

A rendszeres testmozgás hatása az agy öregedésére állatkísérletes modellekben

Doktori értekezés

Marosi Krisztina

Semmelweis Egyetem

Sporttudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nyakas Csaba, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Székács Béla, egyetemi tanár, DSc

Dr. Szabolcs István, egyetemi tanár, DSc

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sipos Kornél, professor emeritus, CSc

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Osváth Péter, egyetemi docens, PhD

Dr. Pucsok József, egyetemi tanár, DSc

Dr. Sós Csaba, egyetemi docens, PhD

Budapest

2012

Tartalom

1. Bevezetés.....	10
2. Irodalmi áttekintés.....	11
2.1 Öregedés, az agy öregedése	11
2.1.1 A szabadgyökök szerepe	13
2.2. Ösztrogén neurobiológiai hatásai	17
2.2.1 Az ösztrogén.....	17
2.2.2 Az ösztrogén hatása akognitív képességekre	18
2.2.3 Az ösztrogén hatása a szinaptikus plaszticitásra	18
2.2.4 Az ösztrogén neuroprotektív és antioxidáns hatása	19
2.2.5 Az ösztrogén hatásmechanizmusa	20
2.2.6 Hormonpótló terápia.....	25
2.3 A testmozgás neurobiológiai hatásai	26
2.3.1 A testmozgás hatása a kognitív képességekre.....	26
2.3.2 A testmozgás hatása a neurogenesisre, szinaptikus plaszticitásra	27
2.3.3 A testmozgásszerepe a redox rendszer szabályozásában	28
2.3.4 A testmozgás lehetséges hatásmechanizmusa az agyban	28
3. Célkitűzések és korlátozó tényezők.....	32
3.1 Célkitűzések	32
3.2 Korlátozó tényezők.....	37
4. Anyagok és módszerek.....	38
4.1 Kísérleti állatok	38
4.2 Magatartási tesztek	40
4.2.1 Nyílt porond teszt	40
4.2.2 Új tárgy felismerése nyílt porondon.....	41
4.2.3 Spontán alternáció - Y útvesztő teszt.....	42
4.2.4 Morris vízi útvesztő teszt	43
4.3 Biokémiai módszerek	45
4.3.1 Western blot.....	45

4.3.2	<i>Plazma hormonszint meghatározások</i>	47
4.3.3	<i>Reaktív oxigén gyökök meghatározása</i>	47
4.3.4	<i>A karbonilált fehérjék meghatározása</i>	48
4.3.5	<i>Génexpressziós vizsgálatok</i>	48
4.3.6	<i>Immunhisztokémia</i>	51
4.4	<i>Statisztikai analízis</i>	52
5.	<i>Eredmények</i>	53
5.1	<i>A. Kísérlet: A hosszú-távú ösztradiol kezelés és a hosszú távú fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére különböző életkorú nőstény patkányokban.</i>	53
5.1.1	<i>Kognitív tesztek eredményei</i>	53
5.1.2	<i>A mért szervek súlya, zsírdépők mennyisége</i>	58
5.1.3	<i>A vérplazma ösztradiol és kortikoszteron szintje</i>	59
5.1.4	<i>Biokémiai eredmények</i>	59
5.2	<i>B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.</i>	74
5.2.1	<i>Viselkedési teszt eredménye</i>	74
5.2.2	<i>Hisztológiai eredmények</i>	76
5.2.3	<i>Biokémiai eredmények</i>	79
5.2.4	<i>Génexpressziós mérési eredmények</i>	84
6.	<i>Megbeszélés</i>	85
7.	<i>Következtetések</i>	94
8.	<i>Összefoglalás</i>	97
9.	<i>Summary</i>	98
10.	<i>Irodalomjegyzék</i>	99
11.	<i>Saját publikációk jegyzéke</i>	121
11.1	<i>Disszertációhoz kapcsolódó közlemények</i>	121
11.2	<i>Független közlemények</i>	121
	<i>Köszönetnyilvánítás</i>	123

Ábrák és táblázatok jegyzéke

Ábrák

1. **ábra** - Patkány fél hippocampusának vázlata (dorsalis metszet)
2. **ábra** - Az agy öregedését befolyásoló tényezők szemléltetése
3. **ábra** - A 17β - ösztradiol molekula térszerkezete
4. **ábra** - Az ösztradiol szignalizációs mechanizmus illusztrációja
5. **ábra** - A BDNF szerepe az LTP kialakításában és a génátírás szabályozásában.
6. **ábra** - A kísérleteinkben vizsgált paraméterek
7. **ábra** - A patkányok futópados edzémódjának szemléltetése
8. **ábra** - Új tárgy felismerési teszt
9. **ábra** - A spontán alternáció teszt szemléltetése
10. **ábra** - A Morris vízi útvesztő teszt szemléltetése
11. **ábra** - A nyílt porond teszt eredménye 15 hónapos és 27 hónapos korú csoportokban
12. **ábra** - Az új tárgy felismerési teszt eredménye 15 és 27 hónapos korban
13. **ábra** - A spontán alternáció teszt eredménye 15 és 27 hónapos korban
14. **ábra** - A Morris vízi útvesztő teszt eredménye 15 és 27 hónapos korban
15. **ábra** - Az ösztrogén receptor alpha ($ER\alpha$) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampusában
16. **ábra** - A BDNF fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampusában
17. **ábra** - A MAPK (A), az Akt (B) és a CREB (C) fehérjék foszforilációja 15 és 27 hónapos állatok hippocampusában
18. **ábra** - A p-AMPK fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampusában

19.ábra - A szinaptofizin (A) és p-szinapszin (B) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

20.ábra - A reaktív oxigén gyökök mennyisége (ROS) 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

21.ábra - A karbonilált fehérjék mennyisége a 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

22.ábra - Az NRF-1 (A) és PGC1 α (B) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

23.ábra - Az antioxidáns enzimek mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

24.ábra - A DCX mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

25.ábra - Az új tárgy felismerési teszt eredménye

26.ábra - Az Morris vízi útvesztő teszt eredménye

27.ábra - A BDNF immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és CA3-as régiójában

28.ábra - A DCX immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz molekuláris rétegében

29.ábra - A Glut-1 immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és DG régiójában

30.ábra - A ChAT immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és DG régiójában

31.ábra - A BDNF mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

32.ábra - A p-Akt mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

33.ábra - A p-AMPK mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

34.ábra - A p-szinapszin mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

35.ábra - A szinaptofizin mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

36.ábra - A Glut-1 mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

37.ábra - A doublecortin (DCX) mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

38.ábra - A ChAT mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

Táblázatok

1. táblázat - A kísérlet során felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok

2. táblázat - A PCR reakció során alkalmazott primerek

3. táblázat - A vérplazma ösztadiol és kortikoszteron mennyisége, a hipofízis és méh súlya valamint a zsírdégek mennyisége 15 és 27 hónapos edző (EX), ösztadiolt (E2) és kombinált kezelést kapott csoportokban

4. táblázat - A kísérlet során vizsgált gének relatív expressziója

Rövidítések jegyzéke

8-oxoG	oxo-7,8 dihidroguanin
AchE	acetilkolin észteráz
AD	Alzheimer-kór
Akt/PKB	Akt/protein kináz B
AMP	adenozin monofoszfát
AMPA	(2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
AMPK	adenozin-monofoszfát-aktiválta protein kináz
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AP-1	aktivátor fehérje 1(activator protein 1)
ATP	adenozin trifoszfát
Bad	proapoptotikusfehérjea Bcl-2 családból
Bax	proapoptotikus fehérje a Bcl-2 családból
Bcl-2	B- sejtes lymphoma fehérje- 2
Bcl-Xl	antiapoptotikus fehérje a Bcl-2 családból
BDNF	agyieredetű növekedési faktor
B-raf	serin/threonine protein kináz B-Raf
BrdU	bromo-deoxiuridin
CA1, CA2	cornu ammonis 1 és 2, hippocampusz régiók
CaMKK	kalmudulindependens kináz
CAT	kataláz
ChAT	kolin acetiltranszferáz
CREB	cAMP reszponzív elem
DNP	dinitrofenilhidrazon
DNPH	dinitrofenilhidrazin
DNS	dezoxiribonukleinsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	ösztrogén receptor
ERE	ösztrogén reszponzív terület
ERK 1/2	extracelluláris szignál-regulált kináz1/2
FKHRL	forkhead transzkripciósfaktor
GAP-43	növekedés- asszociált fehérje 43

GLUT	glükóz transzporter
GPX	glutation-peroxidáz
GSK3	glikogén szintetáz kináz 3
H₂DCFDA	diklorodihidrofluoreszcein diacetát
H₂O₂	hidrogén-peroxid
HRP	tormagyökér peroxidáz
HSP	hő sokk fehérje
IGF-1	inzulinhoz hasonló növekedési faktor 1
LTP	hosszú távú potenciáció
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
mtDNS	mitokondriális DNS
NMDA	<i>N</i> -metil <i>D</i> -aszpartát
NOR	új tárgy felismerési teszt
NF-κB	nukleális faktor κB
NGF	idegi növekedési faktor
NRF-1	nukleálisrespirációs faktor– 1
OVX	ovarietomizált
O₂⁻	szuperoxid
OECD	Gazdasági Együttműködés és Fejlesztés Szervezete
OH⁻	hidroxil gyök
PCR	polimerase chain reaction
PBS	foszfát puffer
PGC-1	peroxiszóma proliferator-aktiválta receptor gamma koaktivátor 1
PVDF	polivinilidín fluorid membrán
Ras	rat sarcoma
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén gyökök
SDS-PAGE	szodium dodecil szulfát-polyakrilamid gél elektroforezis
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SYN	szinapszin
SYP	szinaptofizin
TBS-T	tris-buffered saline-Tween 20

mtTFA mitokondriálistranszkripció faktor A
VEGF vaszkularizációt indukáló faktor

1. Bevezetés

Számos megfigyelés igazolja, hogy az öregedés során a szervezet és így a központi idegrendszer is, veszít a funkcionális rezerv kapacitásaiból, melynek következményeképp megnő a különböző mértékű demenciák és neurodegeneratív betegségek incidenciája. Idősödő társadalmunkban így a prevenció illetve az agy egészséges öregedésének támogatása az egészségtudományok egyik fő irányvonalává vált.

Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy az ösztrogén igen pozitív hatással van az öregedő agyra (Dumitriu et al., 2010, Henderson, 2010). Ennek ellenére az ösztrogén-pótló terápia potenciális mellékhatásai miatt egyelőre nem bizonyult globális megoldásnak az időskori egészségmegőrzésében. A gyógyszeripari kutatások pedig még nem találtak megfelelő ösztrogén-analógo(ka)t. De mivel a szteroid hormon hatásmechanizmusa jól ismert az agyban, a kísérletes ösztrogén-kezelésmegfelelő modellként szolgálhat hasonló hatással bíró farmakonok és nem gyógyszeres módszerek kifejlesztése szempontjából.

Munkám során az ösztrogénkezelés és a mozgás-tréning agy öregedésére kifejtett hatásait vizsgáltam állatkísérletekben. Célom volt a fizikai tréning és az ösztrogén kezelés neuropszichológia és neurofiziológiai hatásainak összehasonlítása annak érdekében, hogy információt kapjunk arról, hogy a mozgásterápia kiegészítheti-e illetve helyettesítheti-e az ösztrogén terápiát menupauzában.

Vizsgálataimat különböző életkorú, idős és idősödő nőstény patkányokon végeztem a kezelések életkor-függő hatásainak megállapítása céljából. A kognitív teljesítményértékelésemellett célom volt az ösztrogén és a fizikai aktivitás hatásmechanizmusában szerepet játszó neuronális jelátviteli útvonalak vizsgálata, valamint egyes szinaptikus plaszticitásban szerepet játszó markerek mérése. Állatkísérletes modellben az egész életen át tartó folyamatos mozgás tréning idegrendszeri hatásait is vizsgáltam. A kutatás kiemelkedő fontosságú, hiszen eddig nem tanulmányozták, hogy az élethosszig tartó fizikai aktivitás hogyan befolyásolja neurotrofikus/neurogenetikus faktorokat, kolinerg rendszert, és az energia valamint redox egyensúly fenntartásában szerepet játszó molekulákat a neuronokban. Mivel a vizsgálatban hím állatokat treníroztam, lehetőségem volt tanulmányozni, hogy a fizikai aktivitás befolyásolja-e az ösztrogén szignalizációs útvonalat hím patkányok esetén is.

2. Irodalmi áttekintés

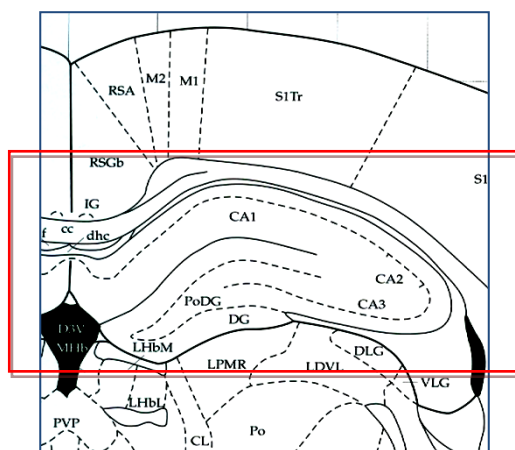
2.1 Öregedés, az agy öregedése

Az utóbbi évtizedekben jelentős demográfiai változások történtek, a fejlett országokban; az idős populáció nagysága jelentősen megnövekedett. Hazánkban jelenleg a népesség 14%-a 65 év feletti lakosból áll. Az OECD 2009-es Health at Glance tanulmányában rávilágít arra, hogy 2050-re a 65 éven felüli népesség nagysága megduplázódik az OECD országokban (Health at a Glance 2009: OECD Indicators © OECD 2009). Hazánkban is megfigyelhető az idős korosztály növekedésének tendenciája, mely jelentős gazdasági, egészségügyi és szociális következményekkel jár. Ezért az 'egészséges öregedés', azaz a korrall járó degeneratív elváltozások potenciális prevenciója valamint a kognitív és fizikális képességek megőrzése a népegészségügy és a humánkineziológia egyik legfontosabb feladatává vált.

Öregedés során a szervezetalkalmazkodó-, és ellenálló képessége csökken, fokozatosan elveszti kapacitását, hogy ellenálljon a fizikai és környezeti stresszoroknak és betegségeknek. A folyamat háttérében komplex biológiai változások állnak, melyek közül az agyat érintő hatásokat szeretném bemutatni disszertáciomban. Az öregedő agyban a kor előrehaladtával jelentős strukturális és funkcionális változások mennek végbe (Grady and Craik, 2000, Baquer et al., 2009). A korrall csökken az agy tömege, az idegsejtek atrófiája és pusztulása figyelhető meg a neocortexben (Tang et al., 1997), a hippocampusban (Simic et al., 1997) és a cerebellumban (Nairn et al., 1989). Emellett a szerv vérellátása, (Riddle et al., 2003) és a szinaptikus denzitás (Morrison and Hof, 1997) is csökken. Számos, az immunválaszban, energia metabolizmusban, szignál transzdukcióban valamint a szinaptikus plaszticitásban, redox egyensúly fenntartásában szerepet játszó génexpressziója is megváltozik (Lu et al., 2004) a kor előrehaladtával.

A vizsgálatom középpontjában a hippocampusz (**1.ábra**) öregedése áll. A hippocampusz a limbikus rendszer része, és a térbeli tanulásban valamint az epizodikus, deklaratív memóriaformálásban vesz részt. Emellett szerepet játszik az emocionális és szexuális magatartásformák integrációjában is. Több kortikális és szubkortikális területtel is kapcsolatban van. A ventrális hippocampusz kapcsolatban áll a rostromediális entorhinális cortexszel, prefrontális cortexszel, az amygdalával és a

nucleus accumbens-szel. A dorsális hippokampusz afferens rostjai a laterális és caudomediális enthorhinális cortexből erednek, efferens rostjai pedig adorsális laterális szeptumba és a corpus mammillareba projektálnak. A két régiónak eltérő funkciója van, az előbbi az érzelmek kialakításáért felelős, az utóbbinak pedig a memóriában és a tanulásban van szerepe.



1. ábra

Patkány fél hippokampuszának vázlata (dorsalis metszet)

A hippokampusz régiói: CA1=Cornu Ammonis 1, CA2= Cornu Ammonis 2, CA3=Cornu Ammonis 3, DG=Dentate Gyrus

A hippokampuszban is jelentős strukturális változások mennek végbe a kor előrehaladtával. A hippokampuszban csökken a neurogenesis (Kuhn et al., 1996) valamint a dentrit tüskék száma (Kawaguchi et al., 1995). Öregedés során csökken a hippokampusz volumene is (Convit et al., 1995), axonális degeneráció lép fel (von Bohlen und Halbach et al., 2006), csökken a gyrus dentatusba (DG) innerváló noradrenerg és dopaminerg rostok száma (Ishida et al., 2000) valamint degenerálódnak a hippokampuszba projektáló kolinerg rostok is (Gilad and Gilad, 1987). Mivel a kolinerg pályák részt vesznek a kognícióban, degenerációjuk memória- és tanulási képességek csökkenéséhez vezet (Lippa et al., 1980).

Neurodegeneratív betegségekben is csökken a kolin kiáramlása és visszavétel a szinapsziszokban valamint megváltozik az acetilkolin receptorok expressziója is

(Picciotto and Zoli, 2002). Alzheimer kórban a kolinerg neuronok nagymértékű atrofíája figyelhető meg amely a memória és figyelmi funkciók hanyatlásával párosul (Weinstock, 1995, Schliebs and Arendt, 2011).

Az egyik legelfogadottabb öregedési elmélet alapján a felsorolt degeneratív változásokért -többek között- döntően az oxidatív stressz által előidézett hatások tehetők felelőssé (Finkel and Holbrook, 2000).

2.1.2 A szabadgyökök szerepe

Aerob körülmények között a terminális oxidáció során az oxigén a mitokondriumban vízzé redukálódik. Az oxigén molekulák 1-2%-a elektron redukción esik át, és párosítatlan elektronnal rendelkező, - és épp ezért igen reaktív- szuperoxid aniont képez (O_2^-). További elektron leadással a szuperoxidból hidrogénperoxid (H_2O_2) keletkezik (Chance et al., 1979). A Fenton reakció során a H_2O_2 -ből OH^- szabadul fel, amely szuperoxid anionhoz és a hidrogén peroxidhoz hasonlóan reakcióba léphet a sejtalkotókkal. A szuperoxidot a sejtben szuperoxid diszmutáz enzim (SOD) eliminálja. A H_2O_2 -ből a kataláz (CAT) és glutathion peroxidáz (GPx) enzimek által katalizált reakcióban víz képződik. Az enzimatis átalakítás mellett a reaktív oxigén gyökök eliminálása történhet nem enzimatis úton is, amelyben egyes gyökfogó un. antioxidáns vegyületek vesznek részt (pl. C és E vitamin, karotinoidek).

Fontos megjegyezni, hogy a reaktív oxigén gyökök számos biológiai szereppel bírnak (Droge, 2002), káros hatásaik akkor jelentkeznek, ha a fiziológiásnál magasabb koncentrációban vannak jelen a sejtekben. A kor előrehaladtával csökken az antioxidáns rendszer kapacitása, így nő az oxidatív sérülés mértéke, amely a sejtalkotók és a sejtfunkciók károsodásában nyilvánul meg (Gemma et al., 2007). A DNS-ben fellépő oxidatív károsodás mutációkhoz vezet, amely tökéletlen fehérjeszintézist, hibás fehérjéket illetve sejthalált eredményezhet. Az oxigén gyökök a mitokondriumot is károsítják, membránlipidjei peroxidatív modifikáción mennek keresztül, amely a mitokondriális diszfunkciót idéz elő (Finkel and Holbrook, 2000). A komplex IV kapacitásának csökkenése nagyobb elektron kiszivárgással és több szabadgyök képződéssel jár.

A kutatók kimutatták, hogy öregedés során a neuronális sejtmagokban és mitokondriumokban is nő a DNS sérülés biomarkerének a hydroxy-2'deoxiguanozin (8-OHdG) mennyisége (Richter et al., 1988). A mitokondriális DNS különösképp érzékeny az oxidatív stresszre, mivel nem rendelkezik a hiszton fehérjék védelmével és a DNS repair mechanizmusával. Számos neurodegeneratív betegségben, mint például Parkinson kórban és Alzheimer kórban mutatták ki a mtDNS mutációk növekedését (Ikebe et al., 1990, Corral-Debrinski et al., 1994).

A DNS-t és a génexpressziót érintő változások mellett a fokozott lipidperoxidáció és a fehérje oxidáció is hozzájárul az agy öregedésének molekuláris folyamatához (Montine et al., 2002). A lipid peroxidáció következményeképp sérülnek a glutamát és glükóz transzporterek, ami az ion és energiaháztartás diszregulációjához vezet (Mattson, 1998). Idős patkányok agyában megfigyelték, hogy nem patológiás öregedés során is csökken a glükózfelvétel a neuronokban az agy egyes területein (Patel and Brewer, 2003). A glükózmétabolizmus megváltozása Alzheimer kór neuropathológiájához is bizonyítottan hozzájárul (Cunnane et al., 2011).

A fehérje oxidáció során karbonil származékok jönnek létre az aminosav láncokon, valamint keresztkötések szaporodnak fel a molekulán belül. Következésképpen megváltozik a fehérjék hidrofobitása és szerkezete, így azok többé nem képesek ellátni fiziológiás funkcióikat (Stadtman, 2006). Idős patkányok hippocampusában a karbonilált fehérjék mennyiségi növekedését írták le, amely a tanulási képességek csökkenésével korrelált (Nicolle et al., 2001).

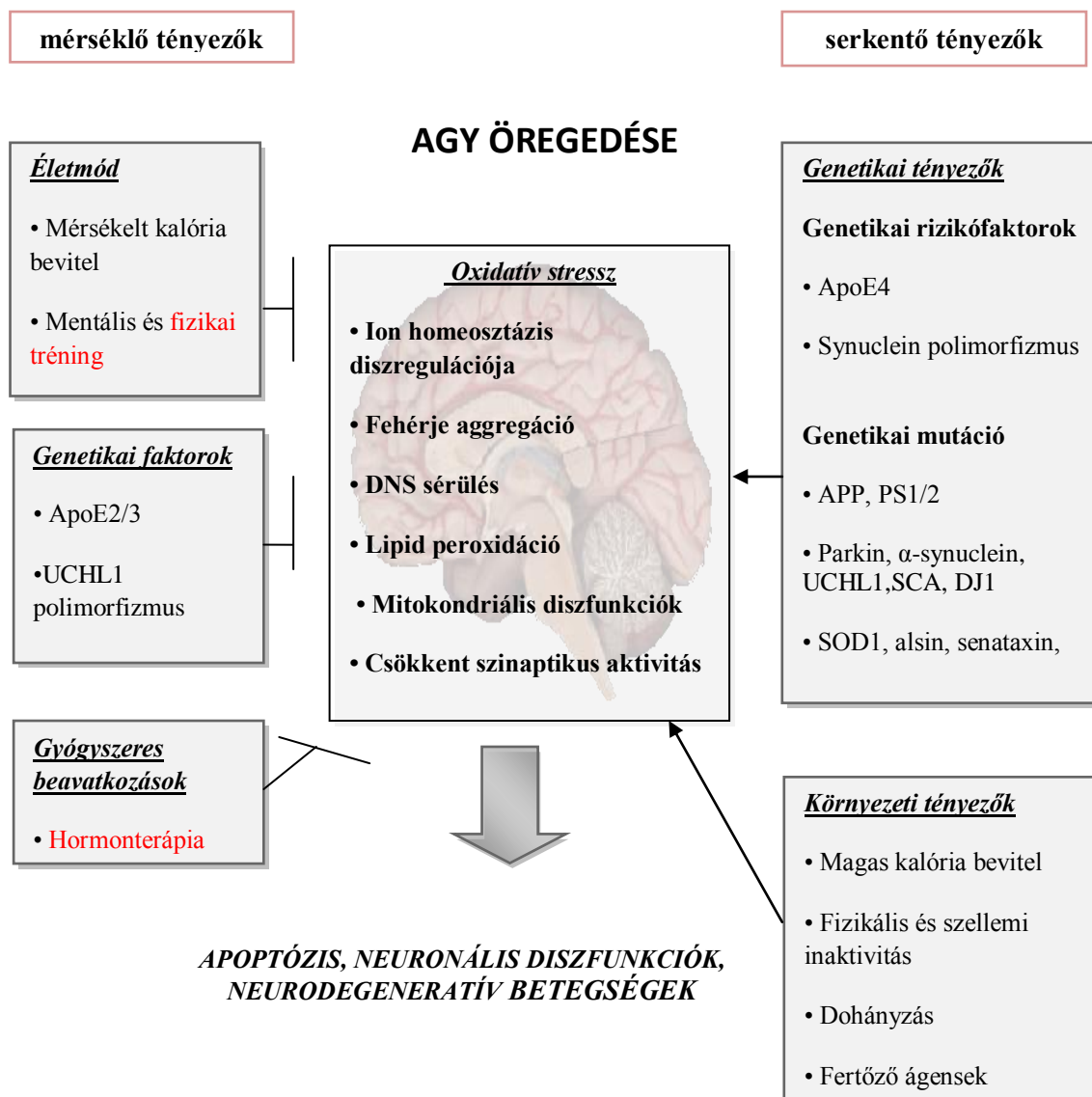
A fiziológiailag inaktív fehérjék eliminálása a sejtben a proteaszóm enzim-komplex által, valamint autofágiás-lizoszómás útvonalon keresztül valósul meg. Öregedés során egyes agyterületeken csökken a károsodott fehérjék protoszómális valamint autofág lebontása (Gray et al., 2003), így fehérje aggregátumok halmozódnak fel. A protein plakkok szerepet játszanak egyes neurodegeneratív betegségek kialakulásában (Stadtman, 2001).

Fontos kihangsúlyozni, hogy az agyi struktúrák öregedésének molekuláris folyamatát, a neuronokban akkumulálódó károsodás mértékét agenetikai adottságok valamint számos más endogén és exogén faktor befolyásolja (**2. ábra**).

Bizonyos genetikai polimorfizmusok és mutációk hajlamosítanak különböző neurodegeneratív betegségekre, mivel a betegség pathológiájában fellépő molekuláris

kaszkádokat indíthatnak el. Alzheimer kórbán presenilin 1 és az amyloid precursor fehérje mutációi a neurotoxikus amyloid fehérje plakkok képződését indukálhatják (Faghihi et al., 2004). Parkinson kórbán a synuclein (szinuklein) és parkin génnek polimorfizmusait illetve mutációit mutatták ki, mely a proteaszóm által mediált fehérjelebontás diszfunkcióját okozzák (Pankratz and Foroud, 2004). A környezeti rizikófaktorok közé sorolhatók a dohányzás, toxinok és az UV sugárzás, melyek gyökképződést generálnak és ezáltal megnövelik az oxidatív stressz mértékét a neuronokban.

Az agy egészséges öregedést támogató endogén és exogén tényezők közül a dolgozatomban az ösztrogén hormon pótlás és a fizikai aktivitás szerepét szeretném kiemelni és részletezni.



2. ábra

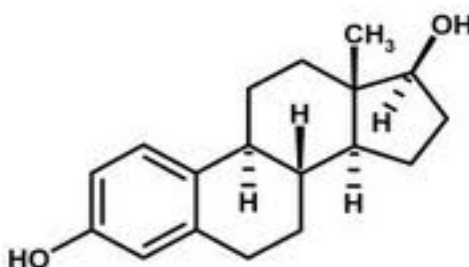
Az agy öregedését befolyásoló tényezők szemléltetése

Az öregedés során molekuláris változások lépnek fel az agyban, amelyek neuronális diszfunkciókhoz vezetnek, illetve megnövelik a neurodegeneratív betegségek fellépésének valószínűségét. A kognitív és fiziológiai funkciók romlásának mértékét illetve a neurológiai betegségek kialakulását számos faktor befolyásolja. Egyes környezeti és genetikai tényezők gyorsíthatják az agy öregedését, míg más faktorok mérsékelhetik az öregedés során fellépő negatív változásokat.

2.2. Ösztrogén neurobiológiai hatásai

2.2.1 Az ösztrogén

Az ösztrogének szteroid hormonok, számos élettani folyamatot szabályoznak. A három biológiailag releváns forma (ösztradiol, ösztron, ösztriol) közül a legaktívabb, legjelentősebb a 17β -ösztradiol (**3. ábra**). Amellett, hogy fontos szerepet játszik a reprodukciók szabályozásában, több igen jelentős nem reprodukcióval is rendelkezik. Le Goascone és munkatársai (1987) mutattak rá először, hogy az ösztrogén az agyban is szintetizálódik. A kutatócsoport felfedezése óta intenzív kutatás zajlik az ösztradiol idegrendszerre kifejtett hatásainak megismerésének céljából. A szteroid hormon *de novo* koleszterolból szintetizálódik vagy tesztoszteronból képződik az agyban az aromatáz enzim által katalizált reakcióban (Panzica and Melcangi, 2008).



3. ábra

A 17β -ösztradiol molekula térszerkezete

Az ösztrogén hormonnak alapvető szerepe van a központi idegrendszer fejlődésében és az agy egyes területein megfigyelhető szexuális dimorfizmus kialakításában. A kilencvenes években kimutatták, hogy a hormon több, szaporodástól független agyi funkciót is befolyásol (Keefe et al., 1994). A menopauza fellépésekor a gonadális hormontermelés megszűnése mellett a neuroszteroidok produkciója is lecsökken az agyban, amely számos fiziológiai és pszichés tünettel jár.

2.2.2 Az ösztrogén hatása akognitív képességekre

A menopauza bekövetkeztével a kognitív változások elsősorban a tér- és verbális funkciók tekintetében a leghangsúlyosabbak. Romlik a verbális memória, verbális fluencia, a finom mozgások szervezése valamint bizonyos térképességek (Wolf and Kirschbaum, 2002). Több állatkísérletes és humántanulmány számol be arról, hogy ösztrogén hiányos állapotban illetve menopauzában az ösztrogén terápialassította a kognitív funkcióromlást (Dumitriu et al., 2010, Bayer and Hausmann, 2011). Ováriumírtott állatok ösztrogén pótlása javította a teljesítményüket vízi útvesztő és passzív elhárító tanulási tesztekben, valamint pozitívan befolyásolta az állatok munkamemóriáját (Bimonte-Nelson et al., 2003). Az említett kognitív hatások hátterében az ösztrogén összetett neurofiziológiai szerepe áll, melyek közül a neurotranszmisszó, agyi plaszticitás és a neuroprotekciónak szabályozását fontos kiemelni.

2.2.3 Az ösztrogén hatása a szinaptikus plaszticitásra

Patkány hippokampuszának CA1 régiójában kimutatták, hogy a szinaptikus denzitás a proösztrozban legnagyobb és folyamatosan fluktuál a ciklus során az ösztrogén szinttel párhuzamban (McEwen and Woolley, 1994). In vitro hippokampusz sejt kultúrán is megfigyelték, hogy az ösztrogénkezelés fokozza a dentrit tüskék denzitását (Blanco et al., 1990). A hosszú-távú ösztrogén kezelés pedig a szinaptikus vezikulák számát is növeli a preszinaptikus térben (Xu and Zhang, 2006). A szinaptogenezis serkentését az ösztrogén feltehetőleg egyes szinaptikus és struktúrfehérjék expressziójának regulációján keresztül éri el. Az ösztrogén befolyásolja a szinaptofizin, szintaxin, szpinophilin valamint GAP-43 (growth-associated protein-43) fehérje gének expresszióját az agyban (Brake et al., 2001).

Az ösztradiol szabályozza az NMDA és glutamát receptorokat is (Cyr et al., 2001). A receptorok az un. hosszú távú potenciáció (long-term potentiation, LTP) kialakításában és fenntartásában kiemelkedő fontosságúak. Az LTP a tanulás és az hosszú-távú memória modellje, hosszú-távú feszültségmódusulás amelyben Ca^{2+} ionok és csatornák, intracelluláris kinázok és transzkripciós faktorok vesznek részt.

