

# Speciálisan szabályozott elektron depriváció hatása az élettartam növelésére és az öregedés késleltetésére középkorú rotifereknél



Ph.D. Tézisfüzet

**Mácsai Lilla**

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola  
Kísérletes és Klinikai Idegtudomány Alprogram

**Témavezető: Dr. Datki Zsolt László**

Általános Orvostudományi Kar  
Pszichiátriai Klinika  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged  
2020

## Az értekezés alapját képező közlemények

- I. **Macsai L**, Olah Z, Bush AI, Galik B, Onody R, Kalman J, Datki Z. Redox modulating factors impact longevity regulation in rotifers. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018;74:811-814. doi: 10.1093/gerona/gly193; **IF: 4.711; Q1**
- II. **Macsai L**, Datki Z, Csupor D, Horvath A, Zomborszki ZP. Biological activities of four adaptogenic plant extracts and their active substances on a rotifer model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;3690683 doi: 10.1155/2018/3690683; **IF: 1.984; Q1**
- III. Datki Z, Olah Z, Hortobagyi T, **Macsai L**, Zsuga K, Fulop L, Bozso Zs, Galik B, Acs, E, Foldi A, Szarvas A, Kalman J. Exceptional *in vivo* catabolism of neurodegeneration-related aggregates. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6:6. doi: 10.1186/s40478-018-0507-3; **IF: 5.883; Q1**
- IV. Datki Z, Olah Z, **Macsai L**, Pakaski M, Galik B, Mihaly G, Kalman J. Application of BisANS fluorescent dye for developing a novel protein assay. *PLOS One*. 2019;14:e0215863. doi: 10.1371/journal.pone.0215863; **IF: 2.776; Q1**

A tézis alapját képező közlemények összesített impakt faktora: **15.354**

Tudományos munkám összesített impakt faktora: 22.827

## Rövidítések jegyzéke

2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (**XTT**); 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid dipotassium salt (**BisANS**); arannyal-jelölt béta-amiloid 1-42 (gold-tagged beta-amyloid-1-42; **Au-A $\beta$ 42**); béta-amiloid (beta-amyloid; **A $\beta$** ) béta-amiloid 1-42 (beta-amyloid 1-42; **A $\beta$ 42**); éles fény irritáció (bright light irritation; **BLI**); éles fény elkerülés (bright light avoidance; **BLA**); élő rotiferek száma (number of rotifers alive; **NRA**) extrém kalória restrikció (extreme caloric restriction; **ECR**); fényérzékenység (bright light disturbance; **BLD**); garatműködés (mastax contraction frequency; **MCF**); Kongóvörös (**CR**); nikotinamid-adenin-dinukleotid, oxidált forma (**NAD<sup>+</sup>**); nikotinamid-adenin-dinukleotid, redukált forma (**NADH**); normalizált átlag élettartam (normalized mean lifespan; **NML**); pásztázó elektronmikroszkóp (scanning electron microscope; **SEM**); phenazine

methosulfate (**PMS**); propídium jodid (**PI**); redukciós kapacitás (cellular reduction capacity; **CRC**); testméret index (body size index; **BSI**).

## 1. Bevezetés

Az öregedés, mint természetes és progresszív fiziológiai hanyatlás az idő múlásával egyre valószínűbben vezet funkcióvesztésekhez és a betegségekkel szembeni fokozott érzékenységhez. A felnőttkori kórképek jelentős része a kor előrehaladtának közvetett következményei, melyek napjainkra egyre nagyobb társadalmi rétegeket érintenek. A természetes jelenség háttérben álló elkerülhetetlen folyamatok kísérletes modellezéséhez és egyben azok modulációjához a legmélyebb alapismeretekre van szükség. Egy rutinszerűen alkalmazott öregedési állatmodellnek legalább három kulcsfontosságú kritériumokban kell megfelelnie: **(1)** a faj legyen kellően rövid élettartamú; **(2)** mérhető fenotípusos változásokat mutasson, melyek háttérmechanizmusa filogenetikailag konzervált az élővilágban; **(3)** laboratóriumi körülmények között célszerű a könnyű kezelhetőség (pl.: kis testméret, gyors szaporodási ráta, költségkímélő tenyésztés).

Az *in vitro* sejtkultúrák alkalmasak az öregedés sejt szintű folyamatainak vizsgálatára, azonban esetükben valódi élettartamról nem beszélhetünk. A gerinctelen állatok (pl.: *Drosophila melanogaster* és *Caenorhabditis elegans*) voltak az első határozott élettartammal bíró, *in vivo* genetikai modelljei az öregedésnek. Napjainkban, ebben a kategóriában, a kerekesszerveket (rotiferek) egyre szélesebb körben alkalmazzák úgyszintén az élettartam és az öregedés kutatásban. A jelen témában a magasabb rendű gerinces fajok természetesen a legtöbb alkalommal előnyösebbek a humán-relevancia tekintetében, de kivitelezésük nehézkes és néha nem életszerű. A humán klinikai vizsgálatokat preklinikai előzmények nélkül lefolytatni lehetetlen, így minden modell, amely használható információt eredményez a valós élettartam vizsgálatában, megfelelő létjogosultsággal bír.

