

37. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Biológia szekció

**Nemi különbségek az izom- és agyszövetben termelődő miokinek
és hősokkfehérjék expressziójában egy hét futást követően**

Készítette:

Koltai Zsófia

Biológia szakos hallgató

Bsc III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Tóth Erzsébet Melinda

Tudományos munkatárs

Belső Konzulens:

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Bevezetés.....	3
1.1. A testmozgás egészségre kifejtett jótékony hatásai	3
1.2. A miokinek általános jellemzése	6
1.3. A miokinek szerepe az izom-agy endokrin körben	6
1.3.1. BDNF	7
1.3.2. FNDC5/irisin	7
1.3.3. Cathepsin B	8
1.4. A hősokkfehérjék általános jellemzése	9
1.5. A hősokkfehérjék csoportjai, és általános jellemzésük	9
1.5.1. HSPB (kismolsúlyú hősokkfehérje) család	10
1.5.2. HSPA (HSP70) család.....	10
1.6. A hősokkfehérjék neuroprotektív tulajdonságai.....	11
2. Célkitűzés	13
3. Anyagok és Módszerek	14
3.1. Állatok kezelése	14
3.2. Vérvizsgálat	15
3.3. Totál RNS izolálás	15
3.3.1. Izomszövet.....	15
3.3.2. Agyszövet	16
3.4. Génexpresszió vizsgálat.....	16
3.4.1. Reverz transzkripció	16
3.4.2. PCR analízis	17
3.5. Immunhisztokémia.....	17
3.5.1. Metszetek készítése	17

3.5.2. Immunhisztokémiai festés	18
3.6. Fehérje izolálás	18
3.7. Western blot analízis	19
3.8. Statisztikai analízis	20
4. Eredmények és értékelésük	21
4.1. Állatok test-, és szervtömegének változása	21
4.2. Vérvizsgálati eredmények.....	22
4.3. Vázizomszövet vizsgálati eredmények	23
4.3.1. qPCR.....	23
4.3.2. Western-blot vázizomszövet	25
4.3.3. Immunhisztokémiai festés	26
4.4. Agyszövet vizsgálati eredmények.....	27
5. Összefoglalás.....	29
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék.....	33
Tételes szerzői hozzájárulás	39

1. Bevezetés

1.1. A testmozgás egészségre kifejtett jótékony hatásai

A testmozgás számtalan jótékony hatással rendelkezik mind a testi, mind a mentális egészségünk tekintetében, manapság pedig már elfogadott tény, hogy a rendszeres testedzés hatékony megoldásként szolgálhat kardiovaszkuláris, metabolikus, és mozgásszervi betegségek esetén (Kramer, 2020). Az edzés ezek mellett az agy egészségének megőrzéséhez is hozzájárul azáltal, hogy csökkenti a demencia, a depresszió és a stressz kialakulásának valószínűségét, valamint fontos szerepet játszik a kognitív funkciók helyreállításában és fenntartásában (Pedersen, 2019). A testmozgás hatásait általában két szempontból szokták vizsgálni. Egyfelől, hogy milyen hatással van a teljesítményre, mint például az erő és az állóképesség fejlődésére. Másfelől pedig az egészségre, pontosabban a kardiovaszkuláris rendszerre, a metabolikus folyamatokra és mentális egészségre gyakorolt hatását szokták kutatni (Kramer, 2020). Szakdolgozatom során az utóbb említett perspektíva egy részét szeretném bemutatni.

Az egészség definíciója az Egészségügyi Világszervezet (WHO) meghatározása szerint: „Az egészség a teljes testi, lelki, szellemi és szociális jóllét állapota, és nem csupán a betegség vagy fogyatékosság hiánya.” Ebből következik, hogy a fizikai teljesítmény javítása növelheti az általános jóllétet, és ennek köszönhetően jótékony hatást gyakorol az egészségre is, betegség jelenlététől függetlenül (Kramer, 2020).

A krónikus betegségek felelősek a halálozások 74%-ért világszerte. Jelentős mennyiséget, a halálozások 44%-át a szív- és érrendszeri betegségek okozzák, ami az összes halálozást 30%-át jelenti (Institute for Health Metrics and Evaluation 2019). A kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának kockázatát a rendszeres testmozgás, aktív életmód közel 50%-kal csökkentheti (Myers és mtsai., 2004).

A mozgásszegény életmód elterjedésével az anyagcserezavart érintő betegségek is egyre gyakoribbá váltak. Metabolikus-szindróma az alábbiakban felsorolt korállapotok közül három együttes fennállása esetén alakul ki: elhízás ($\geq$ BMI 30), magas vérnyomás, glükóz intolerancia, emelkedett szérum triglicerid és csökkent HDL-koleszterin szint (Ford és mtsai., 2002). Ez a fajta anyagcserezavar betegség összefügg a szív- és érrendszeri betegségekkel is, így ebben az esetben a testmozgás szisztematikusan fejtheti ki jótékony hatásait. Napi 30 perc moderált intenzitású testedzés már csökkentheti a betegség kialakulásának kockázatát, enyhítve az inzulinrezisztencia és a magas vérnyomás mértékét (Bassuk & Manson, 2005).

Egyes mozgásszervi megbetegedéseket, mint pl. sarcopenia, dynapenia, ostepenia, osteoporosis, főként az időskor velejáróinak tekintünk, azonban kialakulásukat a szakirodalom

a rendszeres testmozgás hiányával kezdi összefüggésbe hozni. Rendszeres és megfelelő, általában állóképesség fejlesztő edzés segítségével hatékonyan megelőzhetjük a legtöbb mozgásszervi betegség kialakulását (Hall és mtsai., 2016).

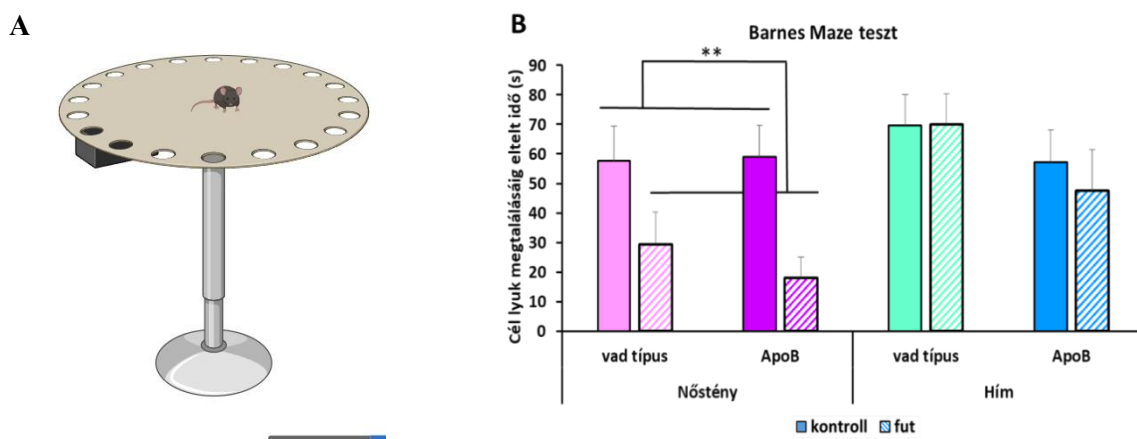
Az utóbbi 10 évben egyre nagyobb figyelem irányult a testmozgás és az agy egészségének kapcsolatára. A rendszeres testmozgás hatással van számos pszichológiai jóllétet befolyásoló tényezőre; csökkenti a depresszió és a stressz mértékét, illetve a szociális készségekre is pozitív hatást gyakorol. A stressz hatására megnövekedett glükokortikoid-, és katekolamin-szint, valamint a szimpatikus idegrendszer fokozott aktivitása fizikai inaktivitás mellett hozzájárul az anyagcsere-zavarok, valamint a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásához (Tsatsoulis és Fountoulakis, 2006). A testmozgás számos jótékony hatás mediátora, elősegíti az agyi angiogenezist, támogatja a neurogenezist és a szinaptikus plaszticitás mértékét a hippocampusz területén, fokozza az agyi vérellátást, csökkenti a vér-agy gát permeabilitását, illetve serkenti az oxigéndús vér szállítását az agy területére (Scisciola és mtsai., 2021). Stimulálja továbbá a prefrontális cortex és a hippocampusz idegsejtjeit, mely következtében az emlékek kódolásáért, visszahívásáért felelős agyrégiók területén fokozza a neuronok serkenthetőségét (Guise & Shapiro, 2017).

Napjainkban több edzésfajta is létezik, ezek különbözhetnek egymástól az edzés módjában, időtartamában illetve intenzitásában. A dolgozatomban az aerob edzés hatásairól szeretnék részletesebben beszámolni. Az aerob állóképesség fejlesztő edzés (aerobic training) célja a kardiovaszkuláris egészség fejlesztése, mely mozgásformák a nagy izmok huzamosabb ideig történő, ritmikus mozgatóján alapulnak (úszás, futás) (Barha & Liu-Ambrose, 2018). Egy másik edzésforma, az ellenállásos edzés (resistance training), az izmok erejének növelésére irányul. Az érvényben lévő egészségügyi iránymutatások mind az állóképességet, mind az izmok erősségét támogató tevékenységeket ajánlják (Kramer, 2020).

Napjainkban már számos szakirodalmi adat támasztja alá, hogy a rendszeres aerob testmozgás támogatja a kognitív funkciók javulását. Egy kutatás során a két edzéstípus kombinációjának kognitív funkcióra gyakorolt hatását vizsgálták egészséges idős embereken. A résztvevők 4 héten keresztül végeztek állóképesség fejlesztő és erősítő gyakorlatokat, amely eredményeképp jelentős fejlődést tapasztaltak a résztvevők végrehajtófunkciójában, epizodikus memóriájában és az információ feldolgozásának sebességében (Nouchi és mtsai 2013). Annak ellenére, hogy a szakirodalomban főként idős populációról találhatunk adatokat, az aerob testmozgás és a hippocampusz mérete közti pozitív irányú korrelációt gyermekeken (Chaddock és mtsai., 2010) és fiatal-serdülőkön (Herting & Nagel, 2012) végzett kísérletek során is

megfigyelték, azonban a vizsgálatok a memória funkciók javulásával nem mutattak összefüggést.

Ezen szakirodalmi adatokat, korrelációkat csoportunk előzetes kutatási eredményei is alátámasztják. Munkatársaim egy korábbi kísérlet során egészséges és elhízott hiperlipidémiás egerek kognitív funkcióját vizsgálták Barnes Maze teszt alkalmazásával (1.A ábra) 7 hónap futópados edzést követően. Ennek eredményeképpen azt találták, hogy a futás hatására szignifikánsan javult az egerek memóriája, viszont ez csak a nőstény egyedek esetében volt megfigyelhető (1.B ábra).



1. ábra A Barnes Maze teszt a térbeli memória vizsgálatára

A memória teszthez használt asztal, amellyel az egerek térbeli memóriájának javulását vizsgálták testmozgás hatására (A). Az oszlop diagram a mérés eredményeit mutatja: míg a vad típusú és az elhízott hiperlipidémiás nőstény egerek memória funkciói szignifikánsan javultak a kontroll csoporthoz képest, addig a hímek memória funkcióiban nem következett be javulás a testmozgás hatására. (B)

Azt, hogy a fizikai aktivitás kognitív funkcióra gyakorolt hatásának mértékét a biológiai nem jelentősen befolyásolhatja, először egy meta-analízisben vetették fel (Colcombe és Kramer, 2003). Jellemző, hogy a végrehajtó funkciókban aerob edzés hatására kialakult javulás azokban a kísérletekben bizonyult jelentősebbnek, amelyben nagyobb arányban vettek részt nők. Ebből arra következtethetünk, hogy a nők számára az adott edzés típus effektívebb a kognitív funkciók fejlesztésének tekintetében (Barha, Davis, és mtsai., 2017). Ezt a felvetést alátámasztja egy olyan kutatás is, melyben enyhe vaszkuláris demenciával diagnosztizált idős betegek 6 hónapon keresztül végeztek aerob típusú testmozgást. A kísérlet eredményei igazolják a korábban leírtakat, ugyanis csak a nők esetében figyeltek meg javulást a végrehajtó funkciók tekintetében, a férfiakban nem jegyezték fel ilyen jellegű változást (Barha, Hsiung, és mtsai., 2017). Egy másik kutatás kapcsán pedig a subiculum, a hippocampusz poszterior részén

található agyi struktúra méretében mutattak ki jelentős növekedést a rendszeres testmozgást végző nőkben (Varma és mtsai., 2015). A szakirodalmi adatok tehát azt mutatják, hogy az aerob típusú edzés kognitív funkciókra kifejtett jótékony hatása feltételezhetően erőteljesebben érvényesül a nők, illetve nőstény kísérleti állatok esetében.

Ahhoz, hogy azonosítani tudjuk a testmozgás hatására a kognitív funkció javulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokat, további kutatások szükségesek, elsősorban az izom-agy endokrin körben résztvevő molekuláris útvonalak felderítése érdekében. Korábbi irodalmi adatok olyan molekula csoportokra irányítják a figyelmet, mint például a miokinek, vagy a hősokkfehérjék, amelyek fontos szerepet tölthetnek be az említett folyamatok szabályozásában.