2.2.4 Az ösztrogén neuroprotektív és antioxidáns hatása

A kutatók megfigyelték, hogy a nők agysérülést követően gyorsabban épülnek fel, mint a férfiak (Herson and Hurn, 2010). Ez a jelenség nagyrészt az ösztrogének neuroprotektív hatásának tulajdonítható. Agyi ischaemia esetén ugyanis az ösztrogén jelenléte csökkenti a neuronok elhalásának mértékét, az elhalt terület nagyságát (Yong et al., 2005). Az ösztrogén redukálja az excitotoxicitást és a gyulladáshoz vezető folyamatokat is az agyban (Stein, 2001, Wise et al., 2009). A hormon neuroprotektív hatását valószínűleg anti-apoptotikus fehérjék expressziójának regulációján keresztül fejti ki. A pontos hatásmechanizmus bemutatására a disszertáció későbbi fejezetében kerül sor. Öregedésben és egyes neurodegeneratív betegségek prevenciójában igen fontos szerepet tulajdonítanak az ösztrogén antioxidáns hatásának is (Nilsen, 2008). A hormon képes redukálni a lipid peroxidációt (Vedder et al., 1999), protein oxidációt (Telci et al., 2002) és a DNS sérülés mértékét (Sierens et al., 2001). Kimutatták, hogy a nőstény patkányok agyában az életkor előrehaladtával kisebb az oxidatív sérülés mértéke, mint a hímekben (Borras et al., 2003). A hormon antioxidáns védő funkcióját így összefüggésbe hozták a nőstények várható magasabb átlagélettartamával (Vina et al., 2005).

Az ösztrogén közvetlenül valamint indirekt módon vesz részt a szabadgyökök elleni védelemben. Egyrészt a szteroid molekula 'A' gyűrűjének 3-as szénatomján elhelyezkedő hidroxil csoportja révén közvetlenül semlegesíti a reaktív oxigén gyököket (Manthey and Behl, 2006). Másrészt a hormon nukleális receptorain keresztül is kifejezheti antioxidáns hatását.

2.2.5 Az ösztrogén hatásmechanizmusa

Az ösztradiol sajtmagi és membránban elhelyezkedő alfa és béta típusú receptorain keresztül fejti ki hatását. Elsőként Pietras és Szego (1977) fedezett fel ösztradiol-kötő receptorokat edometrium sejtek membránjában. Feltételezték, hogy a membrán receptorok azonosak lehetnek a klasszikus magi receptorokkal, ugyanannak a génnek a termékei. Schleger és munkatársai feltételezése szerint az ösztrogén receptor α és β speciális membránstuktúráknak az ún. kaveoláknak caveolin-1 fehérjéihez kötődnek, melyekhez pedig további szignál molekulák asszociálódnak (Schlegel et al., 2001). In vitro patkány cortikális sejtjeinek membránjában azonosítottak egy, az ER α -tól és β -tól struktúráisan eltérő ER-X-nek elnevezett receptort is (Toran-Allerand et al., 2002), amely az ERK 1 és ERK 2 tirozin lánccának foszforilációját indukálja. Ez viszont felnőtt állatban csak is ischemia-okozta agyi sérülés után sikerült kimutatni (Toran-Allerand et al., 2002).

Az ER α szubtypus génje a 6. kromoszómán míg a β típus a 14. kromoszómán helyezkedik el (Enmark et al., 1997). Mindkét receptor protein rendelkezik ligand kötő domainnel, DNS kötő doménnel és két transzkripciós aktivitásért felelős doménnel (AF-1, AF-2) (Green et al., 1986). A két receptor nagymértékben homológ, a DNS-kötő doménjük 95%-ban azonos, a ligand kötő doménjük azonban csak 55%-ban egyezik meg. Ennek ellenére a 17- β ösztradiolt hasonló affinitással kötik (Kuiper et al., 1997). Mind az alfa mind a béta típusnak több splicing variánsa ismert (Hirata et al., 2003). Jelenleg a variánsok fiziológia jelentősége még nem ismert.

Az ER- α az agyalapi mirigyben, vesékben, mellékvesékben, míg az ER- β a prosztatában, tüdőben, méhben, herékben és a petefészekben mutat magasabb expressziót (Pelletier, 2000). Mind a két szubtypus megtalálható az agyban, ahol különböző eloszlást mutatnak. Az ER- α a hippocampuszban ventromediális hypothalamikus magban, ventrolaterális thalamus magvakban, amygdala oldalsó magvaiban, míg a béta szubtypus a hypothalamus paraventriculáris magvaiban, a ventrális tegmentális areában van főként jelen (Kalita and Szymczak, 2003). A receptorok eltérő expressziója feltehetőleg akét szubtypus különböző funkcionális szerepére utal.

Ami a receptorok sejten belüli elhelyezkedését illeti, az ösztrogén receptorok mind a

nukleuszban, mind a citoplazmában megtalálhatóak. Az ösztadiol ún. klasszikus hatásait magi receptoraikon keresztül fejti ki. Ligand hiányában a nukleális receptorok inaktív, monomer formában vannak jelen multiprotein komplexet képezve hőszokk fehérjékkel (pl. Hsp-90) (Hart and Davie, 2002). Ha a lipofil tulajdonságú ösztadiol a sejtbe diffundál, ahol a receptorával komplexet alkot. A komplex képződése indukálja a hőszokk-fehérjék levállását és a receptorok dimerizációját. A receptor-ligand komplexek a sejtmagba a kromatinhoz kötődnek. Az ösztadiol-ER komplexek vagy a célgének promoterének ösztrogén válasz eleméhez (ERE) kötődnek, vagy bizonyos transzkripciós faktorokkal (pl. NF kappa B, SP-1, aktivátor protein (AP)) interakcióban befolyásolják a génátírást (Stice and Knowlton, 2008).

Az ösztadiol gyors, ún. nem-klasszikus hatásait a citoplazmában jelen lévő szignál molekulák aktiválásán keresztül fejti ki (Ramirez and Zheng, 1996). Míg a genomiális hatások 4-8 órát vesznek igénybe, addig a citoplazmatikus kinázok aktiválása néhány másodpercen illetve percen belül megtörténik. Az intracelluláris kinázok gyors aktivációján keresztül az ösztadiol sokféle sejtfunkciót befolyásolhat (Weiss and Gurpide, 1988). A nem-klasszikus útvonal aktivációja a génexpressziót is megváltoztathatja, így a klasszikus és nem-klasszikus hatások biológiai szerepe átfedi illetve kiegészíti egymást (Ordóñez-Moran and Muñoz, 2009).

Az ösztrogén nem közvetlen genomiális hatásának legfontosabb közvetítője a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) (Migliaccio et al., 1996) és a PI3K (foszfatidilinozitol-3 kináz)/ Akt messenger útvonalak (**4.ábra**) (Honda et al., 2000). A MAPK szignálútvonal komponensei aRas, B-Raf, MEK és a MAPK (ERK1/2) fehérjék, melyek szevenciális foszforilációja számos citoplazmatikus szubsztrát aktivációját idézi elő. Az aktivált ERK 1/2 a sejtmagban génexpressziót szabályozó transzkripciós faktorokkal lép interakcióba (Seeger and Krebs, 1995). A jelátviteli útvonal olyan alapvető fiziológiai folyamatokat szabályoz, mint a sejtproliferáció, -differenciáció és sejt túlélés (Fukunaga and Miyamoto, 1998). Több tanulmány igazolja, hogy az ERK1/2 útvonalnak fontos szerepe van az a kognitív funkciókban, idegi plaszticitásban, a tanulásban és a memória kialakulásában a CREB aktiváción keresztül (Sweatt, 2004, Thomas and Huganir, 2004, Giovannini, 2006).

A CREB transzkripciós faktor (c-AMP response element binding) a memóriaformálás

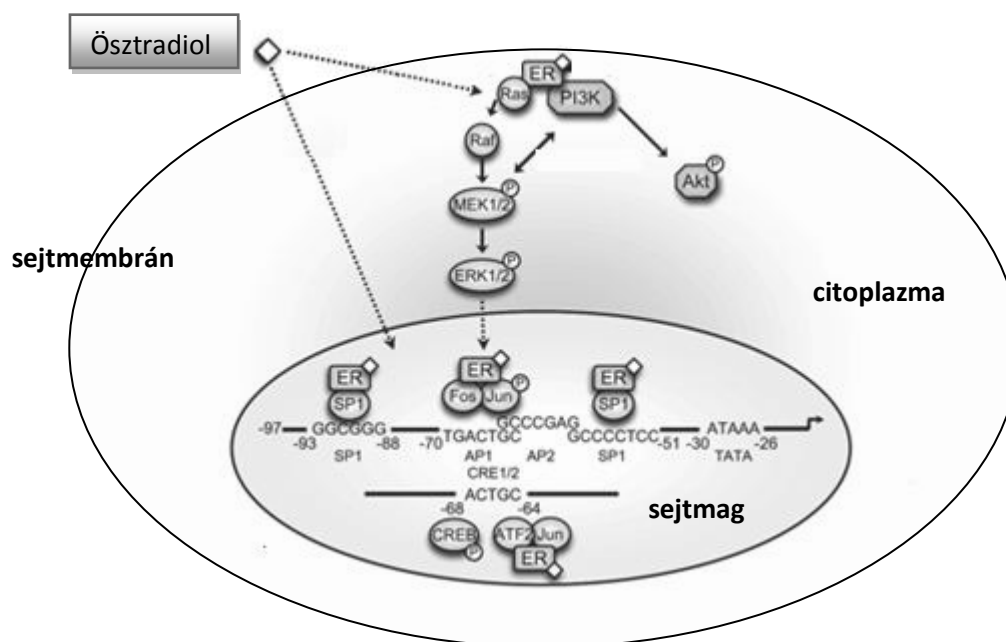
és a neuronok túlélésének egyik fő irányítója (Lamprecht, 1999). A CREB 43 kDa molekulású fehérje, amely a CRE (cAMP response element) promoterral rendelkező gének expresszióját regulálja (Montminy et al., 1990). Géntermékei részt vesznek az új szinapszisok kialakításában (Alberini, 2009), az LTP (long-term potentiation) indukálásában, azaz a memóriaformálás molekuláris folyamatainak szabályozásában (Murphy and Segal, 1997). A CREB expressziójának és szabályozásának megváltozása összefügghet a korral-járó memóriaromlással is. Kudo és munkatársai (2005) kimutatták, hogy a fiatal hím patkányok jobban teljesítettek a félelmen alapuló kondicionálási tesztben, mint az idősebb állatok, amit a fiatalabb állatok hippokampuszban az aktivált p-CREB magasabb immunreaktivitásával magyaráztak a kutatók.

A CREB fehérje részt vesz a sejt túlélés szabályozásában is; ischemiás modellben, CREB foszforiláció hatására nőtt a sejt túlélés a hippokampusz CA1 régiójában (Walton et al., 1996).

Az ösztadiol kezelés a MAPK/CREB kaszkád mellett PI3K/Akt az útvonal aktivációján keresztül is kifejtheti neuroprotektív és antiapoptotikus hatását az agyban. Az ösztadiol receptorán keresztül foszforilálja az Akt (protein kináz B) molekulát (Simoncini et al., 2000). Az Akt az apoptózis folyamatát irányítja, ugyanis képes foszforilálni, és így inaktiválni számos apoptotikus szubsztrátot (BAD-ot, capsase-9-et a GSK 3-t és forkhead transkripciós faktorokat). Emellett a sejtben indukálja a Bcl-2, a Bcl-xL, és több antiapoptotikus gén átírását (Franke et al., 1997). A BAD és BAX fehérjék a mitokondrium membrán permeabilitását fokozzák, míg a Bcl-2 és Bcl-X a mitokondriális membrán integritásának és permeabilitásának szabályozásában vesznek részt (Boise et al., 1995). A mitokondrium membránpermeabilitás növekedése citokróm c kiáramlásához és az apoptózis folyamatának megindulásához vezethet (Yuan and Yankner, 2000).

A PI3K/Akt útvonal a sejt túlélés regulációja mellett részt vesz az inzulin jelátviteli útvonal szabályozásában (Whiteman et al., 2002). Aktivációja a GLUT-4 glükóz transzporter áthelyeződését indukálja a citoplazmából a membránba, valamint szabályozza a GLUT-1 és GLUT-3 expresszióját (Hajdúch et al., 1998). Kísérletes (Gonzalez et al., 2003) és klinikai (Karjalainen et al., 2001) tanulmányok igazolják, hogy az ösztrogén hormonpótlás segít fenntartani az inzulin szenzitivitást menopauza

után, amely feltehetőleg az említett jelátviteli útvonal aktivációjával magyarázható. Idős patkányok izmában az ösztradiol kezelés a GLUT-4 transzlokációját indukálta és javította a glükóz homeosztázist (Moreno et al., 2010).



4. ábra

Az ösztradiol szignalizációs mechanizmus illusztrációja

Az ösztradiol a sejtmembránon diffúzióval átjut és a sejtmagban valamint a citoplazmában receptorához kapcsolódik. A citoplazmában a MAPK és PI3K szignálkaskádok aktivációját idézi elő. Az ERK 1/2 sejtmagba jut, ahol transzkripciós faktorokkal (pl. CREB) interakcióban szabályozza a génátírást. A nukleáris ösztrogén receptorok a célgének ERE promoteréhez kötődnek illetve transzkripciós faktorokkal komplexeket képezve indítják el a transzkripciót. (az ábra másosítva Lee et al. (2001) után)

Az ösztadiol antioxidáns és mitokondriális funkciókat érintő hatásai az agyban még kevésbé ismertek.

Alfa és béta típusú ösztrogén receptorok jelenlétét a nukleusz mellett a mitokondriumban is kimutatták (Chen et al., 2004). Azonban még nem teljesen tisztázott, hogy az ösztrogénközvetlenül regulálja-e a mitokondriális DNS transzkripcióját a mitokondriumban, vagy a nukleuszban kódolt mitokondriális gének expressziójának szabályozásán keresztül befolyásolják a mitokondriális funkciókat. A legtöbb kutatási eredmény az utóbbi elképzelést támasztja alá. Stirone et al. (2005) kimutatták, hogy az ösztrogén kezelés hatására az NRF-1 fehérje mennyisége növekszik az agyi erekben. Az NRF-1 a sejtmagban expresszálandó 68 kDa molekulatömegű fehérje. Dimer formájában a nukleuszban kódolt mitokondriális gének NRF-1 válasz eleméhez kötődik és sejtspecifikusan regulálja a gének expresszióját (Scarpulla, 2002). Az NRF-1 számos mitokondriális és citoszolikus antioxidáns enzim gént, a mitokondriális légzési lánc komponenseinek egyes génjeit, a hem bioszintézis és a mitokondriális fehérje transzport génjeit, valamint több mint 400, a metabolizmusban, DNS replikációban és sejtciklus szabályozásában résztvevő gént szabályoz (Scarpulla, 2006a). Emellett alapvető szerepet játszik a nukleo-mitokondriális interakcióban, mivel szabályozza a mitokondriális DNS transzkripció faktorainak (mtTFA, mtTFB) expresszióját. Az mtTFA és mtTFB a mitokondriális DNS replikációjában is fontos szerepet játszik (Scarpulla, 2006b). Az ösztrogén az NRF-1/mtTFA kaszkádon keresztül sejtspecifikusan szabályozza a mitokondriális biogenezist is. Egér szívben az ösztrogén kezelés növelte a mtDNS mennyiségét, azonban agyban nem találtak változást (Irwin et al., 2008). Az NRF-1 transzkripció faktor koaktivátora a PGC-1 α , mely szintén szerepet játszik az antioxidáns enzim gének és mitokondriális funkciók szabályozásában (Valle et al., 2005). PGC-1 α hiányos állatokban neurodegenerációt, fokozott mértékű ROS produkciót és oxidatív károsodást figyeltek meg (St-Pierre et al., 2006). Így tehát feltételezhető, hogy az ösztrogén az említett transzkripció faktorokon keresztül képes szabályozni a neuronok redox egyensúlyát és ez által redukálni az öregedés során fellépő oxidatív károsodás mértékét. Jelenleg még kevés tanulmányban vizsgálták az ösztrogén kezelés és az említett transzkripció faktorok interakcióját a hippocampusban.

2.2.6 Hormonpótló terápia

A várható élettartam növekedése miatt a fejlett országok társadalmaiban a nők életük egyharmadát is leélhetik ösztrogénhiányos állapotban. Figyelembe véve a szexuálszteroid hiányállapot tüneteit valamint az ösztogén trofikus és protektív idegrendszeri hatásait, a hormonterápia alkalmazás egyre inkább előtérbe került a klinikumban. Azonban a Women's Health Initiative tanulmánya nemrégiben felhívta a figyelmet a posztmenopauzális hormonpótló kezelés mellékhatásainak veszélyeire (Rossouw, 2010). Az ösztrogén (Premarin) és szintetikus progeszteron (Provera) kombinált krónikus terápia növelte a stroke és az emlőrák kialakulásának kockázatát (Dougherty et al., 2004, Manson et al., 2007). A potenciális veszélyek miatt jelenleg a klinikai gyakorlatban csak indokolt esetben és szigorú orvosi felügyelet mellett alkalmazható ösztrogén-pótló terápia.

A gyógyszeres egészségmegőrzés kockázatait figyelembe véve egyre nagyobb figyelem fordult a nem-gyógyszeres prevencióra. Jól ismert, hogy a rendszeres fizikai aktivitás csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát, valamint véd az obezitástól és az annak következményeként gyakran fellépő kettes típusú cukorbetegségtől, magas vérnyomástól, osteoporózistól (Archer and Blair, 2011, Sturek, 2011, Suzuki, 2011). Az utóbbi években az is igazolódott, hogy a rendszeres testedzés az agyi funkciókat is befolyásolja (Gomez-Pinilla, 2008). Így tehát felmerülhet a kérdés, hogy a rendszeres testmozgás az ösztrogén kezeléshez hasonlóan preventív lehet-e az agy öregedésében és az milyen molekuláris változásokat indukál az öregedő és idős állatok hippocampusában.

2.3 A testmozgás neurobiológiai hatásai

2.3.1 A testmozgás hatása a kognitív képességekre

Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy, a rendszeres fizikai aktivitás neurodegeneratív betegségek esetén lassítja a betegség lefolyását. Alzheimeres betegek mozgásterápiája csökkentette a betegség depresszív tüneteit, javította a fizikális és kognitív teljesítőképességet a nem aktív betegekhez képest (Teri et al., 2003). A klinikai tanulmányokkal párhuzamban több neurodegeneratív betegség állatmodelljein végzett kutatás is megerősíti a testmozgás neuroprotektív szerepét. A Huntington szindróma transzgenikus egér modelljében az edzés mérsékelte a kognitív funkciók romlását (Pang et al., 2006). AD modell esetén pedig javította a térbeli tanulást és a memóriát (Liu et al., 2011). A transzgenikus AD egérben a rendszeres testmozgás csökkentette a hippocampusban az amyloid plakkok mennyiségét és fokozta az APP degradációját. (Adlard et al., 2005). A testmozgás ischaemiás agysérülés esetén is pozitív hatású, támogatja a funkcionális rehabilitációt (Rabadi, 2007).

Egészséges állatokon végzett kísérletek is bizonyították a fizikai aktivitás pozitív hatásait a hippocampus- függő tanulási és memória funkciókra (Fordyce and Farrar, 1991, van Praag et al., 2005b). Patkány modellekben a mozgás javította a térbeli tanulást Morris Maze tesztben valamint pozitív hatással volt a rövid-távú memóriára passzív elhárító és új tárgy felismerési tesztekben (van Praag et al., 2005a, Radak et al., 2006, O'Callaghan et al., 2007) felnőtt állatokban. *A hosszú-távú, krónikus testmozgás öregedő és idős állatok kognitív képességeire kifejtett hatásairól azonban egyelőre kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre.*

2.3.2 A testmozgás hatása a neurogenesisre, szinaptikus plaszticitásra

Fizikai aktivitás hatására jelentős morfológiai változásokat figyeltek meg a hippocampus gyurus dentatus régiójában. Mozgás hatására nőtt a dentritek hosszúsága, a neuronális kapcsolatok komplexitása, továbbá intenzív neuronális progenitor sejt proliferációt és neurogenesiszt mutattak ki az említett agyterületen (Eadie et al., 2005). Önkéntes fizikai aktivitást végző egerek agyában már 5 nap után 30%-al több újonnan képződött sejtet mutattak ki mint a nem edző állatokéban (van der Borgh et al., 2009).

Az újonnan képződött sejtek funkcionális jelentősége egyelőre nem tisztázott. A felnőtt agyban képződő neuronok feltételezhetően szerepet játszanak a tanulási folyamatokban (van Praag, 2008). A neurogenesis indikációja leggyakrabban Brdu jelöléssel történik. Emellett doublecortin (DCX) ellenanyaggal is detektálhatóak az újonnan képződött sejtek az agyban. A neuronális precursor sejtek a sejtosztódás kezdetén expresszálják a doublecortint, így a fehérjét a neurogenesis egyik elfogadott markereként tartják számon (Couillard-Despres et al., 2005).

Idős korban csökken a neurogenesis mértéke a hippocampusban, így kisebb a DCX expressziója is (Seki and Arai, 1995). *Kérdéses lehet, hogy a rendszeres testmozgás képes-e kompenzálni a korrall járó neuronpusztulást illetve képes lehet-e neurogenesiszt indukálni időskorban.*

A fizikai aktivitás a neurogenesis mellett befolyásolja a szinaptikus plaszticitást. DNS microarray vizsgálatban kimutatták, hogy mind az akut, mind a hosszú-távú edzés megváltoztatta a szinaptikus plaszticitásban szerepet játszó gének expresszióját a hippocampusban (Tong et al., 2001). A neurogenesisben és szinaptikus fehérjék szabályozásában fontos szerepet játszanak a növekedési faktorok. Az edzés megnövelheti a BDNF, IGF-I, VEGF és NGF neurotrofinok mennyiségét (Ding et al., 2006a), amelyek a későbbi részletezésre kerülő szignál transzdukciós útvonalon hatnak és befolyásolhatják a neuro,- és szinaptogenetikus folyamatokat. Öregedés során valamint neurodegeneratív rendellenességekben a szinapszisok degradálódását a szinaptikus markerek mennyiségi csökkenése is jelzi (Harrison and Eastwood, 2001). *Felmerülhet a kérdés, hogy a fizikai aktivitás képes-e mérsékelni a szinaptikus fehérjék kor-függő csökkenését.*

2.3.3 A testmozgásszerepe a redox rendszer szabályozásában

Az intenzív fizikai aktivitás a fiziológiásnál nagyobb mértékű reaktív oxigén gyök (ROS) produkcióval jár a megnövekedett oxigénfelhasználás miatt (Powers and Jackson, 2008). Azonban bebizonyították, hogy a rendszeres fizikai aktivitás preventív hatású lehet olyan betegségekben, amelyek etiológiájában az oxidatív stressz is közrejátszik (Radak et al., 2005). Állatkísérletekben kimutatták, hogy a rendszeres aerob fizikai aktivitás nem okoz oxidatív stresszt a patkányok hippocampusában és csökkenti a szuperoxid képződését (Aksu et al., 2009). Az edzés a DNS sérülés és a lipid peroxidáció mértékét is csökkentette a patkányok agyában (Radak et al., 2001).

A jelenség hátterében az edzés hatására bekövetkező alkalmazkodás állhat, amely magában foglalja az antioxidáns és repair mechanizmusok adaptációját, valamint a redox-szenzitív jelátvivő rendszerek aktivációját. *Azonban a pontos hatásmechanizmus ismeretlen az agyban. További kérdés lehet, hogy az öregedés során fellépő fokozott mértékű oxidatív stresszt a testmozgás hogyan befolyásolja a hippocampusban.*

2.3.4 A testmozgás lehetséges hatásmechanizmusa az agyban

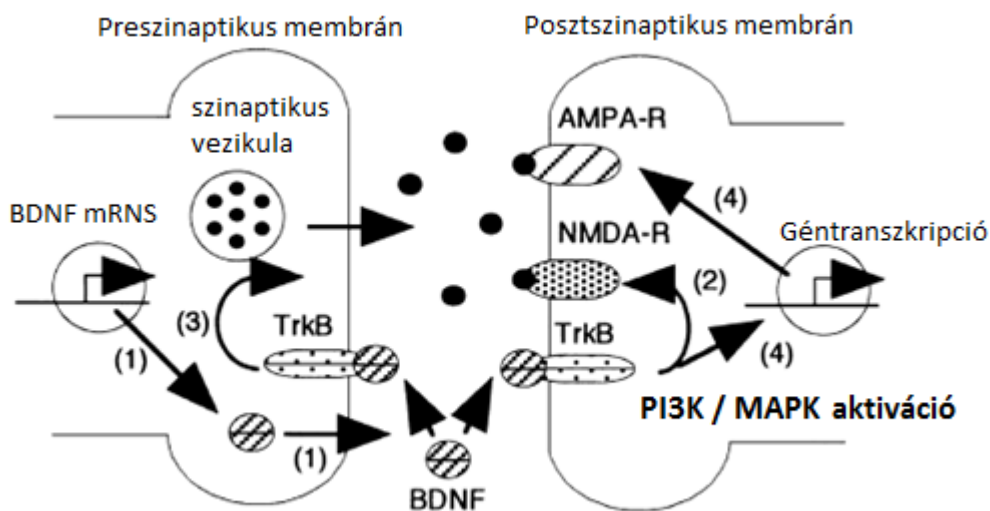
A fizikai aktivitás neurotrofikus és neuroprotektív hatását valószínűleg egyes növekedési faktorok aktivációján keresztül fejt ki. A mozgás-hatás legpotensebb közvetítői lehetnek a BDNF, IGF és VEGF fehérjék. Az IGF-1 a neurogenesisben (Trejo et al., 2001), míg a VEGF a neurogenesis mellett az angiogenesisben játszik fontos szerepet (Ding et al., 2006b). Vizsgálataink középpontjában a BDNF neurotrofin áll, mivel az IGF-1 és a VEGF trofikus faktorok életkor-függő hatását már korábban vizsgálta kutatócsoportunk (Koltai et al., 2011).

A BDNF igen széleskörű hatással van az agyra; befolyásolja a neurotranszmissziót (Kang and Schuman, 1995), szabályozza a szinaptikus proteinek mennyiségét (Vaynman et al., 2006), a neuronok túlélését (Lindholm and Beck, 1994) és a neurogenesiset (Choi et al., 2009, Lee and Son, 2009). Szerepet játszik a hosszú-távú potenciáció (LTP) létrehozásában a hippocampusban (Messaoudi et al., 1998), így a kognitív plaszticitás egyik igen fontos regulátora. Egan (2003) és mtsai kimutatták,

hogy a BDNF gén speciális polimorfizmusai tanulási problémákat okoznak embereknél. BDNF knockout transzgenikus állatoknál az LTP hiánya figyelhető meg, romlik a tanulási képességük és memóriájuk (Patterson et al., 1996).

A BDNF úgy indukálja az LTP-t, hogy foszforilálja az NMDA receptorok NR1 és NR2B alegységeit, aktiválja az AMPA receptorok GR1 alegységét valamint fokozza a glutamát jelátvitelt (Suen et al., 1997) (**5.ábra**).

A BDNF különböző szignalizációs útvonalakat aktiválhat a neuronokban. Az ösztrogénhez hasonlóan szabályozza PKB és MAPK szignálmolekulák foszforilációját (Ying et al., 2002). A szinaptikus molekulák regulációjában is fontos szerepet játszik a BDNF. A gén deléciója ugyanis egereknél a szinaptikus fehérjék és a neurotranszmisszió csökkenéséhez vezet (Pozzo-Miller et al., 1999). Munkám során aszinapszin I és szinaptofizin fehérjék mozgás hatására bekövetkező aktivációjával foglalkozunk részletesebben. A szinapszin I foszfoprotein a szinaptikus vezikulák szervezésében vesz részt, valamint modulálja a neurotranszmitter felszabadulást, az axonok elongációját (Thiel, 1993). A szinaptofizin a preszinaptikus vezikulák membrán komponense és a szinaptikus vezikulák biogenezisében és endocitózisában van szerepe (Daly et al., 2000). A molekulákat a szinaptikus denzitás fő markereiként tartják számon (Thiel, 1993).



5. ábra

A BDNF szerepe az LTP kialakításában és a génátírás szabályozásában

A neuronális aktivitás fokozódás indukálja a BDNF gén expresszióját és stimulálja a BDNF felszabadulását a periszinaptikus térben (1). A BDNF a pre és posztzinaptikus membránon lévő TrkB receptorhoz kötődik és a MAPK és PI3K szignálútvonalak aktivációját idézi elő. A szignálútvonalak szabályozzák a génátírást (4). A BDNF/TrkB aktiváció az NMDA receptorok foszforilációját váltja ki (2) valamint fokozza a neurotranszmitter felszabadulást (3). Ding et al. után (2006a)

A kutatók azt is kimutatták, hogy a BDNF részt vesz az energiametabolizmus szabályozásában is. Azok az egerek, amelyek BDNF gén deléciót hordoznak hiperfágiát és obezitást mutatnak (Rios et al., 2001). A BDNF perifériás vagy centrális infúziója csökkenti a testsúlyt és normalizálja a cukor szintet diabeteses állatokban (Tonra et al., 1999). A neuronok energiaegyensúlyának fenntartása elengedhetetlen a neuronális funkciók és plaszticitáspotenciális megőrzéséhez, azaz az idegrendszer egészséges öregedéséhez.

A sejt energiaháztartásának egyik központi regulátora az AMP kináz, amely a magas AMP/ATP arány illetve megváltozott redox és pH egyensúly hatásra aktiválódik. Az AMPK stimulálja a katabolitikus folyamatokat, serkenti a GLUT-4 transzlokációját, a glikolízist és a zsírsav oxidációt izomszövetben (Hardie, 2004). A tudományos eredmények alapján a GLUT-1-nek is fontos szerepe lehet a neuronok energiaszükségletének szabályozásában a tanulási folyamatok során (Choeiri et al., 2005).

Endothél sejtekben megfigyelték, hogy az AMPK szabályozza az PGC-1 transzkripciós faktort és a SOD antioxidáns enzim aktivitását (Kukidome et al., 2006), következésképp támogatja a mitokondriális funkciókat, szabályozza a sejtek oxidatív státuszát, csökkentheti reaktív oxigén gyökök képződését. Így tehát szerepet játszhat a sejt redox egyensúlyának szabályozásában is.

Az AMPK a testmozgás egyik igen fontos molekuláris hatáspontja a vázizomban. De jelenleg még nem tisztázott, hogy a hippocampusban a mozgás képes-e befolyásolni az AMPK-t és a molekulához köthető szignalizációs útvonalakat. Figyelembe véve az AMPK komplex szerepét a sejt energia,- és redox egyensúlyának fenntartásában, öregedés során fontos kérdés lehet az AMPK aktivációjának szabályozása a hippocampusban.

3. Célkitűzések és korlátozó tényezők

3.1 Célkitűzések

Doktori disszertációmban két kísérletben vizsgáltam a rendszeres aerob típusú fizikai aktivitás agy öregedésére kifejtett hatásait. Ennek megfelelően a célkitűzéseket a két vizsgálat köré csoportosítva a következőképp szeretném összefoglalni:

A. Kísérlet: A hosszú-távú ösztadiol kezelés és a hosszú-távú, közepes intenzitású aerob testmozgás hatása az agy öregedésére különböző életkorú nőstény patkányokban.

A. Az ösztadiol kezelés pozitív neurobiológiai hatása ugyan jól ismert, ám hatékonyságát az életkor függvényében még kevés munkában vizsgálták. Célunk tehát az ösztadiol hatásmechanizmusának életkorfüggő tanulmányozása. Vizsgálatunk során 15 hónapos idősödő és 27 hónapos idős patkányokat kezeltünk ösztadiollal. Patkányok esetén a 15 hónapos életkor felel meg a menopauza kezdeti állapotának, míg a 27 hónapos korban perzisztens anösztrozusz figyelhető meg. A menopauza állapotában bizonyítottan csökken az ösztrogén szint és azzal párhuzmában romlanak a kognitív képességek (Lapolt et al. 1988; Moorthy et al. 2005).