A mikroszkopikus méretű (200-300  $\mu\text{m}$ ) gerinctelen bdelloid (kétpetefészű) rotifereket széles körben alkalmazzák ökotoxikológiai- farmakológiai- és öregedés-kapcsolt kutatásokban. Ezek a fajok adott szomatikus sejt számmal (950-1000 között), valamint jellegzetes morfológiai struktúrákkal (fej, csillós kerékszerv, törzs, láb) és komplett szervrendszerekkel (agydúc, gyomor, bél, mastax, páros petefészkek) rendelkező élőlények. A bdelloidok alkalmazását

kísérleteinkben a következő biológiai előnyök indokolták: (1) rövid élettartam; (2) karakterisztikus mikro-etológia; (3) szűznemzés (genom stabilitás) és közvetlen fejlődés; (4) nagyfokú adaptív fenotipikus plaszticitás; (5) gerincteleneket érintő megengedő etikai követelmények.

Egy biológiai szervezet adaptív és komplex válaszát egy adott fokozódó mértékű kémiai vagy környezeti hatáshoz hormézisnek nevezzük. Ez a jelenség pl. enyhe redox stressz kiváltása révén képes befolyásolni egy releváns egyed élettartamát. A mérsékelt táplálékmegegyezés úgyszintén redox-moduláló faktorként ismeretes, mivel a tápanyag mennyisége közvetlen kapcsolatban van a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  molekulák arányával, amely egyben releváns mutatója a celluláris metabolizmusnak. Kísérletes körülmények között a különböző elektron hordozók és akceptorok együttes hatása lehetővé teszi a sejtszintű redukciós kapacitás (mint egy életképességi marker) mesterséges szabályozását. A rotiferekben a kalória restriktió és ezáltal egyfajta elektron-moduláció szorosan összefonódik az ő túlélési képességükkel. Az éheztetett bdelloid rotiferek kivételes módon képesek a természetes aggregátumokat és konglomerátumokat anyag- és energiaforrásként hasznosítani.

Az evolúciósan konzervált mechanizmusok vizsgálata a *mikro-in vivo* modellekben számos interdiszciplináris újdonságokat eredményezhet. Ez a felismerés ma már természetes a világ legtöbb kutatóintézetében, így az öregedés vizsgálatában a farmakológiától (pl. növényi hatóanyagok szűrése) a neurodegenerációig bármilyen témában játszhatnak központi modell-szerepet a rotiferek.

## 2. Célkitűzések

- Az öregedés és befolyásoló tényezőinek kutatása *in vivo* modellben;
- Bdelloid rotifer alkalmazása redox központú, valós élettartamú, a vizsgálatok szempontjából optimális öregedési modell kidolgozásában;
- Élettartamot befolyásoló sejtszintű redox folyamatok modulációjának vizsgálata;
- Az alkalmazott rotifer fajnál a lehető leghosszabb, extrém módon kitolt, rekord jellegű élettartam elérése, kémiai hatóanyagok és biológiai folyamatok optimalizált kombinációjával;
- Éheztetett egyedekben (*in vivo* elektron megvonással) a potenciális alkalmazkodó képesség interdiszciplináris felhasználása és érvényesítése,

rendhagyó katabolikus folyamatok kiváltása és vizsgálata természetes aggregátumok alkalmazásával;

- Növényi kivonatokból származó hatóanyagok tesztelése az adaptív fenotipikus plaszticitás határainak vizsgálatában az adott rotiferen (feltárva ezzel a faj alkalmazkodó képességének korlátait).

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. *In vivo* módszerek bdelloid rotifereken

A munkám során alkalmazott modellt a bdelloid *Philodina acuticornis* rotifer, ezért a vizsgálatokhoz a jelenlegi szabályozás alapján nem volt szükség etikai engedélyre. Ezen állatok tenyésztési, táplálási és izolálási lépéseinek rövid összefoglalása: az egyedeket fél-steril, ellenőrzött laboratóriumi körülmények között tartottuk. A **tenyésztéshez** sejttenyésztő flasksákat alkalmaztunk (tartalma 15 mL standard médium, kétnaponta cserélve; pH 7,5). Az új kultúrákat egy egyed áttelepítésével indítottuk. A flasksákat szobahőmérsékleten, 12/12 órás fény-sötét ciklus alatt tároltuk. A kezelés és a tenyésztés minden lépését fénymikroszkóppal folyamatosan ellenőriztük. A normál táplálás *Saccharomyces cerevisiae* élesztő homogenizátummal történt minden médiumcserét követően. Az egyedek **izolálása** egy gyors hűtéssel kezdődő, majd többszörös mosást magába foglaló folyamat, mely az életképes egyedek felszínre kitapadó képességén alapul. A továbbiakban a kísérletekhez megközelítőleg 5 (fiatal; közvetlenül a reprodukciós ciklus megkezdése előtt) vagy 15 (érett) napos egyedek kerültek kiválogatásra, majd individuumként és/vagy populációként vizsgáltuk őket.

