7124>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., & Funk, C. D. (1997). Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16644–16651. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16644>
- Ikeda, K., Marutani, E., Hirai, S., Wood, M. E., Whiteman, M., & Ichinose, F. (2015). Mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves neurological outcomes after cardiac arrest in mice. *Nitric Oxide*, 49, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.05.001>

- Johnson, T. E. (1990). *Increased Life-Span of age-I Mutants in Caenorhabditis elegans and Lower Gompertz Rate of Aging*. 249. <https://doi.org/10.1126/science.2392681>.
- Kabil, O., & Banerjee, R. (2014). Enzymology of H₂S Biogenesis, Decay and Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(5), 770–782. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5339>
- Karwi, Q. G., Bornbaum, J., Boengler, K., Torregrossa, R., Whiteman, M., Wood, M. E., Schulz, R., & Baxter, G. F. (2017). AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H₂S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling: Cardioprotection with AP39. *British Journal of Pharmacology*, 174(4), 287–301. <https://doi.org/10.1111/bph.13688>
- Kim, J.-H., Lee, Y., Kwak, H.-B., & Lawler, J. M. (2015). Lifelong wheel running exercise and mild caloric restriction attenuate nuclear EndoG in the aging plantaris muscle. *Experimental Gerontology*, 69, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.06.007>
- Kimura, H. (2015). Signaling Molecules: Hydrogen Sulfide and Polysulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 22(5), 362–376. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5869>
- Kruk, P. A., Rampino, N. J., & Bohr, V. A. (1995). DNA damage and repair in telomeres: Relation to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 258–262. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.258>
- Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., Hofer, T., Seo, A. Y., Sullivan, R., Jobling, W. A., Morrow, J. D., Van Remmen, H., Sedivy, J. M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C., & Prolla, T. A. (2005). Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science*, 309(5733), 481–484. <https://doi.org/10.1126/science.1112125>
- Lavrovsky, Y., Song, C. S., Chatterjee, B., & Roy, A. K. (2000). *Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFκB*.
- Le Trionnaire, S., Perry, A., Szczesny, B., Szabo, C., Winyard, P. G., Whatmore, J. L., Wood, M. E., & Whiteman, M. (2014). The synthesis and functional evaluation of a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, (10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5-

- yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide (AP39). *Med. Chem. Commun.*, 5(6), 728–736. <https://doi.org/10.1039/C3MD00323J>
- Medvedev, Z. A. (1990). AN ATTEMPT AT A RATIONAL CLASSIFICATION OF THEORIES OF AGEING. *Biological Reviews*, 65(3), 375–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1990.tb01428.x>
- Meng, G., Liu, J., Liu, S., Song, Q., Liu, L., Xie, L., Han, Y., & Ji, Y. (2018). Hydrogen sulfide pretreatment improves mitochondrial function in myocardial hypertrophy via a SIRT3-dependent manner: H₂S protects myocardial hypertrophy via SIRT3. *British Journal of Pharmacology*, 175(8), 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/bph.13861>
- Miki, H., & Funato, Y. (2012). Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *Journal of Biochemistry*, 151(3), 255–261. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs006>
- Moreno-García, A., Kun, A., Calero, O., Medina, M., & Calero, M. (2018). An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 464. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00464>
- Murphy, B., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2019). Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease. *The FASEB Journal*, 33(12), 13098–13125. <https://doi.org/10.1096/fj.201901304R>
- Nagy, P., & Winterbourn, C. C. (2010). Rapid Reaction of Hydrogen Sulfide with the Neutrophil Oxidant Hypochlorous Acid to Generate Polysulfides. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1541–1543. <https://doi.org/10.1021/tx100266a>
- Nazari, H., Zhang, L., Zhu, D., Chader, G. J., Falabella, P., Stefanini, F., Rowland, T., Clegg, D. O., Kashani, A. H., Hinton, D. R., & Humayun, M. S. (2015). Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, 48, 1–39. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.004>
- Novo, E., & Parola, M. (2008). Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 1(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-1-5>
- Olas, B. (2017). Hydrogen Sulfide as a “Double-Faced” Compound. In *Advances in Clinical Chemistry* (Köt. 78, o. 187–196). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.07.005>

- Orr, W. C., & Sohal, R. S. (1994). Extension of Life-Span by Overexpression of Superoxide Dismutase and Catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 263(5150), 1128–1130. <https://doi.org/10.1126/science.8108730>
- Park, C. B., & Larsson, N.-G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Journal of Cell Biology*, 193(5), 809–818. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010024>
- Piedrafita, G., Keller, M., & Ralser, M. (2015). The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions. *Biomolecules*, 5(3), 2101–2122. <https://doi.org/10.3390/biom5032101>
- Ramunas, J., Yakubov, E., Brady, J. J., Corbel, S. Y., Holbrook, C., Brandt, M., Stein, J., Santiago, J. G., Cooke, J. P., & Blau, H. M. (2015). Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *The FASEB Journal*, 29(5), 1930–1939. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259531>
- Roberts, E. S., Thomas, R. S., & Dorman, D. C. (2008). Gene Expression Changes Following Acute Hydrogen Sulfide (H₂S)-induced Nasal Respiratory Epithelial Injury. *Toxicologic Pathology*, 36(4), 560–567. <https://doi.org/10.1177/0192623308317422>
- Rudman, D. (1985). Growth Hormone, Body Composition, and Aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 33(11), 800–807. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1985.tb04195.x>
- Shan, H., Li, T., Zhang, L., Yang, R., Li, Y., Zhang, M., Dong, Y., Zhou, Y., Xu, C., Yang, B., Liang, H., Gao, X., & Shan, H. (2019). Heme oxygenase-1 prevents heart against myocardial infarction by attenuating ischemic injury-induced cardiomyocytes senescence. *EBioMedicine*, 39, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.056>
- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53: An oncogene in disguise. *Cell Death & Differentiation*, 22(8), 1239–1249. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>
- Stiles, B. L. (2009). Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: Extending its PTENtacles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(4), 757–761. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.022>
- Szczesny, B., Módos, K., Yanagi, K., Coletta, C., Le Trionnaire, S., Perry, A., Wood, M. E., Whiteman, M., & Szabo, C. (2014). AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor,

- stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. *Nitric Oxide*, 41, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.008>
- Talipov, M. R., & Timerghazin, Q. K. (2013). Protein Control of S -Nitrosothiol Reactivity: Interplay of Antagonistic Resonance Structures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(6), 1827–1837. <https://doi.org/10.1021/jp310664z>
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H. T., & Larsson, N.-G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429(6990), 417–423. <https://doi.org/10.1038/nature02517>
- Untereiner, A. A., Fu, M., Módos, K., Wang, R., Ju, Y., & Wu, L. (2016). Stimulatory effect of CSE-generated H₂S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. *Nitric Oxide*, 58, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.06.005>
- Vermulst, M., Wanagat, J., Kujoth, G. C., Bielas, J. H., Rabinovitch, P. S., Prolla, T. A., & Loeb, L. A. (2008). DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nature Genetics*, 40(4), 392–394. <https://doi.org/10.1038/ng.95>
- Yang, J., Gupta, V., Carroll, K. S., & Liebler, D. C. (2014). Site-specific mapping and quantification of protein S-sulphenylation in cells. *Nature Communications*, 5(1), 4776. <https://doi.org/10.1038/ncomms5776>
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., & Hine, C. (2019). Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B6. *Communications Biology*, 2(1), 194. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0431-5>