A legtöbb kutatásban OVX modellen vizsgálják az ösztrogénhiány illetve a hormonterápia hatásait. Ellenben fontos kérdés lehet, hogy milyen változásokat okoz az ösztrogénkezelés a természetes öregedés progressziója során, ezért kísérletünkben nem alkalmaztunk ovariumírtást az állatokon. Másrésztől vizsgálni kívántuk a 15 hónapos idősödő és 27 hónapos idős patkányok kognitív képességei közötti különbségeket és az öregedés során fellépő biokémiai változásokat a hippocampusban, ezért sem volt indokolt az ovariumírtás. Hipotéziseimet a következőképp fogalmaztam meg:

A1. Az öregedés során romlanak a hippocampus-függő kognitív képességek, a 27 hónapos korban az állatok várhatóan rosszabbul teljesítenek a kognitív tesztekben, mint a 15 hónapos állatok.

A2. Öregedés során csökken a neurotrofikus faktorok és a szinaptikus molekulák mennyisége, nő a szabadgyökök mennyisége és fokozódik az oxidatív károsodás mértéke a hippocampusban. A tartós ösztrogénhiány állapotában lévő állatokban csökkent az ösztrogén receptor mennyisége is a 15 hónaposokhoz képest.

A3. Az ösztrogénkezelés képes javítani a hippocampusz-függő kognitív képességeket 15 és 27 hónapos korban.

A4. Az ösztrogénkezelés a hippocampusban trofikus változásokat idéz elő mindkét életkorban. Feltételezésünk szerint az ösztrogén receptor expressziója megemelkedik, és az ösztrogén szignalizációs útvonal aktiválódik a kezelés hatására mindkét életkorban.

A5. Feltételezhetően a szinaptikus markerek szintje is megemelkedik a kezelések hatására mindkét életkorban.

A6. Az ösztrogén antioxidáns hatással rendelkezik, csökkenti a szabadgyökök és az oxidatív sérülés mértékét mindkét életkorban.

A7. Az ösztrogén képes befolyásolni redox állapotot és aktiválni a mitokondriális gének átírását szabályozó transzkripciós faktorokat a hippocampusban.

B. A rendszeres fizikai aktivitás hatásmechanizmusa az agyban az irodalmi adatokat figyelembe véve az ösztradiolhoz igen hasonló lehet, amely az összehasonlításunk alapját képezheti. Célul tűztük ki tehát, hogy összehasonlítsuk a hosszú-távú ösztradiol és hosszú-távú fizikai aktivitás kognitív és molekuláris neurobiológiai hatásait az életkor függvényében. Hipotéziseim szerint az ösztradiol kezelés és a rendszeres testedzés hatásai hasonlóak, mivel:

B1. A rendszeres testmozgás az ösztrogénkezeléshez hasonlóan képes javítani a hippocampusz-függő kognitív funkciókat 15 és 27 hónapos korban.

B2. A rendszeres testmozgás ösztrogénkezeléshez hasonlóan a hippocampusban trofikus változásokat idéz elő mindkét életkorban.

Feltételezésünk szerint BDNF és a DCX expressziója megemelkedik, és a MAPK/CREB illetve PI3K/CREB szignalizációs útvonal aktivációját idézi elő mindkét életkorban.

B3. Feltételezhetően a szinaptikus markerek szintje is megemelkedik a testmozgás hatására mindkét életkorban.

B4. A rendszeres tesmozgás befolyásolja a redox állapotot a hippocampusban mindkét életkorban.

B5. A testmozgás képes aktiválni a redox egyensúlyt,- és a mitokondriális gének átírását szabályozó transzkripciós faktorokat.

C. További célunk volt, hogy megvizsgáljuk, hogy, milyen változásokat tapasztalunk a felsorolt kognitív és neurokémiaifunkciókban, ha a két kezelést (mozgás és ösztadiol kezelést) együttesen alkalmazunk. Felmerült a kérdés, hogy a két kezelés kombinált alkalmazásával kiváltható-e additív hatás vagy ellenkezőleg, a faktorokgyengítik-e egymás hatásait.

B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.

D. Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás állatmodellje fontos új információkkal szolgálhat a testmozgás idegrendszerre kifejtett hatásairól, mivel a szakirodalomban eddig nem alkalmaztak hasonló modellt. A rendszeres testmozgás hatását a szakirodalomban akut mozgástréning után tanulmányozták ezidáig, így a krónikus, élethosszon át tartó mozgás idegrendszeri hatásai ismeretlenek.

Hipotézisünk szerint az élethosszon át tartó fizikai aktivitás preventív hatással lehet az agy öregedésére, javíthatja a kognitív képességeket, és több neuronális funkcionális rendszert befolyásolhat. Hipotéziseim az élethosszon át tartó testmozgás neurobiológiai hatásait illetően:

D1. A rendszeres, élethosszon-át tartó testmozgás képes javítani a hippocampusz-függő kognitív funkciókat.

D2. Az élethosszon-át tartó testmozgás hippocampuszban trofikus változásokat idéz elő mindkét életkorban. Feltételezésünk szerint BDNF és a DCX

expressziója megemelkedik, és a MAPK/CREB illetve PI3K/CREB szignalizációs útvonal aktivációját idézi elő.

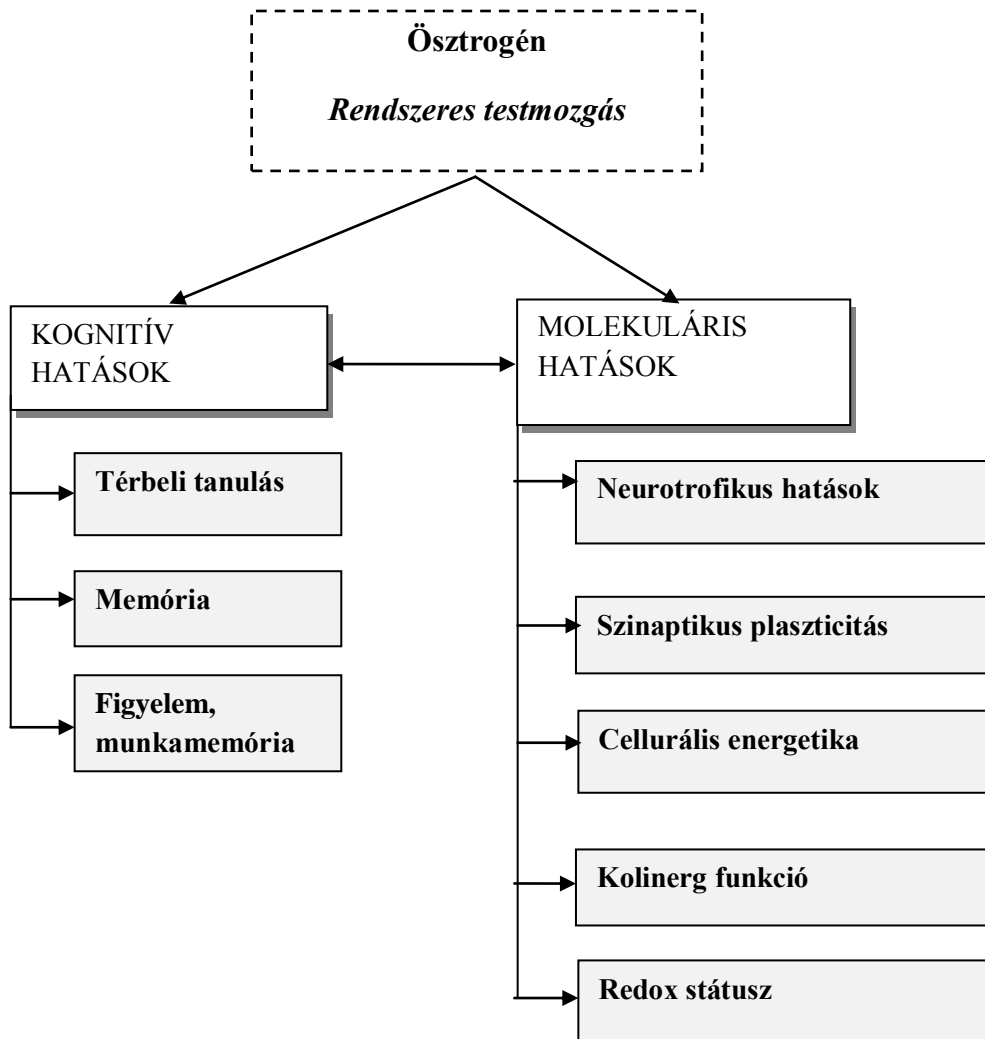
D3. Feltételezhetően a szinaptikus markerek szintje is megemelkedik az élethosszon-át tartó testmozgás hatására.

D4. Az élethosszon-át tartó testmozgás befolyásolja a redox állapotot a hippocampusban.

D5. Az élethosszon-át tartó testmozgás képes aktiválni a redox egyensúlyt,- és a mitokondriális gének átírását szabályozó transzkripciós faktorokat.

D6. Az élethosszon-át tartó testmozgás befolyásolja a kolinerg működést a hippocampusban, mivel megemeli az acetilkolin szintéziséért felelős kolin-acetil-szintetáz szintjét az agyterületen.

A kísérleteinkben vizsgált kognitív és molekuláris faktorokat a **6. ábra** szemlélteti



6. ábra

A kísérleteinkben vizsgált paraméterek

A kísérleteink során vizsgáltuk a kezelések hippokampusz-függő kognitív képességekre kifejtett hatásait valamint annak háttérében álló molekuláris változásokat a hippokampuszban.

3.2 Korlátozó tényezők

Vizsgálatim során számolnom kellett néhány, a lehetőséginkből adódó korlátozó tényezővel, amelyeket a következőekben szeretnék összefoglalni:

- Idősebb korú állatokban a különböző viselkedésvizsgálatok sokszor nehezen kivitelezhetőek, mivel az állatok aktivitása csökken a kor előrehaladtával, nehezebben alkalmazkodnak egyes szituációkhoz, ezért több 27 hónapos idős patkány nem teljesítette a teszt által támasztott követelményeket.
- Az hippocampusz működését nem csak az általunk vizsgált paraméterek határozzák meg, ám a munkám során nem volt lehetőségem a több faktor mérésére illetve más technikák alkalmazására. Ennek ellenére az irodalmi adatokra alapozva a kísérletben vizsgált fehérjék és gének kulcsfontosságúak a vizsgált funkciók tekintetében.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Kísérleti állatok

A. kísérlet

A kísérlet során 32 db 12 hónapos középkorú, és 32 db 24 hónapos idős nőstény Wistar patkányokkal dolgoztam. A 32 állatot szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C) tartottam 12-12 óras világos/sötét megvilágítási periódus alatt. A táplálékhoz és vízhez *ad libitum* hozzáférésük volt. A 32 db 12 hónapos állatot random módon 4 kísérleti csoportra osztottam. A 32 db idős állatot is random módon 4 kísérleti csoportra osztottam. A következő csoportokat hoztuk létre a *két életkoron belül*:

1. kontroll állatcsoport (C), melyek 0,1 ml/kg szezámolajat kaptak szubkután injektálva hetente kétszer.

2. edző állatcsoport (EX), melyek 0,1 ml/ kg szezámolajat kaptak szubkután injektálva hetente kétszer, valamint 18m/min sebességgel napi 30 percet futottak futópadon (**7.ábra**). A kísérlet kezdete előtt az állatokat hozzászoktattam a futópados futáshoz: 5 napon át a sebességet 10-ről 18 m/min –re emeltem.

3. ösztadiol kezelésben részesült állat csoport (E2), mely hetente 30 µg/ kg 17-β ösztradiolt (17 β-estradiol benzoate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kapott szezámolajba feloldva, szubkután injektálva. Az ösztradiolt hetente 2 adagra elosztva kapták az állatok.

4. ösztadiol illetve edzés együttes alkalmazása (E2+EX), az állatok a fent leírt módon ösztadiolt kaptak és futópadon futottak. Az injekció beadására mindig edzés után került sor.

A kísérlet 15 hétig tartott, majd leteszteltem a kognitív képességeiket. Az ösztadiol adagolás a tesztek során is folytatódott. Az állatok a tesznapokon is futottak a futópadon a tesztek befejeztével, kivéve a Morris vízi útvesztő tesz napjait. Az összes kognitív teszt befejeztével újabb 8 kezelési/edzés nap követett. 15 órával az utolsó edzési/kezelés után az állatokat szárazjégen történő altatást követően dekapitáltam. Az állatok máját,

petefészket, méhét, hipofízisét és mellékveséit elkülönítettem, megtisztítottam és lemértem. Az paraateriális és retroperitoneális zsírszövetet is kioperáltam és lemértem. A hippokampuszt az agy többi részétől lehűtött petricsészén elkülönítettem, lefagyasztottam és -80 °C-on tároltam a felhasználásig. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi és Etikai Bizottságának engedélyével és irányelvei alapján történtek.

B. kísérlet

A kísérlet során 16 db hím Wistar patkányokkal dolgoztam. A állatokat szobahőmérsékleten (22 ± 1 °C) tartottam 12-12 órás világos/sötét megvilágítási periódus alatt. A táplálékhoz és vízhez *ad libitum* hozzáférésük volt. A 16 hím állatot random módon 8-8 fős csoportokra osztottam:

1. kontroll állat csoport (C): ketrecükben ugyanolyan körülmények között éltek, mint az edző állatok, de nem végeztek testmozgást.

2. edző állat csoport (EX), melyek 3 hónapos koruktól 24 hónapos korukig 18 m/min sebességgel hetente háromszor 60 percet futottak futópádon.

Az edzési protokoll tehát 21 hónapig tartott. A kísérlet utolsó hetében leteszteltük a kognitív képességeiket.

Az állatok a tesz napokon is futottak a futópádon a tesztek befejeztével, kivéve a Morris vízi útvesztő tesz napjait. Az összes kognitív teszt befejeztével újabb 8 kezelési/edzés nap követett. 15 órával az utolsó edzési után az állatokat dekapitáltam. A hippokampuszt az agy többi részétől elkülönítettem, egyik és lefagyasztottam, -80 °C-on tároltam a felhasználásig, másik felét 8%-os paraformaldehidben fixáltam. Az állatkísérletek a Semmelweis Egyetem Állatvédelmi és Etikai Bizottságának engedélyével és irányelvei alapján történtek.



7. ábra

A patkányok futópados edzésmódjának szemléltetése

4.2 Magatartási tesztek

4.2.1 Nyílt porond teszt

Az open field vizsgálatban az állatok exploratív viselkedését, aktivitását, és az új környezethez való hozzászokását vizsgáltam (Walsh and Cummins, 1976; Nyakas et al. 1994). Ehhez a teszthez egy kör alapú, 80 cm átmérőjű fa open field arénát használtam, amit egy 35 cm magas fémhenger vett körül. Az aréna 20 szektorból állt, amelyek két kört (belső és külső) alkottak, amit felülről középen egy 40 W-os izzóval világítottam meg. Az állatokat az aréna közepére helyeztem, majd 5 percig figyeltem a viselkedésüket. A vizsgált paraméterek a következők:

Latencia – a folyamatos felderítő tevékenység megkezdésének látencia ideje másodpercben (sec.) kifejezve

Rearing – ágaskodás, mindkét mellső lábat felemelve. Az ágaskodások gyakoriságát (epizód) pontoztam, valamint az ágaskodás idejét szekundumokban mértük a fal mentén és az aréna belsejében elkülönítve.

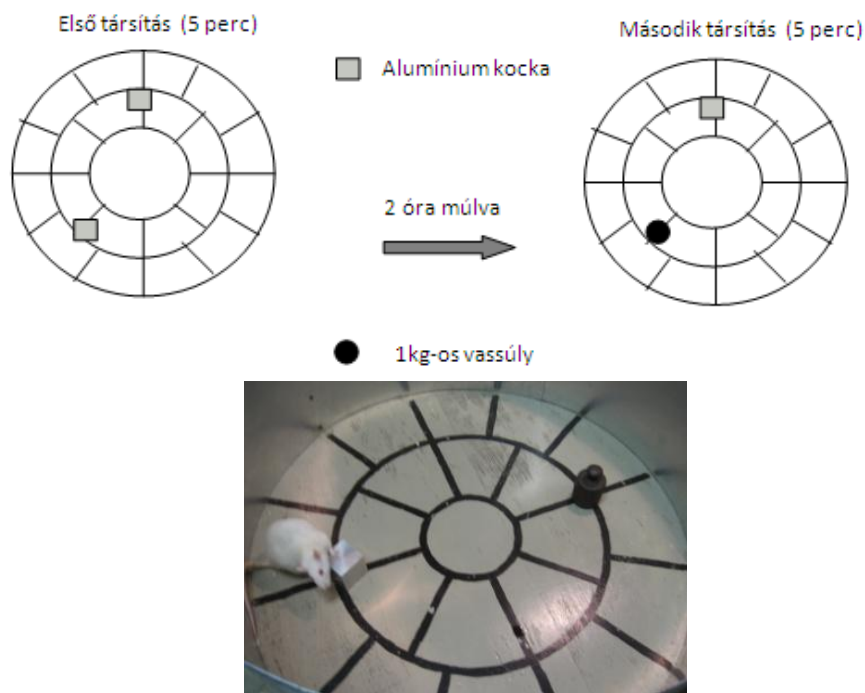
Crossing – a szektorok határvonalain történő áthaladások számát pontoztam a külső (fal melletti) és belső szektorokat elkülönítve.

Grooming – a grooming gyakoriságát pontoztam és időtartamát szekundumokban mértük.

Bolus – a defecatio mértékét a bolusok számával határoztam meg.

4.2.2 Új tárgy felismerése nyílt porondon

A figyelmi funkcióra épülő tárgy-felismerést ismert környezetben, nyílt porondon vizsgáltam (Nyakas et al., 2009) (**8.ábra**). A teszthez 80 cm átmérőjű, 35 cm magasságú open field arénát használtam. Az első társítás során 2 azonos tárgyat helyeztem a teszt doboz arénájába a faltól egyforma távolságra, a kör közepéhez képest aszimmetrikusan. Ezután az állatokat egyenként az aréna közepére helyeztem. A tárgyakat a patkányok 5 percig szabadon vizsgálhatták az első társítás során. Ezután visszakerültek a lakóketrecekbe. 120 perc elteltével került sor a második tesztfázisra. Két azonos tárgy közül az egyiket különbözőre cseréltem, ami anyagában, formájában, színében és felületi simaságban is különbözött az eredetitől. Az arénába behelyezett tárgyakat az adott állatnak mindkét esetben ugyanabba a pozícióba helyeztem, a különböző állatoknak különböző helyekre. A második társítás szintén 5 percig tartott. Azokat az egyedeket, amelyek legalább ötször nem látogatták az egyes tárgyakat, kizártam a vizsgálatból. A tárgy vizsgálatként értékeltem, ha az állat szagolgatta a tárgyat, amit az orr szőrének mozgása kísért, vagy hozzáértette az orrát a tárgyhoz; illetve ha a mellső lábával érintette a tárgyat. A tárgyra ülést nem tekintettem a tárgyvizsgálatának. A második társítás alatt az új tárgy iránti preferenciát mértem szekundumokban az összes, mindkét tárgyra irányuló vizsgálati időnek %-ában. Ha az állat nem ismerte fel, hogy az egyik tárgy egy új tárgy, körülbelül azonos (50-50 %) gyakorisággal látogatta mindkettőt (megismert és új) a második teszt során. Az 50%-os felismerési szint a valószínűségi szintnek felel meg és kizárja a figyelmi felismerést.



8. ábra

Új tárgy felismerési teszt**4.2.3 Spontán alternáció - Y útvesztő teszt**

Az Y-maze az állatok rövidtávú memóriájáról, az aktivitásáról, és a figyelemről ad információt (9. ábra) (Lalonde, 2002). A teszt doboz fekete műanyagból készült, karjai 50 cm hosszúak és 10 cm szélesek (egymással bezárt szögük 120°), falaik 30 cm magasak voltak. A teszt doboz padlójára tiszta almot (faforgács) szórtunk, amit minden vizsgálat után összekevertem, hogy a szagmintákat elimináljam. A patkányokat egyenként a három-karú teszt doboz közepére helyeztem, majd három percig hagytam őket szabadon vizsgálni a terepet. A teszt doboz karjaiba való belépések számát és helyét regisztráltam. Alternálásnak aszámított, ha az állat egy olyan karba lépett be, amit a két előző belépéskor nem látogatott. A relatív alternációt (%) a következőképpen számoltam: $(\text{alternációk száma} / \text{belépések száma} - 2) * 100$. Az alternáció hiánya ebben a tesztben a 33,3%-nak felel meg (véletlen szint).



9. ábra

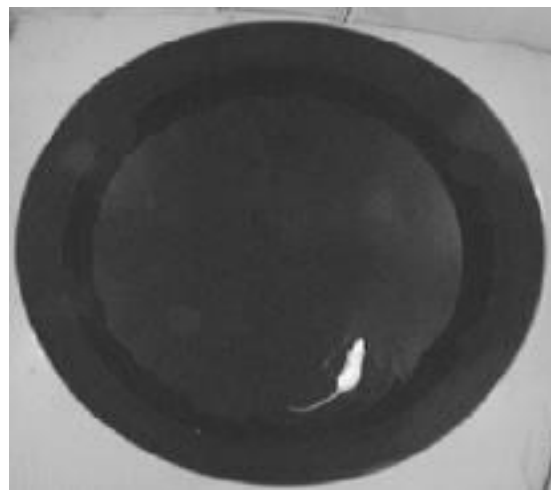
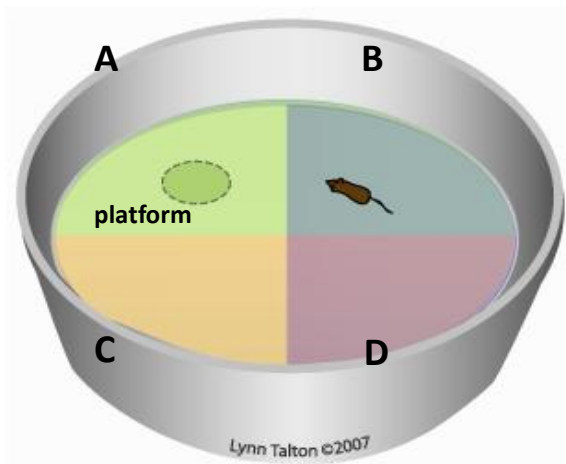
A spontán alternáció teszt szemléltetése

A vázlatos kép forrása: <http://www.biobserve.com/products/viewer/plugins/ymaze.html>

4.2.4 Morris vízi útvesztő teszt

A patkányok térbeli tanulási képességát Morris vízi útvesztő tesztben vizsgáltam (**10. ábra**) (Morris, 1984). Erre a célra egy fekete, 100 cm átmérőjű, 80 magas műanyag medencét töltöttem fel 53 cm magasságig $26 \pm 1^\circ\text{C}$ -os vízzel. A víz felszíne alatt 1,5 cm-rel medence egyik negyedének közepén (vagyis excentrikusan) helyezkedett el egy fixált 11 cm átmérőjű platform, aminek a pozíciója nem változott a teszt során. A középkorú állatokat 5 napig, míg az idős állatokat 7 napig teszteltem. A teszt során 4 egymástól egyenlő távolságra elhelyezkedő startpontot jelöltem ki a medence peremén. Az állatokat a startpontoknál helyeztem a vízbe, a medence fala felé fordítva őket. A startpontok helyzete random módon változott az egymást követő napok során, ám egy tesztnapon belül állandó volt. Minden állat egy nap 4 társításban részesült a 4 különböző startpontról. Egy társítás addig tartott, amíg az állat meg nem találta a víz alatt elhelyezett platformot. Erre maximum 90 másodperc állt rendelkezésére. Ha megtalálta az állat a platformot vagy letelt a 90 másodperc, az állatot ráhelyeztem a platformra, ahol 30 másodpercet pihenhetett, tájékozódhatott. Ezt követte még 3 társítás,

30 másodperces tájékozódási szakaszokkal. A platform megtalálásának látenciaidejét rögzítettem minden társítás során.



10. ábra

A Morris vízi útvesztő teszt szemléltetése

A vázlatos kép forrása: <http://btc.bol.ucla.edu/mwm.htm>

4.3 Biokémiai módszerek

4.3.1 Western blot

A patkányok féloldali hippokampuszát feldolgozásuk során elkülönítettem, lefagyasztottam és -80°C fokon tároltam. A fagyasztott szövetet homogenizáltam enzim gátlókat (1 μl /ml leupeptin hemiszulfát # L2884 Sigma, 1mM fenilmetánszulfonil fluorid, #P7626 Sigma, aprotinin, #A6279 Sigma, sodium orthovanadát, #S6508) tartalmazó lízis puffer oldatban (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% Nonidet P-40, NP-40S #74385 Fulka Biochemica, 10% glycerol #03490-101-340 Molar Chemicals). A homogenizált szövetet 30 percig inkubáltam a pufferben, majd 15 percig 15 300 g-n 4°C -on centrifugáltam. A felülúszót elválasztottam és -20°C -on tároltam felhasználásig.

A szövet fehérjetartalmát Bradford protein teszttel határoztam meg (Bradford and Williams, 1976). Minden mintából azonos (20 μg) protein mennyiséget választottam el 8-15% poliakrilamid gélen SDS poliakrilamid gélelektroforézissel. A fehérje sávokat PVDF nitrocellulóz membránra transzferáltam (Amersham, Piscataway, NJ). A membránokat 5% nem zsíros tejport tartalmazó TBS-Tweenben (Triss Buffered Saline Tween 20) blokkoltam szobahőmérsékleten 2 órán át, majd elsődleges ellenanyagban inkubáltam (felhasznált elsődleges ellenanyagok: **1. táblázat**) 4°C -on egy éjszakán keresztül. Ezután blokkoló oldatban hígított másodlagos ellenanyagban inkubáltam a membránokat, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Kemilumineszcenciás szubsztrát (ECL plus, RPN 2132, Amersham) segítségével X-ray filmen hívtam elő a fehérje bandeket, melyek intenzitását image J szoftverrel kvantifikáltam. A szoftver a fehérje bandek optikai denzitását méri. A foszfoproteinek esetén a foszforilált forma denzitás értékeit a nem foszforilált forma denzitás értékeivel osztotam el. Nem foszforilált fehérjék esetén kontrollként β -aktint használtam.

1. táblázat *A kísérlet során felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagok*

elsődleges ellenanyag	forrás	hígítás	molekulasúly	katalógusszám
ER α	nyúl poliklonális	1:1000	66 kDa	# sc 542 Santa Cruz
CREB	nyúl monoklonális	1:1000	43 kDa	#AB3006 Upstate
p-CREB	nyúl poliklonális	1:1000	43 kDa	#05-807 Upstate
MAPK (Erk1/2)	nyúl poliklonális	1:1000	42 kDa	#9102 Cell Signaling
p-MAPK (Erk1/2)	egér poliklonális	1:2000	42 kDa	#9106 Cell Signaling
Akt	nyúl monoklonális	1:1000	60 kDa	#9272 Cell Signaling
p-Akt(Thr)	nyúl poliklonális	1:750	60 kDa	#9271 Cell Signaling
BDNF	nyúl poliklonális	1:1000	14 kDa	# sc 20981 Santa Cruz
synapsin I	nyúl poliklonális	1:500	77 kDa	#2315 Cell signaling
p-synapsin	nyúl poliklonális	1:1000	77 kDa	#2311 Cell signaling
synaptophysin	nyúl poliklonális	1:10000	38 kDa	# ab 23754 Abcam
ChAT	kecske poliklonális	1:500	69 kDa	# ab50415 Abcam
GLUT-1	kecske poliklonális	1:500	55 kDa	# sc 1605 Santa Cruz
PGC1 α	nyúl poliklonális	1:1000	90 kDa	# sc 13067 Santa Cruz
NRF-1	nyúl poliklonális	1:1000	68 kDa	# sc 33771 Santa Cruz
mtTFA	kecske poliklonális	1:1000	25 kDa	# sc 30963 Santa Cruz
DCX	kecske poliklonális	1:500	45 kDa	# sc 8066 Santa Cruz
AMPK	nyúl poliklonális	1:1000	62 kDa	# 2532 Cell Signaling
p-AMPK	nyúl poliklonális	1:1000	62 kDa	# 2531 Cell Signaling
SOD-1	kecske poliklonális	1:1000	17 kDa	#AV45752 Sigma-Aldrich
SOD-2	egér poliklonális	1:1000	20 kDa	#SAB1406465 Sigma-Aldrich
GPx	nyúl poliklonális	1:1000	20 kDa	#7283P1 Sigma-Aldrich
β aktin	egér poliklonális	1:1000	43 kDa	# sc 81178

Másodlagos ellenanyagok			
Anti goat IgG	1:5000		# A5420 Sigma
Anti mouse IgG	1:5000		# A2554 Sigma
Anti rabbit IgG	1:5000		# A9169 Sigma

4.3.2 Plazma hormonszint meghatározások

A patkányoktól egyenként 2 ml vért vettem a dekapitálás során. A vérmintákhoz 50 µl heparint adtam. A mintákat 2 percig 153000g fordulatszámom centrifugáltam, azt követően avérplazmát elkülönítettem és -80 °C fokon tároltam. Az ösztradiol és kortikoszteron mennyiségét a vérplazmában ELISA kittel határoztam meg a gyártó utasításai szerint. (*Estradiol EIA kit, #5882251, Corticosterone EIA kit, #500651, Cayman, USA*).

4.3.3 Reaktív oxigén gyökök meghatározása

A reaktív oxigéngyökök meghatározására Kim és munkatársai által közölt fluorometriás módszert használtunk (Kim et al., 2000). A meghatározást fluorimetriás célra alkalmas fekete műanyag, 96 lyukú fekete palte-en végeztem. A H₂DCF-DA-ból (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, #D-399 Invitrogen) 15.5 mM töménységű törzsoldatot állítottam elő. A plate mélyedéseibe egyenként 8 µl frissen előállított hippokampusz homogenátumot, 152 µM töménységű kálium foszfát puffert és 40 µl H₂DCF-DA törzsoldatot adtam. Az oxidált H₂DCF-DA által kibocsátott fluoreszcens szignált fluoriméterrel mértem 0, 1 és 30 perc elteltével (exikációs/emissziós hullámhossz: 485-538 nm, Fluoroskan Ascent FL). A kapott eredményeket unit ROS/mg fehérje / perc egységben fejeztük ki.

4.3.4 A karbonilált fehérjék meghatározása

A karbonilált fehérjék mennyiségét Oxyblot kittel határoztam meg (#S7150, Chemicon/ Millipore Temecula) a gyártó előírásait követve. A fehérjéket 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-nal kezeltem 15 percig, majd szobahőmérsékleten inkubáltam az oldatot neutralizáló pufferben. Az átalakított fehérjéket 10% SDS-PAGE gélen futattam meg, majd PVDF membránra transzferáltam át az elektroforezis során molekulatömeg szerint elválasztott fehérjéket. A nem-specifikus kötőhelyeket 5%-os zsírintes tejpport tartalmazó Dulbecco's PBS-T-vel (0,05% Tween 20+Phosphate Buffered Saline) blokkoltam 4°C-on 3 órán keresztül. Ezt követően a membránt anti-DNP elsődleges ellenanyaggal inkubáltam (#S7150, Chemicon/ Millipore Temecula). Ezt követve a membránt 3 alkalommal PBST-ben mostam, majd HRP-másodlagos ellenanyaggal inkubáltam szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Három mosást követően az immunokomplexeket ECL plus reagens (ECL plus, #RPN 2132, Amersham) felhasználásával röntgenfilmen vizualizáltam. Ezt követően X-ray filmen detektáltam a fehérje bandeket, melyet image J szoftverrel kvantifikáltam. A szoftver a fehérje bandek optikai denzitását méri. Kontrollként β -aktint használtam.

4.3.5 Génexpressziós vizsgálatok

Génexpressziós vizsgálatokra a B. kísérletnél került sor. 5 futó és 5 kontroll állat hippokampuszából. Az agyterületrőláz RNS-t kit segítségével (*Total RNA Isolation Nucleo Spin RNA II*, #740955.10m Macherey-Nagel) izoláltam a gyártó utasításai szerint. Az izolálás során nyert RNS-ből cDNS-t szintetizáltam annak megfelelő kit felhasználásával (*cDNA Synthesis kit*, #Biol-65026, Bioline).