#### 3.2. Előkészítési és kezelési módszerek

##### 3.2.1. Biológiai és kémiai elektron depriváció

Biológiai (tápanyag) és kémiai alapú redox modulációval egy gyors és rövid, valamint egy lassú és elhúzódó kezelést alkalmaztam. Előzményként megvizsgáltam a tápanyag mennyiségének hatását a *P. acuticornis* élettartamára ( $\mu\text{g/mL}$ ): 0 (éhezés), 50 (extrém kalória restrikció; ECR), 200 (kalória restrikció), 600 (normál táplálás). Az optimalizált, kombinált elektronmegvonási módszer szakaszai:

(1) **Előszekleációs fázis:** erőteljes és relatíve rövid (72 órás) elektron megvonás, mely során a rotifer populációk és a középkorú (15 napos) izolált állatok kémiai

kezelést kaptak (PMS, 5  $\mu$ M; XTT és aszkorbinsav, 1000-1000  $\mu$ M; egyszerűen vagy kombináltan), teljes táplálék megvonás alatt.

(2) **Kondicionálási fázis:** mérsékelt és relative hosszú távú (több hónapos; médiumcsere kétnaponta) XTT vagy aszkorbinsavas (50-50  $\mu$ M) kezelése az első szakaszt túlélő példányoknál, normál táplálással vagy ECR-el kísérve. A kontrollokat kémiai/biológiai előszelekciónak kitettük, de a második fázisban kémiai kezelésük elmaradt.

### 3.2.2. A béta-amiloid előkészítése és rotiferek kezelése

Az A $\beta$ 42 peptid szintézisét és jellemzését kooperációs partnerünk végezte. Az aggregációs idő 3 óra vagy 3 nap volt (24 °C, pH 3,5). A peptid detektálásához (a rotiferek emésztőrendszerében) az A $\beta$ 42-t abszorbens vagy fluoreszcens festékkel jelöltem. A SEM detektálásához az aggregált (1 mg/mL, 3 nap) A $\beta$ 42 oldatot elegyítettem (2 óra) AuCl<sub>3</sub> oldattal, 1:4 mól arányban, a monomer A $\beta$ 42 aranykötő helyeinek száma szerint (három hisztidin, egy metionin). A pellet-peptid mennyisége Qubit Protein Assay Kit alkalmazásával került meghatározásra. A 15 napos (középkorú) rotifereket 2 napig éhezettük, majd Au-A $\beta$ 42 komplexszel kezeltem (100  $\mu$ g/mL, 1 nap). A jelölt egyedeket 96%-os ultra hideg etanollal (-75 °C-os/5 perc) fixáltam, majd rehidratációt végeztem rajtuk. Az 1%-os paraformaldehiddel történő rögzítés után (30 perc) az adott plate-t kétszer mostam desztillált vízzel. Az összegyűjtött példányokat áthelyeztem egy kerek üveg borítólap középpontjába, és hagytam rászáradni. A kiválasztott egyedek nem kaptak további felszíni nano-aranyfestést. A rotiferek testének szerkezeti integritását Nikon D5500 fényképezőgéppel digitálisan ellenőriztem és rögzítettem.

### 3.2.3. Vizsgált növényi hatóanyagok

A vizsgált növényeket (*P. ginseng* *W. frutescens*, *L. carthamoides* és *R. rosea*) és hatóanyagokat (Ginzenozid Rb1, witanolid A és B, witaferin A, rozavin, szalidroزيد, tirozol, fahéj alkohol, rodiozin, 20-OH ekdizon és ajugaszteron) a kooperációs partnerünk szerezte be. A rotifereket a standard izolálási folyamat után 24 órával kezeltük (100  $\mu$ M, 0.1% DMSO tartalommal) és naponta monitoroztuk. Az abszolút kontroll csoportot standard médiumban, a kezelés-azonos kontroll csoportot 0,1% DMSO-t tartalmazó standard médiumban tartottuk. A toxicitási intervallum (72 óra) alatt az egyedek éheztek, a negyedik naptól pedig egészen a kísérlet végéig ECR alatt álltak, melynek mértéke

lehetővé teszi a túlélést, de meggátolja a szaporodást. A kezelt egyedek állapotát a kontroll csoporthoz hasonlítottuk.

#### **3.2.4. A biológiai minták fehérje mérése**

Intakt rotifer (*P. acuticornis*) egyedek és élesztő sejtek (*S. cerevisiae*) szolgálták komplex fehérje forrásként az újonnan kidolgozott, fluoreszcens festék (BisANS) alapú fehérje koncentrációs mérési módszer teszteléséhez. A minták homogenizációja többlépcsős centrifugálásos folyamat volt, mely fagyasztást/kiolvasztást, valamint ultrahangos vízfürdőt is tartalmazott.