1.2. A miokinek általános jellemzése

A miokinek olyan bioregulátor molekulák, amelyek a vázizomban termelődnek testmozgás hatására, és részt vesznek egyes anyagcsere-, és élettani folyamatok szabályozásában (Tymochko-Voloshyn és mtsai., 2023).

Olyan peptideket, vagy citokineket sorolunk a miokinek közé, amelyeket a vázizom sejtjei expresszálnak, és amelyek autokrin, parakrin, illetve a vérkeringésbe jutva endokrin úton fejtik ki a hatásukat más sejtekre, szövetekre vagy szervekre (Pedersen és mtsai., 2007). Elsőként Goldenstein írta le a lehetőségét annak, hogy az izom kontrakció hatására különböző „humorális” faktorokat szabadíthat fel, amelyek részt vehetnek egyes anyagcserefolyamatok szabályozásában (Goldstein, 1961). Évtizedekkel később az interleukin-6 citokin volt az első miokinként definiált faktor, amelyről bebizonyosodott, hogy a testmozgás hatására szekretálódik a véráramba a kontraháló vázizomszövetből, majd a májban glükóz felszabadulást idéz elő, így biztosítva az izom számára megfelelő energiaellátást (Febbraio és mtsai., 2004). A felismerés, hogy az izom egy endokrin szerv és képes szekretálni proteinek, vagyis miokineket, amelyek részt vesznek a különböző szövetekkel való kommunikációban, fontos előrelépés volt a testmozgás- egészség paradigmában (Whitham és Febbraio, 2016).

1.3. A miokinek szerepe az izom-agy endokrin körben

A fizikai aktivitás kognitív képességekre kifejtett pozitív hatásaiért, legalább részben a kontraháló izomból felszabaduló miokinek lehetnek felelősek. A miokinek olyan agyi folyamatok serkentésében vehetnek részt, mint a neurogenesis, szinaptikus plaszticitás vagy akár a hosszútávú szinaptikus hatékonyság fokozódása. Ezekkel szoros összefüggést mutatnak az agy szerkezetében és funkciójában testmozgás hatására bekövetkező változások, úgy mint az idegsejtek aktivitásában és a neurális hálózatban létrejövő fejlődés (Kim és mtsai., 2019).

Több szakirodalmi adat is azt az elképzelést támogatja, hogy a miokinek a központi idegrendszerben különböző növekedési faktorok, különösképpen a BDNF (brain-derived neurotrophic factor, agyi eredetű növekedési faktor), expressziójának indukálása által fejtik ki jótékony hatásait (Delezie & Handschin, 2018).

A fizikai inaktivitás következtében lecsökkent miokin szintézis hozzájárulhat a szellemi hanyatlás és egyes neurodegeneratív mechanizmusok kialakulásához. Ez mind jól szemlélteti, hogy a vázizom milyen befolyással rendelkezhet az agy egészsége felett (Iizuka és mtsai 2014).

1.3.1. BDNF

A BDNF egy olyan neurotróf faktor, amely kiemelt szerepet játszik a neuronok túlélésének, növekedésének és fenntartásának támogatásában (Leibrock és mtsai., 1989). Részt vesz az aktivitás függő szinaptikus plaszticitás, pre- és poszt szinaptikus mechanizmusok modulációjában (Pencea és mtsai., 2001). Szabályozhatja az axonok és dendritek nyúlványainak elágazódását (branching) és újrarendeződését (remodelling) (Shimada és mtsai., 1998); a szinaptikus transzmisszió hatékonyságát, (Lohof és mtsai., 1993) és a serkentő szinapszisok érését (Rutherford és mtsai., 1998). Kimutatták, hogy ez a neurotróf faktor részt vesz a fizikai aktivitás hatására bekövetkező sejtproliferáció és differenciálódás szabályozásában a hippocampusban található gyrus dentatus területén, amely a memória és tanulási folyamatok kódolásában fontos terület (Vaynman és mtsai., 2004).

A BDNF a központi idegrendszer területén kívül a perifériás szövetekben is expresszálódik. A vázizomban a BDNF termelődése és szekretálódása is testmozgás-függő folyamat. Az izom által termelt BDNF elsősorban autokrin és parakrin hatásokkal rendelkezik (Pedersen és mtsai., 2009), azonban az, hogy endokrin módon kommunikál-e az aggyal, további vizsgálatok tárgyát képezi.

A testmozgás jótékony hatásait azonban leginkább a hippocampus területén kifejeződő BDNF közvetíti, amely expresszióját több, testmozgás hatására termelődő miokin (cathepsin b, FNDC5) is indukálhatja. Ennek következtében megemelkedik a BDNF szintje az agyban, ami a szinaptikus hatékonyság fokozásával hozzájárulhat a kognitív funkciók fejlesztéséhez (Moon és mtsai., 2016; Wrann és mtsai., 2013).

1.3.2. FNDC5/irisin

A membránkötött FNDC5 (Fibronectin type III domain containing 5, fibronectin III domént tartalmazó transzmembrán fehérje 5) a hormon-szerű, miokinek közé tartozó irisin prekursor molekulája (Zhang és Zhang, 2016). Fizikai aktivitás következtében a vázizomban megemelkedik a PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator)

transzkripciós ko-aktivátor faktor expressziója, amely fokozza az FNDC5 molekula kifejeződését (Pedersen, 2019). Legújabb kutatási eredmények alapján az FNDC5 megtalálható az agy egyes régióiban is, mint például a cerebellum, a hipotalamusz, a gerincvelő (Zhang és Zhang, 2016) illetve a hippokampusz területén, ahol testmozgás hatására jelentősen megemelkedik az expressziós szintje, ami a BDNF génexpressziójának fokozódásához vezet (Wrann és mtsai., 2013). Az izom által szekretált, szisztémásan jelenlévő FNDC5 szintjének növekedése eredményeként is emelkedett BDNF expresszió figyelhető meg, amely ezen keresztül szerepet játszhat a testmozgás neurogenézist és a tanulási folyamatokat támogató hatásában (Wrann és mtsai., 2013). Ez továbbá felveti azt a kérdést, hogy az FNDC5 hasított alakja, az irisin képes-e áthatolni a vér-agy gáton, azáltal közvetlenül aktiválva a BDNF expresszióját.

A szakirodalomban nincs egységes álláspont az irisin szint testmozgást követő növekedésének tekintetében (Pedersen, 2019), azonban tömegspektrométerrel végzett analízisek bizonyítják, hogy a plazmában található irisin szintje a testmozgás által szabályozott (Jedrychowski és mtsai., 2015). Az irisin testmozgás hatására keringésbe történő szekréciója magyarázhatná a leírt kapcsolatot az FNDC5 és a BDNF expressziós dinamikája között, amely újabb bizonyíték lenne az izom és az agy kommunikációjára.

1.3.3. Cathepsin B

A cathepsin b (CTSB) testünk minden sejtjében expresszáldó (Turk és mtsai., 2012) lizoszómális cisztein proteáz, amely számos fiziológiai funkcióval rendelkezik (Mort & Buttle, 1997). Edzést követően megemelkedik a *Cathepsin b* gén transzkripciós aktivitása a vázizomban, amelyet a vérplazma növekvő CTSB szintje követ. Egérmodellben kimutatták, hogy a keringéssel a központi idegrendszerig eljutó cathepsin b fehérjék képesek átjutni a vér-agy gáton, ahol a neuroprotektív BDNF és a doublecortin (DCX) expresszióját indukálják mRNS és fehérje szinten egyaránt (Moon és mtsai., 2016). Aerob edzést követően a hippokampusz területén is megnövekedett CTSB szint figyelhető meg, ugyanis a fizikai aktivitás következtében kialakuló hypoxia (Radak és mtsai., 2013) serkentheti a *Cathepsin b* expresszióját (Yakovlev & Gulyaeva, 2015). A cathepsin b olyan neuroprotektív molekula (Bendiske & Bahr, 2003), amely részt vesz az idegsejttörmelékek eliminálásában (Devi & Kiran, 2004), felnőttekben a neurogenesis indukálásában és a memória funkciók javításában (Abrous & Wojtowicz, 2015).

Ebből következően a testmozgás hatására expresszáldó CTSE, mint neuroprotektív molekula lokálisan, és mint miokin, a BDNF expressziójának serkentésével közvetetten is hozzájárulhat az agy egészségének kialakításához.

1.4. A hőszokkfekérjék általános jellemzése

A hőszokkfekérjék (HSP-k) egy olyan diverz feérje csoport, melynek tagjai minden sejtben kifejezőő, evolúciósan konzervált gének termékei (Tóth és mtsai., 2015), és minden jelentősebb sejtalkotóban jelen vannak (Tkáčová és Angelovičová, 2012). A hőszokk-, vagy más terminológiával stresszfeérjék fokozott expresszióját a stressz számos formája kiválthatja, többek között a magas hőmérséklet, hipoxia, iszkémia, nehézfém vagy etanol kezelés. Ezen kívül különböző betegségek, fertőzések során is megemelkedik a szintjük a sejtek védelmének érdekében (Tóth és mtsai., 2015). Dolgozatom során a mérsékelt testmozgás hatására a vázizomban és az agyban indukálódott stresszfeérjék jelentőségét szeretném bemutatni.

A sejt normál állapotában a hőszokkfekérjék fontos szerepet töltenek be a protein homeosztázis fenntartásában azáltal, hogy részt vesznek a szintetizálódott feérjék helyes térszerkezetének kialakításában, transzportjában és az esetleges eliminációjában (Tóth és mtsai., 2015).

A stressz hatására indukálódott hőszokkfekérjék más funkciókat látnak el a proteinhomeosztázis fenntartásában, mint a sejt fiziológiás állapotában jelenlévők. Ilyenkor a sejt védelmének érdekében a kifejezőő HSP-k megakadályozzák a kóros szerkezetű feérjék aggregációját, fenntartják a membránok stabilitását, csökkentik az oxidatív stressz mértékét illetve gátolják az apoptotikus útvonalak egyes lépéseit. A stressz hatására kialakuló helytelenül feltekeredett feérjék ("unfolded proteins"), és a membrán szerkezetének megváltozása stressz-szignalizációs útvonalak indukálásával felel a hőszokkfekérjék megnövekedett expressziójáért (Tóth és mtsai., 2015). A hőszokkfekérjék transzkripcióját szabályzó hőszokk faktor (HSF) normál körülmények között a citoplazmában monomer formában található meg, amely nem képes kötődni a DNS lánchoz. Stressz hatására azonban foszforilálódik, és olyan trimer molekula képződik belőle, amely a hőszokkfekérjéket kódoló gének promoterehez való kötődesével indukálja azok transzkripcióját (Morimoto, 1998).

1.5. A hőszokkfekérjék csoportjai, és általános jellemzésük

A hőszokkfekérjék közé eredetileg a stressz hatására indukálódó, a magas hőmérséklet, illetve a helytelenül feltekeredett feérjék által okozott károsodás elleni védelemben szerepet játszó feérjéket sorolták. Azonban később felfedezték, hogy a HSP család konstitutívan kifejezőő feérjéket is tartalmaz. A hőszokkfekérje család növekedésével a molekulaszűly

alapján rendszerező nomenklatúra elavulttá vált. Emiatt 2009-ben Kampinga és mtsai egy új irányelv alapján sorolták be a fehérjéket: HSPH (HSP110), HSPC (HSP90), HSPA (HSP70), DNAJ (HSP40), HSPB (kis molekulású HSP) és a chaperonin családok HSPD/E (HSP60/10) és CCT (TRiC) (Tóth és mtsai., 2015). Dolgozatomban a HSPB és a HSPA család tagjainak az agy egészségének kialakításában betöltött szerepét szeretném részletezni.

1.5.1. HSPB (kismolsúlyú hősokkfehérje) család

A kismolsúlyú hősokkfehérjék családjába a 16-40 kDa molekuláris tömeggel rendelkező, és a C-terminális végükön konzervált, 100 aminosavból álló, ún. α -crystallin, domént tartalmazó hősokkfehérjék tartoznak (de Jong és mtsai., 1998). Az emlősökben 10 fehérjét definiálunk HSPB-ként, ezek közül is a legjobban tanulmányozott a HSPB1 (HSP27), HSPB4 (α A-crystallin) és a HSPB5 (α B-crystallin). A HSPB fehérjék csak kis eltéréseket mutatnak molekuláris súlyuk tekintetében a különböző fajok között, ez jól mutatja a család evolúciós konzerváltságát (Tóth és mtsai., 2015).

A kismolsúlyú hősokkfehérjék megóvják a sejtet az apoptózissal és az oxidatív stresszel szemben, ezenfelül a citoszkeletonhoz és a sejtmembránokhoz való kötődésükkel biztosítják azok védelmét stressz esetén (Sun & MacRae, 2005). A HSPB család tagjaira jellemző, hogy képesek kötődni a hibásan feltekeredett, részlegesen denaturált, sérült fehérjékhez, megakadályozva azok aggregációját, illetve a helyes konformáció felvételére képes állapotban tartják őket (Nakamoto & Vigh, 2007). Stressz során csökkent ATP szint jellemzi a sejtet, emiatt a HSPB fehérjék funkciójukat ATP-független módon látják el. Amint helyreállt a sejt energiaszintje, ATP-függő chaperon fehérjékhez (HSPA/DNJA) szállítják őket, amelyek ATP felhasználásával képesek serkenteni a fehérje natív térszerkezetének felvételéhez szükséges molekuláris folyamatokat (Sun & MacRae, 2005).