A real time PCR reakciókat Rotor-Gene 6000 (*Corbett Research, Australia*) készüléken végeztem. A polimeráz láncreakciókban keletkező termékek detektálásához SYBR Green interkalálódó festéket (*EVA-Green*, #31000, Biotium), valamint ImmoMix (*#IMX-110C, Bioline*) reagenst használtam. A SYBR Green I a duplaszálú DNS-hez kötődik, foton formájában leadott többletenergiaja 530 nm-en detektálható. A bekötődött SYBR Green I mennyisége, és így a detektált jel nagysága arányos a kettős

szálú DNS hosszával és mennyiségével. Mivel a SYBR Green I minden duplaszálú DNS-hez képes kötődni, a hibás koncentráció érték elkerülése érdekében a kapott PCR termékeket az olvadási görbe analízisen kívül még minden esetben agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztem. A következő PCR körülményeket alkalmazva: 95 °C 10 perc; 95°C 15 másodperc, 60 °C 1 perc (40 cikluson keresztül).

A minták „cycle threshold” (Ct) értékei a PCR reakció során minden gén esetében a 20-40 ciklusok közötti tartományba esett. Az egyes gének expresszióját relatív kvantifikálással határoztam meg az úgynevezett $\Delta\Delta Ct$ formulát használva. A kezelt minták endogén kontrollal való normalizált (ΔCt) expressziós értékéből kivontam a kezelt minták értékeit ($\Delta\Delta Ct$), majd a relatív expressziót a PCR hatékonyságának figyelembe vételével határoztam meg ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A PCR reakció során használt primereket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat *A PCR reakció során alkalmazott primerek*

er alpha	F	5' AGGAGACTCGCTACTGTGCTG 3'
	R	5' ATCATGCCCACTTCGTAACAC 3'
synaptophysin	F	5' TCTTCCTGCAGAACAAAGTACCG 3'
	R	5' GCCAGGTGCTGGTTGCT 3'
glut-1	F	5' GCCTGAGACCAGTTGAAAGAAC 3'
	R	5' CTGCTTAGGTAAAGTTACAGGAC 3'
bax	F	5' TCCAGGATCGAGCAGA 3'
	R	5' AAGTAGAAGAGGGCAACC 3'
bcl2	F	5' CTGGTGGACAACATCGCTCTG 3'
	R	5' GGTCTGCTGACCTCACTTGTG 3'
bdnf	F	5' TGCGAGTATTACCTCCGCCAT 3'
	R	5' TCACGTGCTCAAAGTGTCAG 3'
synapsin I	F	5' CCGCCAGCATGCCTT C 3'
	R	5' TGCAGCCCAATGACCAAA 3'
ampk	F	5' GACTGGACATAAAGTTGCTGTGAAG 3'
	R	5' GGATTTTCCCGACCACGTC 3'
pgc1alpha	F	5' CGCACAACTCAGCAAGTCCTC 3'

	R	5' CCTTGCTGGCCTCCAAAGTCTC 3'
creb	F	5' GCCTCTGGTGATGTACAAACATACC 3'
	R	5' GGGAGGACGCCATAACAACCTC 3'
nrf-1	F	5' ATGGAGGAACACGGAGTGAC 3'
	R	5' GCTTTTTGGGACAGTGAAAT 3'
tfam	F	5' GCTTCCAGGAGGCTAAGGAT 3'
	R	5' CCCAATCCCAATGACAACCTC 3'
catalase	F	5' TTATGGCCTCCGAGATCTTTTC 3'
	R	5' ACCTTGTCAGGTCAAATGGAT 3'
sod1	F	5' CGGATGAAGAGAGGCATGTT 3'
	R	5' CAATCACACCACAAGCCAAG 3'
sod2	F	5' CACTGTGGCTGAGCTGTTGT 3'
	R	5' CCAAGCAATTCAAGCCTCT3'
beta aktin	F	5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGG 3'
	R	5' GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG 3'
ChAT	F	5' GCCACATCG TTCACT CTC TTG 3'
	R	5' CGGTTTCAT AAGCAACACATC 3'

4.3.6 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai méréseket a Groningeni Egyetemen végeztük korábban publikált módszertani leírások alapján (Nyakas et. al 2003; Nimmrich et.al 2008). A fél patkány hippokampuszokat 4 %-os, foszfát-pufferelt paraformaldehid-oldatban (0,1 M; pH=7.4) kerültek a fixáló oldatba. A fixált agyak dehidratációjára ezután 30%-os szacharóz oldatban került sor +4 °C-on. A hippokampuszokból mikrotómmal 20 µm vastag metszetek készültek. Az immunhisztokémiához szabadon úszó (free-floating) metszeteket használtam. A metszetek mosása PBS-ben (pH 7.4) történt. Az endogén peroxidázok aktivitását 20 perces, 1 %-os H₂O₂-ben történő inkubálás blokkolta. 3X20 perc PBS (pH 7.4) mosás után a nem-specifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5%-os normál szérumoldat blokkolta (4 óra). Az inkubáció a primer ellenanyag oldatában 3-5 éjszakán keresztül történt, +4 °C-on. Ezután újból 5X20 perc PBS (pH 7.4) mosás következett, majd a szekunder ellenanyagban való 3-4 órás inkubálás szobahőmérsékleten. Az ABC reakciót (ABC Kit, 1:500; Vector) PBS mosás (5X 20perc) követte, majd a DAB reakció (0.05 % DAB in Tris-HCl; pH=7.6 + 0.01 %, H₂O₂; 5-30 perc). Az immunhisztokémia során felhasznált ellenanyagokat az 1. táblázat tartalmazza.

4.4 Statisztikai analízis

Az **A.** kísérlet során a kezelések hatásait különböző életkorokban két-irányú ANOVA-val értékeltem. Ezután csoportok összehasonlítását Fisher-féle post hoc tesztet végeztem. A spontán alternáció és az új tárgy felismerés esetében a nőstény állatokban is a 'véletlen szinthez' is hasonlítottam az adatokat (első esetben 33,3%; a második esetben 50% volt) Student's *t*-teszttel. A $p < 0,05$ értéket fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak. Az eredmények között az *F* értéket valamint a szignifikancia szintet tüntetem fel. Az ábramagyarázatokban a post hoc teszt eredményei szerepelnek, melyek értelmében: 15 hónapos állatok esetén * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. azonos korú kontroll; 27 hónapos korban : # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs. azonos korú kontroll.

Az egész életen át tartó edzés hatásainak vizsgálata esetében az eredmények kiértékeléséhez két mintás *t*-próbát használtam. Az eredményekben a szignifikancia szint szerepel. Az ábraalíráásokban a post hoc teszt eredményei szerepelnek, melyek értelmében: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. kontroll.

5. Eredmények

5.1 A. *Kísérlet: A hosszú-távú ösztadiol kezelés és a hosszú távú fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére különböző életkorú nőstény patkányokban.*

5.1.1 *Kognitív tesztek eredményei*

Életkorral járó változások

Nyílt porond tesztben a 27 hónapos állatok szignifikánsan hosszabb látenciaidővel kezdték meg az explorációt, mint a 15 hónapos állatok ($F=5,42$, $p<0,05$). A 27 hónapos patkányok explorációja kevesebb volt, mint a 15 hónapos állatok explorációja ($F=74,44$, $p<0,01$). Az exploráció komponensei közül, mind a járkálási (járkálás belül+járkálás kívül), mind az ágaskodási aktivitás kevesebb volt az idős patkányoknál, a középkorú állatokkal összehasonlítva ($F=68,58$, $p<0,01$; $F=.66$, 39 , $p<0,01$). Új tárgy felismerési tesztben a 27 hónapos patkányok új tárgy felismerése rosszabb volt mint a 15 hónapos állatoké ($F=6,43$, $p<0,01$).

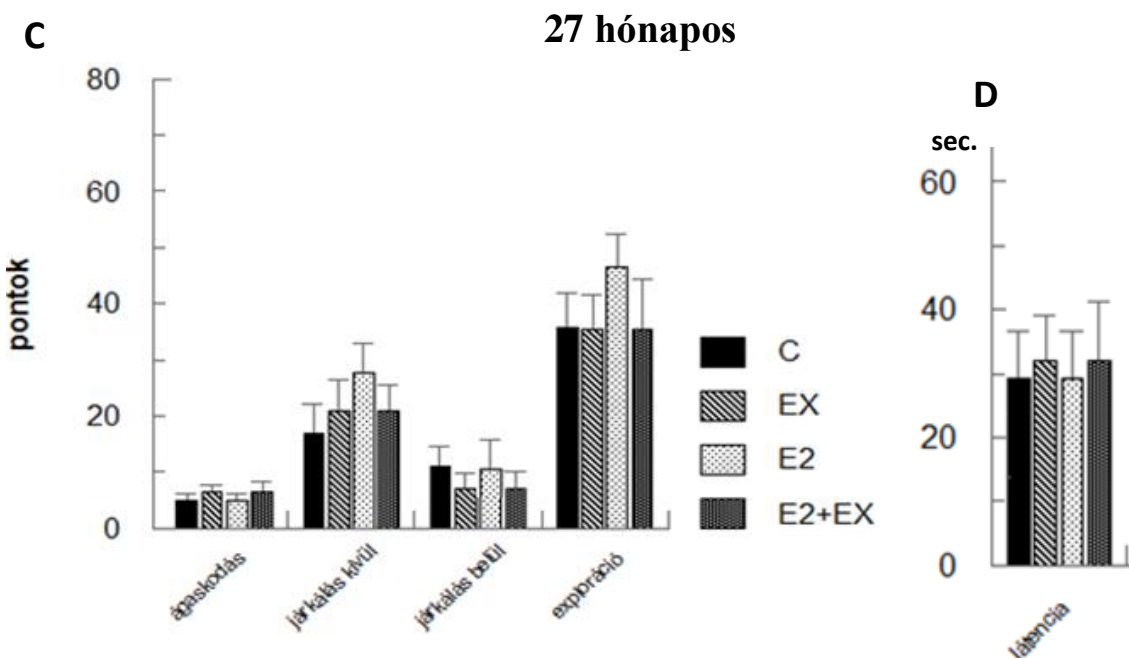
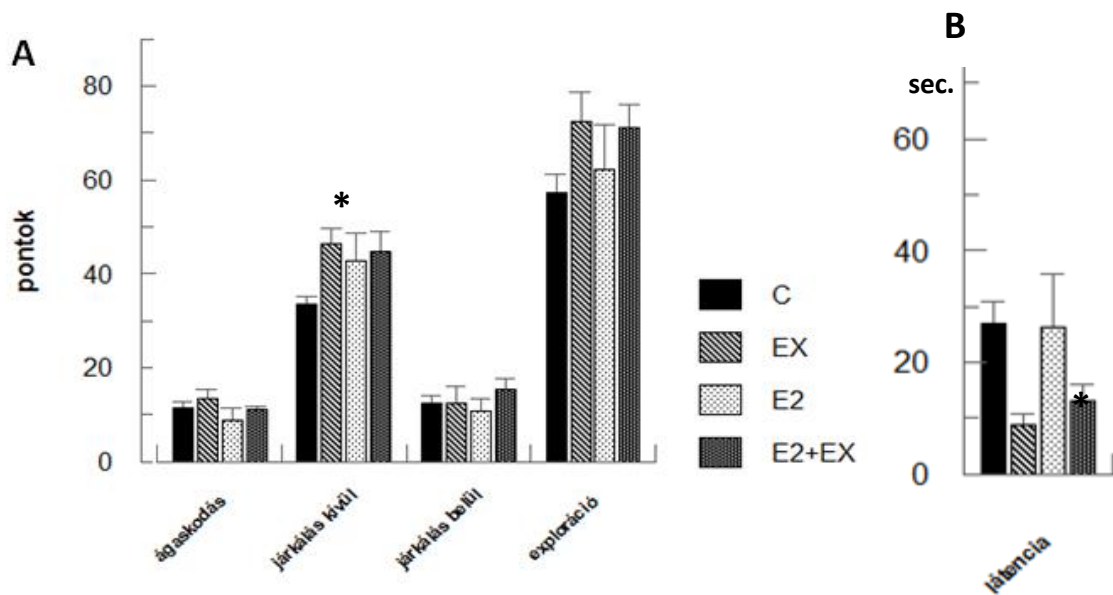
Spontán alternáció tesztben nem mértem szignifikáns életkor hatást.

Morris útvesztőben a két utas ANOVA szignifikáns életkor-hatást mutatott ki ($F=9,78$, $p<0,05$). A 15 hónapos állatok hamarabb találták meg a víz alatt elhelyezett platformot a kísérlet harmadik, negyedik és ötödik napján.

A kezelések hatása

Nyílt porond tesztben a 15 hónapos edző (EX) csoportban az exploráció megkezdésének látenciaideje szignifikánsan rövidebb volt, mint az azonos korú kontroll csoportban ($F=4,15$, $p<0,05$) (**11.B ábra**). A kombinált kezelés esetén isalacsonyabb látenciaidőt mértem, de ez a változás nem volt szignifikáns ($p= 0,08$). Emellett az exploráció horizontális komponensében mértem változást. A futó (EX) csoport járkálási aktivitása nagyobb volt a kontroll csoporttal összehasonlítva ($F=3,60$, $p<0,05$) (**11.A ábra**). A kombinált kezelést kapott csoport horizontális aktivitása is növekvő tendenciát mutatott ($p=0,78$). Az ösztrogén kezelés hatására egyik paraméter sem változott meg a tesztben. 27 hónapos idős állatoknál nem mértem szignifikáns változást egyik paraméterben sem a nyíltporond tesztben (**11.C/D ábra**).

15 hónapos

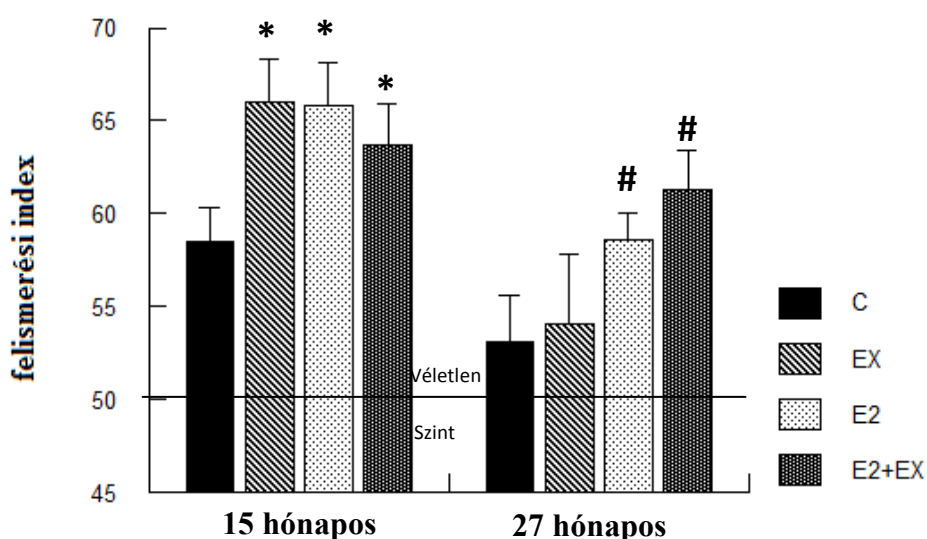


11. ábra

A nyílt porond teszt eredménye 15 hónapos és 27 hónapos korú csoportokban

Az állatok ágaskodási, járkálási és felderítő tevékenysége (exploráció) 15 hónapos csoportokban (A). Az EX csoport horizontális (járkálási) aktivitása nőtt. A felderítő tevékenység megkezdésének látenciaideje csökkent az EX csoportban 15 hónapos korban (B). 27 hónapos korban az ágaskodási és horizontális aktivitás nem változott a kezelések hatására (C). A látenciaidőben sincs változás a csoportok között (D). A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p < 0,05$ vs. azonos korú kontroll csoport.

Új tárgy felismerési tesztben szignifikáns kezelés-hatást mértem ($F=5,14$, $p<0,05$). A Fisher-féle post hoc analízis eredménye szerint, az edzés (EX), ösztradiol kezelés (E2) és a kombinált kezelések is (E2+EX) javították az új-tárgy felismerést 15 hónapos korban ($p<0,05$) (**12. ábra**). 27 hónapos korban az E2 és E2+EX csoportok teljesítettek jobban a tesztben azonos korú kontrollokhoz képest ($p<0,05$) (**12. ábra**). Az összes középkorú csoport a véletlen szint felett teljesítette a tesztet ($t=4,35$, $p<0,01$). Az idős csoportok közül az ösztradiolt és kombinált kezelést kapott csoportok ismerték fel az új tárgyat a véletlen szint felett ($t= 2,49$, $p<0,05$).



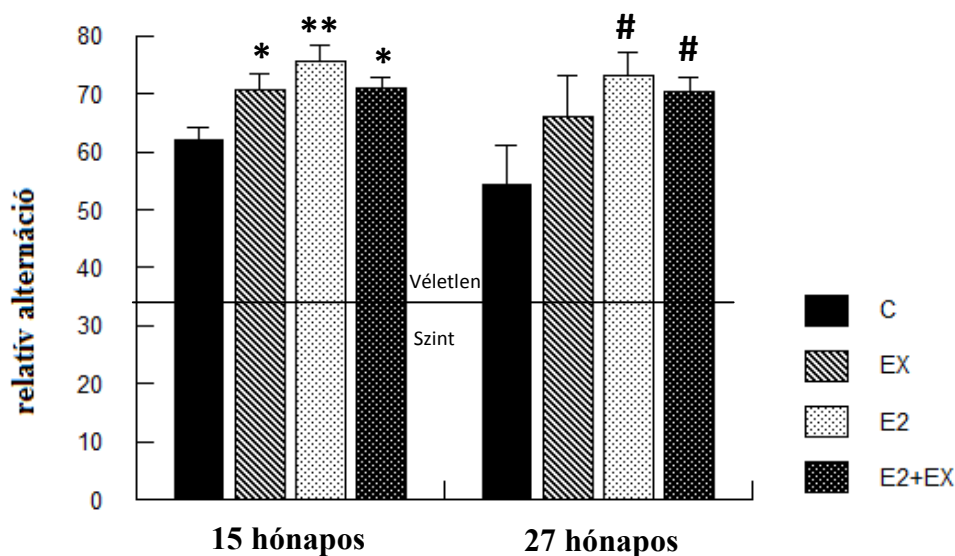
12. ábra

Az új tárgy felismerési teszt eredménye 15 és 27 hónapos korban

*A mozgás (EX), ösztradiol (E2), és kombinált (E2+EX) kezelések javították az új tárgy felismerést 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az ösztradiol (E2) és kombinált (E2+EX) kezeléseket kapott csoportok teljesítettek jobban az azonos korú kontrollokhoz képest. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p<0,05$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p<0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll.*

Spontán alternáció tesztben szignifikáns kezelés-hatást mértem ($F=6,90$, $p<0,01$).

Spontán alternáció tesztben az ösztrogén (E2) és kombinált kezelések (E2+EX) növelték az alternációk számát 15 hónapos és 27 hónapos korban egyaránt (**13.ábra**). Az edzés 15 hónapos állatok esetén javította a munkamemóriát ($p<0,05$). Minden középkorú és idős csoport a 33,33%-os véletlen szint felett teljesített ($t=6,39$, $p<0,01$).

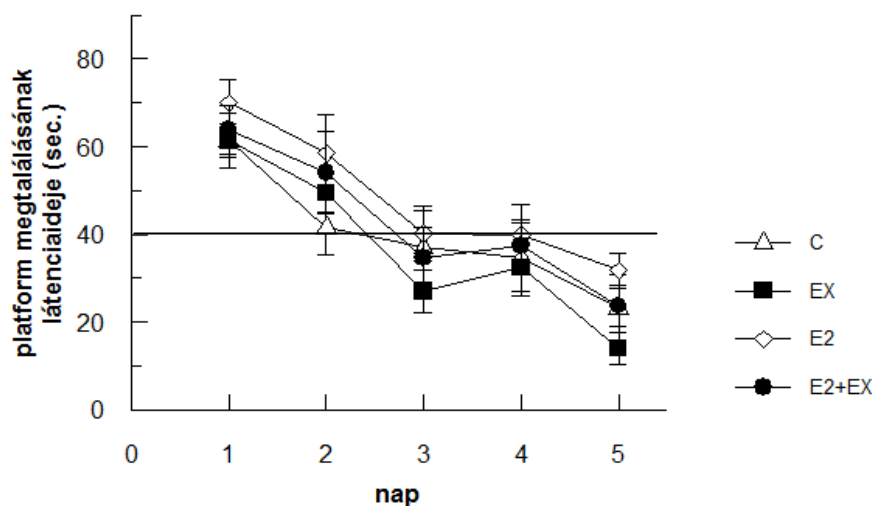
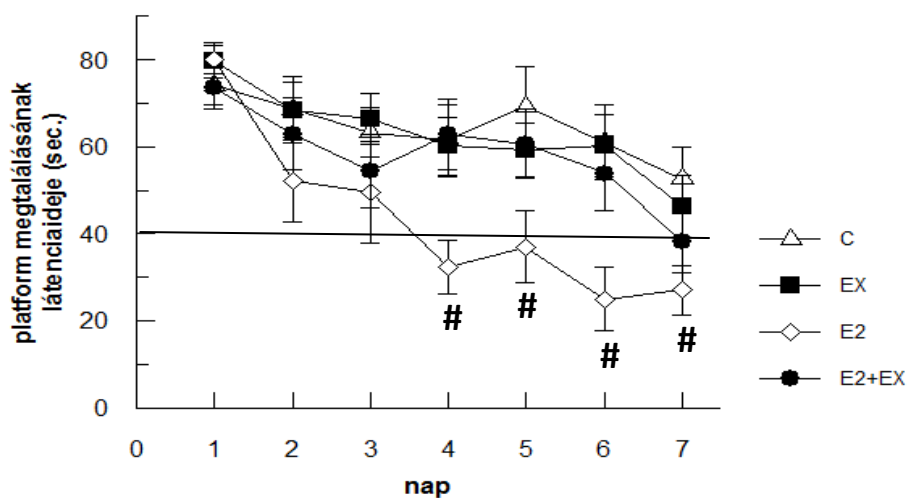


13. ábra

A spontán alternáció teszt eredménye 15 és 27 hónapos korban

*A mozgás (EX), ösztradiol (E2), és kombinált (E2+EX) kezelések növelték az alternációk számát 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az ösztradiol (E2) és kombinál (E2+EX) kezeléseket kapott csoportok teljesítettek jobban az azonos korú kontrollokhoz képest. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p<0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll.*

Morris vízi útvesztőben szignifikáns kezelés-hatást 27 hónapos korban figyeltem meg ($F=2,78$, $p<0,05$). Az ösztrogént kapott csoport (E2) gyorsabban találta meg a víz alatt elrejtett platformot a negyedik, ötödik, hatodik és hetedik napokon a kontroll csoporthoz képest (**14.B ábra**). 15 hónapos korban nem volt különbség a térbeli tanulásban a csoportok között (**14.A ábra**)

A**15 hónapos****B****27 hónapos****14. ábra**

A Morris vízi útvesztő teszt eredménye 15 (A) és 27 (B) hónapos korban

15 hónapos korban a térbeli tanulási képesség nem változott a kezelések hatására. 27 hónapos korban az ösztrodiol (E2) javította a térbeli tanulást, mivel a víz alatt elhelyezett platform megtalálásának látenciaideje rövidebb volt az E2 csoportban a 4. 5. 6. és 7. napokon. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM # $p < 0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll csoport.

5.1.2 A mért szervek súlya, zsírdepók mennyisége

Életkorral járó változások

A vizsgált szervsúlyok közül az méh súlyának tekintetében mutatható ki szignifikáns életkori hatás ($F=3,79$, $p<0,05$). A méh súlya kisebb volt az idős kontroll és idős edző állatoknál, a 15 hónapos csoportokkal összehasonlítva ($p<0,05$). A zsírdepók mennyisége (retroperitoneális+uterális zsír) nagyobb volt a 27 hónapos csoportokban, mint a 15 hónapos csoportokban (retroperitoneális zsír: $F=4,01$, $p<0,05$, uterális zsír: $F=6,42$, $p<0,05$) (3.táblázat).

Kezelések hatása

A statisztikai analízis szignifikáns kezelés-hatást mutatott a hipofízis súlyának tekintetében ($F=7,48$, $p<0,01$). A mirigy súlya nagyobb volt az E2 és E2+EX csoportokban a kontrollokhoz képest mindkét életkorban.

Edzés hatására (EX, E2+EX) mind 15 hónapos, mind 27 hónapos korban csökkent a retroperitoneális és uterális zsír mennyisége (retroperitoneális zsír: $F=3,55$, $p<0,05$, uterális zsír: $F=7,76$, $p<0,05$). A máj, petefészkek, mellékvesék és csecsemőmirigy súlya nem változott szignifikánsan a kezelések hatására egyik életkorban sem.

3. táblázat A vérplazma ösztradiol és kortikoszteron szintje, a hipofízis és méh súlya valamint a zsírdepók mennyisége 15 és 27 hónapos edző (EX), ösztradiolt (E2) és kombinált kezelést kapott csoportokban

A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p<0,05$ vs. 15 hónapos kontroll, # $p<0,05$ vs. 27 hónapos kontroll, ** $p<0,01$ vs. 15 hónapos kontroll, ## $p<0,01$ vs. 27 hónapos kontroll

kor	kezelés	kortikoszteron (ng/ml)	ösztradiol (pg/ml)	hipofízis (mg)	méh (mg)	retroperitoneális zsír (mg)	paraateráliszsír (mg)
15hó.	C	42,10 \pm 16,49	40,97 \pm 15,17	15,65 \pm 0,75	0,71 \pm 0,04	3,51 \pm 0,71	7,65 \pm 0,38
	EX	101,10 \pm 35,60	46,14 \pm 7,21	16,58 \pm 0,67	0,75 \pm 0,06	2,73\pm0,60*	5,54\pm0,46*
	E2	65,93 \pm 27,62	816,91\pm145,00**	23,01\pm1,99**	0,76\pm0,03*	2,85 \pm 0,83	6,18 \pm 0,39
	E2+EX	65,61 \pm 27,11	892,35\pm135,04**	25,41\pm2,82**	0,82\pm0,07*	2,61\pm0,15*	5,65\pm0,59*
27hó	C	115,53\pm19,57	14,30 \pm 3,20	16,48 \pm 2,42	0,53 \pm 0,07	9,88 \pm 1,74	17,43 \pm 1,75
	EX	101,54\pm23,56	16,72 \pm 2,70	17,80 \pm 3,15	0,45 \pm 0,08	5,84\pm1,09#	10,40\pm1,19#
	E2	111,57\pm33,45	333,33\pm55,36##	26,62\pm4,16##	0,92\pm0,09#	7,44 \pm 1,56	14,26 \pm 1,66
	E2+EX	142,81\pm33,73	255,71\pm35,58##	31,87\pm5,99##	1,09\pm0,09#	4,03\pm0,61#	8,07\pm1,11#

5.1.3 A vérplazma ösztadiol és kortikoszteron szintje

Életkorral járó változások

Két utas ANOVA-val nem mutattam ki életkori hatást a sem a plazma ösztadiol, sem a plazma kortikoszteron koncentrációjának tekintetében (**3.táblázat**).

Kezelések hatása

A plazma ösztadiol szintjét vizsgálva szignifikáns kezelés-hatást mutattam ki ($F=31,62$, $p<0,01$). Az ösztadiolt kapott (E2, E2+EX) 15 hónapos és 27 hónapos csoportok plazma ösztadiol szintje magasabb volt az azonos korú kontroll és edző csoportokhoz képest. Emellett szignifikáns interakció áll fenn a kor faktor és a kezelés faktor között ($F=10,16$, $p<0,05$). Az ösztadiol kezelés 15 hónapos korban sokkal markánsabban megemelte a plazma ösztadiol szintjét. A plazma kortikoszteron mennyisége nem változott szignifikánsan a kezelések hatására egyik életkorban sem.

5.1.4 Biokémiai eredmények

Életkorral járó változások

Az ösztrogén receptor alfa ($ER\alpha$) immunreaktivitása 15 hónapos korban nagyobb volt, mint 27 hónapos korban ($F=21,78$, $p<0,01$). A BDNF mennyisége alacsonyabb volt 27 hónapos korban ($F=15,76$, $p<0,01$) a 15 hónapos korú állatokkal összehasonlítva. szignálmolekulák mennyiségében (Akt, CREB, MAPK) nem találtam életkor-függő változást. A szinaptikus markerek közül a szinaptofizin fehérje mennyisége magasabb volt a 15 hónapos állatok hippocampuszában a 27 hónapos állatokhoz képest ($F=22,21$, $p<0,01$). A szinapszin mennyisége nem változott öregedés során.

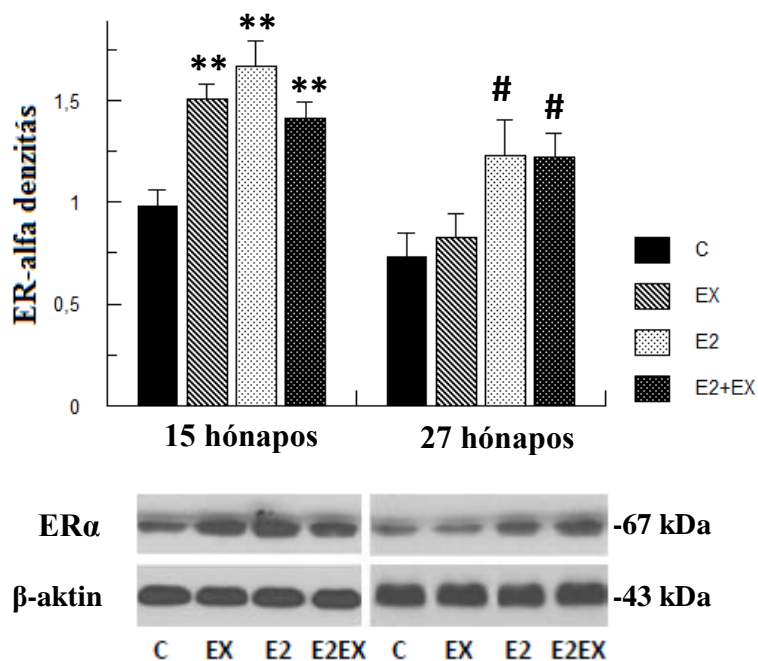
Az oxidatív stressz magasabb volt a 27 hónapos állatok hippocampuszában, mivel mind a karbonilált fehérjék mennyisége ($F=4,31$, $p<0,05$), mind a szabadgyök képződése ($F=4,68$, $p<0,05$) magasabb volt a 15 hónapos állatokhoz képest. A PGC-1 α mennyisége alacsonyabb volt az idős állatokban ($F=8,12$, $p<0,01$), míg az NRF-1 és mtTFA mennyiségében nem mértem kor-függő változást. Az antioxidáns enzimek mennyisége is csökkent öregedéssel: SOD-1 ($F=6,65$, $p<0,01$), SOD-2 ($F=12,32$, $p<0,01$). Az AMPK foszforilációja alacsonyabb volt a 27 hónapos állatok

hippokampuszban ($F=5,10$, $p<0,05$). A DCX mennyisége is kevesebb volt a 27 hónapos állatokban ($F=14,44$, $p<0,01$).

Kezelések hatása

A statisztikai analízis elvégzésével szignifikáns kezelés-hatást mutattam ki az ER α fehérje mennyiségében ($F=8,00$, $p<0,01$) (**15.ábra**). A 15 hónapos állatoknál az edzés (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelések hatására nőtt az ER α mennyisége. 27 hónapos állatok esetén az E2 és E2+EX kezelések emelték meg a receptor mennyiségét.

