

A több évtizedes testedzés hatása a humán vérből izolált extracelluláris vezikulák tartalmára

Doktori tézisek

György Bernadett

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



**MAGYAR TESTNEVELÉSI
ÉS SPORTTUDOMÁNYI
EGYETEM**
BUDAPEST

Témavezető: Dr. Koltai Erika tudományos főmunkatárs, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Martos Éva c. egyetemi tanár, CSc
Dr. Vannay Ádám tudományos főmunkatárs, PhD

Budapest

2025

„Nekem azt tanították, hogy a haladás útja se nem gyors, se nem könnyű.”

Marie Curie

1. Bevezetés

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) kulcsszerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, ezért egyre nagyobb figyelmet kapnak az egészségtudományi kutatásokban. Szerepük az egészséges működéstől a betegségek kialakulásáig sokrétű, és sejtípusonként eltérő jellemzőik lehetővé teszik diagnosztikai és terápiás alkalmazásukat. A disszertáció célja az EV-k humán mintákon történő vizsgálatának két fő területét bemutatni: egyrészt az EV-k izolálásának és jellemzésének módszertani kérdéseit, másrészt a testedzés hatását az EV-k molekuláris összetételére és élettani szerepére.

1.1. Extracelluláris vezikulák általános jellemzése és típusai

Az EV-k olyan apró, membránnal körülvett részecskék, amelyeket a sejtek juttatnak ki a környezetükbe. Ezek a vezikulák fontos szerepet töltenek be a sejtek közötti kommunikációban, mivel különféle biológiailag aktív anyagokat, például fehérjéket, nukleinsavakat (mint az mRNS vagy mikroRNS), lipideket és más molekulákat szállítanak. Jelentős mennyiségben található meg különböző biológiai folyadékokban, mint például a vér, a nyál, a vizelet és az anyatej.

Az EV-k biogenezis alapján két fő típusba sorolhatók: exoszómákra, amelyek endoszomális eredetűek, és ektoszómákra, amelyek közvetlenül a plazmamembránból származnak. Méret szerint az EV-k lehetnek kis méretűek (sEV-k, 50–150 nm), közepes méretűek (mEV-k, 200–800 nm) vagy nagy EV-k (≥ 1000 nm).

Szinte minden sejtípus képes EV-ket kibocsátani, és ezek összetétele nagymértékben függ a sejt típusától, annak aktuális állapotától, illetve a külső környezeti hatásoktól. Éppen ezért az EV-k információt hordoznak a kibocsátó sejtekről, ami különösen értékesé teszi őket a diagnosztikában és a betegségek korai felismerésében.

1.2. Az extracelluláris vezikulák és a testmozgás kapcsolata

Az elmúlt évek során vizsgálatok kimutatták, hogy a többi sejthez hasonlóan, a vázizomzat is képes EV-eket kibocsátani a keringésbe edzés hatására. Frühbeis és munkatársai elsőként vizsgálták az sEV-k szintjét és tulajdonságait a keringésben edzés hatására. Kerékpáros és futóprotokoll során kimutatták, hogy az edzés során megnövekvő EV-szint a szervezet fiziológiai aktivációját tükrözi. Feltételezésük szerint ezek a vezikulák jelátviteli szerepük révén hozzájárulnak a fizikai aktivitáshoz kapcsolódó adaptációs folyamatok szabályozásához.

Safdar és munkatársai áttekintő tanulmányukban az állóképességi edzés során felszabaduló exoszómák anyagcsere-betegségek kezelésében rejlő lehetőségeit vizsgálták. Whitham és kollégái kvantitatív proteomikai és intravitalis képalkotó módszerekkel jellemezték az edzés hatására szekretált EV-fehérjéket, és több új myokin-jelöltet azonosítottak, amelyek nem a klasszikus szekréción keresztül jutnak a keringésbe.

A testmozgás befolyásolja a vezikulák mennyiségét és összetételét, ami arra utal, hogy fontos közvetítői lehetnek a fizikai aktivitás által kiváltott pozitív élettani hatásoknak.

1.3. A hosszútávú testedzés hatása a szervezetre, öregedési folyamatokra

Ma már számos bizonyíték támasztja alá a rendszeresen végzett testedzés jelentős pozitív hatását, amelyet az emberi szervezetre gyakorol, és amely az élettani rendszerek széles körét érinti, beleértve a szív- és érrendszert, a mozgató szervrendszert, az anyagcserét és a mentális egészséget.