1.5.2. HSPA (HSP70) család

A HSPA családba tartozó fehérjék az N-terminális végükön egy 45 kDa-s ATPáz domént, a C-terminális végükön pedig egy 25 kDa-s szubsztrátkötő domént hordoznak. Ebbe a családba 13 különböző fehérjét sorolunk, hasonló strukturális és funkcionális tulajdonságaik alapján (Vos és mtsai., 2008).

Stressz esetén a HSPA fehérjecsalád legfontosabb funkciója a denaturált fehérjék „refolding”-ja, vagyis helyes konformáció felvételének elősegítése, mivel a natív állapotát elvesztett polipeptidlánc hidrofób tulajdonságú aminosavai a felszínre kerülnek, ami megnöveli a fehérjék aggregációra való hajlamát. A hősokkfehérjék C-terminális végén található szubsztrátkötő doménjével képesek kötődni a denaturált fehérjék hidrofób régióihoz, így

létrehozva HSPA-fehérje komplexet. Az N-terminális doménhoz kötődő ATP hatására a HSPA konformációja megváltozik, a HSPA-fehérje komplex disszociál, és a levált fehérje konformációja is megváltozik (Gragerov és mtsai., 1994). Ez a kötődés-disszociáció lépés mindannyiszor ismétlődik, míg a hidrofób régiók fedésbe nem kerülnek és a fehérje ismét natív állapotba nem kerül (Qiu és mtsai., 2006).

Amennyiben szükséges, a HSPA család tagjai ko-chaperonok segítségével képesek facilitálni a kóros fehérjék proteosómális lebontását is. Ezeknek a folyamatoknak köszönhetően fenntartják a protein homeosztázist, amely a megfelelő sejtműködés alapvető feltétele (Söti & Csermely, 2002). A HSPA fehérjék képesek megakadályozni a sejthalált a prokaspáz-9 apoptosómális komplex inhibíciójával. Illetve az apoptózis későbbi, kaszpáz kaszkád aktivációját követő időszakban is képesek terminálni a sejthalált (Jäättelä és mtsai., 1998).

1.6. A hő sokkfehérjék neuroprotektív tulajdonságai

A különböző családokba tartozó hő sokkfehérjék egymással együttműködve, a proteinhomeosztázis és a sejtmembrán megfelelő állapotának fenntartásában játszott szerepüknek köszönhetően elősegíthetik a fehérje homeosztázis felborulásával járó neurodegeneratív betegségek megelőzését.

Az egyik leggyakoribb demenciával együtt járó neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór. Jellemző neuropatológiai elváltozásai az intracelluláris neurofibrilláris kötegek illetve az extracelluláris térben található, amiloid- β fehérjéből álló szenilis plakkok, ezenfelül az oxidatív stressz és az idegsejtek pusztulása is a betegség velejárója (Haass & Selkoe, 2007). A többi protein homeosztázis felborulásával járó betegségre is, mint pl.: Huntington-kór, Parkinson-kór, jellemző a fokozott oxidatív stressz. A szervezet öregedése során megnő a reaktív oxigéngyökök mennyisége, a sejt védekezőképessége pedig gyengül, ami a szabálytalanul feltekeredett, hibásan degradálódott fehérjék további felhalmozódásához vezethet (Andersen, 2004).

A neurodegeneratív betegségben szenvedők agyára jellemző a HSP-k fokozott jelenléte, amelynek egyre több szakirodalom tulajdonít neuroprotektív hatást (Sun & MacRae, 2005). Ezt jól mutatja, hogy a különböző családba tartozó HSP-k a kóros fehérje-plakkokkal asszociáltan detektálhatóak. A HSPB család tagjai például a szenilis plakkokban és a cerebrális amiloid angiopátia során az agyi erek falára lerakódott amiloid- β plakkokban is megtalálhatóak (Wilhelmus és mtsai., 2006). A HSPA transzgenikus túltermelése csökkentette az amiloid- β plakkok képződését, az idegsejt pusztulás mértékét és a kognitív funkciók csökkenését Alzheimer-kóros transzgenikus egér modellben (Hoshino és mtsai., 2011). Csoportunk korábbi

kísérletei azt mutatják, hogy a HSPB1 transzgenikus túltermelése Alzheimeres egerekben visszaszorította a kognitív funkciók romlását, csökkentette az amiloid- β plakkok mennyiségét a hippokampusz és a kortikális régiók területén, illetve helyreállította az állatok szinaptikus funkcióit (Tóth és mtsai., 2013). A hősokkfehérjék a stressz során a membránban található fehérje „lipid-raftok”-hoz kötve növelik azok rendezettségét, stabilizálják a sejtmembránt és helyreállítják annak funkcióit, ezzel növelve a sejt ellenállóképességét. Ezenfelül képesek közvetlenül a membrán foszfolipid részéhez is kötődni, ezzel tovább növelve a membrán stabilitását és a sejt védekezőképességét (Horváth és mtsai., 2008; Nakamoto és Vigh, 2007).

Összefoglalva tehát a hősokkfehérjék fokozott jelenléte a központi idegrendszer területén számos jótékony hatást gyakorol az agy egészségére. Jelenlétük biztosítja a megfelelő proteinhomoeosztázist, ami a sejtek egészséges működésének alapfeltétele. Ezenfelül neuroprotektív hatásaiknak köszönhetően enyhíthetik a kóros elváltozásokat az agyban, így preventív hatással vannak különböző neurodegeneratív betegségek kialakulását illetően. Mivel a testmozgás miatt kialakuló fiziológiás változások, mint például a megnövekedett testhőmérséklet vagy a csökkent véroxigén szint hatására az agyban megemelkedik a hősokkfehérjék expressziója, feltételezhető, hogy legalább részben szerepük van a testmozgás kognitív funkciókra kifejtett jótékony hatásaiban.

2. Célkitűzés

Jelen dolgozatomban célja azon molekulák azonosítása, amelyek szerepet játszhatnak a testmozgás kognitív funkciókra kifejtett jótékony hatásainak közvetítésében. Továbbá a kutatócsoportunk korábbi kísérlete során, a memória funkciók javulásában megfigyelt nemi különbségek lehetséges okainak azonosítása.

A feltett kérdések megválaszolásának érdekében a következőket tervezzük elvégezni:

- A vizsgálandó egereket, egy héten keresztül, fokozatosan nehezedő mérsékelt intenzitású testedzésnek tesszük ki;
- Az edzési periódus végeztével megmérjük az állatok test, szív, agy és vázizom tömegét;
- Az artériás vérből vett mintán fiziológiai vizsgálatot végzünk;
- Az állatok agy- és izomszövetéből RNS-t és fehérjét izolálunk, majd qPCR és Western-blot analízis segítségével a génkifejeződés különböző szintjein bekövetkező változásokat vizsgáljuk;
- Az izomszövetből továbbá metszeteket készítünk, amelyeken immunfluoreszcens festéssel vizsgáljuk a fehérjék szöveten belüli expressziós mintázatát.

3. Anyagok és Módszerek

3.1. Állatok kezelése

Kísérleteink során 6 hónapos nőtény és hím C57BL/6 egereket használtunk. A kísérletünk során felhasznált állatok állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 22 °C tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és normál rágcsálótáp) voltak tartva. A kísérletek elvégzéséhez a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által jóváhagyott állatkísérleti engedéllyel rendelkezünk (XVI./776/2018).

Kísérletünk során az állatok számára egy moderált intenzitású edzést állítottunk be, amely során az állatok 7 napon keresztül végeztek futópados edzést (1. táblázat). Az állatok a kísérlet első két napján 45 percet futottak max. 0,8 km/h sebességgel, a harmadik napon 55 percet futottak max. 0,9 km/h sebességgel. A negyedik naptól a hetedik napig 60 percen keresztül futottak max. 0,9 km/h sebességgel. A kontroll csoport állatai az ülőéletmód modellezése érdekében nem végeztek futóedzéseket, azonban a testmozgást végző csoporttal egy helyiségben tartottuk őket a futás ideje alatt is.

1. nap		2. nap		3. nap		4. nap		5. nap		6. nap		7. nap	
ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)	ΔT (perc)	v (km/h)
10	0,5	10	0,5	10	0,5	10	0,5	10	0,5	5	0,5	5	0,5
10	0,6	10	0,6	10	0,6	10	0,6	10	0,6	5	0,6	5	0,6
10	0,7	10	0,7	10	0,7	10	0,7	10	0,7	10	0,7	10	0,7
10	0,8 -- 0,6	10	0,8 -- 0,6	10	0,8	10	0,8	10	0,8	10	0,8	10	0,8
5	0,5	5	0,5	10	0,9 -- 0,6	10	0,9	10	0,9	20	0,9	20	0,9
				5	0,5	5	0,8 -- 0,6	5	0,8 -- 0,6	5	0,8 -- 0,6	5	0,8 -- 0,6
						5	0,5	5	0,5	5	0,5	5	0,5

1. táblázat: A kísérletben használt futási protokoll

Az állatokat a hetedik napon a délelőtti futópados edzésüket követően délután munkatársaim terminálták. Isoflurán gázzal történő altatás során egy injekciós tű segítségével a bal kamrából artériás vért vettek, majd az érrendszert 20 ml 1x foszfát-puffer (PBS) perfúziós folyadékkal mosták át. Az állatokból ezt követően vázizom (m. quadriceps femoris) és hippokampusz mintákat gyűjtöttek. A mintákat a későbbi felhasználásuknak megfelelően tároltuk: a bal oldali hippokampusz mintát 4% paraformaldehid oldatban, a kontralaterális hippokampuszt RNA later stabilizáló oldatban -80°C-on tartottuk. Továbbá a bal oldali vázizom mintát OCT-be ágyazva, a jobb oldali vázizom mintát eppendorf csőben szárazjégen lefagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk felhasználásukig. A vérmintát 1 órán keresztül 37°C-on hagytuk kicsapódni, ezt követően 1000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk, és az így kapott mintát -80 °C-on tároltuk.

3.2. Vérvizsgálat

A vér fiziológiai paramétereinek változásának mérésével az állatok testmozgáshoz való adaptációjának mértékét vizsgáltuk. A vérminták analízisét az epoc® vérgáz analizátorral végeztük, vizsgálva a bal kamrából altatás során vett artériás vér pH-ját, vérgáz-, elektrolit- és metabolit értékeit (Siemens Healthcare, Ottawa, Kanada).

3.3. Totál RNS izolálás

3.3.1. Izomszövet

A -80°C-on tárolt vázizom (m. quadriceps femoris) mintákat szárazjégen porítottuk. 20-30 mg porított mintát 300 ml lízis pufferbe helyeztünk, majd egy fecskendő segítségével homogenizáltuk az izomszövetet. Az izomszövet fibrózus tulajdonsága miatt indokolt fehérje emésztési lépés során a már homogenizált lizátumhoz 590 µl RNáz mentes vizet adtunk, majd 10 µl Proteináz K oldat hozzáadása után 55°C-on 10 percen keresztül inkubáltuk az emésztő enzim oldatban a mintákat. Ezt 3 perces centrifugálás (10 000 x g, 15-25°C) követte. A (kb. 900 µl) felülúszót egy tiszta 2 ml-s centrifugacsőbe vittük át, majd a lizátum tisztításához ½ térfogatnyi EtOH-t használtunk. A mintánkból 700 µl-t, egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztünk, RNeasy Mini centrifuga oszlopra mértünk, és ezt 15 másodpercig (8000 x g, szobahőmérséklet) centrifugáltuk, majd megismételtük a minta maradékával is. Az RNeasy Mini centrifuga oszlop membránjának tisztításához az 350 µl RW1 puffert használtunk, és az előző paramétereknek megfelelően centrifugáltunk. Ezt követően 10 µl DNáz I törzssoldatot 70 µl RDD pufferben feloldottunk, a keveréket az RNeasy Mini centrifuga oszlop membránjára mértük és 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után 350 µl RW1 Puffert adtunk a DNáz I oldathoz és 15 másodpercig centrifugáltuk (8000 x g, szobahőmérséklet). A membrán tisztításához a RNeasy Mini centrifuga oszlopot 500 µl RPE pufferrel 15 másodpercig centrifugáltuk (8000 x g, szobahőmérséklet). A mosási lépést megismételtük 2 perc centrifugálási idővel is, hogy a membrán száraz legyen és EtOH-tól teljesen mentes. Az RNeasy Mini centrifuga csövet maximum sebességen 1 percig centrifugáltuk, hogy elimináljuk az oszlopon maradt puffer folyadékot. Ezt követően 50 µl RNáz mentes vizet adtunk közvetlenül a centrifuga oszlop membránjához majd 1 percen keresztül centrifugáltuk (8000 x g) az izolált RNS eluálásához. Az izolált RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométer (Nanodrop ND-1000) segítségével detektáltuk.