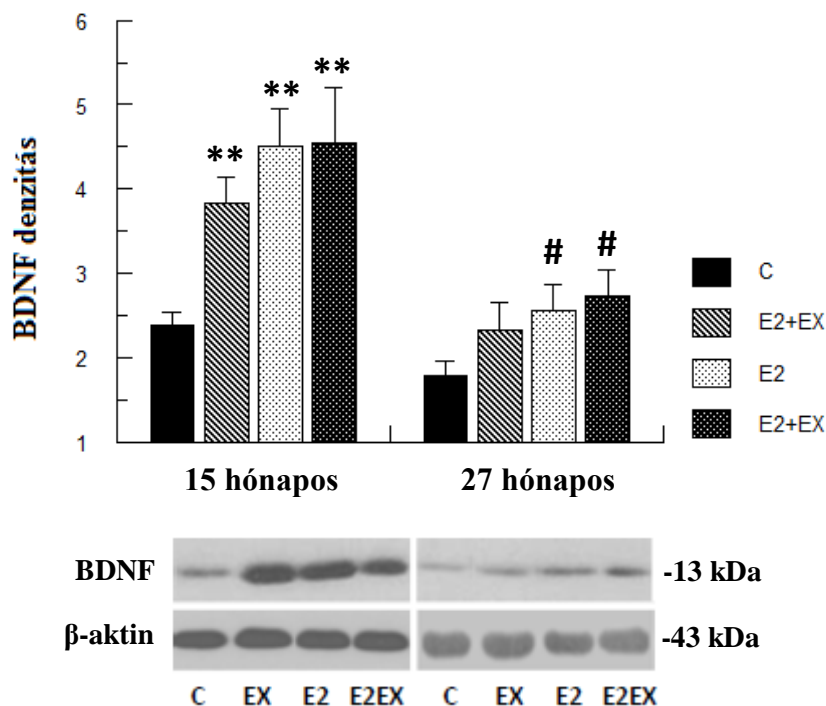
A BDNF fehérje tekintetében hasonló eredményeket tapasztaltam (kezelés hatás: $F=15,76$, $p<0,01$). 15 hónapos korban az EX, E2 és E2+EX csoportokban magasabb volt a BDNF szintje a kontrollokhoz képest. 27 hónapos korban az ösztrogén és kombinált kezelések a neurotrofin mennyiségének növekedését eredményezték (**16.ábra**).



15. ábra

Az ösztrogén receptor alpha (ER α) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

Az ösztrogén receptor alpha (ER α) mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban. 27 hónapos korban az ösztradiol és kombinált kezeléseket növelték meg az ER α szintjét az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hippocampusban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p < 0,05$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p < 0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll.



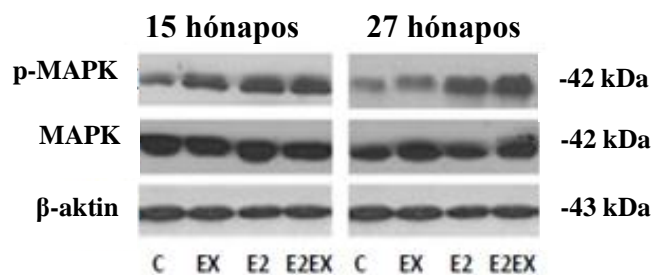
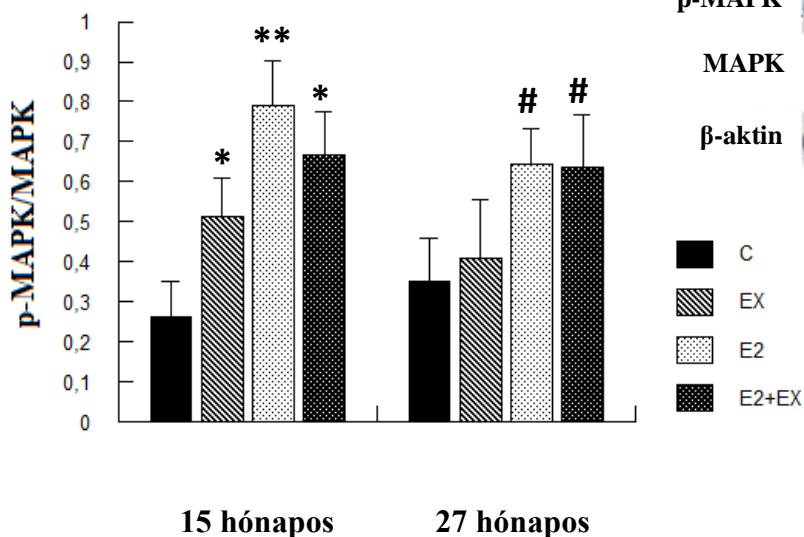
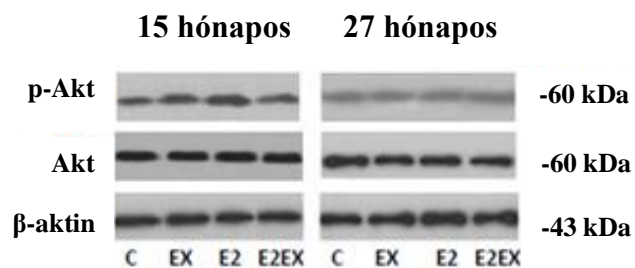
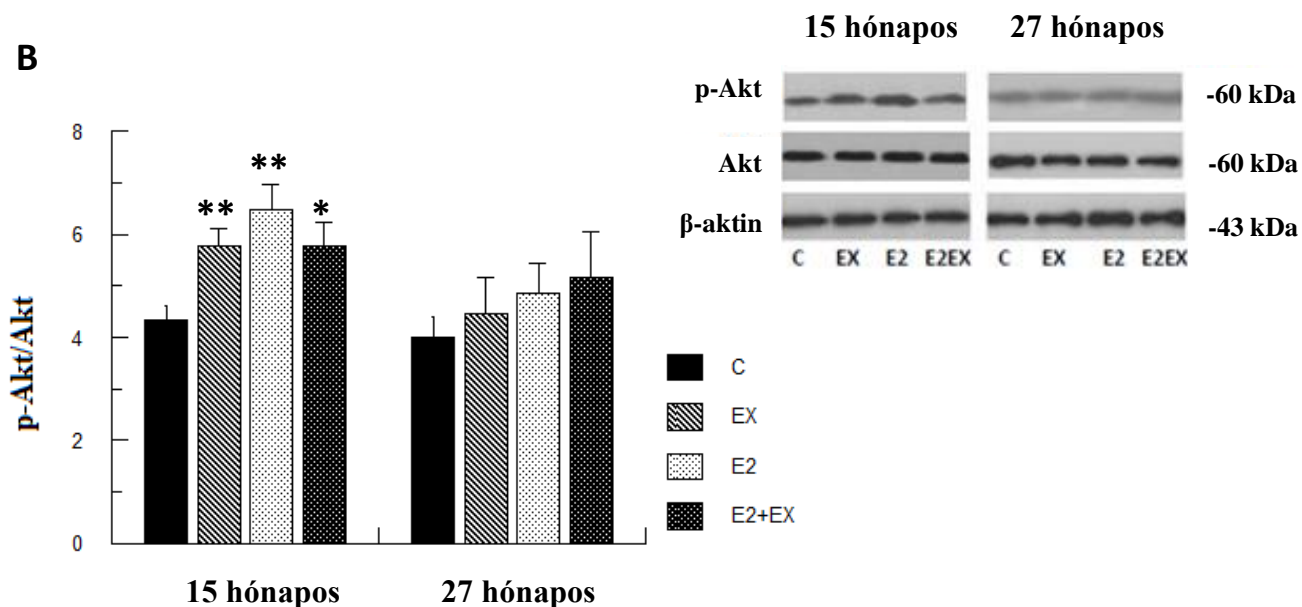
16. ábra

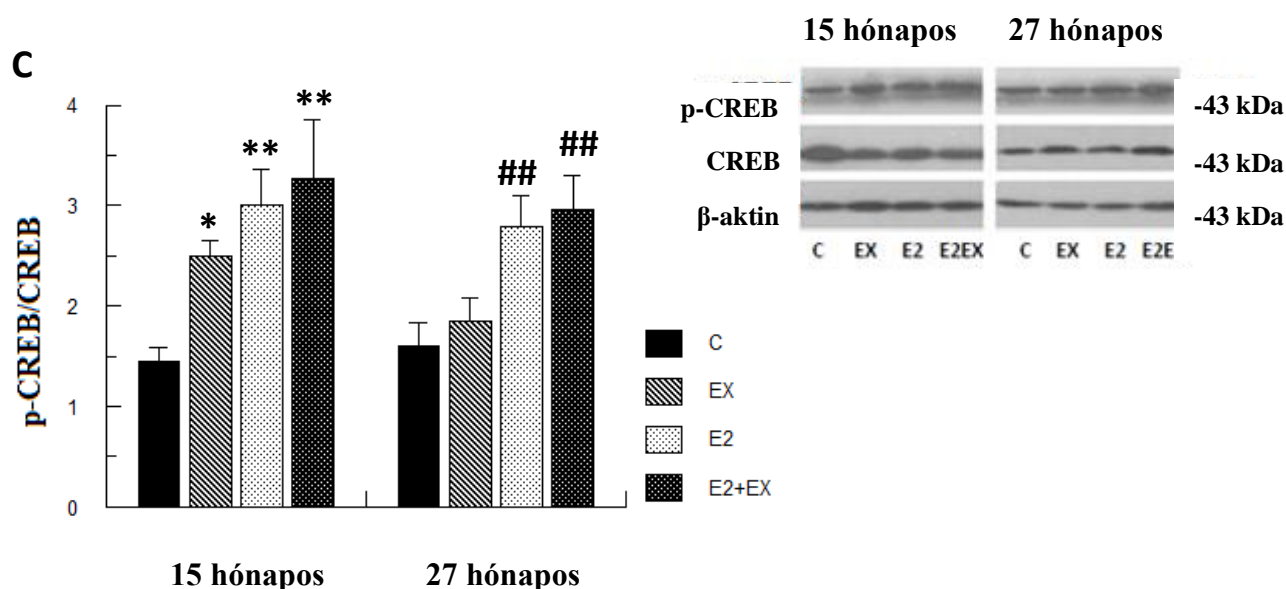
A BDNF fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippokampuszában

Az BDNF mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban. 27 hónapos korban az ösztradiol és kombinált kezeléseket növelték meg BDNF szintjét az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hippokampuszban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM ** $p < 0,01$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p < 0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll.

A szignálmolekulák (MAPK, Akt, AMPK) és a CREB aktivációját foszforilált formájuk mérésével vizsgáltuk. A foszforilált formákat a megfelelő nem foszforilált formához illetve a β -aktin kontrollhoz normalizáltuk. A varianciaanalízis szignifikáns kezelés-hatást mutattam ki a következő fehérjék esetén: p-MAPK: $F=15,16$, $p < 0,01$; p-CREB: $F=17,48$, $p < 0,01$, Akt: $F=8,56$, $p < 0,01$, AMPK: $F=12,34$, $p < 0,01$). 15 hónapos korban a MAPK, Akt és a CREB foszforilációja növekedett edzés, ösztrogén és kombinált kezelése hatására a kontroll csoporthoz képest (17.ábraA/B/C). A p-AMPK mennyisége nőtt edzés (EX) hatására 15 hónapos korban (18.ábra). 27hónapos korban a

sem a p-Akt, sem a p-AMPK mennyisége nem változott. A MAPK és CREB foszforilációja szignifikánsan magasabb volt az E2 és E2+EX csoportokban az azonos korú kontrollokhöz képest 27 hónapos korban.

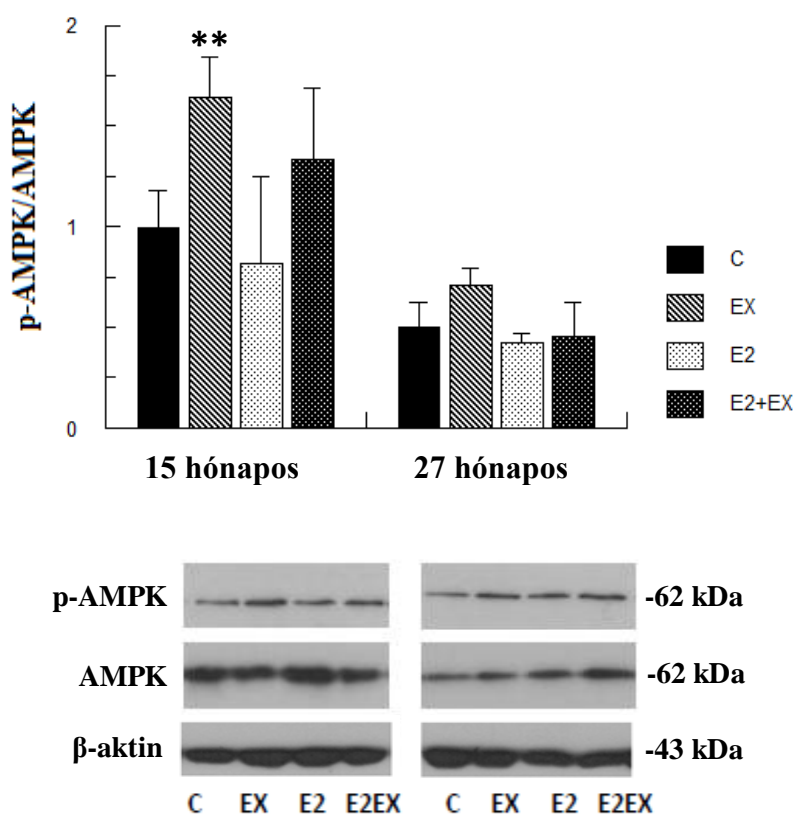
A**B**



17. ábra

A MAPK (A), az Akt (B) és a CREB (C) fehérjék foszforilációja 15 és 27 hónapos állatok hipokampuszában

Az *p*-MAPK mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban. 27 hónapos korban az ösztradiol és kombinált kezeléseket növelték meg *p*-MAPK szintjét az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hipokampuszban. Az *p*-Akt mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. Az *p*-CREB mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az ösztradiol és kombinált kezeléseket növelték meg *p*-CREB szintjét az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hipokampuszban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. 27 hónapos korú kontroll.



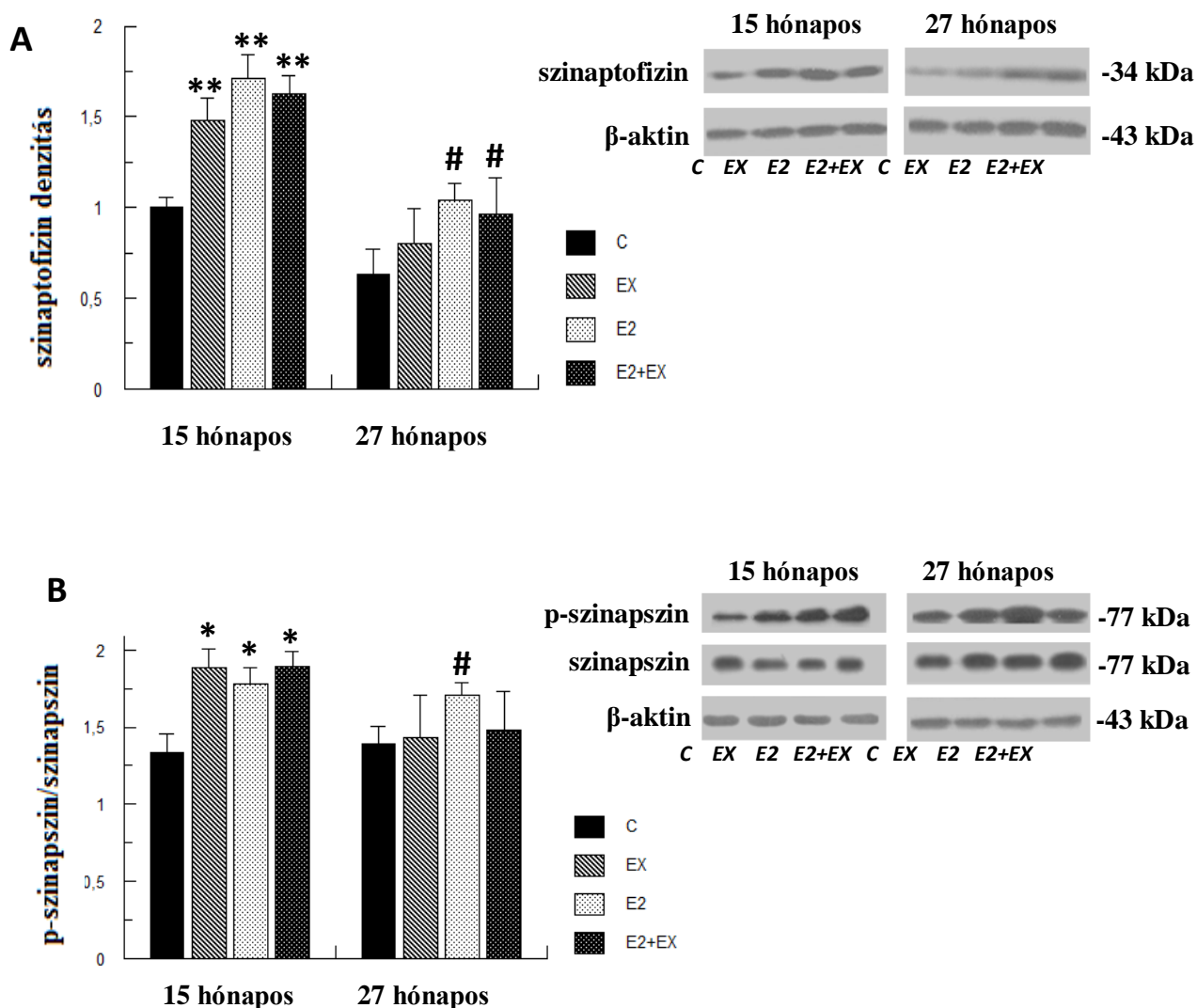
18. ábra

A p-AMPK fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippokampuszában

*Az p-AMPK mennyisége nőtt az edző (EX) csoportban az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hippokampuszban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM ** $p < 0,01$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport.*

A szinaptikus markerek expresszióját is befolyásolták a kezelések mindkét életkorban (19. ábraA/B). A szinaptofizin mennyisége nőtt a 15 hónapos állatok hippokampuszában az EX, E2 és E2+EX csoportokban ($F=3,62$, $p < 0,05$). A szinapszin foszforilációja is magasabb volt az edző, ösztrogén és kombinált kezelésben részesült állatokban a kontroll csoporthoz képest ($F=9,15$, $p < 0,05$).

27 hónapos korban az ösztrogén illetve a kombinált kezelés emelte meg a szinaptofizin mennyiségét. A p-szinapszin fehérje szintje az E2 csoportban volt nagyobb a kontroll csoporttal összehasonlítva.

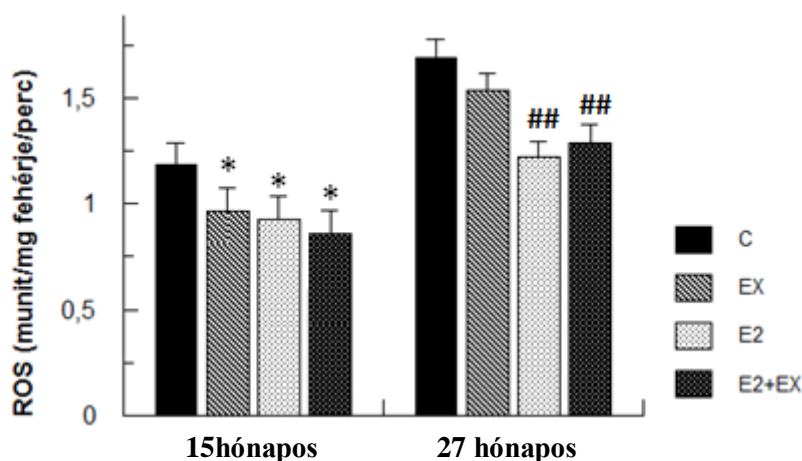


19. ábra

A szinaptofizin (A) és p-szinapszin (B) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok
hippokampuszában

Az szinaptofizin (A) és p-szinapszin (B) mennyisége nőtt az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az ösztradiol és kombinált kezelések növelték meg szinaptofizin (A) szintjét az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hippokampuszban. A p-szinapszin fehérje mennyisége az E2 csoportban volt magasabb. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM * $p < 0,05$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p < 0,05$ vs. 27 hónapos korú kontroll.

A reaktív oxigén gyökök (ROS) mennyisége alacsonyabb volt mind 15mind 27 hónapos korban az ösztrogén (E2) és kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban (kezelés-hatás: $F=8,91$, $p<0,01$) (**20.ábra**). 15 hónapos edző állatokban a szabadgyök mennyiség szignifikánsan alacsonyabb volt az azonos korú kontroll csoporthoz képest.

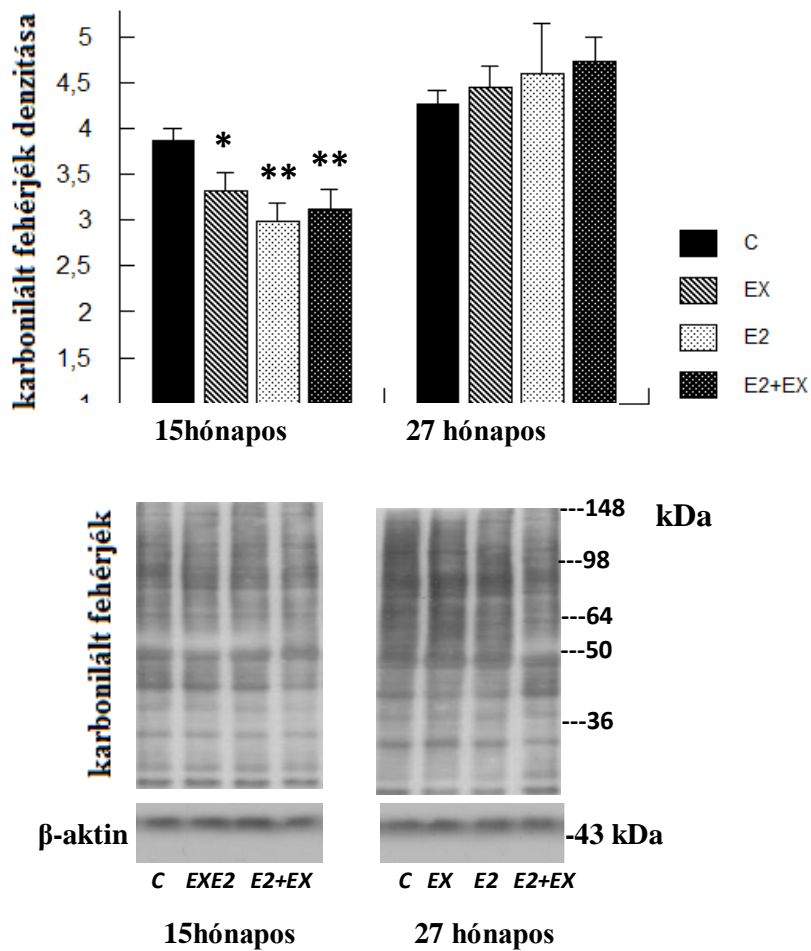


20. ábra

*A reaktív oxigén gyökök mennyisége (ROS) 15 és 27 hónapos állatok
hippokampuszában*

*Az ROS mennyisége csökkent az ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban mindkét életkorban. A testmozgás csökkentette a ROS mennyiséget 15 hónapos korban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p<0,05$, vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, ## $p<0,01$ vs. 27 hónapos korú kontroll.*

A karbonilált fehérjék mennyiségében életkori hatás mellett szignifikáns kezelés-hatást is kimutattam ($F=6,96$, $p<0,01$). 15 hónapos korban alacsonyabb volt a karbonilált fehérjék mennyisége az edző (EX), ösztrogént kapott (E2) és kombinált kezelésben (E2+EX) részesült csoportokban, mint az azonos korú kontroll állatcsoportban (**21.ábra**). 27 hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között.

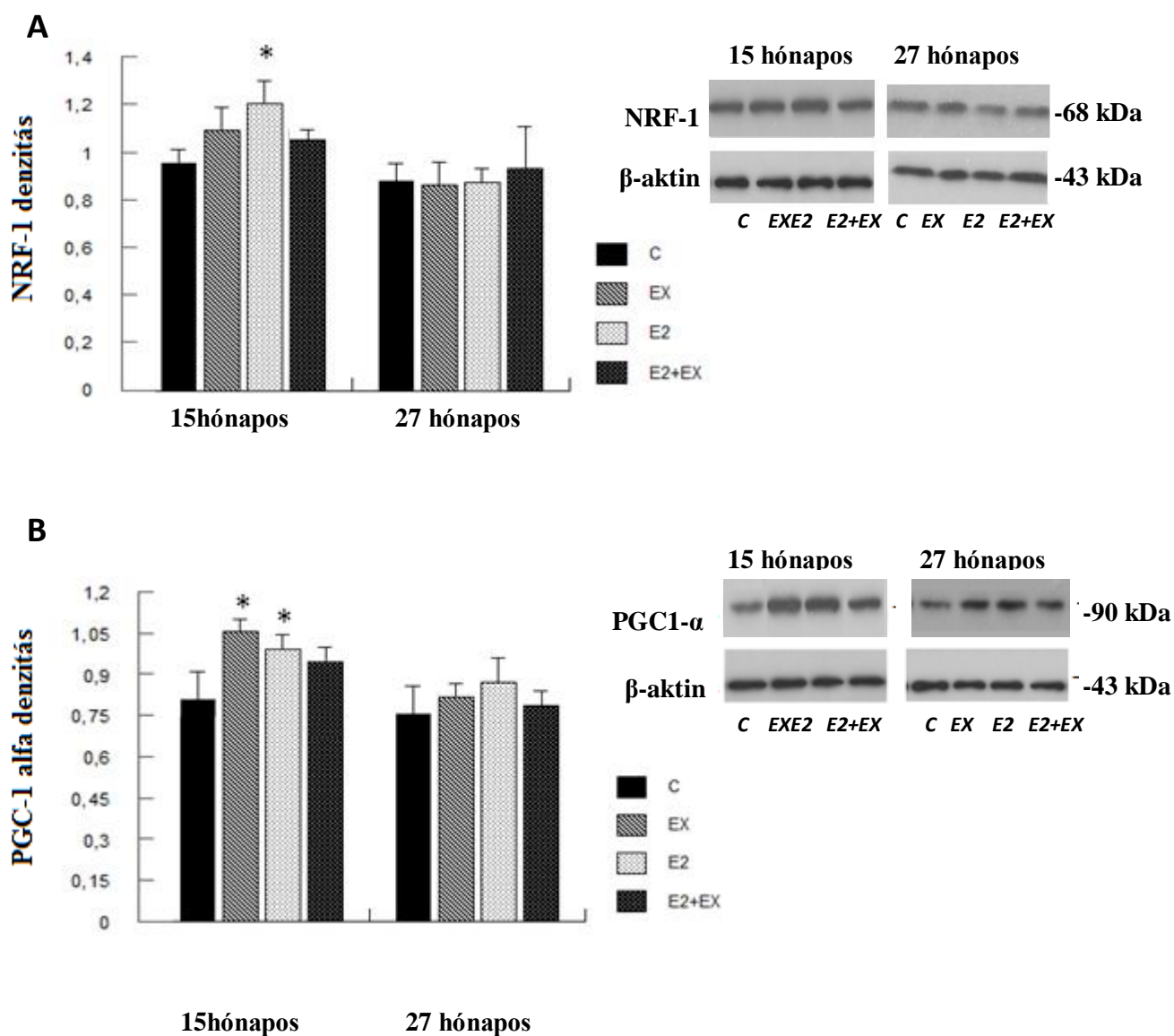


21. ábra

A karbonilált fehérjék mennyisége a 15 és 27 hónapos állatok hippocampuszában

A karbonilált fehérjék mennyisége csökkent az edző (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport.

Szignifikáns kezelés-hatást mutattam ki NRF-1 ($F=3,77$, $p<0,05$) és PGC1- α ($F=2,78$, $p<0,05$) transzkripciós faktorok esetén (**22.ábraA/B**). A 15 hónapos korban nőtt az NRF1 mennyisége az ösztrogénkezelésben (E2) részesült csoportokban az azonos korú kontroll állatcsoporthoz képest. 27 hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A PGC1- α mennyisége nőtt a 15 hónapos állatok hippocampuszában az EX, E2 és csoportokban. 27 hónapos korban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. Az mtTFA mennyisége nem változott a kezelések hatására egyik életkorban sem (nem szerepel diagram).



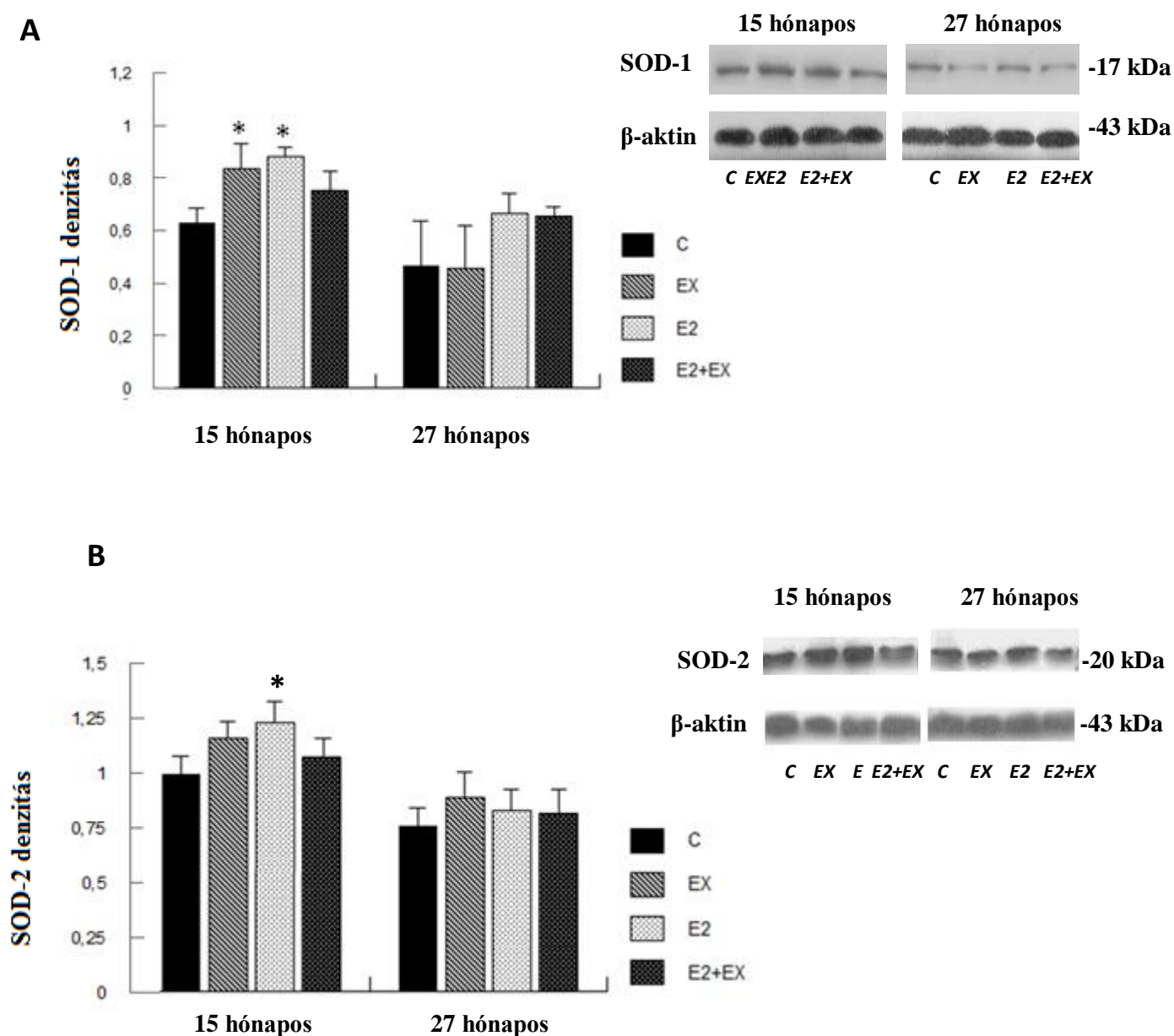
22. ábra

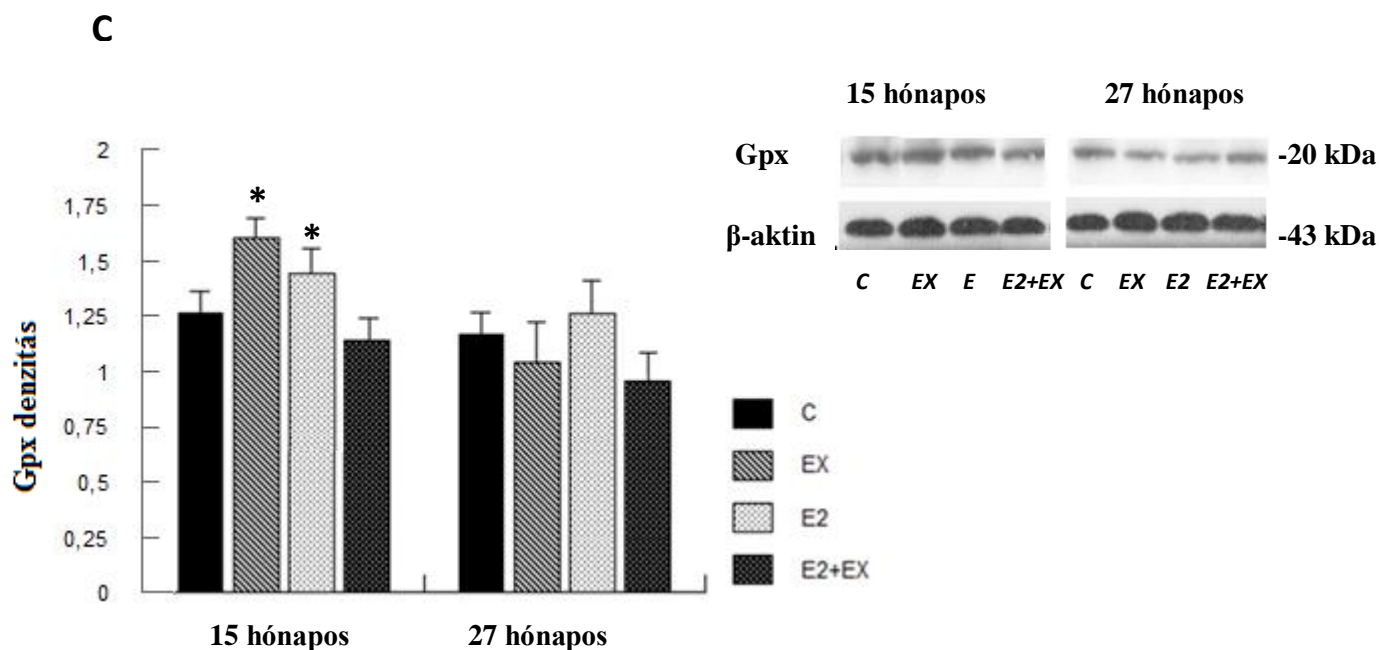
Az NRF-1(A) és PGC1 α (B) fehérje mennyisége 15 és 27 hónapos állatok
hippokampuszában

Az NRF-1 (A) és PGC1 α (B) mennyisége nőtt ösztrogén (E2) kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. Edzés hatására a PGC1- α fehérje mennyisége nőtt 15 hónapos korban. Az ösztrogénkezelés a PGC1- α és NRF-1 fehérjék mennyiségét növelte 15 hónapos korban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p < 0,05$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport.