A vázizomzat plaszticitása révén gyorsan reagál a fizikai aktivitásra, és kulcsszerepet játszik az anyagcsere szabályozásában. Az edzés molekuláris adaptációi, beleértve a DNS-, nem kódoló RNS- és hiszton-módosításokat, epigenetikai módosítások formájában szabályozzák a génexpressziót. Kimutatták, hogy a magasabb szintű fizikai fittség összefügg a betegségek csökkenő előfordulásával és az öregedés lassabb ütemével.

1.4. Az epigenetika

Az epigenetika fogalmát Waddington vezette be a genetika és a fejlődésbiológia összekapcsolására. Riggs és munkatársai szerint, és ez ma már általánosan elfogadott meghatározás, az epigenetika a génműködés olyan, mitotikusan és/vagy meiotikusan öröklődő változásait vizsgálja, amelyek nem járnak a DNS-szekvencia módosulásával. Ez azt jelenti, hogy a gének ki- vagy bekapcsolása nem genetikai mutációval, hanem egyéb szabályozó mechanizmusok révén történik.

Az epigenetikában három alapvető mechanizmust vizsgálnak kiemelten: a DNS-metilációt, a hisztonmodifikációkat és a nem kódoló RNS-eket. A terület gyors fejlődése fokozta az érdeklődést azok iránt a technológiák iránt, amelyek képesek feltérképezni az egészséget és betegségeket befolyásoló epigenetikai jeleket.

1.5. A DNS-metiláció

A DNS-metiláció olyan epigenetikai szabályozó mechanizmus, amely kulcsszerepet játszik a génexpresszió finomhangolásában anélkül, hogy megváltoztatná a DNS örökítő információját. Olyan alapvető epigenetikai módosítást jelent, amely során egy metilcsoport kapcsolódik a DNS-ben található citozin bázis 5. szénatomjához, leggyakrabban olyan szakaszokon, ahol a citozin egy guanin bázis előtt áll (ezeket CpG dinukleotidoknak nevezzük). A DNS-metiláció létfontosságú az embrionális fejlődésben, és olyan folyamatokra van hatással, mint a genomális imprinting, az X-kromoszóma inaktiváció és az ismétlődő DNS elnémítása.

1.6. Az epigenetikai órák

Az öregedést, mint bonyolult folyamatot, különböző változások jellemzik sejtes, szubcelluláris és nukleáris szinteken, amelyek közül az egyik az epigenetikai öregedés. Ahogy egyre nagyobb figyelmet kap az epigenetikai változások szerepe az öregedésben, a DNS-metilációs mintázatok mércéjévé váltak a biológiai életkor meghatározásának, melyet jelenleg epigenetikai óráként emlegetnek.

Az első generációs epigenetikai órák, mint Horvath összeszöveti órája és Hannum véralapú órája, a biológiai életkort becsülik meg. Ezzel szemben a második generációs órák, például a DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge és a longitudinális adatokon alapuló DunedinPoAm és DunedinPACE, elsősorban a halálozási kockázat előrejelzésére szolgálnak.

A DNAmFitAge-t, amely biológiai életkorutatóként szolgál a fizikai erőnlét olyan mérőszámainak integrálásával, mint a VO₂max és a kézi szorítóerő. Ez az óra azzal a céllal került kifejlesztésre, hogy összekapcsolja az epigenetikát az edzettséggel, különös figyelmet fordítva arra, hogy a fittség hogyan befolyásolja az öregedési folyamatokat.

2. Célkitűzés

Kutatásunk célja a több évtizedes testedzés hatásának vizsgálata volt a humán vérben keringő kis extracelluláris vezikulákra (sEV-k). Elsőként egy megbízható, MISEV-irányelveknek megfelelő izolálási protokollt dolgoztunk ki és validáltunk a későbbi proteomikai vizsgálatokhoz. Vizsgáltuk továbbá a frissen vett és hosszabb ideig fagyasztva tárolt plazmából izolált sEV-k közötti különbségeket is. A kialakított módszerrel izolált sEV-k fehérjetartalmát proteomikai módszerrel elemeztük a két eltérő edzettségű csoport mintáiban.