3.3.2. *Agyszövet*

A hippocampusz mintákat -80°C-on RNA laterben tároltuk a felhasználásukig. A homogenizálás során a mintákat 500 µl, 1% β-merkaptóetanolt tartalmazó pufferbe tettük. A szövet tömegével megegyező mennyiségű, 0,5 mm-es üveggyöngyök hozzáadása után a mintákat Bullet Blender gép segítségével homogenizáltuk (6-os sebesség, 3 perc, 4°C). A lizátumot NucleoSpin® Filter/oszlop segítségével tisztítottuk, ahova a mintát a felvitele után 1 percig centrifugáltuk (11000 x g, szobahőmérséklet). Az átfiltrált mintához 250 µl 70%-os EtOH-t adtunk majd szuszpendálással segítettük az elkeveredését. A mintákat 2 ml-es centrifugacsőbe helyezett NucleoSpin® RNA oszlopra mértük, ezt 30 másodperc centrifugálás követte (11000 x g, szobahőmérséklet), amely során felkötött a minta nukleinsav tartalma az oszlopra. Az oszlopot 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) pufferrel 1 percen keresztül centrifugáljuk (11000 x g), ezzel elvonjuk a membrántól a sót és szárítjuk azt. A minta DNS tartalmának emésztéséhez használt keverék 10 µl rDNáz és 90 µl reakció puffert tartalmazott, ebből 95 µl-t közvetlenül az oszlop membránjára mértünk és 15 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt három mosási lépés követte, először 200 µl RA2 puffert centrifugáltunk (30 mp, 11000 x g) át a mintán, amellyel inaktiváltuk a DNázok működését. Második lépés során 600 µl RA3 puffert centrifugáltunk (30 mp, 11000 x g) át a membránon. Az utolsó mosási lépés során 250 µl RA3 puffert centrifugáltunk (2 perc, 11000 x g) át a membránon. Az izolált totál RNS eluálásához 60 µl RNáz mentes vizet használtunk a centrifugáláshoz (11000 x g). A minta RNS koncentrációjának ellenőrzéséhez fotometriás módszert (Nanodrop) alkalmaztunk.

3.4. **Génexpresszió vizsgálat**

A hősokkfehérje és a miokin gének aktivitását valós idejű kvantitatív reverz transzkriptáz- polimeráz láncreakció (qRT-PCR, qPCR) analízissel határoztuk meg. A vizsgált szövetekből izolált RNS molekulákat reverz transzkripcióval cDNS-é írtuk át majd ezek segítségével qPCR vizsgálatot végeztünk.

3.4.1. *Reverz transzkripció*

A qPCR vizsgálatokhoz kijelölt mRNS mintákat High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem) segítségével írtuk át cDNS-é. A reverz transzkripcióhoz szükséges reakcióelegy 1 µg RNS-t (15 µl), 1,5 µl reverz transzkriptázt, 3 µl primert, 1,2 µl dNTP-t, 3 µl puffert és 6,3 µl RNáz mentes vizet tartalmazott. A qPCR reakcióhoz felhasznált protokoll: inkubáció: 25°C-on 10 perc, reverz transzkripció: 37°C-on 2 óra, inaktiváció: 85°C-on 5 perc.

3.4.2. PCR analízis

Az előzőleg átirrt cDNS termékeket a qPCR reakcióhoz hússzorosára hígítottuk. A qPCR reakcióelegy 9 µl cDNS-t, 1 µl primert és 10 µl Power Syber Green PCR Master mix enzim keveréket tartalmazott és egér *glicerinaldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz* (*Gapdh*) gént használtunk belső kontrollként vizsgálataink során. A PCR reakciókat RotorGene 3000 instrument (Corbett Research) gép segítségével hajtottuk végre. A PCR program 39 ciklusból állt, amely során a következő lépések követték egymást: UDG inkubáció: 50°C-on 2 percig, denaturáció: 95 °C-on 2 percig, denaturáció: 95 °C-on 15 másodpercig, annealing: 60 °C-on 45 másodpercig. A qPCR analízishez felhasznált primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

	Gén	Forward primer	Reverz primer
1	<i>Gapdh</i>	GGGTTTCCTATAAATACGGACTGC	CCATTTTGTCTACGGGACGA
2	<i>Hsp25</i>	ATCCCCTGAGGGCACACTTA	GGAATGGTGATCTCCGCTGAC
3	<i>Hsp70</i>	GAGATCGACTCTCTGTTCGAGG	GCCCGTTGAAGAAGTCCTG
4	<i>Cryab</i>	GTTCTTCGGAGAGCACCTGTT	GAGAGTCCGGTGTCAATCCAG
5	<i>Hspb8</i>	AGA CCC CTT TCG GGA CTC A	GGC TGT CAA GTC GTC TGG AA
6	<i>Erfe</i>	TCCTCTATCTACAGGCAGGACA	GAAGTGAGAGCCACTGCGTA
7	<i>Fndc5</i>	TTGCCATCTCTCAGCAGAAGA	GGCCTGCACATGGACGATA
8	<i>Ctsb</i>	ATTCACACCAATGGCCGAGT	TAGCCACCATTACAGCCGTC
9	<i>Il-6</i>	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
10	<i>Il-1</i>	GCAACTGTTTCCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
11	<i>Tnf</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
12	<i>Cd68</i>	GACCTACATCAGAGCCCGAGT	CGCCATGAATGTCCACTG
13	<i>Bip</i>	TTCAGCCAATTATCAGCAAACCTCT	TTTTCTGATGTATCCTCTTCACCAGT
14	<i>Iba1</i>	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	CAGCATTTCGCTTCAAGGACATA
15	<i>Gfap</i>	CGGAGACGCATCACCTCTG	AGGGAGTGGAGGAGTCATTCCG
16	<i>Bdnf</i>	GCATCTGTTGGGGAGACAAG	TCACCTGGTGGAACATTGTG
17	<i>Dcx</i>	CATTTTGACGAACGAGACAAAGC	TGGAAGTCCATTATCCGTGA

2. táblázat: A qPCR reakció során használt primerek szekvenciái

3.5. Immunhisztokémia

3.5.1. Metszetek készítése

A vázizom mintákon a fehérje expressziós mintázatok megvizsgálásának érdekében fluoreszcens immunhisztokémiai festést végeztünk. Az OCT-be ágyazott izommintákból fagyasztó mikrotóm segítségével -20°C-on 10 µm-es metszeteket készítettünk. A metszeteket hordozó tárgylemezeket festőkádba állítottuk, ahol 10%-os formaldehidben fixáltuk azt 20

percen keresztül. Ezt követően a tárgylemezeket desztillált vízben mostuk és elszívófülke alatt szárítottuk.

3.5.2. Immunhisztokémiai festés

Az eljárás első napján a tárgylemezen a mintákat ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen H-4000 hidrofób tollal körbejelöltük. Ezután háromszor 5 percen keresztül, rázatón, 1x PBS-ben mostuk a metszeteket. Ezt háromszor 10 perc 1x PBS-el történő mosás követte, ezt követően 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, rázatón blokkoltunk. A blokkoló oldat 24 ml 1x PBS-t, 72 mg (0,3%) szarvasmarha szérumalbumint (BSA), és 0,2% Triton X-100-at tartalmazott. Ezt ismét háromszor 10 perc 1x PBS-ben való mosás követte rázatón, szobahőmérsékleten, majd 4°C-on egész éjszakán át inkubáltuk blokkoló oldatban feloldott elsődleges ellenanyagban a mintáinkat (100 µl/minta). Az elsődleges ellenanyaghoz (1:1000 hígítás) 30 mg BSA-t és 10 ml PBS-t használtunk, majd ebből az oldatból 1,5 ml-t elegyítettünk össze 3 µl ellenanyaggal (anti-HSP25 (ADI-SPA-801; Enzo Life Sciences), anti-HSP70 (ADI-SPA-810; Enzo Life Sciences)).

Az immunhisztokémia festés második napján ismét háromszor 10 perc 1x PBS-ben történő mosással kezdtünk, majd BSA-t tartalmazó PBS-ben oldott másodlagos ellenanyag (Alexa Fluor™ 594 konjugáltatott anti-nyúl; Alexa Fluor™ 488 konjugáltatott anti-egér) (hígítás 1:1000) rámerését követően szobahőmérsékleten, rázatón, lefedve inkubáltuk két órán keresztül a mintáinkat. Ezt ismét háromszor 1x PBS-ben történő mosás követte szobahőmérsékleten és rázatón. A sejtmagok megfestéséhez 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) festéket használtunk, amelyet PBS-ben hígítottunk 1:1000 arányban és 10 percen keresztül inkubáltuk a mintákon. Ezt a háromszor 10 perc 1x PBS-ben történő mosási ciklus követte, majd a mintát fénytől elzárva, szabad levegőn hagytuk megszáradni. A száraz mintákat fedőlemezzel lefedtük, és azt confocal matrix segítségével fixáltuk.

3.6. Fehérje izolálás

-80°C-on tárolt m. quadriceps femoris vázizom mintánkból fehérjét izoláltunk a Western-blot analízishez, a folyamat során végig jégen dolgoztunk, a mintánk megfelelő állapotban tartásának érdekében. Az izommintákból 30 mg-ot használtunk fel állatonként, csoportonként 6 állatból származó mintát egyesítettünk. Az így összesen 180 mg egyesített izommintákat 300 µl 1x RIPA és proteáz enzim inhibitor koktél keverékével Potter-Elvehjem eszközzel homogenizáltuk. Ehhez további 300 µl 1X RIPA és proteáz inhibitor mix-et adtunk majd 4°C-on 1400 rpm-en ráztunk 1 órán keresztül. Ezt követően 4 °C-on 15000 rpm

centrifugáltuk 10 percen át, majd a fehérjét tartalmazó felülúszóból 250-300 µl-t nyertünk ki. A kinyert minták totál fehérje koncentrációját Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) alkalmazásával határoztuk meg, gyártói ajánlás alapján.

3.7. Western blot analízis

A kezelés hatására a fehérje szinten létrejövő változások vizsgálatához Western-blot analízist használtunk.

SDS-poliakrilamid gélelektorforézis: A fehérjék elválasztásához használt gél egy 5%-os stacking és egy 12%-os szeparáló részből állt. Egy 12%-os szeparáló gél elkészítéséhez 1600 µl UP vizet, 1300 µl 1.5 M Tris-HCl-t (pH 8.8), 50 µl 10%-os SDS-t, 2 µl TEMED-et és 2000 µl 30%-os poliakrilamidot használtunk fel. Ebből 3,5 ml-t mértünk a két üveglap közé, a tetejére 200 µl butanolt öntöttünk, majd 40 percen keresztül hagytuk polimerizálódni. Ezt követően UP víz segítségével kimostuk a butanolt, és a stacking gélből 1 ml-t rétegeztünk a polimerizálódott szeparáló gél tetejére. Egy 5%-os stacking gél 1400 µl H₂O, 250 µl 1.5M Tris-HCl (pH8.8), 20 µl 10%-os SDS, 2 µl TEMED és 330 µl 30% poliakrilamid elegyítéséből állt. A stacking gélbe belehelyeztük a zsebek kialakításához szükséges „fésűt”, majd 40 percen keresztül hagytuk polimerizálódni.

Futtatás/loading: A gélen zsebenként 10 µl mintát futtatunk kb. 1 órán keresztül, 150 mV-on. Molekulásúly markerként PeqGold protein markert használtunk.

Blottolás: Ezt követően a gél blottoló pufferben 15 percen keresztül billegő rázógépen mostuk. A használt blottoló puffer Schafer-Nielsen puffer 20% MeOH-val kiegészítve, ami így 5,82 g Tris-base-t, 2,93 g glicint, 500 ml desztillált vizet és 200 ml MeOH-t tartalmazott, melyet 1000 ml-re egészítettünk ki desztillált vízzel. Ez alatt a polivinilidén-fluorid (PVDF) membránt az aktiválásához 10-20 mp-re metanolba helyeztük, majd 1-2 percre UP vízben helyeztük és végül 2-3 percen keresztül a blottoló pufferben billegtetve átmostuk. Blottoló tankba rétegeztük a gél és aktivált membránt, amelyeket a blottoló folyadékkal nedvesen tartottunk, majd 15 V feszültségen 30 percig blottoltuk a membránt.

Blokkolás: Az aspecifikus kötődések elkerülésének érdekében a membránt 5%-os tejporos oldatban 1 órán keresztül rázaton blokkoltuk.

Jelölés: Ezt követően háromszor 0,1% Tween-20-al kiegészített Tris-puffer sóoldatban (TTBS) rázaton mostuk a membránokat, amelyekre ráhelyeztük az elsődleges antitesteket (3. táblázat), majd egész éjszakán át 4°C-on inkubáltuk.

A protokoll második napján az membránokról leöntöttük az elsődleges ellenanyagot, majd háromszor mostuk TTBS segítségével. A másodlagos ellenanyagokat (3. táblázat) 3%-os

tejporos oldatban 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákon szobahőn. A belső kontrollnak használt GAPDH ellen termeltetett elsődleges és másodlagos antitesteket is csak 1-1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten.