A SOD-1 mennyisége változott a kezelések hatására ($F=3,65$, $p<0,05$). A fehérje mennyisége 15 hónapos életkorban nőtt a futó és az E2 kezelésben részesült csoportokban (23.ábraA).

A SOD-2 mennyisége középkorú állatokban változott ($F=5,01$, $p<0,05$). Az ösztrogénkezelés megnövelte a SOD-2 mennyiségét a kontroll csoporthoz képest (23. ábra B). A GPx fehérje expressziója 15 hónapos korban változott meg a kezelések hatására ($F=3,11$, $p<0,05$). Az EX kezelés megnövelte a Gpx mennyiségét a kontroll csoporthoz képest (23.ábra C).



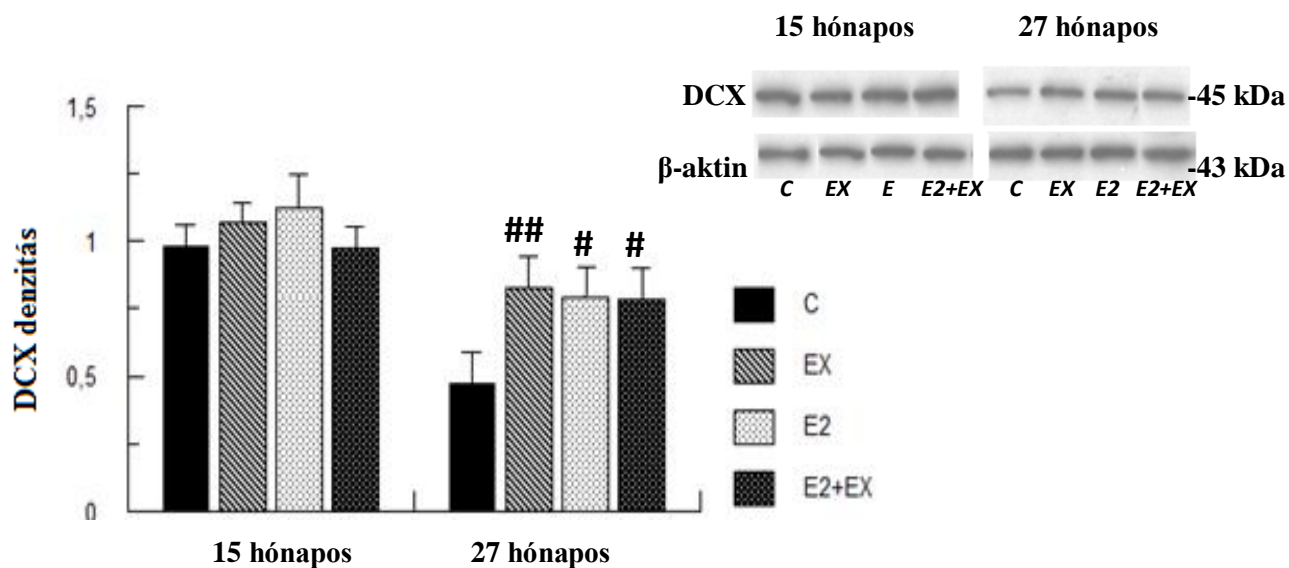


23. ábra

Az antioxidáns enzimek mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippokampuszában

15 hónapos korban a SOD-1 mennyisége magasabb volt az edző (EX), ösztrogént kapott (E2) az azonos korú kontroll csoporthoz képest a hippokampuszban (A). Ugyanebben az életkorban a SOD-2 mennyisége magasabb volt az ösztrogént kapott (E2) kezelésben részesült csoportban az azonos korú kontroll csoporthoz képest (B). A Gpx mennyisége magasabb volt az edző (EX) csoportban az azonos korú kontroll csoporthoz képest A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM * $p < 0,05$ vs. 15 hónapos korú kontroll csoport.

A DCX mennyisége szignifikánsan magasabb volt 27 hónapos korban mindhárom kezelést követően ($F=5,64$, $p<0,05$) (24.ábra).



24. ábra

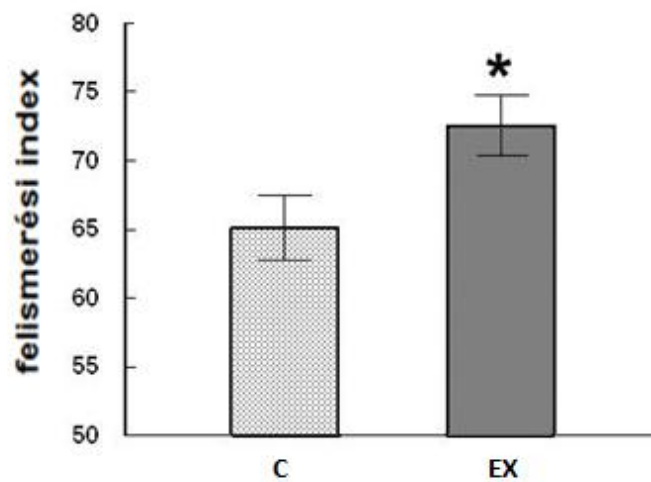
A DCX mennyisége 15 és 27 hónapos állatok hippokampuszában

Az DCXmennyiségenőtt edzés (EX), ösztrogén (E2) és a kombinált (E2+EX) kezelésben részesült csoportokban 27 hónapos korban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p<0,05$, vs. 15 hónapos korú kontroll csoport, # $p<0,05$ ## $p<0,01$ vs. 27 hónapos korú kontroll.

5.2 B. Kísérlet: Az élethosszon át tartó fizikai aktivitás hatása az agy öregedésére hím patkányokban.

5.2.1 Viselkedési teszt eredménye

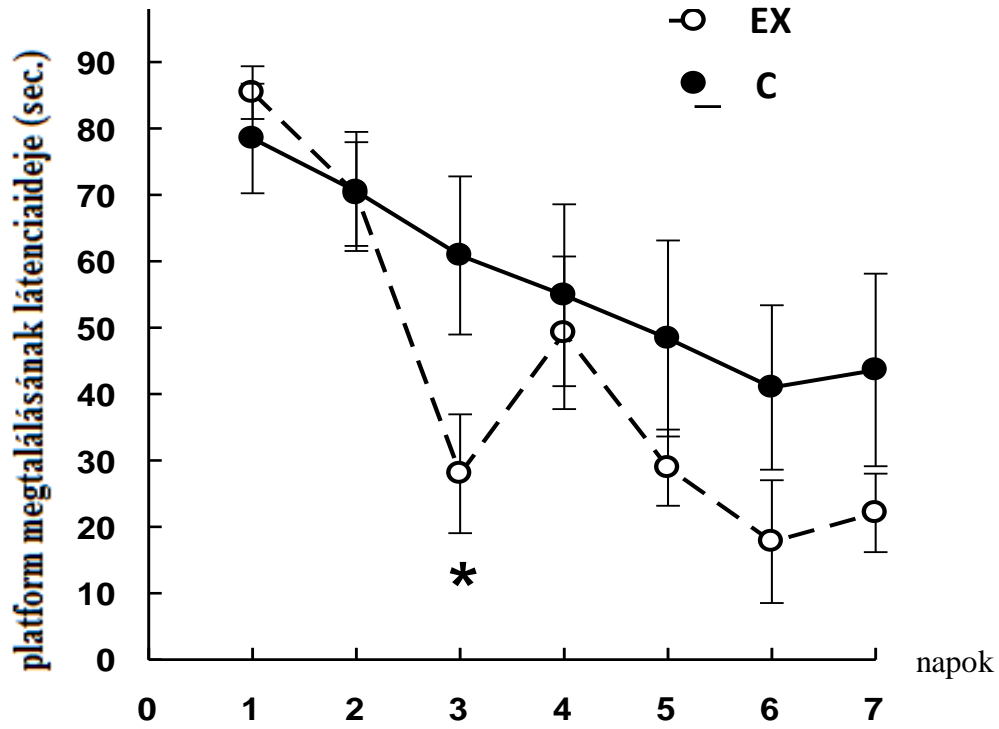
Új tárgy felismerési teszt. Az élethosszig tartó testmozgás javította a memóriát új tárgy felismerési tesztben ($p=0.031$). Morris vízi útvesztőben az edző csoport jobban teljesített a kísérlet 3 napján, mint a kontroll csoport.



25. ábra

Az új tárgy felismerési teszt eredménye

*Az élethosszig tartó testedzés javította memóriát az új tárgy felismerési tesztben. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p < 0,05$, vs. kontroll csoport*



26. ábra

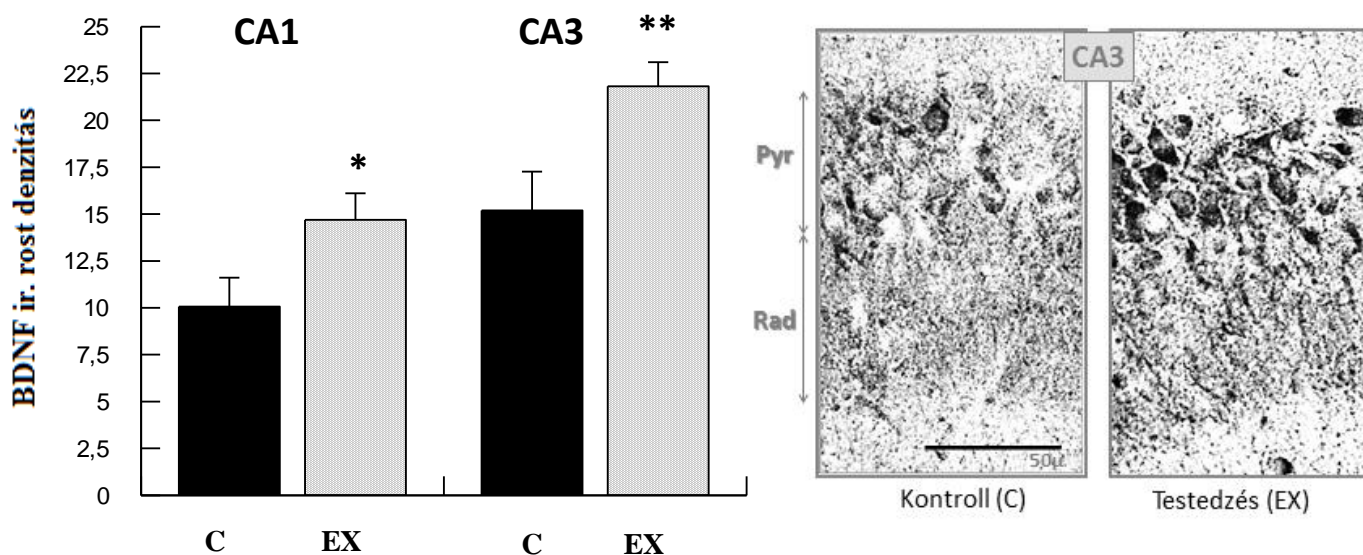
Az Morris vízi útvesztő teszt eredménye

*Az edző csoport szignifikánsan rövidebb idő alatt találta meg a víz alatt elrejtett platformot a 3. tesztnapon. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, * $p < 0,05$, vs. kontroll csoport*

5.2.2 Hisztológiai eredmények

A BDNF ir. rostok denzitása szignifikánsan nőtt a testmozgás hatására a hippocampusz CA1-es ($p<0,05$) és CA3-as ($p<0,01$) régióiban (27. ábra). A doublecortin mennyisége nőtt a hippocampusz molekuláris rétegében ($p<0,01$) (28. ábra).

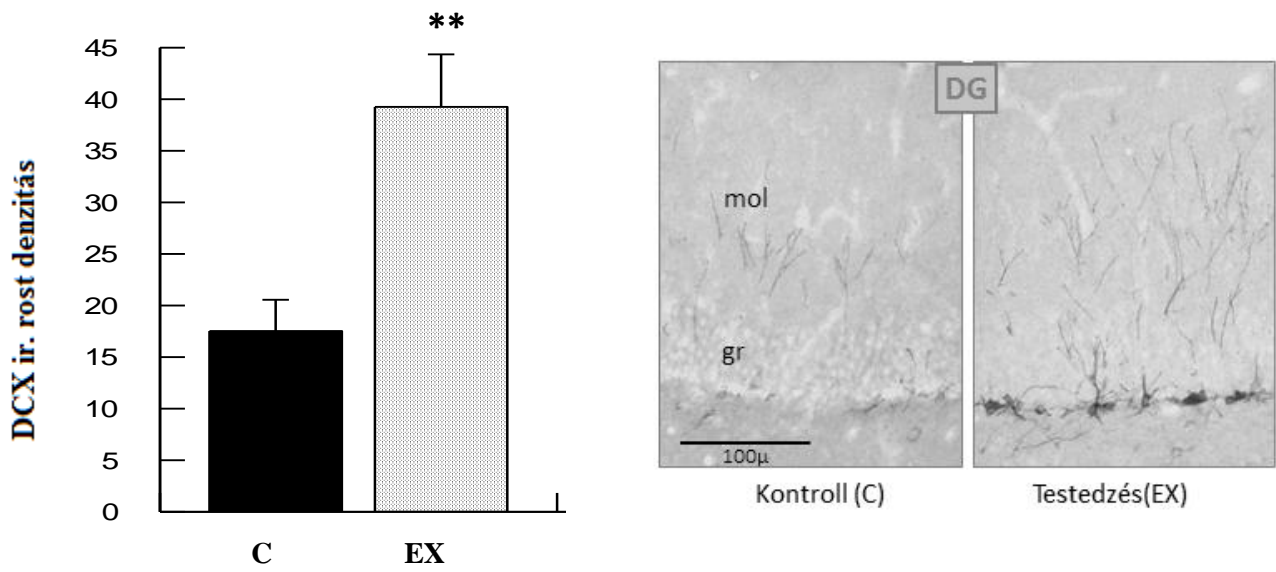
A Glut-1 ir. rostok denzitása szignifikánsan magasabb volt az edzett állatok hippocampuszának Gyrus Dentatus (DG) régiójában ($p<0,05$) (29. ábra). Továbbá, a mozgás növelte a CA-1-es ($p<0,01$) és a DG($p<0,01$) régiókban a ChAT ir. rostok mennyiségét (30. ábra).



27. ábra

A BDNF immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és CA3-as régiójában

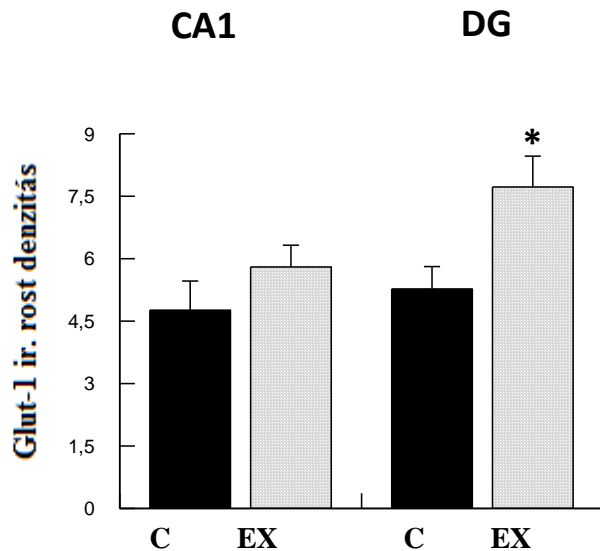
*Az élethosszig tartó testmozgás megnövelte a BDNF ir. rostok mennyiségét mind a CA1, mind a CA3 régiókban a hippocampuszban. A jobb szélső ábrán a CA3 régióban készült mikroszkópos felvétel látható. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ vs. azonos korú kontroll csoport.*



28. ábra

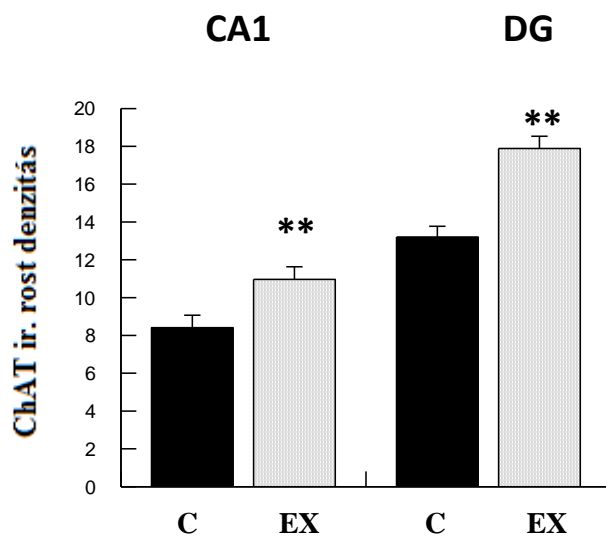
A DCX immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz molekuláris rétegében

*Az élethosszig tartó testmozgás megnövelte a DCX ir. rostok mennyiségét a hippocampuszban. A jobb szélső ábrán a DG molekuláris rétegben készült mikroszkópos felvétel látható. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, $**p < 0,01$ vs. azonos korú kontroll csoport.*



29. ábra

A Glut-1 immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és DG régiójában
Az élethosszig tartó testmozgás megnövelte a Glut-1 ir. rostok mennyiségét mind
*a DG régiókban a hippocampuszban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, * $p < 0,05$ vs.*
azonos korú kontroll csoport.

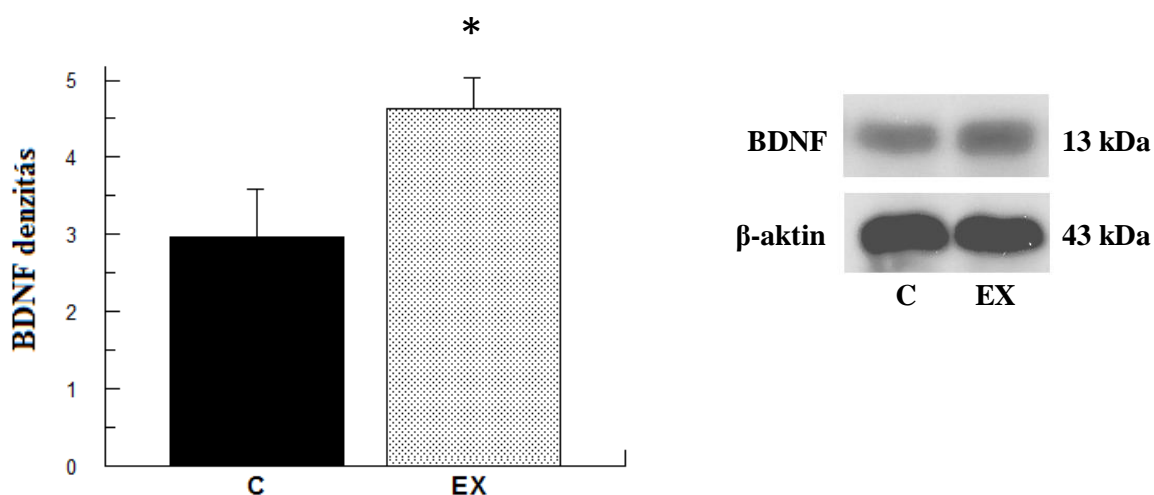


30. ábra

A ChAT immunreaktív rostok denzitása a hippocampusz CA1 és DG régiójában
Az élethosszig tartó testmozgás megnövelte a Glut-1 ir. rostok mennyiségét mind
a CA1, mind a DG régiókban a hippocampuszba. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM,
*** $p < 0,01$ vs. azonos korú kontroll csoport.*

5.2.3 Biokémiai eredmények

A BDNF neurotrofin mennyisége szignifikánsan ($p=0,05$) nőtt az edző csoportban a kontroll csoporthoz képest (**31.ábra**).

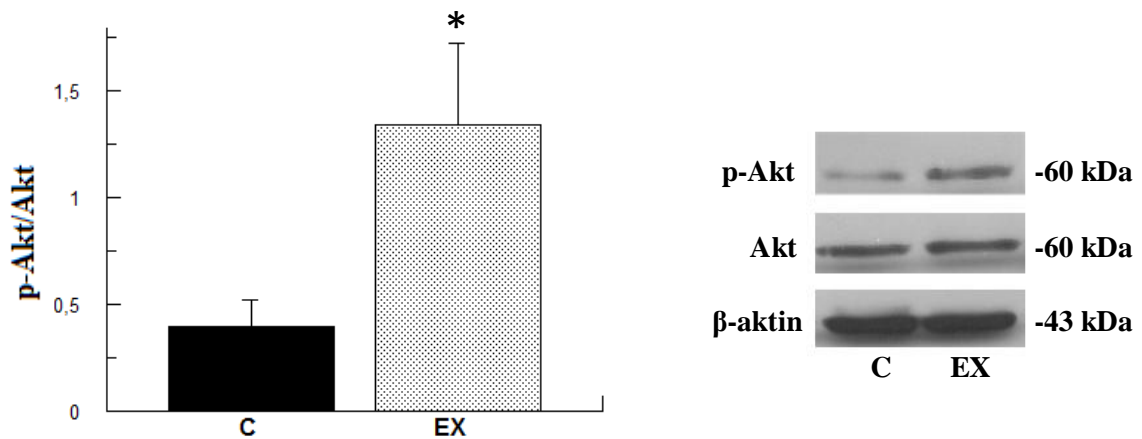


31. ábra

A BDNF mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampusában

A BDNF fehérje mennyisége szignifikánsan ($p=0,05$) nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM

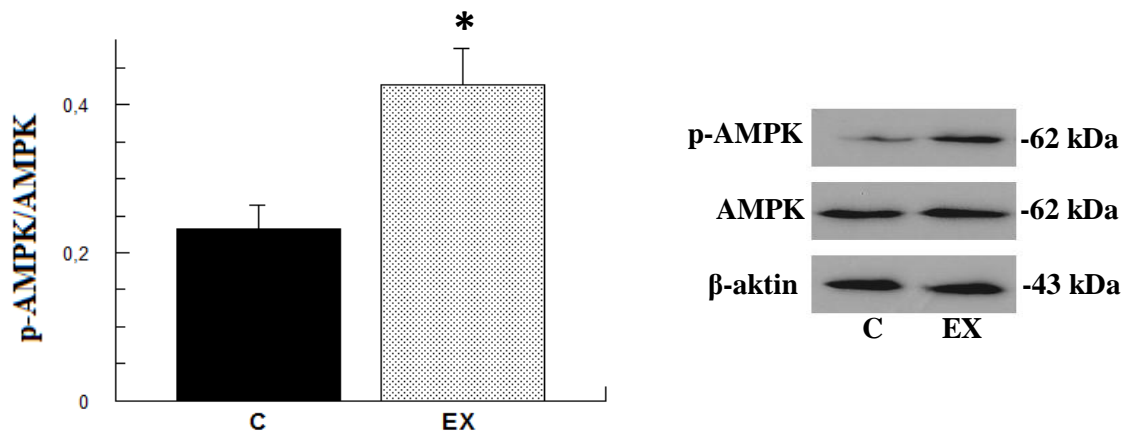
A CREB és a MAPK foszforilációja nem változott. Szignifikáns növekedést mértem az AMPK ($p<0,05$) és az Akt fehérjék ($p<0,05$) foszforilációjában a futó csoportban a kontroll csoporthoz képest (**32. ábra**, **33.ábra**). Szignifikáns növekedést mutattam ki az edző állatoknál szinaptofizin fehérje mennyiségében a kontroll csoporthoz képest ($p<0,05$) (**34.ábra**). Futó csoportban a p-szinapszin növekedésének tendenciája figyelhető meg ($p=0,05$) (**35.ábra**).



32. ábra

A p-Akt mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

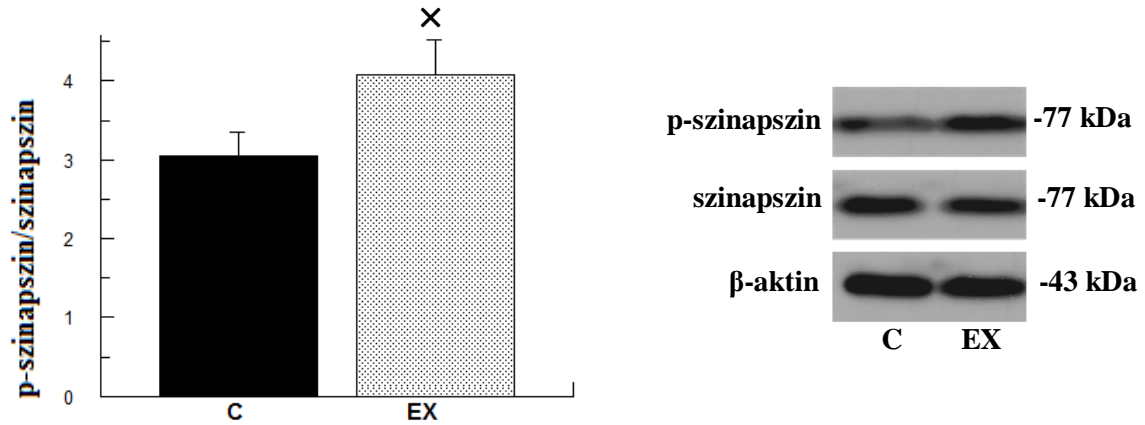
A p-Akt fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, * $p < 0,05$ vs. kontroll csoport.



33. ábra

A p-AMPK mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

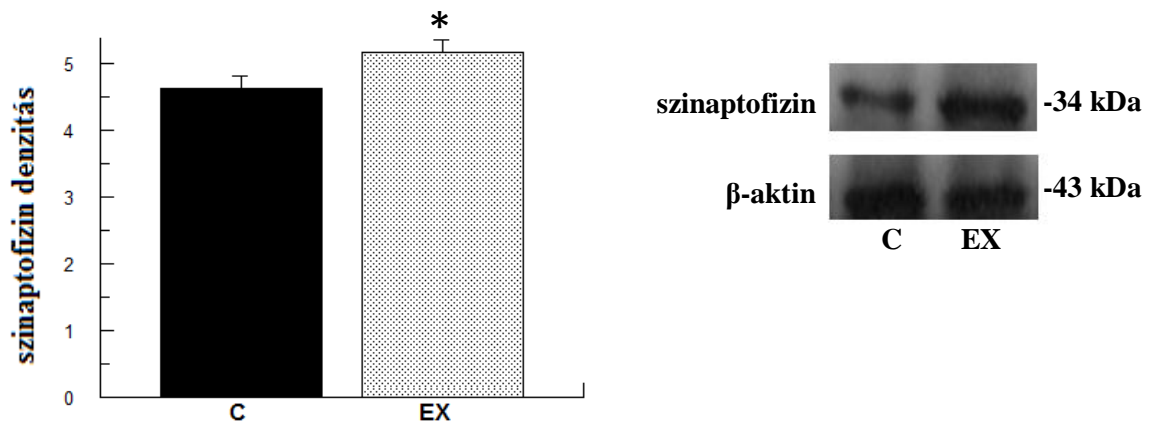
A p-AMPK fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, * $p < 0,05$ vs. kontroll csoport.



34. ábra

A p-szinapszin mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippokampuszában

A p-szinapszin fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, × $p=0,05$ vs. kontroll csoport.

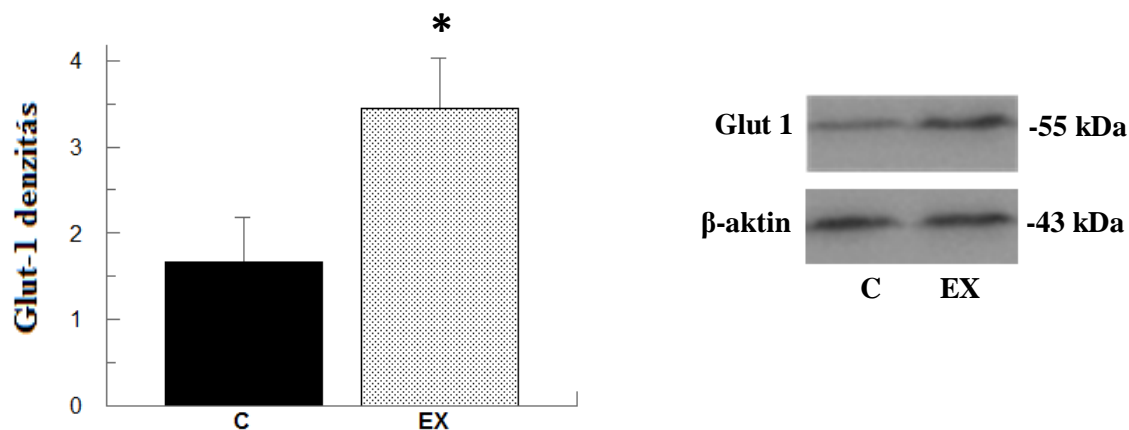


35. ábra

A szinaptofizin mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippokampuszában

A szinaptofizin fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, * $p<0,05$ vs. kontroll csoport.

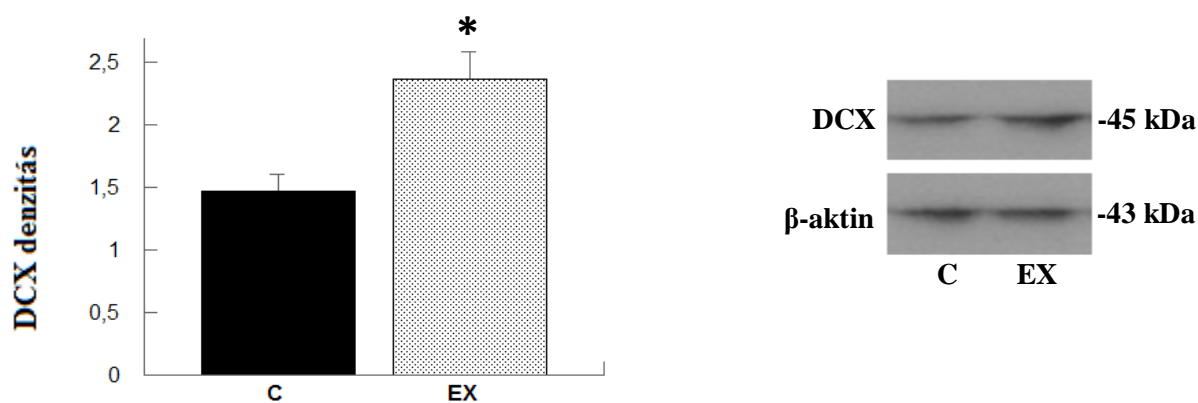
A Glut 1 mennyisége szignifikánsan magasabb volt a futó csoportban ($p < 0,05$) (36. ábra). Hasonlóképpen, a doublecortin ($p < 0,05$) valamint a ChAT ($p < 0,05$) fehérje mennyisége is nagyobb volt a futó csoportban a kontroll csoporthoz képest (37. ábra, 38. ábra).