### **3.3. Optikai képalkotási- és detektálási módszerek**

#### **3.3.1. Mikroszkóp-alapú kísérletes monitorozás (fenotípusos markerek)**

##### **3.3.1.1. Fénymikroszkópia**

Az élő rotiferek száma (**NRA**) megadja a rotiferek halálozási arányát adott kezelés során, egy adott időpontban. A kontroll jelenti a 100%-ot. A testméret index (**BSI**) egy matematikai hányados, amely egy bizonyos kalibrációs görbe alapján a standard tenyészetekből izolált *P. acuticornis* rotiferek életkorának meghatározására szolgál. Az állatok garatműködése (**MCF**), mint kvantitatív életképességi marker alkalmazható. A normalizált átlagos élettartam (**NML**) a rotiferek átlag élettartamát adja meg a kezelési időszak alatt. A fényérzékenység (**BLD**) az egyedek válaszreakcióját méri nagy felbontásban és pontossággal. Életképességi mutatóként a BLD 100%-hoz közeledik, amikor tükrözi az egyedek maximális érzékenységét és reakcióját az erős megvilágításra. A rotifereknek maximálisan 5 percük van elhagyni a megvilágított teret, ezt követően menekülésre képtelennek ítéljük őket, és 0-ás BLD értéket kapnak. A **szaporodási képesség** vizsgálata megadja a rotiferek peterakási készségét, valamint a szaporodásuk kinetikáját. A **fagyasztási tolerancia** vizsgálata során mérjük a felengedést követően életképes egyedek számát. Az exogén, aggregált A $\beta$ 42 (100  $\mu$ g/mL, 3 nap) detektálása a rotiferek testében **CR** festéssel (*in vitro*; 50  $\mu$ M, 1 óra) történt.

##### **3.3.1.2. Fluoreszcens mikroszkópia**

A kiválogatott és egy napig éheztetett, öt napos (fiatalkorú) rotifereket jelöletlen A $\beta$ 42 aggregátumokkal (100  $\mu$ g/mL; 3 óra vagy 3 nap inkubáció), mint „tápanyag forrással” kezeltük. A 12-ik nap elteltével a well-ek tartalmát aggregált és festett A $\beta$ 42-re (3 óra, *in vitro* jelölve 10  $\mu$ M BisANS fluoreszcens

festékekkel 30 percig) cseréltem. Az 5 órás kezelést („etetés”) követően az egyedek emésztőrendszerében az optikai jeleket fluoreszcens mikroszkóppal (OLYMPUS) detektáltam. Reprezentatív digitális fényképeket készítettem az A $\beta$ 42 lokalizációjáról a csoportok (éheztetett, normál módon táplált és kezelt) összehasonlításához.

### 3.3.1.3. Elektron mikroszkópia

A kiválasztott rotiferek testének nagy felbontású struktúráját SEM (Zeiss) alkalmazásával figyeltük meg és dokumentáltuk 8 mm-es munkatávolsággal 10 kV feszültségen, különféle nyomásmódban használt visszaszórt-elektron detektor segítségével, 30 Pa vákuum-nyomáson. A SEM képek fehéregyensúlyát a nem specifikus háttérre normalizáltuk.

## 3.3.2. Plate-reader alapú optikai detektálás (fiziológias markerek)

### 3.3.2.1. Abszorbancia (optikai denzitás)

A PMS/XTT rendszer NADH-függésének igazolására az XTT redukcióját *in vitro* és *in vivo* egyaránt mértem spektrofotométerrel (Spectramax Plus) 492 nm-en, 630 nm háttér referenciával. Az *in vitro* kísérletekben PMS (5  $\mu$ M), XTT (1000  $\mu$ M) és NADH (100  $\mu$ M) került alkalmazásra önmagukban vagy kombinálva (7 órás sötét inkubáció után) standard médiumban. Az *in vivo* vizsgálatok során a rotifereket 24 órán át kezeltem, exogén eredetű NADH nélkül. A rotiferek **redukciós kapacitásának** (CRC) mérésére módosított EZ4U sejtproliferációs assay-t alkalmaztam. Az abszorbanciát 492/630 nm-en mértem, melyeket normalizáltam az adott well-ben lévő egyedek számára. Az abszorbancia és a kezeltlen kontroll állatok hányadosa volt a 100%. Az **intracelluláris NADH szintet** NADH Quantification Kit alkalmazásával végeztem (abszorbancia: 450 nm) és az így kapott értékeket az előszelektió túlélőinek számára normalizáltuk.

### 3.3.2.2. Fluoreszcencia (emisszió)

**BisANS-alapú fehérje mennyiség** meghatározásához a bdelloid rotiferekből (*P. acuticornis*) vagy élesztőből (*S. cerevisiae*) származó mintákat használtuk, melyeket feltáró pufferben izoláltuk. Az alap médiumot kiegészítettük a kelátképző EDTA-val, a detergens SDS-el és inhibitorokkal (leupeptin hidroklorid és pepsztatin A). A fehérje vizsgálatokban a feltáró puffer volt a vak próba, és a BisANS fluoreszcens festék (50  $\mu$ M; pH 6,5) önmagában jelentette a nem specifikus háttérrel. A méréseket 96-well plate-ben végeztük, BMG



NOVOstar plate readerrel, 405/520 nm excitáció/emisszió értékekkel. Az adatok korrekcióját úgy a feltároló pufferre, mind a BisANS háttérre elvégeztük. A kereskedelemben kapható Qubit Protein Assay Kit szolgált a mérések validálására. A normál és a szuper rotiferek **nukleinsav/fehérje arányának mérésére** PI (5  $\mu\text{M}$ ) és BisANS (50  $\mu\text{M}$ ) festékeket alkalmaztunk (10 perc inkubációt követően). A beállítások és a műszer megegyezik a BisANS vizsgálatban leírtakkal. A PI méréshez 530/620 nm excitáció/emisszió értékeket használtunk. A méréseket a rotiferek számára normalizáltuk.