Előhívás: A jelölt membránokat Pierce ECL Western Blotting Substrate 1:1 arányú elegyével 1 percen keresztül inkubáltuk, majd nagyfelbontású kamera segítségével detektáltuk. Utolsó lépésben Coomassie Brilliant Blue festékkel megfestettük a membránokat, amelyeket fényképező segítségével digitalizáltuk.

A Western-blot analízist kétszer megismételtük, a kapott denzitometriás adatok kiértékeléséhez az Image Lab 6.0.1. (© 2017 Bio-Rad Laboratories, Inc) szoftver használtuk.

	Elsődleges ellenanyag		Másodlagos ellenanyag	
	cikkszám (gyártó)	hígítás	cikkszám (gyártó)	hígítás
HSP70	ADI-SPA-810 (Enzo Life Sciences)	1:8000	A3682 anti-Mouse IgG (Merck)	1:40000
HSP25	ADI-SPA-801 (Enzo Life Sciences)	1:2000		1:100000
αB-crystallin	ADI-SPA-223 (Enzo Life Sciences)	1:1000	A9169 anti-rabbit IgG (Merck)	1:60000
GAPDH	G9545 (Merck)	1:15000		1:85000

3. táblázat: A Western-blot analízis során alkalmazott elsődleges és másodlagos ellenanyagok adatai.

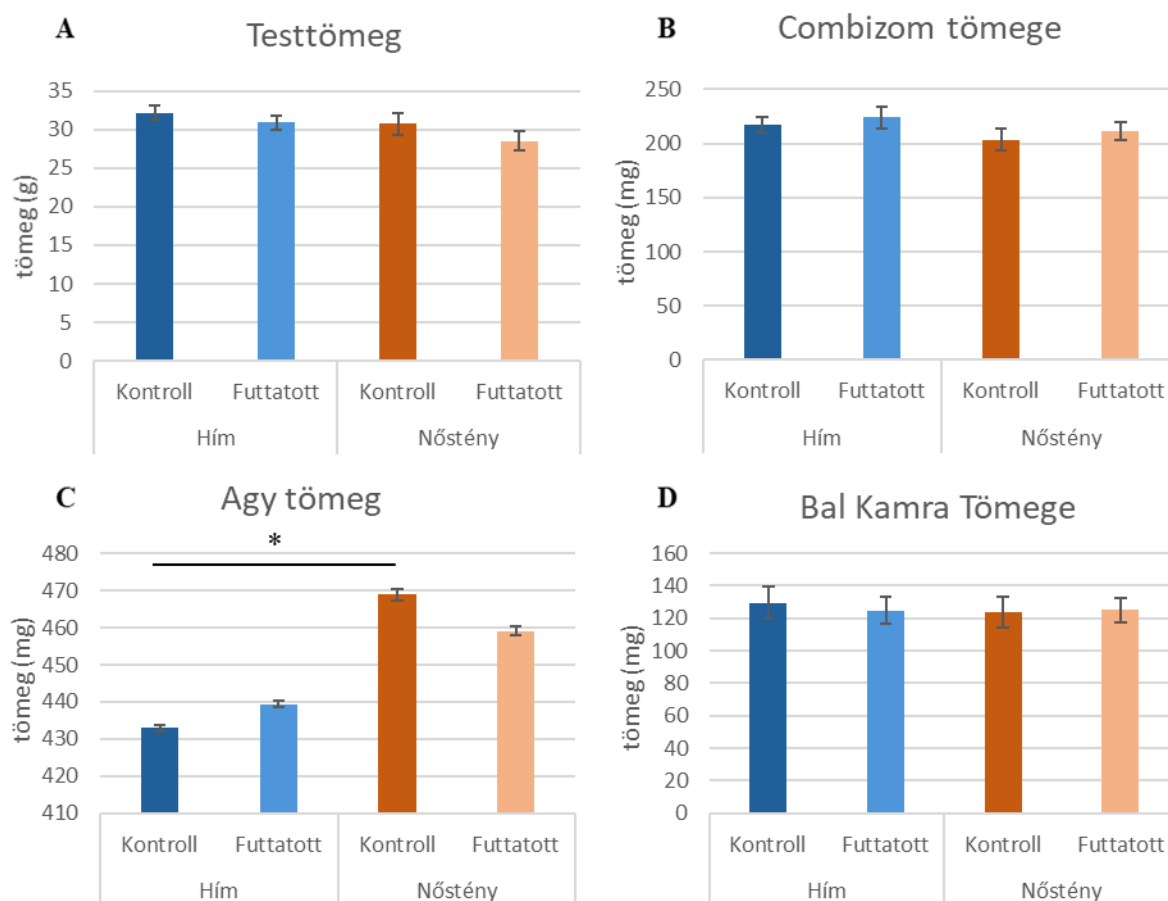
3.8. Statisztikai analízis

A vizsgálataink kiértékeléséhez a Sigmaplot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) programot használtuk. A statisztikailag szignifikáns szintet $p < 0.05$ határoztuk meg, az értékeket átlag $\pm$ SEM-ként adtuk meg. A vérvizsgálat, testtömeg változás és a szervek tömegének kiértékeléséhez két-utas ANOVA tesztet használtunk, a qPCR és Western-blot analízis eredményeinek statisztikai elemzéséhez pedig T-próbát alkalmaztunk. Szignifikáns eredmények esetén Holm-Sidak post hoc tesztet alkalmaztunk az ANOVA teszt után.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Állatok test-, és szervtömegének változása

A moderált testedzés molekuláris szintű hatásainak és a nemek között megmutatkozó különbségek megfigyeléséhez vad típusú nőstény és hím C57BL/6 egerek egy héten keresztül futópados edzést végeztek. A kontroll csoport alacsony aktivitáson tartott nőstény és hím C57BL/6 egerekből állt. Az állatok testtömegét terminálásukat megelőzően, az egyes szerveik, mint a m. quadriceps femoris, az agy és a szív tömegét pedig azt követően mértük meg az esetleges különbségek megfigyelésének érdekében. A testmozgás hatására nem következett be statisztikailag szignifikáns változás sem az állatok szerveit, sem a testsúlyukat illetően. Azonban a csoportunk által már korábban észrevett tendencia, ami szerint a nőstény egerek agya szignifikánsan nagyobb tömegű, mint a hím egereké, ebben az esetben is megfigyelhető volt (2. ábra).

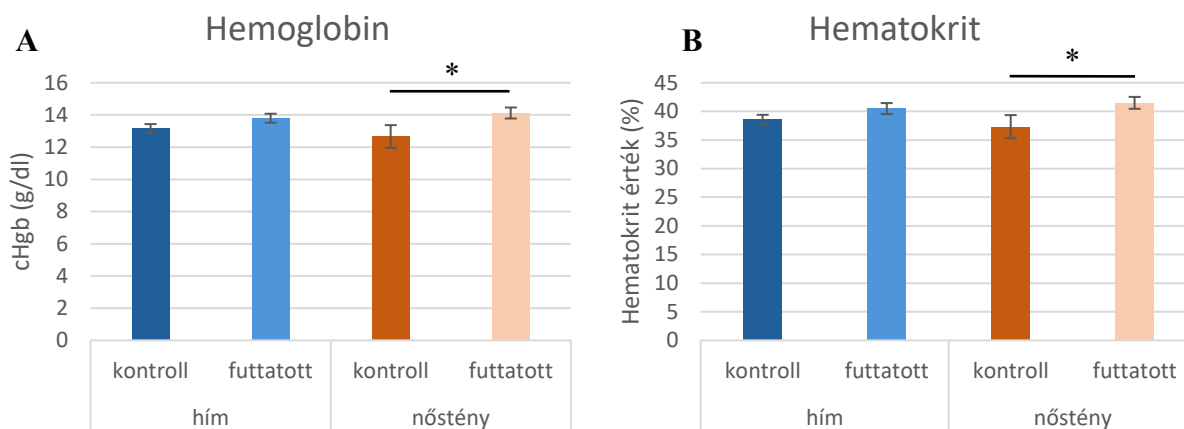


2. ábra: Szerv- és testtömeg változás 1 hét futást követően

A diagrammon a kontroll és a testedzést végző egerek test- (A), vázizom (m. quadriceps femoris) (B), agy (C) és bal kamra (D) tömegeinek átlaga $\pm$ SEM értékei láthatóak. Két-utas ANOVA teszt, Szignifikancia: $*p < 0,05$, egyedszám/csoport: $n=6$, össz. egyedszám: $n=24$.

4.2. Vérvizsgálati eredmények

A bal kamrából vett artériás vérminták eredményei alapján az állatok fiziológiás változásait, vagyis az állatok testmozgáshoz való adaptációjának mértékét vizsgáltuk. A hematokrit és a hemoglobin érték a futást követően mind két nem esetében növekedést mutatott, azonban csak a nőstények esetében érte el a statisztikailag releváns szintet (3. ábra).



3. ábra: A vér hemoglobin és hematokrit értékei egy hét testmozgást követően

Az állatok vérparamétereit véranalizátor segítségével az utolsó edzést követően megmértük. Szignifikáns növekedést a testmozgást végző nőstények hemoglobin (A) és hematokrit (B) értékei mutattak a kontroll csoporthoz képest. A diagram a csoport átlag $\pm$ SEM értékeit mutatja. Két-utas ANOVA teszt, szignifikancia szint: * $p < 0,05$, egyedszám/csoport: $n=6$, össz. egyedszám: $n=24$

A szakirodalmi adatok azt mutatják, hogy a hematokrit érték, vagyis a vér sejtessége aránya a teljes vértérfogathoz képest megemelkedik fizikai aktivitás során. Ugyanis testmozgás közben a fokozott verejtékezésnek, levegővételeknek és ozmotikusan aktív anyagok extracelluláris térben való felhalmozódásának köszönhetően a vérplazma víz tartalma jelentősen lecsökken (Costill és mtsai. 1974). Az általunk használt modell állatokra azonban a verejtékezés és a lihegés nem jellemző (Gordon, 2012), ezért valószínűleg a vérplazma folyadéktartalmának csökkenése csak részben járult hozzá a megemelkedett hematokrit értékhez. Számos kutatásban a teljes vértérfogat és a plazmatérfogat közvetlenül edzést követően már emelkedést mutatott. A vörösvértest szintjében csak napokkal később következett be növekedés, emiatt a hematokrit értékben az edzési periódus elején kisebb csökkenést mutatott és csak pár nappal később, a vörösvértestek adaptációja hatására kezdett el emelkedni, amely később egy új steady-state szintben állapodott meg (Sawka és mtsai. 2000).

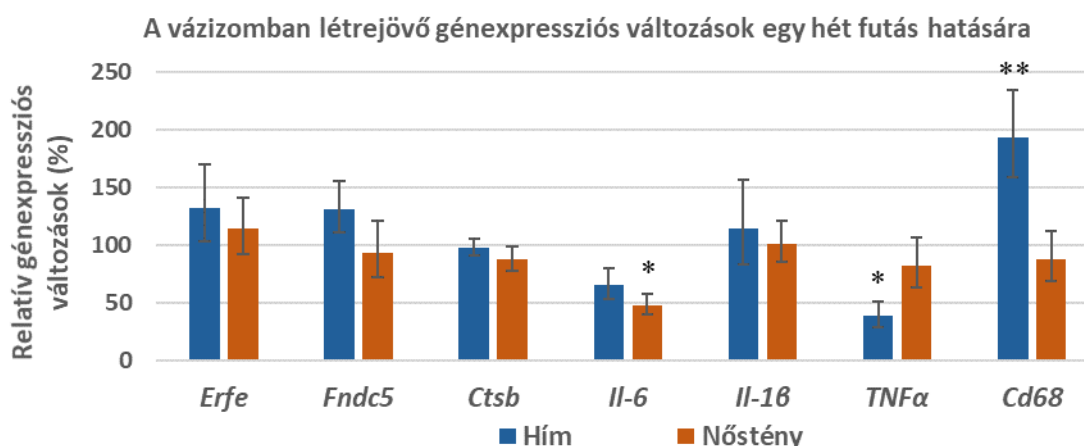
Ezen szakirodalmi adatokkal összevetve eredményeinket azt mondhatjuk, hogy a nőtények hatékonyabban és gyorsabban kezdtek el alkalmazkodni az adott edzéstípushoz és intenzitáshoz, amelyet a megnövekedett hematokrit és hemoglobin szint is mutat, mint a hím egerek, amelyek számára kevésbé volt adaptív ez a fajta edzéstípus és intenzitás.

4.3. Vázizomszövet vizsgálati eredmények

4.3.1. qPCR

Feltételeztük, hogy a testmozgás kognitív funkcióra kifejtett hatását részben a vázizomszövetből kontrakció hatására felszabaduló miokinek közvetíthetik. Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk ezen faktorok testmozgásra adott válaszát, az állatok m. quadriceps femorisából vett mintáinkon kvantitatív valós idejű PCR analízist végeztünk, amely során többek között a mionektint kódoló *Erfe*, az irisin membránkötött propeptidjét kódoló *Fndc5* és a chathepsin b fehérjét kódoló *Ctsb* géneket vizsgáltuk.