36. ábra

A Glut-1 mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampusában

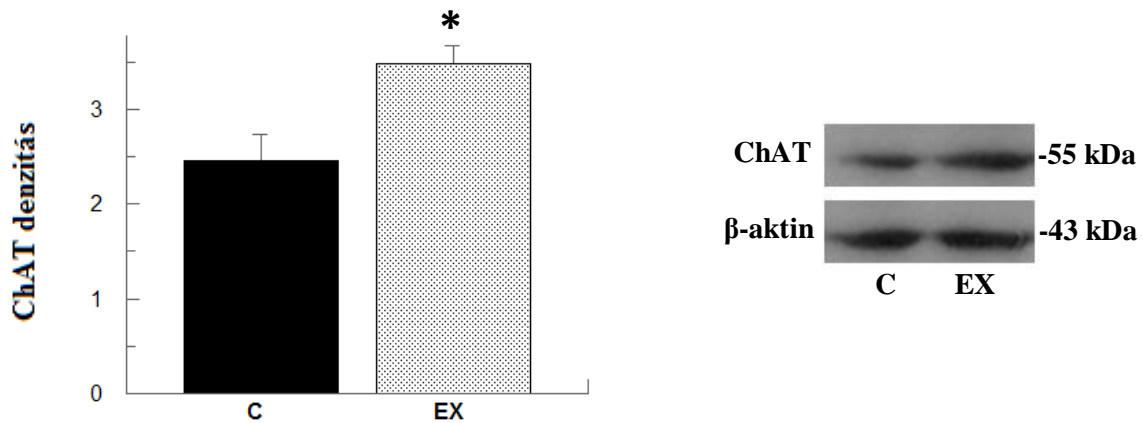
A Glut-1 fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, $*p < 0,05$ vs. kontroll csoport.



37. ábra

A doublecortin (DCX) mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampusában

A doublecortin fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag \pm SEM, $*p < 0,05$ vs. kontroll csoport.



38. ábra

A ChAT mennyisége a kontroll (C) és edző (EX) állatok hippocampuszában

A ChAT fehérje mennyisége szignifikánsan nőtt az edző csoportban. A feltüntetett értékek: átlag ± SEM, * $p < 0,05$ vs. kontroll csoport.

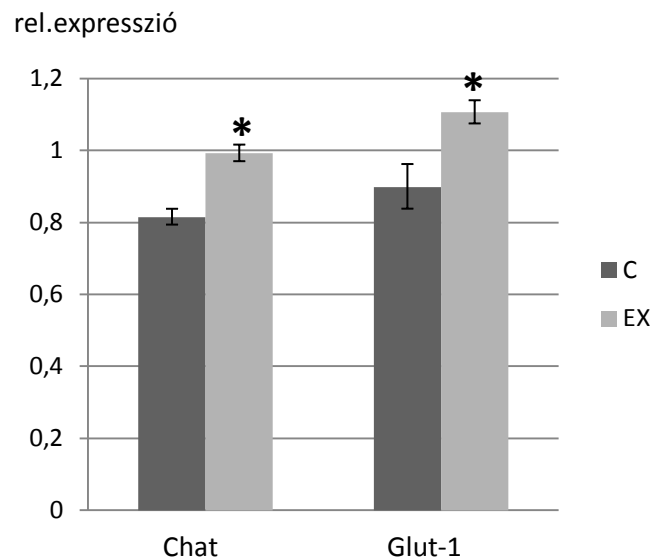
A reaktív oxigén gyökök és a karbonilált fehérjék mennyiségében nem mértem szignifikáns különbséget a két csoport között. Nem volt különbség a következő transzkripciós faktorok mennyiségét illetően sem: PGC1- α , NRF1, mtTFA. Az ER- α mennyisége sem változott a fizikai aktivitás hatására a hím patkányokban.

5.2.4 Génexpressziós mérési eredmények

A PCR reakciók során csak a ChAT és Glut-1 gének esetén mértünk szignifikáns változást. A ChAT és a Glut-1 gének expressziója magasabb volt az edző csoportban, mint a kontroll csoportban. PCR reakciók eredményeit a táblázat foglalja össze

4. táblázat A kísérlet során vizsgált gének relatív expressziója. A Chat és a Glut-1 expressziója növekedett az edző csoportban a kontroll csoporthoz képest. Értékek: átlag \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. kontroll csoport.

Gén neve	változás
CREB	nincs változás
synapsin	nincs változás
synaptophysin	nincs változás
BDNF	nincs változás
ERα	nincs változás
AMPK	nincs változás
ChAT	overexpresszió
Glut-1	overexpresszió
NRF-1	nincs változás
PGC-1α	nincs változás
kataláz	nincs változás
SOD1	nincs változás
SOD2	nincs változás
bax	nincs változás
bcl-2	nincs változás



6. Megbeszélés

Munkám célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a rendszeres testmozgás milyen hatással van az idegrendszerre öregedés során. Kísérleteim során tanulmányoztam, hogy a testmozgás és az ösztrogénkezelés hasonlóan hat-e a hippocampusz-függő kognitív képességekre valamint a két kezelés milyen intracelluláris szignálmolekulákat és neurotrofikus fehérjéket aktivál a hippocampuszban különböző életkorú nőstény patkányokban. A kísérlet eredményei alátámasztották azt a feltételezést, hogy az ösztrogénpótláshoz hasonlóan a testmozgás javítja a memóriát és olyan molekulákat aktivál a hippocampuszban, melyek neurotrofikus hatásúak illetve részt vesznek a redox és energiaegyensúly fenntartásában, mérséklék az oxidatív stresszt és támogatják az energiatermelő folyamatokat. Azonban fontos megjegyezni, hogy hipotézisünk csak öregedő, 15 hónapos állatok esetén nyert bizonyítást a nőstény állatokban. Ezzel ellentétben a hosszú-távú anösztrusz állapotában, 27 hónapos korban az ösztrogénkezelésnek és a kombinált kezelésnek volt csak jelentősebb pozitív hatása.

Az ösztrogénkezelés hatékonyságát a vérplazma 17β -ösztradiol szintjének markáns emelkedése támasztotta alá mindkét életkorban. Mivel a méh és a hipofízis is érzékenyen reagál az ösztrogénra (Kelner et al., 1982), a szervek tömegének növekedése mindkét életkorban szintén a kezelés hatékonyságát jelzi.

A kísérlet során rendszeres, közepes intenzitású testmozgásban vettek részt az állatok, melyet a rágcsálók számára kifejlesztett futópadon végeztek. A futópadon végzett mozgás kényszerített, un. 'forced' edzésnek minősül, amely könnyen krónikus stresszsel járhat. Az intenzív stressz emelkedett kortikoszteron- elválasztást és a memóriafunkciók romlását válthatja ki (McEwen and Sapolsky, 1995, Schaaf et al., 1998, Brown et al., 2007). Annak érdekében, hogy ellenőrizzük a testmozgás okozta stressz-hatást, megmértem a plazma kortikoszteron mennyiségét minden állatban. Mivel nem volt kimutatható változás a hormonszint értékekben, az alkalmazott edzésprotokoll nagy valószínűséggel nem jelentett jelentős stresszhelyzetet az állatoknak, így a stressz- okozta negatív hatások nem befolyásolták a kísérlet eredményeit. A futópadon végzett testmozgás azonban hatékonyan csökkentette a zsírdépők mennyiségét mindkét életkorban, ezért az jelentős pozitív anyagcsere-hatásokkal járt.

Az állatok általános viselkedéséről és aktivitásáról a nyílt porond teszt szolgáltat információval. 15 hónapos korban az edző állatok horizontális aktivitása nőtt, az exploráció megkezdésének látenciaideje pedig csökkent, ami azt jelzi, hogy az edzés hatására állatok a kontrollokhoz képest kevésbé idegesek, szorongóak. Ez az eredmény a testmozgás pozitív pszichés hatásait jelzi.

Ami a testmozgás kognitív képességekre kifejtett hatásait illeti, a mozgás 15 hónapos életkorban javította a figyelmet és a memóriát új tárgy felismerési és spontán alternáció tesztekben. Korábbi tanulmányok is hasonló pozitív hatásokról számoltak be középkorú és idősödő patkányok esetén (O'Callaghan et al. 2007; Van der Borgh et al. 2007). 27 hónapos korban az edzés nem befolyásolta a kognitív képességeket. Az irodalmi adatok ellentmondásosak az időskori testmozgás tanulási képességekre kifejtett hatásait illetően. Albeck et al. (2006) kimutatta, hogy a mozgás pozitív hatással volt a tanulási képességekre, ezzel ellentétben Barnes et al. (1991) nem mutatott ki különbséget az edző és kontroll állatok térbeli tanulási képességei között Morris vízi útvesztőben. Ezek az eredmények azzal magyarázhatóak, hogy öregkorban az agy szenzitivitása a testmozgás hatásaira lecsökken, ezért feltehetően csak megfelelő intenzitású illetve típusú tréninggel érhetünk el pozitív változásokat. Laboratóriumunkban jelenleg is zajlanak olyan kísérletek, melyben különböző edzésprotokollok hatékonyságának tesztelése zajlik. Az előkísérletek alapján a koordinációs tréninggel és szociális interakcióval kiegészített mozgástréning megfelelő hatékonyságú lehet 27 hónapos korban.

Ezzel ellentétben az ösztadiol mindkét életkorban hatásosan javította a memóriát. Kísérletünk más kutatási eredménnyel is összhangban (Frick, 2009) alátámasztja, hogy az ösztrogén-pótlás hatékonyan mérsékeli a kognitív képességek korral járó hanyatlását. A kombinált kezelés is pozitív viselkedésbeli változásokat eredményezett mindkét életkorban, azonban a két kezelés együttes alkalmazásának hatása nem bizonyult additívnak. Néhány esetben pedig a kombinált kezelés gyengébb hatással bírt, mint az ösztrogénkezelés. Így például a Morris útvesztőben a kombinált kezelés nem befolyásolta a térbeli tanulást 27 hónapos korban, annak ellenére, hogy az ösztrogén javította a teljesítményt ebben a tesztben. Feltehetőleg az ösztrogén kezelés pozitív hatásai nem fokozhatóak tovább edzéssel. Több kezelés együttes alkalmazásakor előfordulhat az is, hogy az egyébként pozitív hatású faktorok gyengítik egymás hatását.

Hasonlóképp Koltai et al. (2011) megfigyelték, hogy a testmozgás és az IGF-1 szuplementáció neurogenézist indukált a hippocampusban, a két kezelést együttes alkalmazása nem bizonyult hatásosnak.

A kezelések hatására javult kognitív képességek a hippocampusban bekövetkező molekuláris változásokkal magyarázhatóak. Az ösztrogén receptorok és a BDNF is olyan intracelluláris szignálútvonalakat szabályoznak, melyek részt vesznek a memóriaformálás molekuláris folyamataiban (Vaynman et al., 2004). Vizsgálatunkban mind az ösztrogén, mind a mozgás és a kombinált kezelések növelték a BDNF és az ER α mennyiségét a hippocampusban 15 hónapos korban. Mindkét fehérje mennyisége csökkent öregedés során, amely összefügghet az életkorral járó kognitív funkcióromlással.

Korábban más tanulmányokban is kimutatták, hogy a testmozgás megnöveli a BDNF mennyiségét a hippocampusban (Berchtold et al., 2005, Soya et al., 2007) a neuronális öregedés kezdeti szakaszában. Azonban idős, 27 hónapos életkorban nem mértem változást a BDNF szintjében. Feltételezhető, hogy idősebb korban a BDNF gén regulációja megváltozik, kevésbé érzékenyen reagál bizonyos stimulusokra. A kutatók kimutatták, hogy a gén szabályozása függ az edzés intenzitásától (Lou et al., 2008). Így feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott tréning intenzitása nem volt elegendő a megfelelő hatás eléréséhez. A tréning intenzitása mellett több más faktor, például hormonális tényezők is befolyásolják a BDNF gén szabályozását. Brechtold et al. (2001) kimutatták, hogy az edzés hatására bekövetkező BDNF-válasz függ az ösztrogén hormon jelenlététől. A kutatók megfigyelték, hogy hosszú-távú ösztrogénhiányos állapotban a testmozgás nem emelte meg a BDNF mRNS szintjét, de amikor ösztrogénpótlással normalizálták a hormon-szintet, az állatok hippocampusában megnőtt a BDNF mennyisége edzés hatására. Ennek alapján feltételezhető az is, hogy kísérletünkben a 27 hónapos állatok esetén a hosszú-távú ösztrogén hiány miatt nem következett be jelentősebb változás a BDNF szintjében. Ezzel ellentétben hím patkányokban kimutatható, hogy a testmozgás kompenzálja a BDNF szintjének csökkenését öregedés során (O'Callagan et al. 2009). Ennek oka, hogy a BDNF gén kevésbé érzékenyen reagál a tesztoszteron szint változásra, mint az ösztrogén szint változásra (Bakos et al., 2009). Így ebben a tekintetben különbségek lehetnek nemek között. További kutatás szükséges ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy a BDNF

regulációja fenntartható-e az életkor előrehaladtával a menopauza kezdetén alkalmazott rendszeres mozgásterápiával.

A testmozgással ellentétben az ösztrogénkezelés és a kombinált kezelés mindkét életkorban szignifikánsan megemelte a BDNF mennyiségét. Feltételezhető, hogy az ösztrogén neurotrofikus hatásait részben a BDNF-en keresztül fejtí ki. Az ösztrogén a nukleális receptorainak illetve a másodlagos messenger kaszkádok aktiválása révén változtathatja meg a BDNF expresszióját (Berchtold et al., 2001).

Az ER α expressziója szignifikánsan csökkent a kor előrehaladtával. Az ER α mennyiségének kor-függő csökkenését és az ösztrogénkezelés receptorára kifejtett trofikus hatását az agyban korábban már több tanulmányban leírták (Mehra et al., 2005, Bohacek and Daniel, 2009, Waters et al., 2011). A kísérletünk egyik legfontosabb eredménye, hogy 15 hónapos korban nem csak az ösztrogén kezelések, hanem a mozgás is megnövelte az ER α mennyiségét, annak ellenére, hogy a plazma ösztradiolszintje nem változott. Az ER α edzés-függő növekedését az izomban (Cartoni et al., 2005) a és a májban (Hao et al., 2010) mutatták ki korábban. Azonban még egyetlen tanulmányban sem vizsgálták a testmozgás és az ER α kapcsolatát az agyban.

Az ER α az ösztrogén ligand jelenléte nélkül is aktiválható (Kato et al., 1995). Így pl. az IGF-1 is képes aktiválni a receptort (Mendez et al., 2006). Az IGF-1 szintje bizonyítottan nő edzés hatására (Llorens-Martin et al., 2008), így feltételezhetően az IGF-1 szignalizációs útvonalon keresztül idézte elő a testmozgás az ER α expressziójának fokozódását 15 hónapos korban. Valószínű tehát, hogy a rendszeres testmozgás képes szabályozni a neurotrofikus hatású ösztrogén receptor-függő jelátvitelt idősödő korban. Kérdéses marad azonban, hogy ER α szabályozása rendszeres fizikai aktivitással mennyi ideig tartható fenn az öregedés progressziója során.

Kísérletükben a testmozgás, az ösztrogén és a kombinált kezelések is stimulálták a MAPK, CREB és az Akt fehérjék foszforilációját 15 hónapos korban. A MAPK és Akt útvonalak egyik célpontja a CREB transzkripciós faktor, amely szabályozza egyes szinaptikus fehérjék expresszióját (Meyer et al., 1993). Korábbi vizsgálatokban szintén kimutatták a MAPK/CREB és Akt/CREB szignál útvonalak edzés hatására (Shen et al., 2001) és ösztrogénkezelés hatására (Fan et al., 2008). bekövetkező aktivációját felnőtt patkányokban. A p-szinapszin I és a szinaptofizin mennyiségének növekedését is kimutattam a kísérlet során. Mivel ezek a fehérjék a szinaptikus vezikulák

szervezésében fontos szerepet töltenek be, szintjük emelkedése összefüggésben állhat a kezelések hatására bekövetkező memóriajavulással is. Ez a megfigyelés más laboratóriumban született eredményeket támasztja alá (Molteni et al., 2002, Heschem et al., 2009).

27 hónapos életkorban a mozgás nem változtatta meg sem a szignálmolekulák, sem a szinaptikus fehérjék mennyiségét a hippocampusban. Feltételezhetően ez az eredmény azzal magyarázható, hogy a szignalizációs útvonalakat aktiváló BDNF fehérje mennyisége sem változott meg edzés hatására idős korban.

Az ösztrogén és a kombinált kezelések a testmozgással ellentétben aktiválták a MAPK/CREB útvonalat és megemelték a szinaptofizin és p-szinapszin mennyiségét is. A CREB és a szinaptofizin ösztrogén kezelés hatására bekövetkező növekedését Sharma et al. (2007) ováriumírtott állatokban mutatták ki. Az Akt foszforilációját azonban nem változtatták meg a kezelések 27 hónapos korban. Yildirim et al. (2011) kimutatták, hogy az Akt ösztrogénkezelés hatására bekövetkező aktivációja életkorfüggő. Kísérletükben, a fiatal állatokban az ösztrogén hatékonyan fokozta az Akt foszforilációját, míg idős korban nem tapasztaltak hasonló hatást. Ez a megfigyelés összhangban áll a mi eredményeinkkel is.

A kezelések a hippocampusban jelentősen befolyásolták a redox homeosztázist. 15 hónapos korban az edzés, ösztrogén és a kombinált kezelések csökkentették a szabadgyökök mennyiségét a hippocampusban. Az irodalmi adatok alapján az edzés intenzitása és időtartama döntően befolyásolja a szabadgyökök mennyiségét. Akut, kimerítő edzés megnövelte a ROS mennyiséget az izomban és a májban (Radak et al., 1999). Az emelkedett szabadgyök mennyiség 20 órával az edzést követően is kimutatható volt. Ezzel ellentétben a hosszú-távú közepes intenzitású tréning csökkentette az oxidatív stressz markereket az agyban (Ogonovszky et al., 2005). A csökkent ROS mennyiséggel összhangban a karbonilált fehérjék alacsonyabb szintjét is kimutattuk az edző és az ösztrogén és kombinált kezelésben részesült csoportokban 15 hónapos korban. Hasonlóképp Radak et al. (2001) is megfigyelték a 14 hónapos hím patkányok agyában a karbonilált fehérjék csökkenését krónikus úszás-tréning hatására. Így a korábbi kísérleti eredményekkel összhangban megállapítható, hogy a közepes intenzitáson végzett, rendszeres testmozgás csökkenti az oxidatív károsodás mértékét idősödő korban nőstény patkányok esetén is. Az ösztrogén antioxidáns hatása jól ismert

(Kumar et al. 2011a, b, c), kísérletünkben az ösztrogén és a kombinált kezelések mindkét életkorban szignifikánsan csökkentették a ROS mennyiséget, valamint mérsékelték a karbonilált fehérjék mennyiségét 15 hónapos korban.

A kezelések oxidatív státuszra kifejtett pozitív hatásai az antioxidáns enzimek expressziójának növekedésével magyarázhatóak. Munkám során a Gpx, a citoszolban jelen lévő SOD-1 és a mitokondriális SOD-2 szintjét vizsgáltam. Edzés hatására nőtt a Gpx és a SOD-1 szintje, az ösztrogén kezelés pedig az összes vizsgált antioxidáns enzim szintjét megnövelte a hippocampusban 15 hónapos korban. Um et al. (2011) szintén kimutatták a SOD enzimek expressziójának növekedését 3 hónapos tréning hatására. 27 hónapos korban nem változtak az enzim-szintek, így a szabadgyökök ösztrogén és kombinált kezelésre bekövetkező csökkenése az ösztrogén molekula közvetlen antioxidáns hatásainak tudhatóak be.

A munkám során kimutattam a PGC-1 α növekedését testmozgás és ösztrogén kezelés hatására. Steiner et al. (2011) is hasonló megfigyelést tettek, kísérletünkben a PGC-1 α mRNS expressziója nőtt az agykülönböző területein 8 hetes edzésprogramot követően. A PGC-1 α a redox egyensúly egyik fontos szabályozó fehérjéje, mivel számos antioxidáns enzim transzkripcióját irányítja, így aktivációja az agyban csökkentheti az oxidatív stresszt (St-Pierre et al., 2006).

PGC-1 α az antioxidáns enzimek expressziójának szabályozása mellett befolyásolja a mitokondriális funkciókat és a mitokondriális biogenezist. A PGC-1 α transzkripciós faktor aktiválja az NRF-1 és a mTFA fehérjéket, melyek a mitokondriális fehérje gének átírását illetve a mitokondriális genom replikációját irányítják. Jelen vizsgálatunkban a sem az NRF-1, sem az mTFA mennyisége nem változott edzés hatására. Koltai et al. (2011) a vázizomban hasonlóképpen nem mutatott ki változást az NRF-1 és mTFA mennyiségében, annak ellenére, hogy a PGC-1 α expressziója növekedett edzés hatására. Eddig a hippocampusban még nem kutatták a testmozgás szerepét az NRF-1 és mTFA transzkripciós faktorok szabályozásában.

Fontos megjegyezni, hogy az NRF-1 és mTFA fehérjék mellett számos más faktor is befolyásolja a mitokondriális fehérjék formációját és az új mitokondriumok keletkezését (Lopez-Lluch et al., 2008), Továbbá, a PGC-1 α aktivitását poszttranszlációs mechanizmusok is befolyásolják, amelyek így közvetve érinthetik az NRF-1 és mTFA

szabályozását (Canto and Auwerx, 2009). További kutatómunkát igényel annak vizsgálata, hogy a testmozgás képes-e befolyásolni a mitokondriális funkciókat az agyban és, ha igen, akkor az milyen intracelluláris szignálútvonalak szabályozásán át valósul meg.

Munkám során kimutattam, hogy a fizikai aktivitás megnövelte az AMPK foszforillációját a 15 hónapos állatok hippocampusában. Az AMPK és a PGC-1 α között kapcsolat feltételezhető. Yu et al. (2010) kimutatták, hogy a kortikális neuronokban az AMPK farmakológias stimulációja a PGC-1 α aktivációját eredményezte. Az edzés hatására bekövetkező AMPK aktivációt a vázizomban már több kutatásban is kimutatták (Canto et al., 2010). A hippocampusban Gomez-Pinilla et al. (2008) vizsgálták az edzés és az AMPK kapcsolatát. A szerzők kimutatták, hogy az edzés hatására bekövetkező AMPK aktiváció szerepet játszik a neuronális plaszticitásban és a neuronok metabolismusának irányításában. Bayod et al. (2011) szintén megfigyelték, hogy a p-AMPK szint növekszik az agykülönböző régiókban 36 hetes hosszú-távú tréning hatására. Ezekre az eredményekre alapozva megállapítható, hogy az AMPK a vázizommal egyetemben az agyban is a testmozgás egyik fontos molekuláris hatáspontja. Fontos kérdés lehet, hogy a testmozgás milyen molekuláris mechanizmuson keresztül idézi elő az AMPK aktivációját.

A fizikai aktivitás növeli a neuronális aktivitást a hippocampusban és modulálja a CaMKK szignalizáció útját (Hescham et al., 2009, Nishijima et al., 2012). Mindkét faktor az AMPK aktivátorának tekinthető (Yu and Yang, 2010; Hawley et al., 2005). A CaMKK szignalizációs útját hipoxia és az oxidatív egyensúly megváltozásakor aktiválódhat. Feltételezhető, hogy mozgás során fokozott ugyan a szabadgyök termelés, de az aktiválja CaMKK/AMPK/PGC-1 α útját, melynek hatására fokozódik az antioxidáns enzimek expressziója. Az enzimatikus adaptációs folyamatok eredményeképp a neuronok ellenállóbbak az oxidatív stressznek, alacsonyabb az oxidatív károsodás mértéke. Így hosszú-távon a rendszeres testmozgás antioxidáns hatású lehet, ezért jelentős lehet olyan neurológiai betegségek megelőzésében, melynek etiológiájában az oxidatív stressz is szerepet játszhat.

Az ösztadiol a mozgáshoz hasonlóan hatékonyan növelte az antioxidáns enzimek szintjét és aktiválta a PGC-1 α /NRF-1 transzkripciós faktorokat. A kombinált kezelés azonban nem bizonyult hatásosnak. Idős, 27 hónapos korban ugyan az ösztrogén

csökkentette a szabadgyökök mennyiségét, de nem aktiválta az említett fehérjéket. Így az ösztrogén szabadgyök csökkentő hatása valószínűleg a molekula gyökfogó tulajdonságainak tudható be.

További fontos eredmény, hogy az ösztrogén és kombinált kezelések mellett a rendszeres testmozgás neurotrofikus hatású volt idős, 27 hónapos korban, mivel növelte a DCX mennyiségét a hippocampusban. A DCX neuronális progenitor sejtekben expresszálódik, szintjének megemelkedése a fokozott neurogenézissel függhet össze. Így a kezelések feltételezhetően segítenek mérsékelni a korral járó neuron pusztulást. Korábban Koltai et al. (2010) is leírták, hogy az testmozgás fokozza a neurogenézist idős patkányok hippocampusában. Azonban a szerzők az eredményeimhez hasonlóan nem találtak korrelációt a neurogenézis és a kognitív képességek között. Az edzés hatására az újonnan képződött neuronok funkciójának megismerése tehát további kutatómunkát igényel.

Az élethosszig tartó testmozgás is hasonlóképp trofikus hatású volt hím állatokban is. Az edzés növelte a DCX mennyiségét a hippocampusban, melyet western blottal és szövettani elemzéssel is kimutattunk. A rendszeres testmozgás további jelentős trofikus hatásaként említhető a megnövekedett BDNF, szinaptofizin mennyisége is. A BDNF tehát emelkedett az idős hím patkányok agyában mozgás hatására, ellentétben a nőstény idős patkányokkal. A kapott eredmények a nemek közötti különbségekkel vagy a különféle edzésprotokollok eltérő hatásaival magyarázhatóak (pl. a testedzés időtartamával). Hímekben a BDNF gén regulációja ugyan függ a tesztoszterontól, de kevésbé meghatározó faktor, mint nőstényeknél az ösztrogén (Bakos et al., 2009). O'Callagen et al. (2007) is kimutatta korábban a BDNF szint növekedését testmozgás hatására idős hím patkányokban.

Az élethosszig tartó testmozgás pozitívan befolyásolta a neuronok anyagcseréjét. Nőtt az inzulin szignalizációs útvonalban szerepet játszó Akt aktivációja, az energiaegyensúlyt szabályozó AMPK foszforilációja és a glükózfelvételért felelős Glut-1 expressziója. Ezek a változások összefüggésben állhatnak a szinaptikus markerek emelkedett szintjével, mivel a szinaptogenezis energiaigényes folyamat. Az inzulin jelátviteli útvonal (Akt) aktivációja az agyra jelentős hatással van. A kutatók kimutatták, hogy a receptor aktiváció részt vesz a tanulás és a memóriaformálás szabályozásában

(Zhao et al., 2004). A testedzés hatására bekövetkező változások a hippocampusban tehát hozzájárulnak a tanulás molekuláris folyamatainak energiaigényének biztosításához.

Az élethosszon át tartó testmozgás pozitív hatással lehet a kolinerg jelátvitelre is, mivel magasabb volt az acetilkolin szintéziséért felelős ChAT mennyisége az edző állatokban a kontrollokhoz képest. A kolinerg rendszer degenerációjának prevenciója kulcsfontosságú a kognitív funkcióromlás megelőzése szempontjából. Az élethosszig tartó testmozgást végző állatok jobb memóriával és tanulási képességekkel bírtak, mint a nem edző patkányok. A jobb kognitív képességek tehát betudhatóak a magasabb ChAT, BDNF és szinaptikus markerek szintjének.

A redox rendszer szabályozását nem érintette az élethosszig tartó testmozgás. 27 hónapos korban nőstény állatokban sem tapasztaltunk változást. A redox egyensúlyt szabályozó faktorok expressziója feltehetőleg olyan mértékben megváltozik öregedéskor, hogy az mozgással nehezen kompenzálható.

7. Következtetések

A Célkitűzések fejezetben feltett kérdésekre vizsgálataink alapján az alábbi válaszokat kaptam:

- A1.** Az eredményeim alapján az anösztrusz alatt jelentős kognitív funkcióromlás tapasztalható, mivel a 27 hónapos állatok rosszabbul teljesítettek mind az új tárgy felismerési, mind a Morris útvesztő tesztekben.
- A2.** Öregedés során csökken a neurotrofikus hatású BDNF és ösztrogén receptor alfa mennyisége valamint a szinaptofizin mennyisége, amely alátámasztja a kognitív képességek korral-járó romlását. Ugyanakkor nőtt a szabadgyökök mennyisége és fokozódik az oxidatív károsodás mértéke a hippocampusban.
- A3.** Az ösztrogénkezelés képes javítani a hippocampusz-függő kognitív képességeket 15 és 27 hónapos korban, tehát kísérletünk újabb bizonyítékot szolgáltat a hormonpótló kezelés hatékonyságára.
- A4.** Az ösztrogénkezelés a hippocampusban trofikus változásokat idézett elő, növelte a BDNF mennyiségét mindkét életkorban. Az ösztrogén receptor alfa expressziója megemelkedett a kezelés hatására, mely az ösztrogén szignalizációs útvonal aktivációját eredményezte mindkét életkorban. Az ösztrogén szignalizációs útvonal tehát az életkortól függetlenül szabályozható hosszú-távú ösztrogénkezeléssel.
- A5.** Aszinaptikus markerek szintje is megemelkedett az ösztrogénkezelés hatására, amely az ösztrogén szinaptogenetikus hatását erősíti meg.
- A6.** Az ösztrogén antioxidáns hatással rendelkezik, csökkenti a szabadgyökök és az oxidatív sérülés mértékét. Ez az eredmény megerősíti az ösztrogén neuroprotektív szerepét. Azonban idős korban nem csökkentette a fehérje

karbonilok mennyiségét, feltételezhetően az öregedés során akkumulálódó sérülés mértéke magas volt, így a 15 hetes ösztrogénkezelés nem eredményezett szignifikáns változást.

- A7.** Az ösztrogén képes aktiválni a redox egyensúlyt és a mitokondriális gének átírását szabályozó transzkripciós faktorokat valamint befolyásolja az antioxidáns enzimek szintjét a hippocampusban korai anösztrusz állapotában.
- B1.** A rendszeres testmozgás az ösztrogénkezeléshez hasonlóan képes javítani a hippocampusz-függő kognitív funkciókat 15 hónapos korban. 27 hónapos korban az általunk alkalmazott mozgás módszer nem bizonyult hatásosnak.
- B2.** A rendszeres testmozgás ösztrogénkezeléshez hasonlóan a hippocampusban trofikus változásokat idéz elő, megnöveli a BDNF és az ER α mennyiségét, és aktiválja a MAPK/CREB illetve PI3K/CREB szignalizációs útvonalakat. A mozgás tehát az ösztrogénkezeléssel azonos neurobiológiai hatásokat eredményez a menopauza kezdeti szakaszában. Idős korban a 15 hetes közepes intenzitású teszmozgás pozitív neurobiológiai hatásait nem sikerült igazolni.
- B3.** A szinaptikus markerek szintje is megemelkedik a testmozgás hatására idősödő korban, így az ösztrogén hiányos állapot kezdeti szakaszában a testmozgás támogathatja a szinaptogenezist.
- B4.** A rendszeres testmozgás csökkenti a szabadgyökök mennyiségét és az oxidatív károsodás mértékét a hippocampusban. Így a közepes intenzitású tréning antioxidáns hatással bír az ösztrogénhiányos állapot kezdeti szakaszán. Tartós, ösztrogénhiányos állapotban az alkalmazott edzés módszer nem képes csökkenteni az oxidatív stresszt a hippocampusban.
- B5.** A testmozgás nem befolyásolta a mitokondriális gének átírását szabályozó vizsgált transzkripciós faktorokat. A rendszeres testmozgás és a mitokondriális funkciók kapcsolatának vizsgálata további kutatómunka tárgyát képezi.