### 3.4. Statisztika

A statisztikai analízist és az eredmények ábrázolását SPSS 23.0 szoftverben (SPSS Inc.) egy-utas ANOVA Bonferroni *post hoc* teszttel valamint GraphPad Prism 7.0b szoftver (GraphPad Software Inc.) alkalmazásával végeztük. Kaplan-Meier görbékkel (log-rank; Mantel-Cox) prezentáltuk a csoportok túlélését.

## 4. Eredmények

### 4.1. Kombinált redox moduláció hatása a *P. acuticornis* túlélésére és életképességére

Az összetett elektron-deprivációs módszer alkalmazása előtt a rendszer komponenseit (biológiai és kémiai) egyenként vizsgáltam meg. Az éheztetett egyedek élettartama mutatkozott a legrövidebbnek (medián = 13,5 nap), míg a kalória restrikció alatt álló csoporté a leghosszabbnak (medián = 48 nap). A normál etetés során a fajra jellemző élettartamot (medián = 33,5 nap) is meghatároztam. Az extrém kalória restrikció alatt álló rotiferek élettartama szignifikánsan rövidebb volt (medián = 23 nap), pl. összehasonlítva a normál táplált csoporttal. Az XTT redukcióját *in vitro* (validáció) és *in vivo* (vizsgálat) egyaránt mértük. Az XTT oldott formazánná redukálódott *in vivo*. A PMS- és XTT-tartalmú kombinált rendszert (*in vitro*, sejtmentesen) NADH jelenlétében teszteltem. Ezek a kísérletek megerősítették, hogy az *in vivo* mérésekben az intracelluláris NADH volt az extracelluláris XTT redukciójának forrása. A PMS, mint intermedier elektron hordozó, jelentősen gyorsította ezt a reakciót. NADH hiányában az XTT redukciója *in vitro* nem zajlott le.

Az előszelekció során a PMS/XTT vagy a PMS/aszkorbinsav kombinációja az élő rotiferek számában és az intracelluláris NADH szintben szignifikánsan kisebb mértékű csökkenést eredményezett, mint a PMS kezelések során.

Ugyanezen tendenciát figyeltük meg az MCF érték esetében is. Sem az XTT, sem az aszkorbinsav önmagában nem volt kiemelkedő hatással az életképességi markerekre, ellenben egy másodlagos védő hatást feltételeztünk (a NADH metabolizmus aktiválásán keresztül) a PMS-el szemben. Az élő rotiferek számának alakulása, az MCF és az intracelluláris NADH szintje pozitív korrelációt mutattak egymással.

A túlélő egyedeket egy tartós kondicionálási fázisnak vettem alá, mely állandó (több hónapig tartó), de mérsékelt (alacsony dózisú) kémiai elektron megvonásból állt, normál táplálás vagy ECR alatt. A *P. acuticornis* példányok túlélését különféle kezelési körülmények között vizsgáltam. A kombinált ECR/XTT kezelés az előkondicionált rotifer csoportban, szinergizmussal extrém mértékben meghosszabbította az élettartamot (akár 182 napig; átlagban 155 nap) a kezeletlen kontrollokhoz képest. Kevésbé kifejezett, de hasonlóképpen kiemelkedő hosszú élettartamot figyeltünk meg a második fázisban az XTT-vel kezelt csoportban normál táplálás alatt. Az XTT és az aszkorbinsav egyaránt szignifikánsan (bár kevésbé figyelemre méltóan) meghosszabbította az előkondicionált rotiferek élettartamát a kizárólag előkondicionált és a teljesen kezeletlen kontrollokkal összehasonlítva. A táplálék mennyisége nem bírt jelentősebb befolyásoló hatással ebben az esetben.

A PMS/XTT/éheztetés alapú előszelekció és az XTT (ECR mellett) kondicionálás kombinációja létrehozta az úgynevezett „szuper rotifereket”, melyek neve tükrözi azok egyedi tulajdonságait. A kiválasztott középkorú (15 napos) normál rotifereket és az idős (110 napos) szuper rotifereket 10 napig monitoroztuk normál táplálás alatt, kémiai kezelés nélkül, az életképességi markereik összehasonlítása céljából. A szuper rotiferek BSI értéke szignifikánsan magasabbnak bizonyult, míg az MCF értéke alacsonyabbnak, mint a normál egyedeké. Az idős állatok képesek voltak életképes petéket rakni (mely tükrözi a kezelésnek a reprodukciós szakaszra gyakorolt pozitív hatását); emellett a 10 napos periódus után az utódok száma szignifikánsan nagyobb volt, mint a normál csoportban. Megfigyeltük, hogy a szuper rotiferek jobban tolerálták a fagyasztást, továbbá szignifikánsan több túlélőt találtam a tenyészetükben ( $5,0 \pm 0,52$  egyed), mint a kontrollokból ( $2,6 \pm 0,40$  egyed). A normál etetés újbóli bevezetése után a 110 napos állatok „fennmaradó élettartama” az eredeti várható értékre ( $25 \pm 4,2$  nap) állt vissza.