Kutatási eredményeinkkel célunk az volt, hogy bővítsük a tudományos ismereteket egy viszonylag új kutatási területen, amely a sport és a fizikai aktivitás hatását vizsgálja a vezikulákra. E kutatási irány feltárása nemcsak a sportélettani, sejtbiológiai és orvosi tudományok szorosabb összekapcsolására nyújt lehetőséget, hanem hozzájárulhat új biomarkerek és terápiás célpontok azonosításához is.

1. A módszertan kidolgozásához kapcsolódó hipotézisek:

1.1: Feltételezzük, hogy a minták alapos preanalitikai vizsgálata segít az sEV izolálásra legalkalmasabb minták kiválasztásában.

1.2: Feltételezzük, hogy a 70 nm-es pórusnagyságú oszlop kisebb kontaminációval, hatékonyabban izolál sEV-eket tömegspektrometriás mérésre, mint a 35 nm-es oszlop.

1.3: Feltételezzük, hogy a frissen levett vérből készült PFP, és a hosszabb távon fagyasztva tárolt PFP egyaránt alkalmas az sEV izolálásra.

2. Az edzettségi szint és a kis méretű extracelluláris vezikulák (sEV) kapcsolatának vizsgálatára vonatkozó hipotézisek:

2.1: Feltételezzük, hogy az sEV minták proteomikai elemzése során kapcsolatot találunk a vezikulákban található fehérjék, és az epigenetikai öregedés üteme között.

2.2: Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki az edzettségi szint függvényében az sEV mennyiségi meghatározásában.

2.3: Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a fehérjeszintek és a fiziológiai fitsségi mutatók között az edzettségi szint függvényében.

3. Módszerek

3.1. A vizsgálat alanyai

A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács etikai engedélye (25167-6/2019/EÜIG) alapján végeztük, a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően. A kutatásban kizárólag egészséges, önkéntesen részt vevő személyek vettek részt, akik írásos beleegyezést adtak. A fő mintavételre a 2019-es Velencei Evezős Masters Világbajnokságon, majd a kontrollcsoport toborzására Budapesten került sor, összesen 303 fő részvételével. Célunk egy fizikailag aktív edzett csoport kialakítása, valamint korcsoportban illeszkedő inaktív, ülő életmódot folytató kontroll csoport toborzása volt. A résztvevőket fizikai fitsségük szerint VO_2max érték alapján kategorizáltuk. A korcsoportjukra vonatkozó 75% feletti VO_2max becslésekkel rendelkező egyéneket magas fitsségűnek (High-fit: férfi $n = 93$, átlagéletkor (év) = $60,0 \pm 10,6$; női $n = 91$, átlagéletkor (év) = $59,0 \pm 10,6$), míg az alatta lévőket közepesen alacsony fitsségűnek (Med-Low-fit: férfi $n = 50$, átlagéletkor (év) = $63,0 \pm 12,4$; női $n = 62$, átlagéletkor (év) = $63,0 \pm 12,5$) jelöltük. A vizsgálatot megelőzte egy pilot mintavétel is, amely 19 egészséges alany bevonásával zajlott Budapesten.

3.2. Terhelésélettani, antropometriai és kognitív vizsgálatok

A mintavételt megelőzően minden résztvevő ugyanazon szakemberek által elvégzett, egységes teszt sorozaton vett részt. Az antropometriai mérések során testmagasságot, testtömeget és testtömeg-indexet (BMI) határoztunk meg. A fizikai és kognitív állapot felmérése négy tesztből állt: kézi szorítóerő-mérés, maximális felugrás, Chester-step teszt (a $VO_2\text{max}$ becslésére), valamint egy számterjedelem-teszt a munkamemória vizsgálatára.

3.3. Vértétel, biokémiai és hematológiai paraméterek vizsgálata

A vérmintákat szakképzett személyzet vette le az alanyok könyökvénájából háromféle vérvételi csőbe (K2-EDTA, ACD-A és szérumos csövek). A minták egy részét néhány órán belül megvizsgáltuk (pl.: vérkép, kémiai paraméterek), másik részét pedig későbbi vizsgálatokhoz (pl.: sEV izolálás, DNS-metiláció) fagyasztva tároltuk $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on. A vérvétel mindig a terheléses teszt előtt történt, hogy az akut fizikai aktivitás ne befolyásolja a biológiai minták összetételét.