- C.** Az ösztrogénkezelés és a testmozgás hatásai nem additívak, azok együttes alkalmazása nem eredményez az ösztrogén kezelés és a testmozgás hatásaitól eltérő változást, így a kombinált kezelés alkalmazása az eredmények alapján nem indokolt.
- D1.** A rendszeres, élethosszon-át tartó testmozgás képes javítani a hippocampusz-függő kognitív funkciókat.
- D2.** Az élethosszon-át tartó testmozgás hippocampuszban trofikus és neurogenetikus változásokat idéz. Magasabb a BDNF expressziója, a doublecortin mennyisége.
- D3.** A szinaptikus markerek szintje is magasabb volt az élethosszon-át tartó testmozgás következményeképp a kontroll állatokhoz képest. A testmozgás támogatja a szinaptogenetikus folyamatokat.
- D4.** Az élethosszon-át tartó testmozgás támogatja a neuronok energiametabolizmusát a Glut-1, AMPK és Akt molekulák aktivációja révén a hippocampuszban.
- D5.** Az élethosszon-át tartó testmozgás nem változtatta meg a redox állapotot és a mitokondriális gének átírását szabályozó transzkripciós faktorokat. A redox egyensúlyt és a mitokondriális funkciókat szabályozó faktorok expressziója feltehetőleg olyan mértékben megváltozik öregedéskor, hogy az mozgással nem kompenzálható.
- D6.** Az élethosszon-át tartó testmozgás befolyásolja a kolinerg működést a hippocampuszban, mivel megemeli az acetilkolin szintéziséért felelős kolin-acetil-szintetáz szintjét az agyterületen

8. Összefoglalás

Munkám során kimutattam, hogy a hosszú távú testmozgás potenciális nem-farmakológias prevenciósi módszer lehet idősödő korban, mivel a menopauza kezdeti szakaszában képes javítani a kognitív képességeket és olyan molekuláris változásokat indukálni a hippocampusban, melyek hozzájárulnak az agy egészséges öregedéséhez. Idősödő korban a testmozgás az ösztrogénnel azonos szignálútvonalakat aktivált a neuronokban és növelte a szinaptikus molekulák mennyiségét is. Emellett a rendszeres, közepes intenzitáson végzett testmozgás csökkentette a szabadgyökök és az oxidatív károsodás mértékét is az agyban, mivel olyan szignálútvonalakat aktivált, melyek részt vesznek az antioxidáns enzimek expressziójának szabályozásában.

Idős korban az általam alkalmazott mozgás tréning hatása nem volt hasonló az ösztrogén terápia hatásához. Azonban nem zárható ki, hogy optimális tréning kondíciók mellett idős korban is pozitív változások érhetőek el mozgás terápiával. Hím állatok esetén az élethosszig tartó rendszeres testmozgásnak jelentős hatásai voltak az idegrendszerre. A mozgás neurotrofikus hatású volt, befolyásolta a neuronok anyagcseréjét szabályozó szignálmolekulákat is a hippocampusban. Az idős hím állatok kognitív funkciói javultak a testmozgás hatására. Azonban sem a nőstény állatoknál sem a hím állatokban nem sikerült idős korban kimutatni a redox változásokat mozgás hatására. A redox egyensúlyt szabályozó faktorok expressziója feltehetőleg olyan mértékben megváltozik öregedéskor, hogy az mozgással nem kompenzálható.

Összefoglalva a rendszeres fizikai aktivitás pozitív hatással van az agy öregedésére, de a különböző életkorokban és a nemeket tekintve is más és más edzés módszer szükséges a kívánt eredmények eléréséhez. Az állatkísérletes modellek és annak alapján az eredményes humán időskori edzésprotokollok kidolgozása a jövő feladata.

9. Summary

In summary exercise can emerge as a potential non-pharmacological intervention that can improve the cognitive vitality around the onset of menopause or the early stage of postmenopausal period, because it exerted rather comparable behavioral and molecular neurotrophic effects with estradiol treatment in female rats in the early ageing period found in this study. The data from this study demonstrate that long term physical exercise results in lower levels of ROS and protein carbonyls as well as elevated levels of antioxidant enzymes in the hippocampal neurons of older rats. Physical training, thus, can be an effective option to regulate the oxidative balance and thus delay the onset of oxidative stress-related neurodegenerative processes. During the well advanced stage of female ageing effectiveness of regular physical exercise proved to be far less pronounced. However, it is not excluded that under other more optimized conditions exercise might also be effective in aged female rats and the movement therapy may compensate at least partly the natural decline of estrogens including their dose-dependent beneficial actions on the ageing brain.

Life-long exercise has also resulted in beneficial effects on brain ageing in male rats. Physical activity during the whole life-span had neurotrophic actions; it influenced the signal molecules regulating the energy metabolisms of the neurons. In addition life-long exercise had beneficial effects on cognition as well. The redox balance and the related signaling molecules were not affected by exercise neither in the female nor in the aged male rats.

In conclusion physical activity has preventive role in terms of brain ageing, however there are gender and age differences regarding its effectiveness. Further studies are necessary to establish the effective training protocols in different age groups and genders.

10. Irodalomjegyzék

- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005) Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:4217-4221.
- Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* 452:281-285.
- Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L (2006) Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav Brain Res* 168(2):345-348
- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89:121-145.
- Archer E, Blair SN (2011) Physical activity and the prevention of cardiovascular disease: from evolution to epidemiology. *Prog Cardiovasc Dis* 53:387-396.
- Bakos J, Hlavacova N, Rajman M, Ondicova K, Koros C, Kitraki E, Steinbusch HW, Jezova D (2009) Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience* 164:788-797.
- Baquer NZ, Taha A, Kumar P, McLean P, Cowsik SM, Kale RK, Singh R, Sharma D (2009) A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. *Biogerontology* 10:377-413.
- Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS, Maier SF, Lal H (1991) Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody-response in aged f344 rats. *Neurobiol Aging* 12(1):47-53
- Bayer U, Hausmann M (2011) Estrogen treatment affects brain functioning after menopause. *Menopause Int* 17:148-152.

- Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. (2011) Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol.* (5):1380-90. Epub 2011 Aug 4.
- Berchtold NC, Chinn G, Chou M, Kessler JP, Cotman CW (2005) Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133:853-861.
- Berchtold NC, Kessler JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW (2001) Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 14:1992-2002.
- Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Hunter CL, Price KL, Moore AB, Granholm AC (2003) Ovarian hormones and cognition in the aged female rat: I. Long-term, but not short-term, ovariectomy enhances spatial performance. *Behav Neurosci* 117:1395-1406.
- Blanco G, Diaz H, Carrer HF, Beauge L (1990) Differentiation of rat hippocampal neurons induced by estrogen in vitro: effects on neuriteogenesis and Na, K-ATPase activity. *J Neurosci Res* 27:47-54.
- Bohacek J, Daniel JM (2009) The ability of oestradiol administration to regulate protein levels of oestrogen receptor alpha in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats is altered following long-term ovarian hormone deprivation. *J Neuroendocrinol* 21:640-647.
- Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB (1995) Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 200:107-121.
- Borras C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J (2003) Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine* 34:546-552.

- Bradford MM, Williams WL (1976) New, rapid, sensitive method for protein determination. *Federation Proceedings* 35:274-274.
- Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS (2001) Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology* 142:1284-1289.
- Brown DA, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Caruso NM, Ehlers LB, Fleshner M, Spencer RL, Moore RL (2007) Short-term treadmill running in the rat: what kind of stressor is it? *Journal of Applied Physiology* 103:1979-1985.
- Canto C, Auwerx J (2009) PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 20:98-105.
- Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakic C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 11:213-219.
- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERR alpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *Journal of Physiology-London* 567:349-358.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605.
- Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD (2004) Mitochondrial localization of ER alpha and ER beta in human MCF7 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 286:E1011-E1022.
- Choeiri C, Staines W, Miki T, Seino S, Messier C (2005) Glucose transporter plasticity during memory processing. *Neuroscience* 130:591-600.
- Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS (2009) Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Molecular Neurodegeneration* 4.

- Convit A, de Leon MJ, Tarshish C, De Santi S, Kluger A, Rusinek H, George AE (1995) Hippocampal volume losses in minimally impaired elderly. *Lancet* 345:266.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC (1994) Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 23:471-476.
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005) Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21:1-14.
- Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F, Bocti C, Paquet N, Begdouri H, Bentourkia M, Turcotte E, Allard M, Barberger-Gateau P, Fulop T, Rapoport SI (2011) Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27:3-20.
- Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T (2001) Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res Brain Res Rev* 37:153-161.
- Daly C, Sugimori M, Moreira JE, Ziff EB, Llinas R (2000) Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6120-6125.
- Ding Q, Vaynman S, Akhavan M, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2006a) Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience* 140:823-833.
- Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y (2006b) Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res* 3:15-23.

- Dougherty MK, Schumaker LM, Jordan VC, Welshons WV, Curran EM, Ellis MJ, El-Ashry D (2004) Estrogen receptor expression and sensitivity to paclitaxel in breast cancer. *Cancer Biology & Therapy* 3:460-467.
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.
- Dumitriu D, Rapp PR, McEwen BS, Morrison JH (2010) Estrogen and the aging brain: an elixir for the weary cortical network. *Ann N Y Acad Sci* 1204:104-112.
- Eadie BD, Redila VA, Christie BR (2005) Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. *J Comp Neurol* 486:39-47.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*. 24;112(2):257-69.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, Gustafsson JA (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265.
- Faghihi MA, Mottagui-Tabar S, Wahlestedt C (2004) Genetics of neurological disorders. *Expert Rev Mol Diagn* 4:317-332.
- Fan L, Hanbury R, Pandey SC, Cohen RS (2008) Dose and time effects of estrogen on expression of neuron-specific protein and cyclic AMP response element-binding protein and brain region volume in the medial amygdala of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 88:111-126.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.

- Fordyce DE, Farrar RP (1991) physical-activity effects on hippocampal and parietal cortical cholinergic function and spatial-learning in f344 rats. *Behavioural Brain Research* 43:115-123.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88:435-437.
- Frick KM (2009) Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Horm Behav* 55:2-23.
- Fukunaga K, Miyamoto E (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol* 16:79-95.
- Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC (2007) *Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention*.
- Gilad GM, Gilad VH (1987) Age-related reductions in brain cholinergic and dopaminergic indices in two rat strains differing in longevity. *Brain Res* 408:247-250.
- Giovannini MG (2006) The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci* 17:619-634.
- Gomez-Pinilla F (2008) The influences of diet and exercise on mental health through hormesis. *Ageing Res Rev* 7:49-62.
- Gonzalez C, Alonso A, Diaz F, Patterson AM (2003) Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1. *J Endocrinol* 176:367-379.
- Grady CL, Craik FI (2000) Changes in memory processing with age. *Curr Opin Neurobiol* 10:224-231.
- Gray DA, Tsirigotis M, Woulfe J (2003) Ubiquitin, proteasomes, and the aging brain. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003:RE6.

- Green S, Kumar V, Krust A, Walter P, Chambon P (1986) Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 2:751-758.
- Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS (1998) Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47:1006-1013.
- Hao LK, Wang YJ, Duan YS, Bu SM (2010) Effects of treadmill exercise training on liver fat accumulation and estrogen receptor alpha expression in intact and ovariectomized rats with or without estrogen replacement treatment. *European Journal of Applied Physiology* 109:879-886.
- Hardie DG (2004) AMP-activated protein kinase: a key system mediating metabolic responses to exercise. *Med Sci Sports Exerc* 36:28-34.
- Harrison PJ, Eastwood SL (2001) Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus* 11:508-519.
- Hart LL, Davie JR (2002) The estrogen receptor: more than the average transcription factor. *Biochem Cell Biol* 80:335-341.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2(1):9-19.
- Henderson VW (2010) Action of estrogens in the aging brain: dementia and cognitive aging. *Biochim Biophys Acta* 1800:1077-1083.
- Herson PS, Hurn PD (2010) Gender and the injured brain. *Prog Brain Res* 186:177-187.
- Hescham S, Grace L, Kellaway LA, Bugarith K, Russell VA (2009) Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress. *Metab Brain Dis* 24:701-709.

- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K (2003) Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* 14:124-129.
- Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60:321-327.
- Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Hattori K, Kondo T, Mizuno Y, Ozawa T (1990) Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 170:1044-1048.
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149:3167-3175.
- Ishida Y, Shirokawa T, Miyaishi O, Komatsu Y, Isobe K (2000) Age-dependent changes in projections from locus coeruleus to hippocampus dentate gyrus and frontal cortex. *Eur J Neurosci* 12:1263-1270.
- Kalita K, Szymczak S (2003) [Estrogen receptors in the brain]. *Neurol Neurochir Pol* 37 Suppl 3:63-78.
- Kang HJ, Schuman EM (1995) Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Journal of Physiology-Paris* 89:11-22.
- Karjalainen A, Paasilta M, Heikkinen J, Backstrom AC, Savolainen M, Kesaniemi YA (2001) Effects of peroral and transdermal oestrogen replacement therapy on glucose and insulin metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:165-173.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P (1995) Activation of the estrogen-receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein-kinase. *Science* 270:1491-1494.
- Kawaguchi S, Kishikawa M, Sakae M, Nakane Y (1995) Age-related changes in basal dendrite and dendritic spine of hippocampal pyramidal neurons (CA1) among

SAMP1TA/Ngs--quantitative analysis by the rapid Golgi method. *Mech Ageing Dev* 83:11-20.

Keefe D, Garcia-Segura LM, Naftolin F (1994) New insights into estrogen action on the brain. *Neurobiol Aging* 15:495-497.

Kelner KL, Kirchick HJ, Peck EJ (1982) Differential sensitivity of estrogen target tissues - the role of the receptor. *Endocrinology* 111:1986-1995.

Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY (2000) The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. *Free Radic Biol Med* 28:683-692.

Koltai E, Zhao Z, Lacza Z, Cselenyak A, Vacz G, Nyakas C, Boldogh I, Ichinoseki-Sekine N, Radak Z (2011) Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. *Rejuvenation Res* 14:585-596.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.

Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E (2006) Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 55:120-127.

Kumar P, Kale RK, Baquer NZ (2011a) Estradiol modulates membrane-linked ATPases, antioxidant enzymes, membrane fluidity, lipid peroxidation, and lipofuscin in aged rat liver. *J Aging Res* 2011:580245

- Kumar P, Kale RK, McLean P, Baquer NZ (2011b) Protective effects of 17beta estradiol on altered age related neuronal parameters in female rat brain. *Neurosci Lett* 502 (1):56-60
- Kumar P, Taha A, Kale RK, Cowsik SM, Baquer NZ (2011c) Physiological and biochemical effects of 17beta estradiol in aging female rat brain. *Exp Gerontol* 46 (7):597-605
- Lalonde R (2002) The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26:91-104.
- Lamprecht R (1999) CREB: a message to remember. *Cell Mol Life Sci* 55:554-563.
- Lapolt PS, Yu SM, Lu JK (1988) Early treatment of young female rats with progesterone delays the aging-associated reproductive decline: a counteraction by estradiol. *Biol Reprod* 38(5):987-995
- Le Goascogne C, Robel P, Gouezou M, Sananes N, Baulieu EE, Waterman M (1987) Neurosteroids: cytochrome P-450_{scc} in rat brain. *Science* 237:1212-1215.
- Lee SJ, McEwen BS.(2001) Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:569-91. Review.
- Lee E, Son H (2009) Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *Bmb Reports* 42:239-244.
- Lindholm D, Beck T (1994) Role of neurotrophic factors in ischemic brain damage.
- Lippa AS, Pelham RW, Beer B, Critchett DJ, Dean RL, Bartus RT (1980) Brain cholinergic dysfunction and memory in aged rats. *Neurobiol Aging* 1:13-19.
- Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD (2011) Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res* 218:308-314.

- Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2008) Growth factors as mediators of exercise actions on the brain. *Neuromolecular Med* 10:99-107.
- Lopez-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R (2008) Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 43:813-819.
- Lou SJ, Liu JY, Chang H, Chen PJ (2008) Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Research* 1210:48-55.
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429:883-891.
- Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, Kuller LH, Cochrane BB, Hunt JR, Ludlam SE, Pettinger MB, Gass M, Margolis KL, Nathan L, Ockene JK, Prentice RL, Robbins J, Stefanick ML, Ludlam S, Lund B, Prentice R, O'Rourke C, Du L, Pillsbury S, Hightower C, Ellison R, Tan J, Wassertheil-Smoller S, Magnani M, Noble DH, Dellicarpini T, Bueche M, McGinnis AD, Rybicki FJ, Assaf AR, Sloane G, Phillips LS, Butler V, Huber M, Vitali J, LeBrun C, Palm R, Embersit D, Whitlock E, Arnold K, Sidney S, Cantrell V, Kotchen JM, Feltz C, Howard BV, Thomas-Geevarghese A, Boggs G, Jelinick JS, Greenland P, Neuman A, Carlson-Lund G, Giovanazzi SM, Swope S, Jackson R, Toussant K, Lewis CE, Pierce P, Stallings C, Wactawski-Wende J, Goel S, Laughlin R, Zaragoza S, Macias D, Belisle D, Voigt B, Goldin J, Woo M, Lien X, Wright CM, Sheridan S, Robinson JG, Feddersen D, Kelly-Brake K, Carroll J, Ockene J, Churchill L, Lasser NL, Miller B, Maldjian PD, Pierre-Louis J, Fishman J, O'Sullivan MJ, Fernandez D, Bjerk CL, Truwit C, Hearity JA, Hyslop WB, Darroch K, Murphy C, Heiss G, Edmundowicz D, Ives D, Johnson KC, Satterfield S, Connelly SA, Jones EL, Brzyski R, Nashawati MA, Torchia S, Rodriguez A, Garza R, Nentwich P, Sarto GE, Broderick L, Sweitzer NK, Nabel E, Pottern L, McGowan J, Ford L, Geller N, Anderson G, LaCroix A, Kooperberg CL, Patterson RE, McTiernan A, Shumaker S, Stein E, Cummings S, Hays J, Phillips L, Beresford S, Chlebowski R, Caan B, Van Horn L, Black H, Lane D, Bassford T, Hubbell FA, Judd H,

- Limacher M, Curb D, Wallace R, Lasser N, Brunner R, Bonds D, Hendrix S, Investigators WW-C (2007) Estrogen therapy and coronary-artery calcification. *New England Journal of Medicine* 356:2591-2602.
- Manthey D, Behl C (2006) From structural biochemistry to expression profiling: Neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience* 138:845-850.
- Mattson MP (1998) Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* 21:53-57.
- McEwen BS, Sapolsky RM (1995) Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 5:205-216.
- McEwen BS, Woolley CS (1994) Estradiol and progesterone regulate neuronal structure and synaptic connectivity in adult as well as developing brain. *Exp Gerontol* 29:431-436.
- Mehra RD, Sharma K, Nyakas C, Vij U (2005) Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res* 1056:22-35.
- Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura LM (2006) Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 27:391-403.
- Messaoudi E, Bardsen K, Srebro B, Bramham CR (1998) Acute intrahippocampal infusion of BDNF induces lasting potentiation of synaptic transmission in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 79:496-499.
- Meyer TE, Waeber G, Lin J, Beckmann W, Habener JF (1993) The promoter of the gene encoding 3',5'-cyclic adenosine-monophosphate (camp) response element binding-protein contains camp response elements - evidence for positive autoregulation of gene-transcription. *Endocrinology* 132:770-780.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292-1300.

- Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2002) Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur J Neurosci* 16:1107-1116.
- Montine TJ, Neely MD, Quinn JF, Beal MF, Markesbery WR, Roberts LJ, Morrow JD (2002) Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 33:620-626.
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 13:184-188.
- Moorthy K, Yadav UC, Siddiqui MR, Mantha AK, Basir SF, Sharma D, Cowsik SM, Baquer NZ (2005) Effect of hormone replacement therapy in normalizing age related neuronal markers in different age groups of naturally menopausal rats. *Biogerontology* 6(5):345-356
- Moreno M, Ordonez P, Alonso A, Diaz F, Tolivia J, Gonzalez C (2010) Chronic 17beta-estradiol treatment improves skeletal muscle insulin signaling pathway components in insulin resistance associated with aging. *Age (Dordr)* 32:1-13.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278:412-419.
- Murphy DD, Segal M (1997) Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1482-1487.
- Nairn JG, Bedi KS, Mayhew TM, Campbell LF (1989) On the number of Purkinje cells in the human cerebellum: unbiased estimates obtained by using the "fractionator". *J Comp Neurol* 290:527-532.
- Nicolle MM, Gonzalez J, Sugaya K, Baskerville KA, Bryan D, Lund K, Gallagher M, McKinney M (2001) Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience* 107:415-431.

- Nilsen J (2008) Estradiol and neurodegenerative oxidative stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29:463-475.
- Nimmrich V, Szabo R, Nyakas C, Granic I, Reymann KG, Schröder UH, Gross G, Schoemaker H, Wicke K, Möller A, Luiten P (2008) Inhibition of Calpain Prevents N-Methyl-D-aspartate-Induced Degeneration of the Nucleus Basalis and Associated Behavioral Dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 327:343-352.
- Nishijima T, Okamoto M, Matsui T, Kita I, Soya H (2012) Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J Appl Physiol* 112:197-203.
- Nyakas C, Buwalda, MarkelÉ, Korte SM, Luiten PGM (1994) Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction induced by prenatal hypoxia is prevented by calcium antagonist nimodipine. *Eur. J. Neurosci.* 6: 746-753,
- Nyakas C, Felszeghy K, Szabó R, Keijser JN, Luiten PGM, Szombathelyi Z, Tihanyi K (2009) Neuroprotective effects of vinpocetine and its major metabolite cis-apovincaminic acid on nmda-induced neurotoxicity in a rat entorhinal cortex lesion model. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 15:89-99.
- Nyakas C, Mulder J, Felszeghy K, Keiser JN, Mehra R, Luiten PGM (2003) Chronic excess of corticosterone increases serotonergic fibre degeneration in aged rats. *J Neuroendocr.* 15: 498-507
- Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PGM (2011) The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behav Brain Res.* 221(2):594-603.
- O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM (2007) The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* 176:362-366.
- O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM (2009) Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 19(10):1019-1029

- Ogonovszky H, Berkes I, Kumagai S, Kaneko T, Tahara S, Goto S, Radak Z (2005) The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int* 46:635-640.
- Ordonez-Moran P, Munoz A (2009) Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 8:1675-1680.
- Pang TY, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ (2006) Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience* 141:569-584.
- Pankratz N, Foroud T (2004) Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx* 1:235-242.
- Panzica GC, Melcangi RC (2008) The endocrine nervous system: source and target for neuroactive steroids. *Brain Res Rev* 57:271-276.
- Patel JR, Brewer GJ (2003) Age-related changes in neuronal glucose uptake in response to glutamate and beta-amyloid. *J Neurosci Res* 72:527-536.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
- Pelletier G (2000) Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15:1261-1270.
- Picciotto MR, Zoli M (2002) Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol* 53:641-655.
- Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265:69-72.
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88:1243-1276.
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, Lu B (1999) Impairments in high-frequency transmission,

synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19:4972-4983.

Rabadi MH (2007) Randomized clinical stroke rehabilitation trials in 2005. *Neurochem Res* 32:807-821.

Radak Z, Chung HY, Goto S (2005) Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* 6:71-75.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucso J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38:17-23.

Radak Z, Pucso J, Mecseki S, Csont T, Ferdinandy P (1999) Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 26:1059-1063.

Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int* 49:387-392.

Ramirez VD, Zheng J (1996) Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 17:402-439.

Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6465-6467.

Riddle DR, Sonntag WE, Lichtenwalner RJ (2003) Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev* 2:149-168.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001) Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15:1748-1757.

Rossouw JE (2010) Prescribing postmenopausal hormone therapy to women in their 50s in the post-Women's Health Initiative era. *Maturitas* 65:179-180.

- Scarpulla RC (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 286:81-89.
- Scarpulla RC (2006a) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97:673-683.
- Scarpulla RC (2006b) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 97:673-683.
- Schaaf MJM, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E (1998) Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Research* 813:112-120.
- Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP (2001) Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J* 359:203-210.
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555-563.
- Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735.
- Seki T, Arai Y (1995) Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6:2479-2482.
- Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U (2007) Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res* 1132(1):10-19
- Shen H, Tong L, Balazs R, Cotman CW (2001) Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience* 107:219-229.
- Sierens J, Hartley JA, Campbell MJ, Leathem AJ, Woodside JV (2001) Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res* 485:169-176.

- Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 379:482-494.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538-541.
- Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Iimura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, Nishijima T (2007) BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358:961-967.
- Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM.(2011) Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *J Appl Physiol.* 111(4):1066-71
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127:397-408.
- Stadtman ER (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38.
- Stadtman ER (2006) Protein oxidation and aging. *Free Radic Res* 40:1250-1258.
- Stein DG (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24:386-391.
- Stice JP, Knowlton AA (2008) Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response. *Mol Med* 14:517-527.
- Sturek M (2011) Ca²⁺ regulatory mechanisms of exercise protection against coronary artery disease in metabolic syndrome and diabetes. *J Appl Physiol* 111:573-586.

- Suen PC, Wu K, Levine ES, Mount HT, Xu JL, Lin SY, Black IB (1997) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8191-8195.
- Suzuki T (2011) Exercise for prevention of osteoporosis and other lifestyle-related diseases. *Clin Calcium* 21:722-729.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.
- Tang Y, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Gundersen HJ (1997) Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiol Aging* 18:609-615.
- Telci A, Cakatay U, Akhan SE, Bilgin ME, Turfanda A, Sivas A (2002) Postmenopausal hormone replacement therapy use decreases oxidative protein damage. *Gynecol Obstet Invest* 54:88-93.
- Teri L, Gibbons LE, McCurry SM, Logsdon RG, Buchner DM, Barlow WE, Kukull WA, LaCroix AZ, McCormick W, Larson EB (2003) Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:2015-2022.
- Thiel G (1993) Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol* 3:87-95.
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Tong L, Shen H, Perreau VM, Balazs R, Cotman CW (2001) Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 8:1046-1056.
- Tonra JR, Ono M, Liu X, Garcia K, Jackson C, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Wong V (1999) Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Lepr(db)/lepr(db) mice. *Diabetes* 48:588-594.

- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Jr., Nethrapalli IS, Tinnikov AA (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 22:8391-8401.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21:1628-1634.
- Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Jin-Lee, Kim EJ, Yang CH, An GY, Cho IH, Cho JY. (2010) Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Res.* 2011 69(2):161-73.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005) PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66:562-573.
- Van der Borght K, Havekes R, Bos T, Eggen BJL, Van der Zee EA (2007) Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: Relationship with hippocampal neurogenesis. *BehavNeurosci* 121(2):324-334
- Van der Borght K, Kóbor-Nyakas DE, Klauke K, Eggen BJ, Nyakas C, Van der Zee EA, Meerlo P.(2009) Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus.* 2009 Oct;19(10):928-36.
- van Praag H (2008) Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med* 10:128-140.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005a) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680-8685.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience* 20:2580-2590.

- Vaynman SS, Ying Z, Yin DL, Gomez-Pinilla F (2006) Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Research* 1070:124-130.
- Vedder H, Anthes N, Stumm G, Wurz C, Behl C, Krieg JC (1999) Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J Neurochem* 72:2531-2538.
- Vina J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV (2005) Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *Febs Letters* 579:2541-2545.
- von Bohlen und Halbach O, Krause S, Medina D, Sciarretta C, Minichiello L, Unsicker K (2006) Regional- and age-dependent reduction in trkB receptor expression in the hippocampus is associated with altered spine morphologies. *Biol Psychiatry* 59:793-800.
- Walton M, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M (1996) The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Brain Res Mol Brain Res* 43:21-29.
- Waters EM, Yildirim M, Janssen WG, Lou WY, McEwen BS, Morrison JH, Milner TA (2011) Estrogen and aging affect the synaptic distribution of estrogen receptor beta-immunoreactivity in the CA1 region of female rat hippocampus. *Brain Res* 1379:86-97.
- Weinstock M (1995) The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic hypothesis: an update. *Neurodegeneration* 4:349-356.
- Weiss DJ, Gurside E (1988) Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens. *J Steroid Biochem* 31:671-676.
- Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ (2002) Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13:444-451.
- Wise PM, Suzuki S, Brown CM (2009) Estradiol: a hormone with diverse and contradictory neuroprotective actions. *Dialogues Clin Neurosci* 11:297-303.

- Wolf OT, Kirschbaum C (2002) Endogenous estradiol and testosterone levels are associated with cognitive performance in older women and men. *Horm Behav* 41:259-266.
- Xu X, Zhang Z (2006) Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci* 79:1553-1560.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TVP, Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: Requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *Journal of Neuroscience* 22:1532-1540.
- Yildirim M, Janssen WG, Lou WY, Akama KT, McEwen BS, Milner TA, Morrison JH (2011) Effects of estrogen and aging on the synaptic distribution of phosphorylated Akt-immunoreactivity in the CA1 region of the female rat hippocampus. *Brain Res* 1379:98-108
- Yong Y, Xie HJ, Zhang YF, Yang QD, Liao DF, Yang HL, Yan PK, Liu ZJ (2005) 17beta-estradiol potentiates ischemia-reperfusion injury in diabetic ovariectomized female rats. *Brain Res* 1054:192-199.
- Yu L, Yang SJ (2010) AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and nuclear respiratory factor 1 expression in rat visual cortical neurons. *Neuroscience* 169:23-38.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL (2004) Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 490:71-81.
- http://www.eski.hu/new3/politika/politika_adatok/Health_at_a_Glance_2009.pdf
- <http://btc.bol.ucla.edu/mwm.htm>
- <http://www.biobserve.com/products/viewer/plugins/ymaze.html>

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1 Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Marosi K, Felszeghy K, Mehra RD, Radák Z, Nyakas C. Are the neuroprotective effects of estradiol and physical exercise comparable during ageing in female rats? *Biogerontology*. 2012 Jun 22. PMID: 22722983

IF:3.339

Marosi K., Bori Z., Hart N., Sárga L., Koltai E., Radák Z., Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of ageing rats. *Neuroscience*. 2012 Sep 12. pii: S0306-4522 (12)00902-5. PMID:22982624

IF:3.380

11.2 Független közlemények

Marosi K, Horváth E, Nagy P, Köles B, Nagy ZB. Review of genetic research and testing in sport. *Orv Hetil*. 2012 Aug 12;153(32):1247-55. Hungarian. PMID:22878034

Marosi K, Agota A, Végh V, Joó JG, Langmár Z, Kriszbacher I, Nagy ZB. The role of homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase, methionine synthase reductase polymorphisms in the development of cardiovascular diseases and hypertension. *Orv Hetil*. 2012 Mar 25;153(12):445-53. Review. Hungarian. PMID:22411217

Börzsönyi B, Demendi C, Pajor A, Rigó J Jr, **Marosi K**, Agota A, Nagy ZB, Joó JG. Gene expression patterns of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 enzyme in human placenta from intrauterine growth restriction: the role of impaired fetomaternal glucocorticoid metabolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012 Mar;161(1):12-7. Epub 2012 Jan 11. PMID:22239940

IF:1,974

Hornnyák I, **Marosi K**, Kiss L, Gróf P, Lacza Z. Increased stability of S-nitrosothiol solutions via pH modulations. *Free Radic Res.* 2012 Feb;46(2):214-25. Epub 2012 Jan 12. PMID:22149535

IF:2,878

Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem végén szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Nyakas Csabának, aki az elmúlt évek során sok hasznos gyakorlati és elméleti tudást adott át nekem, mindvégig segítette a munkámat.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Radák Zsoltnak, hogy a Sporttudományi Kutatóintézetben biztosították számomra a PhD kutatómunkámhoz szükséges feltételeket.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Paul Luitennek, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy a Groningeni Egyetemen kutatómunkát végezhsek, és új módszereket sajátítsak el.

Továbbá köszönettel tartozom, Dr. Felszeghy Klárának, Varga Istvánnénak és a Sporttudományi Kutatóintézet összes dolgozójának.

Végül köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik mindig mellettem álltak, segítettek a munkámban és támogattak a döntéseimben.