Érdekes módon, egy hetes futást követően az állatok vázizomszövetében nem találtunk szignifikáns növekedést miokinek génexpresszióját illetően (4. ábra). Mivel egy korábbi kísérletünkben három nap edzést követően az *Erfe* gén szintjében növekedést tapasztaltunk, elképzelhetőnek tartjuk, hogy az állatok az egy hetes edzési periódus végére adaptálódtak annyira testmozgáshoz, hogy nem láthatunk génexpressziós szinten eltérést. Ugyanakkor fehérje szinten még lehetnek különbségek a csoportok közt. Ennek a felderítéséhez további, fehérje szintű vizsgálatok szükségesek.

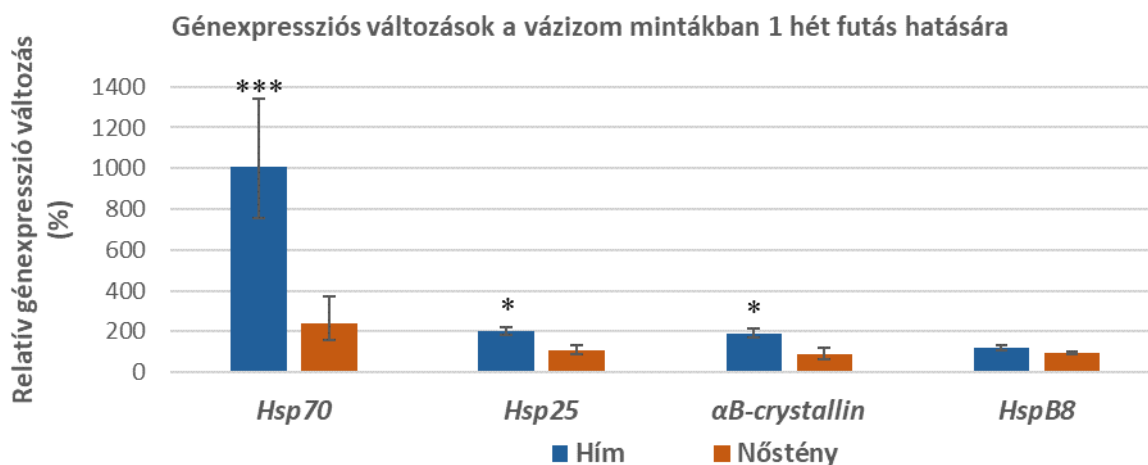


4. ábra: A miokinek és gyulladásos faktorok génexpressziójának relatív változásának vizsgálata qPCR analízissel

Az oszlopdiagrammokon a vázizomban (m. quadriceps femoris) futás hatására bekövetkező relatív génexpressziós változásokat ábrázoltuk százalékban kifejezve (%), ahol kontroll állatok értéke =100%. A diagrammon a csoportok átlag $\pm$ SEM értékeit láthatóak. Szignifikancia szint: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; egyedszám/csoport: $n=6$; össz. egyedszám: $n=24$

Azonban az *Il-6* citokin génexpressziójában szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a futóedzést végző nőtények vázizomszövetében a kontroll állatokhoz képest. Habár a testedzés aktiválja az *Il-6* gén expresszióját az izomban (Keller és mtsai. 2001) és fehérje szintje is exponenciális növekedést mutat, edzés végeztével ezt gyors csökkenés követheti, amely szakirodalmi adat a mi eredményeinkre is magyarázatul szolgálhat (Steenberg és mtsai 2000). Az interleukin-6 alapvetően pro-inflammatórikus citokinként van számontartva, ellenben az izomból felszabaduló formájának olyan anti-inflammatórikus hatásokat tulajdonítanak, mint a TNF α pro-inflammatórikus citokin termelődésének gátlása (Benatti és Pedersen 2015). A testmozgást végző hímek esetében megfigyeltük a *Tnfa* génexpressziós szintjének szignifikáns csökkenését. Amennyiben azt feltételezzük, hogy az IL-6 szintje ténylegesen megemelkedett a futóedzés alatt, amely szakirodalom szerint gátló hatással bír a *Tnfa* kifejeződésére, akkor ez a változás potenciális magyarázatként szolgálhat a *Tnfa* génexpressziós szintjében megfigyelt csökkenésére (4. ábra).

Az esetleges gyulladás monitorozásának érdekében a *Cd68* makrofág marker génexpressziós szintjét is megvizsgáltuk. A nőtények esetében nem találtunk változást a kontroll csoporthoz képest. Ezzel szemben a testmozgást végző hím állatok vázizom szövetében közel kétszeres növekedést tapasztaltunk, amely utalhat a testmozgás által kiváltott szöveti sérülés hatására kialakuló makrofág infiltrációra (4. ábra).



5. ábra: A hősokkfehérjék génexpressziójában bekövetkező relatív változások vizsgálata qPCR technikával

A vázizomszövetben a hősokkfehérjék génexpressziójának változásait qPCR-al azonosítottuk. A kontroll csoporthoz képest létrejövő relatív génexpressziós különbségeket százalékban fejeztük ki (kontroll csoport = 100%). A csoportok átlag $\pm$ SEM értékeit ábráztuk. Szignifikancia szint: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; egyedszám/csoport: $n=6$, össz. egyedszám: $n=24$

A fizikai aktivitás hatására kialakuló sejtszintű stresszválasz megfigyeléséhez a hősokkfehérjék expressziós szintjében bekövetkező változásokat vizsgáltuk (5. ábra). A kismolsúlyú hősokkfehérjék közül a *Hspb8*, *Hsp25*, és az α B-crystallin-t kódoló *Cryab* gének, a HSPA családból pedig a *Hsp70* gén transzkripció aktivitását követtük nyomon (5. ábra). A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a HSPB családba tartozó fehérjék közül mind a *Hsp25*, mind *Cryab* gén expressziója szignifikánsan megnövekedett a futóedzést végző hímek vázizom mintájában a kontroll csoport értékéhez képest, míg a nőstények esetében nem figyelhettünk meg ilyen változást. A testmozgásra válaszul a *Hsp70* gén expressziójában pedig több mint tízszeres emelkedést tapasztaltunk a hím állatok esetében a kontroll csoporthoz képest, míg a nőstényekben megfigyelhető kisebb mértékű emelkedés nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet.

A makrofág marker és a stresszfehérje gének expressziójának nagyobb mértékű növekedése a hím állatok izomszövetében akár futás hatására kialakuló szöveti sérülésre is utalhat, szemben a nőstényekben megfigyelhető kisebb mértékű változásokkal. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a kísérletünkben használt típusú és intenzitású testmozgás a hímek számára nagyobb megerőltetéssel járt, mint a nőstények esetében.

4.3.2. Western-blot vázizomszövet

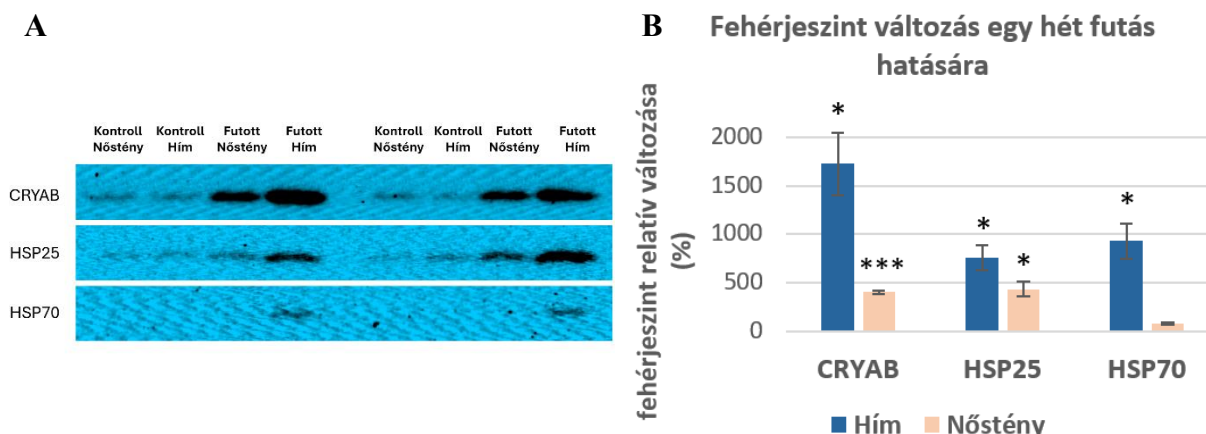
A génexpresszióban megfigyelt változások megerősítésének érdekében Western-blot analízist végeztünk. Vizsgálataink során elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a hím állatok izomszövetében a HSP-ket kódoló gének expressziójában megfigyelt emelkedést fehérje szinten milyen változások kísérnek.

A western-blot előhívás során készült képeken (6. ábra) jól látható, hogy a HSPB családba tartozó konstitutívan termelődő HSP25 és α B-crystallin (CRYAB) esetében a génexpresszióban mért növekedést a fehérjék kifejeződésében is megfigyelhetjük. A hím állatok mintáin végzett vizsgálatok során a CRYAB fehérje szintjében jelentős, tizenhétszeres, a HSP25 szintjében hét és félszeres növekedést figyeltünk meg a testmozgást végző állatok mintáiban a kontrollcsoportéhoz képest, amely a génexpresszióban megfigyelt változásokhoz képest jóval nagyobb mértékű. A nőstények mintáiban míg génexpressziós szinten nem tapasztaltunk szignifikáns növekedést, addig a fehérjék vizsgálatakor mind a CRYAB, mind a HSP25 szintje kb. négyszeresére emelkedett, amely növekedés statisztikailag szignifikánsnak bizonyult.

A vázizomszövetben a konstitutívan nem, csak stressz hatására expresszálódó HSP70 fehérje szintjében csak a hím állatok mintáiban mértünk növekedést, amely a *Hsp70*

génexpressziójában látott növekedéshez hasonlóan itt is közel tízszeresére emelkedett. A HSP70 szintje a testmozgást végző nőstény, és kontroll állatok mintáiban elhanyagolható.

A testmozgás hatására bekövetkező génexpressziós változásokban megfigyelt nemi különbségeket fehérje szinten is igazoltuk, amely megerősíti a feltételezést, hogy a hím egerek szervezetére a végzett testmozgás intenzitása sokkal nagyobb stresszt gyakorolt, mint a nőstényekére.

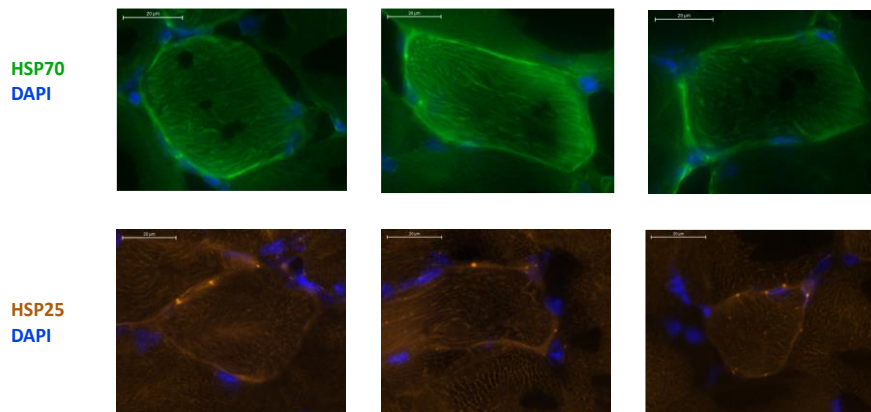


6. ábra: Az α B-CRYSYALLIN, HSP25 és HSP70 fehérjék vizsgálata Western-blot módszerrel

A digitalizált membránképen kontroll nőstények és hímek, illetve a futott nőstények és hímek vázizomszövet mintáiból izolált fehérjék láthatóak (A). A diagrammon (B) a denzitometriás kiértékelés eredményei láthatóak, amely a kontroll csoporthoz képest (=100%) testmozgás hatására bekövetkező relatív különbségeket százalékban (%) kifejezett átlag $\pm$ SEM értékeit ábrázolja. Szignifikancia szint: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; egyedszám/csoport: n=6; össz. egyedszám: n=24

4.3.3. Immunhisztokémiai festés

A hím egerek vázizomszövetében fokozottan termelődő HSP25 és HSP70 fehérjék sejten belüli lokalizációját is megvizsgáltuk fluoreszcens immunhisztokémiai festés segítségével (7. ábra). Ennek eredményeképpen láthattuk, hogy a két fehérje eltérő lokalizációval rendelkezik az izomsejteken belül, azonban a sejtmembrán körül mindkettő jelenléte megfigyelhető. A HSP70 fehérje lokalizációja a vázizomsejtekben főként a sejthártya és a citoszkeleton körül koncentrált. Eközben a HSP25 olyan pont-szerű elrendeződést mutatott, amely leginkább sejtmagok környékén és a sejtek határán volt megfigyelhető, de jelenléte citoplazma területén is detektálható.