3.4. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálata

A vezikula izolálás pontossága érdekében preanalitikai vizsgálatokat végeztünk a trombocita-mentes plazma (PFP) minőségének ellenőrzésére. A szemmel láthatóan hemolitikus vagy lipémiás mintákat kizártuk. A hemolízist, ikteruszt és lipémiát abszorbanciaértékek alapján, meghatározott hullámhosszon ellenőriztük, míg a trombocita- és hemoglobinszinteket hematológiai analizátorral mértük. A 100 mg/dl -nél magasabb hemoglobin-, 5 millió sejt/l feletti trombocitaszámú vagy nem megfelelő abszorbanciájú mintákat elvetettük, illetve további tisztításnak ($0,8\text{ }\mu\text{m}$ -es szűrés) vetettük alá, ami után javasolt a trombocitaszám újbóli ellenőrzése.

3.5. A kis méretű extracelluláris vezikulák izolálásának lépései

Elsőként a pilot kísérlet mintáit izoláltuk a metodikai protokoll beállításához. Ezt követően izoláltuk a High-fit és Med-Low-fit alanyoktól származó 40 mintát a validált eljárással. Két ACD-A cső vér került levételre alanyonként, és minden izolálás 2,5 ml PFP-ből indult.

A fagyasztott mintákat szobahőmérsékleten 1 órán át olvasztottuk, majd tandemszűrt NaCl-Hepes pufferrel 5 ml-re hígítottuk. Ezután 0,8 µm-es fecskendőszűrőt használtunk a nagyobb részecskék eltávolítására. Ezután 18 000g-n 20 percig centrifugáltuk, hogy sEV-ben gazdag felülúszót nyerjünk. A felülúszót 0,2 µm-es szűrővel tisztítottuk tovább, majd 100 kDa ultrafiltrációval 1000–1500 µl-re koncentráltuk. A mintákat 1500 µl-re töltöttük fel pufferrel, majd 10 000g-n 10 percig centrifugáltuk az aggregátumok eltávolítására.

A 1500 µl-es mintákat a méretkizárásos kromatográfiás (SEC) oszlopra pipettáztuk, majd NaCl-Hepes pufferrel eluáltuk. A frakciógyűjtés így történt: 3 ml hulladék, majd 10 db 0,5 ml-es frakció. A 35 nm-es oszlopnál az 1–3, a 70 nm-esnél a 2–4 frakciót egyesítettük (pool). Ezeket a mintákat NaCl-Hepes pufferrel feltöltve ultracentrifuga-csőbe pipettáztuk, majd 100 000g-n 60 percig centrifugáltuk. A kapott pelletet 15–20 µl pufferben szuszpendáltuk, és –80 °C-on tároltuk a tömegspektrometriás analízishez.

3.6. A kis méretű extracelluláris vezikulák jelenlétének validálási módszerei

A részecskék méreteloszlását és koncentrációját egy ZetaView Z nanopartikula számláló műszerrel (Particle Metrix GmbH, Inning am Ammersee, Németország) mértük (NTA módszer). A sEV-k méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározásához a SEC-frakciókból (1-8) és az UC előtti pool frakciókból különböző hígításokat (50-800×) készítettünk. Az poolozott minták esetében az 1×10^9 részecske/ml alatti részecskekoncentrációjú mintákat kizártuk az elemzésből.

A teljes fehérjetartalmat NanoDrop ND-1000 készülékkel (Thermo Fisher Scientific) mértük 280 nm-es hullámhosszon, vakként NaCl-Hepes puffert használva. A pilot minták esetében frakciónként (1–10), a többi mintánál összevont (poolozott) formában végeztük a mérést. A 1,5 µl-es mintákat háromszor mértük. Az elfogadási kritérium mindkét oszlop esetén a <0,75 mg/ml fehérjekoncentráció volt.