#### **4.2. Eutelizmus bizonyítása a megnövekedett példányokban**

A BisANS-alapú fehérje meghatározás optimális alkalmazhatóságát teszteltük komplex biológiai mintákon, interferáló szerek jelenlétében. Méréseink validálására Qubit assay-t alkalmaztunk. Nem volt szignifikáns különbség a saját módszerünkkel mért adatok és a Qubit között. Ezt követően párhuzamosan mértük a normál és szuper rotiferek testében a fehérje és nukleinsav mennyiséget. A BisANS módszer kimutatta a szuper rotiferekben a fehérje koncentráció növekedését a kontroll csoporthoz mérten. A PI-alapú vizsgálattal nem detektáltunk különbséget a normál és a szuper rotiferek nukleinsav tartalma között. Elmondható, hogy a testméret növekedése nem járt együtt sejtosztódással.

### **4.3. Az aggregált A $\beta$ 42 peptid jótékony hatása a rotiferekre teljes táplálék megvonás során**

Megvizsgáltuk az A $\beta$ 42 hatását a *P. acuticornis* példányokra. Az állatok A $\beta$ 42 aggregátummal történő kezelése szignifikánsan hosszabb átlagélettartamot ( $51 \pm 2,71$  nap) eredményezett az éheztetett ( $14 \pm 2,29$  nap) és normál-táplált ( $32 \pm 2,72$  nap) csoportokkal szemben. Kísérletes mérési módszerekkel karakterizáltam az A $\beta$ 42-kezelt rotifereket. A 3 órás vagy 3 napos aggregált A $\beta$ 42-vel kezelt csoportok NML értéke jelentősen megnőtt a kontrollokhoz képest. A BSI és a BLD növekedése a kezelt állatok fenotípusos és élettani változásait mutatta az éheztetett kontrollokhoz viszonyítva. Az MCF-ben és a CRC-ben bekövetkezett módosulások változó energiaszintre utaltak, melyek a neuromuszkuláris és a sejtes redox folyamatokra vezethetők vissza. Az A $\beta$ 42-vel kezelt, izolált rotifer egyedek sokkal jobban teljesítettek a mért paraméterekben, mint az éheztetett kontroll példányok, és nem különböztek jelentősen a normál táplálású társaiktól. Eredményeink azt mutatják, hogy az A $\beta$ 42 nem toxikus a *P. acuticornis*-ra, sőt, ezen egyedek képesek felhasználni a peptidet kizárólagos tápanyagforrásként egy hermetikusan elkülönített környezetben az életben maradáshoz és fejlődéshez.

Az exogén eredetű aggregált (3 órás és 3 napos) A $\beta$ 42 jelenlétét a rotiferek emésztőrendszerében közvetlenül az „étezés” után fluoreszcens (BisANS) és abszorbens (CR) festékekkel mutattam ki. Annak érdekében, hogy a katabolizált peptid maradványait a mélyebb szövetekben is kimutathassuk, az élő rotifereket arannyal jelölt A $\beta$ 42 aggregátumokkal tápláltuk. Az elektronmikroszkópos monitorozás során a szemcséket homogén eloszlásban figyeltük meg az egyedek testében. Az arany egyetlen forrása kizárólag az Au-A $\beta$ 42 komplex lehetett.

#### 4.4. Fenotípus-moduláló tulajdonsággal bíró növényi extraktumok alkalmazása táplálékként

Három életképességi markert (NRA, MCF és BSI) vizsgáltunk a kezelőanyagok hatásának felmérése céljából. A rozavin, a fahéj alkohol, az Rb1 ginzenozid, a witanolid B, a witanolid A és a witaferin A vegyületek az NRA és az MCF értékek szignifikáns csökkenését okozták. Ugyanakkor a BSI növekedését figyeltük meg a túlélők körében, feltételezhetően képesek voltak a vegyületeket tápanyagként hasznosítani. Jelentős növekedést figyeltünk meg a *W. frutescens* és *R. rosea* kivonatokkal kezelt csoportok BSI értékeiben, az NRA és az MCF szintek enyhe emelkedésével párhuzamosan. A szalidrozinak való kitettség azonban szignifikánsan csökkentette az MCF-et, míg a BSI normál értéket mutatott a túlélőkben. A 20-OH-ekdizon kapott csoportban az élő rotiferek számában 40%-os csökkenést figyeltük meg, a csökkent BSI és normál MCF szintek mellett. A 14 vizsgált vegyület közül a witaferin A bizonyult a legmérgezőbbnek. Korábbi kísérleteinkben megfigyeltük, hogy normál mértékű tápanyag és 20-OH-ekdizon jelenlétében a rotiferek szaporodása megindult, azonban petéiket nem tudták lerakni és az egyedek elpusztultak. Mindezek ellenére a fiatal példányok kikeltek az anyjuk testében (a germovitelláriumban) és kijutottak a környezetbe.