7. ábra: a hsp25 és a hsp70 expressziós mintázata vázizomszövetben

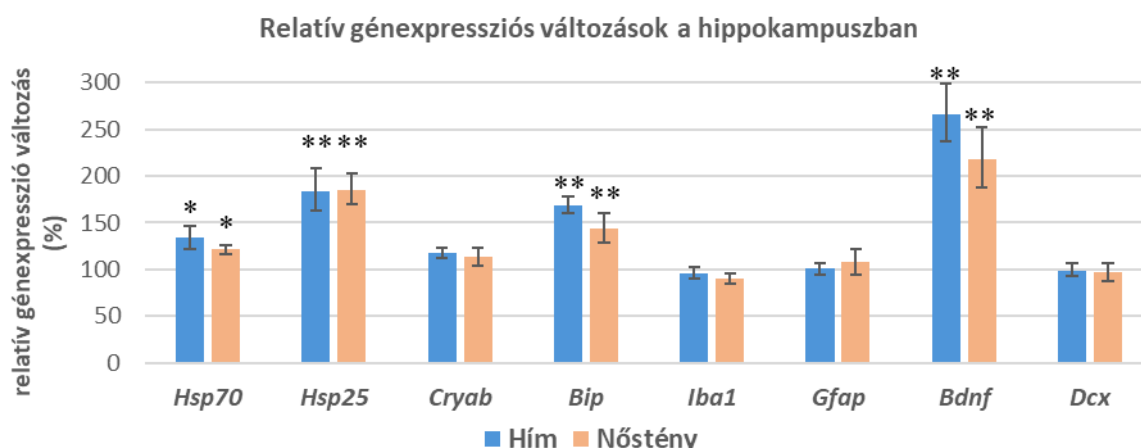
A hősokkfehérjék vázizomsejten belüli lokalizációjának megfigyelésének érdekében fluoreszcens immunhisztokémiai festést alkalmaztunk hím állatok m. quadriceps femoris mintáin 1 hét futást követően. A HSP70 fehérje zölddel, a HSP25 narancssárgával a sejtmagok pedig kékkel jelölten láthatóak.

Megfigyelésünket magyarázhatja, hogy a sejt védelmének érdekében stressz hatására a HSPB családba tartozó fehérjék jellemzően a sejtmembrán, a citoplazma illetve a nukleusz közelébe transzlokálódnak (McClaren & Isseroff, 1994; Sun & MacRae, 2005). A HSP70 pedig a citoszkeletont alkotó mikrotubulusokhoz és intermedier filamentumokhoz való kötődésével, illetve a sejtmembránt stabilizáló funkciói révén támogatja a sejt túlélését stressz körülmények között (Balogi és mtsai., 2019; Liang & MacRae, 1997).

4.4. Agyszövet vizsgálati eredmények

A testmozgás kognitív funkciókra kifejtett pozitív hatásainak felderítéséhez az egy hét futás hatására bekövetkező génexpressziós változásokat a hippocampusz területén is megvizsgáltuk qPCR analízis segítségével. Szakirodalmi adatok a futás hatására memória funkciókban létrejött fejlődést a *Bdnf* kifejeződésének fokozódásával hozzák párhuzamba, amely expresszióját a vázizomból felszabaduló miokinek is aktiválhatják különböző jelátviteli utakon keresztül (Pedersen, 2019).

Az állatok agyszövetén elvégzett qPCR tesztek során glia aktivációs markerek közül az ionizált kalcium-kötő adaptor molekula 1-t (*Iba1*) és a gliális fibrilláris savas fehérjét (*Gfap*) kódoló gének, a neurogenesis karakterizálásához pedig a *doublecortin* (*Dcx*) gén kifejeződését vizsgáltuk. Továbbá kíváncsiak voltunk a neurotróf faktorokat kódoló gének közül a *Bdnf* expressziójában létrejövő változásokra, mivel a vázizomszövet mintákban nem tapasztaltunk növekedést a miokinek génexpresszióját illetően. Eredményeink azt mutatják, hogy a testmozgásra válaszul a *Bdnf* expressziója szignifikánsan megnövekedett a hippocampusban a kontroll csoporthoz képest, és ezt a változást mind a két nemből egyaránt megfigyelhettük.



8. ábra: Relatív génexpresszió változás a hippocampusz területén

A hippocampusz mintákon qPCR segítségével a relatív génexpressziós változásokat vizsgáltuk. Az eredményeinket százalékban kifejezve ábráztuk, ahol kontroll állatok értéke = 100 %. A diagrammon a csoportok átlag $\pm$ SEM értékeit ábráztuk. Szignifikancia szint: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, egyedszám/csoport: $n=6$, össz. egyedszám: $n=24$

Ezenfelül a *Hsp*-k génexpressziós aktivitásának változásaira is kíváncsiak voltunk, ugyanis a proteinhomeosztázis fenntartásával fontos szerepet játszhatnak az agy egészségének kialakításában és megőrzésében, így csökkentve a neurodegeneratív betegségek kialakulásának valószínűségét (Tóth és mtsai., 2015). Kísérletünk során a *Hsp70*, *Hsp25*, *Cryab* és glükóz szabályozott protein 78 fehérjét kódoló *Bip* gének transzkripció aktivitás változására voltunk kíváncsiak. Egy hét futás hatására csak a HSPB családba tartozó *Hsp25* gén expressziójának növekedése érte el a statisztikailag relevánsnak tekinthető szintet, ezt a növekedést mind hímek mint nőstények esetében megfigyelhetjük.

Feltételezhető tehát, hogy a hippocampusz mintákban megfigyelt génexpressziós aktivitás növekedés a BDNF és a HSP25 fehérjét kódoló gének esetén hozzájárulhat azokhoz a jótékony hatásokhoz, amelyet a testmozgás gyakorol a kognitív funkciókra.

5. Összefoglalás

Csoportunk korábbi kísérlete során megfigyelte, hogy a rendszeres testmozgást végző nőstény egerek térbeli memória funkciói szignifikáns javulást mutattak a futóedzést nem végző kontroll csoporthoz képest, míg hím állatokban nem fedeztek fel ilyen jellegű változást. Munkánk során e jelenség magyarázatául szolgáló molekuláris folyamatok felderítését tűztük ki célul. Egyrészt kíváncsiak voltunk arra, hogy a kognitív funkciókban tapasztalt javulás milyen molekulák közvetítésével jött létre a testmozgást végző egerekben. Másrészt a nemek közt megfigyelt különbség háttérében álló folyamatokat szeretnénk volna feltárni. A kérdések megválaszolásának érdekében hím és nőstény C57BL/6 egerek moderált intenzitású futópados edzést végeztek egy héten keresztül. A kontroll csoport állatai nem végeztek semmilyen típusú kényszerített testmozgást.

A korábbiakban ismertetett edzési protokoll befejezését követően feljegyeztük az állatok test-, illetve egyes szerveinek tömegét, amelyekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást a futás hatására. Az edzés hatására bekövetkező fiziológiai változásokat vérvizsgálati tesztekkel is megvizsgáltuk. A testmozgást végző nőstény egerek megnövekedett hematokrit és hemoglobin értékeiből arra következtethetünk, hogy a nőstény állatok hatékonyabban alkalmazkodtak az adott edzés típushoz.

Annak érdekében, hogy a génkifejeződés különböző szintjein edzés hatására létrejött változásokat megvizsgáljuk, az állatok terminálását követően eltávolított m. quadriceps femoris és hippokampusz mintákból totálRNS-t és fehérjét izoláltunk. Szakirodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy legalább részben, a miokinek és a hősokkfehérjék állnak a megfigyelt pozitív hatások mögött, ezért főként ezen molekulacsoportok génexpressziós változásait vizsgáltuk qPCR analízis segítségével. Várakozásainkkal ellentétben a testmozgást végző állatok vázizom mintáin végzett vizsgálatok során nem találtunk növekedést a vizsgált miokinek génexpressziójának aktivitásában. Feltételezzük, hogy az állatok egy hét alatt adaptálódtak az edzés intenzitásához, ami következtében ekkora a miokinek expresszáldásának mértéke is lecsökkent. Azonban a hippokampusz mintákon végzett vizsgálataink azt mutatják, hogy testmozgás hatására mind a két nemből egyaránt megemelkedik a *Hsp25* és *Bdnf* gének transzkripció aktivitása. Ezen molekulák fokozott jelenléte a hippokampusz területén, neuroprotektív és szinaptikus plaszticitást támogató tulajdonságaiknak köszönhetően, hozzájárulhat a memória funkciók javulásához (Tóth és mtsai., 2013; Vaynman, Ying, & Gomez-Pinilla, 2004). Egy másik kutatás során hasonló kísérleti felállásban, 5 nap önkéntes testmozgást követően Sprague-Dawley patkányok térbeli memória funkcióiban megfigyelt

javulással együtt a hippocampális *Bdnf* mRNS szintjének növekedését is detektálták. Ez a tanulmány az első közvetlen bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy a testmozgás a BDNF szintjének fokozásával is hozzájárul a kognitív funkciók javulásához (Vaynman, Ying, & Gomez-Pinilla, 2004). Az általunk is megfigyelt génexpressziós változások a hippocampus területén tehát magyarázatul szolgálhatnak a testmozgás kognitív funkciókra kifejtett jótékony hatására. Ezzel szemben a memória javulásának mértékében mért nemi különbségre nem adnak magyarázatot, ugyanis mindkét nemben közel egyenlő mértékű növekedés volt megfigyelhető. Így a különbség lehetséges okainak felderítéséhez további vizsgálatokat végeztünk.

A korábbiakban említett vérvizsgálati eredmények azt mutatták, hogy míg a nőstények gyorsan adaptálódtak a testmozgáshoz, addig a hímek fiziológiai értékei egy hét edzés után még nem mutattak szignifikáns változást. Ezért megvizsgáltuk, hogy a gyulladásban, sejtszintű stresszválaszban létrejönnek-e olyan nemi különbségek, amelyekből arra következtethetnénk, hogy a hímek számára megerőltetőbb volt a végzett testedzés típusa és intenzitása. A qPCR vizsgálat eredményei alátámasztották a felvetésünket, ugyanis a vizsgált hősokkfehérjék közül a *Hsp70*, *Hsp25* és a *Cryab* gének expressziójában, illetve a *Cd68* makrofág markergén kifejeződésében jelentős növekedést csak a hím állatok vázizom mintáiban figyeltünk meg. Nőstény állatok vázizomszövetében futás hatására nem fokozódott számottevően a Hsp-k expressziója. Eredményeinket western-blot analízissel is megerősítettük, a hősokkfehérjéket kódoló gének fokozott aktivitása tehát nem csak az mRNS, hanem a kifejeződött fehérjék szintjében is nyomon követhető. Az immunhisztokémiai festés segítségével láthatóvá tett expressziós mintázatuk is mutatja, hogy a kifejeződött HSP-k sejt védelmének érdekében a sejtmembrán, a citoplazma és a sejtmag környékére transzlokálódtak.

Eredményeink alátámasztják, hogy testmozgás hatására megemelkedik az agyban egyes hősokkfehérjék illetve neurotróf faktorok expressziója, ami korábbi irodalmi adatok alapján hozzájárulhat a rendszeres edzés neurodegeneratív betegségeket megelőző hatásához. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a kísérletünkben alkalmazott közepes intenzitású futópados edzés a hím állatok számára megerőltetőbb, mint nőstény állatoknak. A hím állatok vázizom mintáiban mérhető magasabb szintű hősokkfehérje és makrofág marker gén expresszió ugyanis szöveti sérülésre utalhat, amit nőstény állatokban nem figyeltünk meg. Feltételezhető, hogy a korábbi kísérletünk során a 7 hónapig tartó futóedzés a hím egerekben túledzettséghez, krónikus gyulladás kialakulásához vezethetett, amely elnyomta a testmozgás agy egészségére gyakorolt jótékony hatásait, emiatt nem volt megfigyelhető memória javulás a hímek esetében. Ezzel szemben a nőstények valószínűleg könnyebben adaptálódtak az adott testmozgáshoz, így bennük nem alakult ki tartós stresszválasz és szabadon kifejeződhetett a futás hatására

aktiválódó fehérjék memória javító hatása. Megfigyeléseink egybevágunk azon korábbi eredményekkel, amelyek szerint az aerob típusú edzés hatékonyabban javítja a kognitív funkciókat idősödő nőkben, mint férfiakban. Ez egyúttal felhívja a figyelmet az edzésforma és -intenzitás személyre szabásának fontosságára, hogy a testmozgás valóban hatékony megoldás legyen agyunk egészségének fenntartásában.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Török Zsoltnak, hogy a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetében, a Molekuláris Stresszbiológiai csoportban szerezhettem meg a dolgozatom elkészítéséhez szükséges technikai és elméleti tudást.

Őszinte köszönettel tartozom témavezetőmnek, Tóth E. Melindának, aki végtelen türelmével, kedvességével rengeteget segített a dolgozatom elkészítésében, és legjobb tudásával támogatott abban, hogy maradandó ismereteket és tapasztalatot szerezzek témavezetése alatt.

Szeretném megköszönni Ruppert Zsófiának a Western-blot analízis elvégzése során nyújtott segítségét és precíz odafigyelését, a felém tanúsított tengernyi türelmét.