Az ISEV ajánlásának megfelelően Western blot módszert alkalmaztunk az izolált sEV-k jelenlétének igazolására, specifikus fehérjéket vizsgálva. Az ultracentrifugálás után az sEV pelletet proteáz-inhibitoros lízispufferben szuszpendáltuk, majd 15 µl fehérjelizátumból gélelektroforézist végeztünk. A mintákat denaturáltuk, majd 8–16% Criterion TGX gélen futtattuk jéggel hűtött folyófürdőben. A fehérjéket PVDF membránra blottoltuk 3,5 órán át 80 V-on, majd Sypro Ruby-val festettük a gél. A membránokat SuperBlock oldattal blokkoltuk, elsődleges antitesttel éjszakai inkubációt követően másodlagos HRP-jelölt antitesttel jelöltük, majd Clarity Max ECL segítségével detektáltuk. A képeket ChemiDoc XRS+ rendszerrel rögzítettük és ImageLab szoftverrel elemeztük.

Az sEV-k vizuális kimutatását Théry és mtsai protokollja alapján végeztük immun transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM-mel), kisebb módosításokkal. A mintákat formvarral bevont nikkelrácsra vittük fel, 4%-os PFA-val fixáltuk, majd 2%-os szacharóz-PBS oldattal blokkoltuk. Elsődleges antitesttel egy éjszakán át, másodlagos antitesttel 1 órán át inkubáltuk, közben többször mostuk. Posztfixálás után 2%-os glutáraldehiddel kezeltük, majd JEOL 1011 TEM készülékkel vizsgáltuk. Az EV-k átmérőjét ImageJ szoftverrel mértük.

3.7. Tömegspektrometriás vizsgálatok

A vezikula mintákat fagyasztás-olvasztás után etanollal csaptuk ki, majd karbamidban redukáltuk és alkileztük. Lys-C/tripszin emésztést végeztünk, peptideket C18 oszlopon tisztítottuk, és Bruker Maxis II QTOF-mal mértük. Az adatokat Byonic és MaxQuant szoftverekkel elemeztük, csak magas megbízhatóságú fehérjéket fogadtunk el.

3.8. Statisztikai analízis, EV-Track

Az sEV-k statisztikai elemzését GraphPad Prism 9.4.1. szoftverrel végeztük. Csoportok közti variáciát ANOVA-val, korrelációkat Pearson-módszerrel (vagy Spearman-al ha szükséges) elemeztük az R 4.4.1. verziójában. A normalitást és homoszkedaszticitást Breusch-Pagan és Lilliefors tesztekkel vizsgáltuk. Többszörös tesztkorrekciót FDR 0,05 szinten alkalmaztunk, LFQ értékeket log₂-transzformáltuk, és csak legalább 90%-ban előforduló fehérjéket vizsgáltunk. Fehérjegzadagodási elemzést PANTHER keretrendszerrel és Gene Ontology annotációval végeztünk Fisher-teszttel és FDR korrekcióval.

Az EV-kísérletek átláthatóságát és megismételhetőségét segíti az EV-TRACK tudásbázis (<http://evtrack.org>), amely az EV biológiát és módszertant gyűjti össze. Metodikai adatainkat ennek megfelelően feltöltöttük az EV-TRACK-be.

4. Eredmények

4.1. A trombocita-mentes plazma preanalitikai vizsgálatának eredményei

A módszertani kizárási kritériumok alapján 37 PFP mintát választottunk pilot vizsgálatokhoz a módszertan kidolgozására és validálására. Funkcionális vizsgálatokhoz a preanalitikai eredmények alapján 56 High-fit és 10 Med-Low-fit férfi, valamint 50 High-fit és 30 Med-Low-fit női minta felelt meg. Mivel a férfi csoport elemszáma nem volt megfelelő, csak 40 női mintával (20-20 High-fit és Med-Low-fit) folytattuk a vizsgálatokat. A pilot és funkcionális minták preanalitikai eredményeit egyben értékeltük (n=77).

A 77 mintából 500 µl-t használtunk preanalitikai mérésekhez, melyek során hematológiai analizátorral mértük a trombocitaszámot (átlag: 1,00 millió sejt/l, majd 0 millió sejt/l szűrés után) és hemoglobint. ELISA leolvasóval több hullámhosszon mértük az abszorbanciát a lipémia, hemolízis és ikterusz interferenciáinak kiküszöbölésére. Az eredmények alapján minden minta alkalmas volt sEV izolálásra.