#### 5. Diskusszió

A specifikus és jól karakterizált *mikro-in vivo* modellrendszerünk lehetővé teszi számos körülmény egymástól független és egyidejű mérését, egyben megbízható vizsgálati eszközt biztosít az élettartam-, az öregedés- és a plaszticitás kutatásában. Eredményeink további magyarázatot adnak az öregedés mechanizmusára, valamint a redox rendszer és a megnövekedett élettartam közötti ok-okozati összefüggésekre.

Munkám során céлом volt egy öregedési modell létrehozása, melynek központjában az élet legkisebb egységének, az elektronoknak a manipulálása áll. Módosítottam a *P. acuticornis* bdelloid rotifer faj redox rendszerét *in vivo*, egy kombinált biológiai-kémiai elektron megvonáson alapuló eljárással. A kombinált PMS-XTT előszelekció (éhezetés mellett), majd a túlélőkön alkalmazott moderált XTT kezelés (ECR alatt) szinergista módon hatott az egyedek élettartamára és fenotípusára. Az így kialakult forma a 'szuper rotifer', utalva az egyedek különleges tulajdonságaikra. A tudományos irodalomban a *P. acuticornis* esetében eddig még nem publikált, extrém hosszú élettartamot

írtunk le. A fenotípusos jellemzők vizsgálata középkorú és kiemelkedően hosszú élettartamú egyedeknél történt meg, 10 napos normál újra-táplálást követően, további kémiai kezelések nélkül. A szuper rotifereknél újraindult a szaporodás, ráadásul életképes petékkel, szignifikánsan nagyobb számban, mint normál társaiknál. Tudomásunk szerint ilyen hosszú élettartamot reprodukációs kapacitás megőrzése mellett (lappangó állapot nélkül) még senki nem közölt a rotifereknél. Az állandó szomatikus sejtszámmal rendelkező (eutelizmus) mikrolényeknél a BisANS-alapú metodikánkat alkalmazva kimutattam, hogy a méretnövekedés nem sejtproliferáció, hanem sejttérfogat- és tömeg növekedés következménye. Szignifikáns korrelációt találtunk a BSI érték és a fehérje mennyiség között (normál/szuper rotifer arányokban). A szuper rotifer egyedek toleranciája a fagyhatásra jobbnak bizonyult, valamint a kultúrák feléléde is sikeresebb volt, mint a kontroll csoportban. A megnövekedett élettartam és a késleltetett öregedés (fokozott reprodukációs képességgel) a *P. acuticornis* adaptív fenotipikus plaszticitásának határain belül maradt. Az alacsony kalória bevitel és a megnövekedett élettartam közti fordított arányosság újabb megerősítést nyert.

Kalória restriktió alatt, izolált mikrocepp környezetben egy újszerű katabolikus aktivitást figyeltünk meg a *P. acuticornis* egyedeknél. A részleges éheztetés nem csak az élettartamra hat, de extrém lebontó képességeket is aktiválhat. Aggregált A $\beta$ 42 kezelést, vagy nevezzük „etetés” kapott példányok szignifikánsan hosszabb élettartamot mutattak, továbbá az életképességi markereik is jobbak voltak kezeletlen, nem etetett kontroll társaiknál. A bevitt A $\beta$ 42 aggregátumokat először az egyedek emésztő rendszeréből mutattuk ki, bizonyítva, hogy elfogyasztották az állatok a peptidet. Külön kísérletben az arannyal jelölt peptid maradványait elektron mikroszkóp alkalmazásával a teljes testben monitoroztuk. Mivel a kezelt *P. acuticornis* példányok megőrizték életképességüket, fenntartották funkciójukat és redox kapacitásukat, feltételezzük, hogy a neurodegeneráció-kapcsolt aggregátumok energiaforrásként szolgáltak a glükoneogenezis folyamatához kísérletes körülményeink között.

A továbbiakban kísérleti modellszervezetünk adaptív képességének limitációit teszteltük adaptogén növényekből származó extraktumokkal. Megfigyeltük, hogy a nyers extraktumok kevésbé bizonyultak toxikusnak, ellenben a tiszta anyagok (szubletális dózisban) gyakran negatívan befolyásolták az egyedek életképességét. A 20-OH-ekdizon hatása a szaporodásra átlépte a rotiferek

fiziológiás tűrőképességét, az adott egyed és az utódja elhullását idézve elő. Növényi eredetű hatóanyagok és extraktumok további tesztelése modellállatunkon a faj adaptív képességének alaposabb megértését segítette elő. Ezen információk birtokában megbizonyosodhattunk, hogy a rotifereket nagy biztonsággal alkalmazhatjuk nagyléptékű farmakológiai tesztelesekre.