Köszönöm Menyhárt Ákosnak (Agyi keringés és metabolizmus kutatócsoport) a vérvizsgálatok elvégzését valamint Diósdai Ákosnak a metszetek szkennelését. Köszönetet mondok továbbá a Molekuláris Stresszbiológiai csoport összes dolgozójának, akik támogató légkörük és a legkülönbözőbb interakcióik által segítettek szakmai tudásom gyarapításában.

Munkánk a NKFIH FK138390 támogatásával készült.

Irodalomjegyzék

- Abrous, D. N., & Wojtowicz, J. M. (2015). Interaction between Neurogenesis and Hippocampal Memory System: New Vistas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), a018952. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018952>
- Andersen, J. K. (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Medicine*, 10(S7), S18–S25. <https://doi.org/10.1038/nrn1434>
- Balogi, Z., Multhoff, G., Jensen, T. K., Lloyd-Evans, E., Yamashima, T., Jäätelä, M., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2019). Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 74, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.004>
- Barha, C. K., Davis, J. C., Falck, R. S., Nagamatsu, L. S., & Liu-Ambrose, T. (2017). Sex differences in exercise efficacy to improve cognition: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in older humans. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 46, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.04.002>
- Barha, C. K., Hsiung, G.-Y. R., Best, J. R., Davis, J. C., Eng, J. J., Jacova, C., Lee, P. E., Munkacsy, M., Cheung, W., & Liu-Ambrose, T. (2017). Sex Difference in Aerobic Exercise Efficacy to Improve Cognition in Older Adults with Vascular Cognitive Impairment: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 60(4), 1397–1410. <https://doi.org/10.3233/JAD-170221>
- Barha, C. K., & Liu-Ambrose, T. (2018). Exercise and the Aging Brain: Considerations for Sex Differences. *Brain Plasticity*, 4(1), 53–63. <https://doi.org/10.3233/bpl-180067>
- Bassuk, S. S., & Manson, J. E. (2005). Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Journal of Applied Physiology*, 99(3), 1193–1204. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00160.2005>
- Bendiske, J., & Bahr, B. A. (2003). Lysosomal Activation Is a Compensatory Response Against Protein Accumulation and Associated Synaptopathogenesis—An Approach for Slowing Alzheimer Disease? *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(5), 451–463. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.5.451>
- Chaddock, L., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Kim, J. S., Voss, M. W., VanPatter, M., Pontifex, M. B., Raine, L. B., Konkel, A., Hillman, C. H., Cohen, N. J., & Kramer, A. F. (2010). A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. *Brain Research*, 1358, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.049>
- Colcombe, S., & Kramer, A. F. (2003). Fitness Effects on the Cognitive Function of Older Adults. *Psychological Science*, 14(2), 125–130. <https://doi.org/10.1111/1467-9280.t01-1-01430>

- de Jong, W. W., Caspers, G.-J., & Leunissen, J. A. M. (1998). Genealogy of the α -crystallin—small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22(3–4), 151–162. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00013-0)
- Delezie, J., & Handschin, C. (2018). Endocrine crosstalk between Skeletal muscle and the brain. In *Frontiers in Neurology* (Köt. 9, Szám AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00698>
- Devi, S. A., & Kiran, T. R. (2004). Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiology of Aging*, 25(4), 501–508. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00112-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00112-X)
- Febbraio, M. A., Hiscock, N., Sacchetti, M., Fischer, C. P., & Pedersen, B. K. (2004). Interleukin-6 Is a Novel Factor Mediating Glucose Homeostasis During Skeletal Muscle Contraction. *Diabetes*, 53(7), 1643–1648. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.7.1643>
- Ford, E. S., Giles, W. H., & Dietz, W. H. (2002). Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. *JAMA*, 287(3), 356. <https://doi.org/10.1001/jama.287.3.356>
- Goldstein, M. S. (1961). Humoral nature of hypoglycemia in muscular exercise. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 200(1), 67–70. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.200.1.67>
- Gordon, C. J. (2012). Thermal physiology of laboratory mice: Defining thermoneutrality. *Journal of Thermal Biology*, 37(8), 654–685. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2012.08.004>
- Gragerov, A., Zeng, L., Zhao, X., Burkholder, W., & Gottesman, M. E. (1994). Specificity of DnaK-peptide Binding. *Journal of Molecular Biology*, 235(3), 848–854. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1043>
- Guisse, K. G., & Shapiro, M. L. (2017). Medial Prefrontal Cortex Reduces Memory Interference by Modifying Hippocampal Encoding. *Neuron*, 94(1), 183–192.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.011>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), 101–112. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hall, K. S., Cohen, H. J., Pieper, C. F., Fillenbaum, G. G., Kraus, W. E., Huffman, K. M., Cornish, M. A., Shiloh, A., Flynn, C., Sloane, R., Newby, L. K., & Morey, M. C. (2016). Physical Performance Across the Adult Life Span: Correlates With Age and Physical Activity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, glw120. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw120>
- Herting, M. M., & Nagel, B. J. (2012). Aerobic fitness relates to learning on a virtual Morris Water Task and hippocampal volume in adolescents. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.012>

- Horváth, I., Multhoff, G., Sonnleitner, A., & Vigh, L. (2008). Membrane-associated stress proteins: More than simply chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7–8), 1653–1664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.012>
- Hoshino, T., Murao, N., Namba, T., Takehara, M., Adachi, H., Katsuno, M., Sobue, G., Matsushima, T., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(14), 5225–5234. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5478-10.2011>
- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., & Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal*, 17(21), 6124–6134. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6124>
- Jedrychowski, M. P., Wrann, C. D., Paulo, J. A., Gerber, K. K., Szpyt, J., Robinson, M. M., Nair, K. S., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2015). Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metabolism*, 22(4), 734–740. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.001>
- Kim, S., Choi, J.-Y., Moon, S., Park, D.-H., Kwak, H.-B., & Kang, J.-H. (2019). Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 471(3), 491–505. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02253-8>
- Kramer, A. (2020). *An Overview of the Beneficial Effects of Exercise on Health and Performance* (o. 3–22). https://doi.org/10.1007/978-981-15-1792-1_1
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., & Barde, Y.-A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341(6238), 149–152. <https://doi.org/10.1038/341149a0>
- Liang, P., & MacRae, T. H. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 110(13), 1431–1440. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.13.1431>
- Lohof, A. M., Ip, N. Y., & Poo, M. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, 363(6427), 350–353. <https://doi.org/10.1038/363350a0>
- McClaren, M., & Isseroff, R. R. (1994). Dynamic Changes in Intracellular Localization and Isoforms of the 27-kD Stress Protein in Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(3), 375–381. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371798>
- Moon, H. Y., Becke, A., Berron, D., Becker, B., Sah, N., Benoni, G., Janke, E., Lubejko, S. T., Greig, N. H., Mattison, J. A., Duzel, E., & van Praag, H. (2016). Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. *Cell Metabolism*, 24(2), 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.05.025>
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, 12(24), 3788–3796. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788>

- Mort, J. S., & Buttle, D. J. (1997). Cathepsin B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(5), 715–720. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00152-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00152-5)
- Myers, J., Kaykha, A., George, S., Abella, J., Zaheer, N., Lear, S., Yamazaki, T., & Froelicher, V. (2004). Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. *The American Journal of Medicine*, 117(12), 912–918. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.06.047>
- Nakamoto, H., & Vigh, L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(3), 294–306. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6321-2>
- Pedersen, B. K. (2019). Physical activity and muscle–brain crosstalk. In *Nature Reviews Endocrinology* (Köt. 15, Szám 7, o. 383–392). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0174-x>
- Pedersen, B. K., Åkerström, T. C. A., Nielsen, A. R., & Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology*, 103(3), 1093–1098. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00080.2007>
- Pedersen, B. K., Pedersen, M., Krabbe, K. S., Bruunsgaard, H., Matthews, V. B., & Febbraio, M. A. (2009). Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. *Experimental Physiology*, 94(12), 1153–1160. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.048561>
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., & Luskin, M. B. (2001). Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6706–6717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06706.2001>
- Qiu, X.-B., Shao, Y.-M., Miao, S., & Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(22), 2560–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6192-6>
- Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., & Atalay, M. (2013). Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(10), 1208–1246. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4498>
- Rutherford, L. C., Nelson, S. B., & Turrigiano, G. G. (1998). BDNF Has Opposite Effects on the Quantal Amplitude of Pyramidal Neuron and Interneuron Excitatory Synapses. *Neuron*, 21(3), 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80563-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80563-2)
- Scisciola, L., Fontanella, R. A., Surina, Cataldo, V., Paolisso, G., & Barbieri, M. (2021). Sarcopenia and cognitive function: Role of myokines in muscle brain cross-talk. In *Life* (Köt. 11, Szám 2, o. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11020173>
- Shimada, A., Mason, C. A., & Morrison, M. E. (1998). TrkB Signaling Modulates Spine Density and Morphology Independent of Dendrite Structure in Cultured Neonatal Purkinje Cells. *The Journal of Neuroscience*, 18(21), 8559–8570. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08559.1998>

- Söti, C., & Csermely, P. (2002). Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochemistry International*, 41(6), 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00043-8)
- Sun, Y., & MacRae, T. H. (2005). The small heat shock proteins and their role in human disease. *The FEBS Journal*, 272(11), 2613–2627. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04708.x>
- Tkáčová, J., & Angelovičová, M. (2012). Heat Shock Proteins (HSPs): a Review. In *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* (Szám 1).
- Tóth, M. E., Gombos, I., & Sántha, M. (2015). Heat shock proteins and their role in human diseases. *Acta Biol Szeged*, 59, 121–141. <https://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2844>
- Tóth, M. E., Szegedi, V., Varga, E., Juhász, G., Horváth, J., Borbély, E., Csibrány, B., Alföldi, R., Lénárt, N., Penke, B., & Sántha, M. (2013). Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice. *Cell Stress and Chaperones*, 18(6), 759–771. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0428-9>
- Tsatsoulis, A., & Fountoulakis, S. (2006). The Protective Role of Exercise on Stress System Dysregulation and Comorbidities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1083(1), 196–213. <https://doi.org/10.1196/annals.1367.020>
- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
- Tymochko-Voloshyn, R., Hashchyshyn, V., Paraniak, N., Boretsky, V., Reshetylo, S., & Boretsky, Y. (2023). Myokines are one of the key elements of interaction between skeletal muscles and other systems of human body necessary for adaptation to physical loads. *Visnyk of Lviv University. Biological series*, 88, 3–16. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2023.88.01>
- Varma, V. R., Chuang, Y., Harris, G. C., Tan, E. J., & Carlson, M. C. (2015). Low-intensity daily walking activity is associated with hippocampal volume in older adults. *Hippocampus*, 25(5), 605–615. <https://doi.org/10.1002/hipo.22397>
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2580–2590. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x>
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2580–2590. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x>
- Vos, M. J., Hageman, J., Carra, S., & Kampinga, H. H. (2008). Structural and Functional Diversities between Members of the Human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ Chaperone Families. *Biochemistry*, 47(27), 7001–7011. <https://doi.org/10.1021/bi800639z>

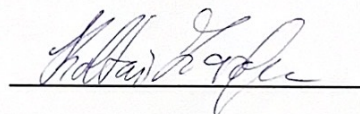
- Whitham, M., & Febbraio, M. A. (2016). The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(10), 719–729. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.153>
- Wilhelmus, M. M. M., Boelens, W. C., Otte-Höller, I., Kamps, B., de Waal, R. M. W., & Verbeek, M. M. (2006). Small heat shock proteins inhibit amyloid- β protein aggregation and cerebrovascular amyloid- β protein toxicity. *Brain Research*, 1089(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.058>
- Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., Lin, J. D., Greenberg, M. E., & Spiegelman, B. M. (2013). Exercise Induces Hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 Pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), 649–659. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.008>
- Yakovlev, A. A., & Gulyaeva, N. V. (2015). Possible role of proteases in preconditioning of brain cells to pathological conditions. *Biochemistry (Moscow)*, 80(2), 163–171. <https://doi.org/10.1134/S0006297915020030>
- Zhang, J., & Zhang, W. (2016). Can irisin be a linker between physical activity and brain function? *Biomolecular Concepts*, 7(4), 253–258. <https://doi.org/10.1515/bmc-2016-0012>

Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott (Koltai Zsófia) nyilatkozom, hogy a 37. TDK-ra benyújtott (Nemi különbségek az izom- és agyszövetben termelődő miokinek és hősokkfehérjék expressziójában egy hét futást követően) című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

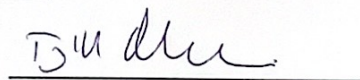
Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke
Szervek tömegének mérése	100%
Izomminták homogenizálása	50%
totalRNS izolálás a mintákból	50%
qPCR vizsgálatok	80%
Fagyasztott metszetek készítése	100%
Immunhisztokémiai festés	50%
Fehérje izolálás izomszövetből	50%
Western-blot analízis	50%
Mérési adatok statisztikai kiértékelése	80%
Ábrák készítése	100%

Kelt: Szeged, 2024. április 14.



Koltai Zsófia

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Tóth E. Melinda

HUN-REN Szegedi Biológiai
Kutatóközpont