4.2. A 35 nm-es és 70 nm-es oszloponon izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása

A 35 nm-es és 70 nm-es oszlopokkal 31 PFP mintából izoláltunk sEV-eket. Közülük 21 mintát egyszerre izoláltunk mindkét oszlopon, 2 mintát csak a 35 nm-es, és 8-at csak a 70 nm-es oszlopon. Az utóbbi 10 mintát tömegspektrometriás kvantifikálásra, 6 mintát pedig a friss és fagyasztott minták összehasonlítására használtuk.

A sEV-ek morfológiáját és méretét TEM-mel vizsgáltuk (n=8), az ultracentrifugált, SEC után egyesített mintákban. A 35 nm-es oszlopon az átlagos átmérő 98,6 nm volt, míg a 70 nm-es oszlopon 70,8 nm. A vezikulák alakjában található különbségek a minták előkészítéséből adódnak. TEM és NTA alapján három részecskepopulációt különböztettünk meg: "plazma lipoprotein részecske" („PLP”), sEV és mEV.

Tömegspektrometriával kimutattuk, hogy a 70 nm-es oszlopról származó minta magasabb arányban tartalmazott „vezikuláris” fehérjéket (12,31% - 8,27%), míg a 35 nm-es oszlopon több plazma eredetű „PLP” és immunglobulin fehérje maradt vissza. Az ExoCarta és GO annotáció alapján 130 specifikus „vezikuláris” fehérje listáján a 70 nm-es oszlopon szignifikánsan magasabb találati arányt mértünk, ami hatékonyabb, tisztább sEV izolálást jelent. Összességében a 70 nm-es SEC oszlop jobb választásnak bizonyult a specifikus sEV-ek izolálására, míg a 35 nm-es oszlopról származó minta nagyobb plazmafehérje kontaminációval járt.

4.3. A 70 nm-es oszloponon friss és fagyasztott trombocita-mentes plazmából izolált kis méretű extracelluláris vezikulák karakterizálása

Friss és több mint 2,5 évig -80 °C-on tárolt fagyasztott plazmából izolált sEV-eket hasonlítottunk össze 70 nm-es SEC oszlop segítségével. A TEM, NTA és NanoDrop mérések nem mutattak különbséget a részecskeszám, méret és fehérjeabszorbancia tekintetében a két mintacsoport között. Tömegspektrometriás elemzés során 35 „vezikuláris” és 279 „nem-vezikuláris” fehérjét azonosítottunk, de a „vezikuláris” fehérjék arányában nem volt szignifikáns eltérés friss és fagyasztott minták között.

Eredményeink szerint a fagyasztott plazma minták is megbízhatóan használhatók sEV izolációhoz és proteomikai vizsgálathoz.

4.4. Az edzettség mértékének hatása a vezikulákra

A High-fit és Med-Low-fit csoportokban széles körű vizsgálatokat végeztünk (terhelésélettani, antropometriai, kognitív, vérvizsgálat), valamint önbevallásos kérdőívekkel gyűjtöttünk életmódbeli és egészségi adatokat. A High-fit csoportban a rendszeres testmozgás átlagosan 20,3 év és heti 9,1 óra volt, míg a Med-Low-fit csoportban 15,1 év és heti 5,9 óra. Az étrendi szokások között vegetáriánus és gluténmentes étrend is előfordult, főként a High-fit csoportban. Az összegyűjtött adatok elemzésének következő lépéseként az sEV minták proteomikai profilját vizsgáltuk, és azokat a klinikai paraméterekkel összevetettük

4.5. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulák analízise metodikai megfelelőség szempontjából

A TEM elemzés kimutatta, hogy a mintákban tipikus csésze alakú szerkezettel (cup-shaped) rendelkező EV-k találhatóak. A NanoDrop-pal mért teljes fehérjekoncentráció esetén minden minta a kizárási kritérium alatt volt, és a csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget. Az NTA segítségével vizsgáltuk az sEV-k méreteloszlását és koncentrációját, ahol a méretbeli különbségek alapján három enyhén átfedő populációt figyeltünk meg: „PLP-k”, sEV-k és mEV-k. A koncentrációra vonatkozó kizárási kritérium 1×10^9 részecske/ml volt. Az átlagos részecskekoncentráció $5,08 \times 10^9$ részecske/ml volt a High-fit csoportban és $3,46 \times 10^9$ részecske/ml a Med-Low-fit csoportban.