Az általunk létrehozott, redox-rendszert moduláló protokoll extrém hosszú élettartamot eredményezett mikroszkopikus méretű kísérleti modellszervezetnél, továbbá tesztelte a faj adaptív fenotipikus plaszticitását. Célunk, hogy további élettartam-moduláló molekulák (pl.: szongorin, spermidin, cAMP) alkalmazásával, 'omics' megközelítéssel feltárjuk az öregedést gátló folyamatok molekuláris hátterét is. Az *in vivo* fenotipikus és sejtszintű moduláció lehetővé teszi az interdiszciplináris szemléletek bővülését a farmakológiai vizsgálatokban és neurodegeneratív betegségek kutatása során.

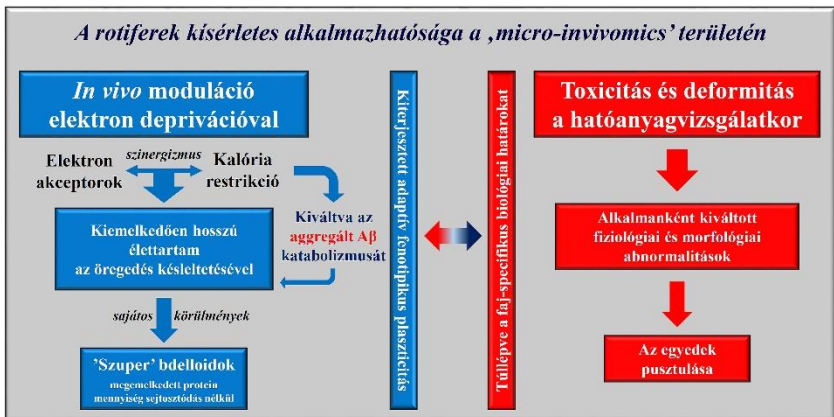
## 6. Összefoglalás

A doktori tézis alapját képező kísérletek az '**öregedés – élettartam – metabolizmus – reprodukció – adaptív fenotipikus plaszticitás**' relációit vizsgálták egy reneszánszát élő *in vivo* kerekeshéreg (rotifer) modellben (*Philodina acuticornis*). A redox alapú, valós élettartamú és egyben optimalizált öregedési modellben a sejtszintű folyamatok modulációját (kémiai- és éhezési alapú *in vivo* elektron megvonással) vizsgáltuk, kiterjesztve az adaptív fenotipikus plaszticitásra és annak interdiszciplináris felhasználására. A témához kapcsolódó farmakognóziái vizsgálatok során különböző növényi hatóanyagok tesztelését is elvégeztük a faj biológiai határait feszegetve.

A középkorú rotifer egyedeken alkalmazott intenzív, 72 órás kémiai előkezelés (elektron hordozó és akceptor, teljes táplálék megvonás) kombinálva az ezt követő mérsékelt, hosszú időtartamú kondicionálással (elektron akceptor, ECR) rendkívül hosszú (ötszörös, korábban nem dokumentált élettartam, pl. 182 nap), valamint sajátos fenotipikus változásokat (testméret növekedés és fokozott szaporodási képesség) eredményezett. A folyamat NADH-függő redukcióját *in vitro* és *in vivo* egyaránt tanulmányoztuk. A fenotípusok jellemzőinek vizsgálata normál (15 napos) és kiemelkedően hosszú élettartamú (110 napos) egyedeknél történt, 10 nap normál táplálás mellett. Egy saját fejlesztésű, fluoreszcens (BisANS) alapú mérési módszerrel bizonyítottuk, hogy az állandó sejtszámmal (eutelizmus) rendelkező rotiferekben a méretbeli változást nem a sejtproliferáció okozta, sokkal inkább például a fehérjemennyiség növekedése.

Az éheztetés alapú *in vivo* elektron megvonás adaptív fenotipikus plaszticitást indukált ezen mikroszkopikus gerinctelenekben.

A modellünk alkalmazásának interdiszciplináris jellegét jól tükrözi az a jelenség is, hogy ezen képtetefésszkű rotiferek képesek voltak a humán neurodegenerációban szerepet játszó, sok más fajban toxikusnak bizonyuló aggregált A $\beta$ -t katabolizálni. Egyedülálló módon képesek táplálékként felhasználni az A $\beta$ 42-t, amely trófikus módon megnövelte az élettartamot, normál életképességi szint mellett. A disszertáció az extrém hosszú élettartam öregedési folyamatok nélküli elérésének, valamint az alkalmazott modellrendszer plaszticitásának és limitációinak újszerű és komplex tanulmánya.



## 7. Köszönetnyilvánítás

Hálámat szeretném kifejezni témavezetőm, Dr. Datki Zsolt László iránt, aki tanácsaival segítette a kísérletek elvégzését, valamint hozzájárult a tézis elkészüléséhez. Külön köszönöm Prof. Dr. Kálmán Jánosnak, hogy lehetővé tette az értekezés alapjául szolgáló munka elvégzését a Pszichiátriai Klinika Kutatólaboratóriumában, valamint Prof. Dr. Janka Zoltán korábbi intézetvezetőnek, hogy értékes javaslataival segítette a dolgozat megszületését. Köszönet illeti munkatársaimat, Dr. Gálik-Oláh Zitát és Molnárné Hatvani Ilonát a kísérletekben nyújtott segítségükért.