A vezikuláris markerek (CD9, CD81, Alix) intenzitását MS adatok alapján elemeztük, a teljes fehérjeintenzitáshoz viszonyítva. A CD81-et 39, a CD9-et 27, az Alix-et pedig 37 mintában detektáltuk 40-ből. Az Apolipoprotein A-II jelenléte jelzi, hogy az apolipoproteinek együtt izolálódhatnak a vezikulákkal. Az elemzést a MISEV2023 irányelvei szerint végeztük.

A Gene Ontology (GO) dúsulási elemzés eredményei megerősítik a minták vezikuláris jellegét, kiemelve a vezikuláris biológiai folyamatokkal, molekuláris funkciókkal és sejtszerkezeti komponensekkel kapcsolatos GO-kifejezések jelentős dúsulását.

4.6. Az izolált kis méretű extracelluláris vezikulákban található fehérjék tömegspektrometriás analízisének eredményei

Eredményeink alapján hőterképet készítettünk a normalizált fehérje tömegspektrometriás intenzitás és a fiziológiai markerek közötti korrelációk vizualizálására. Nem találtunk jelentős különbséget a fehérjeszintek között a High-fit és Med-Low-fit csoportokban, valamint nem mutatkozott szignifikáns összefüggés a fehérjék és a fittségi mutatók között sem (FDR <0,05). A memóriefunkció, vérzsír szintek és BMI korrelációi sem voltak statisztikailag szignifikánsak.

Az EV-kben található fehérjék és az öregedési órák közül a DNAmFitAge életkor-akcelerációja mutatott szignifikáns kapcsolatot 10 fehérjével ($q < 0,05$), többek között az Annexin 2A-val ($r=0,61$), Protein S100A9-cel ($r=0,55$), valamint különböző fibrinogén láncokkal és komplement fehérjékkel. Más életkormutatók, mint a GrimAge és PhenoAge akcelerációja, nem mutattak szignifikáns korrelációt.

Elemzésünk során három fehérjekészletet vizsgáltunk: az összes tömegspektrometriával detektált fehérjét ($n=509$) a vezikuláris eredet igazolására, a High-fit csoportban jelenlévő fehérjéket ($n=24$), és a DNAmFitAge-akcelerációval szignifikánsan összefüggő fehérjéket ($n=10$, FDR<0,05). Az összes fehérje dúsulási elemzése erős mikrovezikuláris kapcsolódást igazolt, különösen a vér mikrorészecskékre és extracelluláris vezikulákra vonatkozóan.

A GO elemzés jelentős dúsulást igazolt immunrendszeri folyamatokban, koagulációban és sejt felszíni adhézióban. A High-fit csoportban 24 egyedi fehérjét találtunk, míg a Med-Low-fit csoportban csak 2-t. A heti edzésórák pozitív korrelációt mutattak koagulációs és komplement fehérjékkel.

5. Következtetések

5.1. Legfontosabb eredményeink és az ezekből levonható következtetések

A vérminták feldolgozása 45 percen belül történt, így a kapott trombocita-mentes plazma (PFP) minták alkalmasak voltak mind hosszú távú tárolásra, mind azonnali sEV izolálásra. A preanalitikai vizsgálatok során kiszűrtük a nem megfelelő mintákat, ezzel is kiemelve a helyes mintaelőkészítés jelentőségét, különösen az egységes protokollok hiányában.

A sEV izolálás során méretkizárásos kromatográfiához 35 nm és 70 nm IZON qEV oszlopokat teszteltünk humán plazmából történő sEV izolálás céljából. Mindkét oszlop hatékonyan működött, azonban a 70 nm-es oszlop több „vezikuláris” fehérje izolálását tette lehetővé. Ezért proteomikai vizsgálatokhoz a 70 nm-es oszlop bizonyult az optimális választásnak.

A friss és több mint 2,5 évig -80°C -on tárolt PFP mintákból izolált sEV-ek között, a 70 nm-es oszlop használatával, nem volt jelentős különbség. Ez arra utal, hogy a megfelelően előkészített PFP minták legalább 2,5 évig stabilan tárolhatók sEV izolálás céljára.

A fehérjemennyiség tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a High-fit és a Med-Low-fit csoportok között. Hasonlóképpen, a fehérjeszintek és különböző fiziológiai mutatók, mint például a memóriafunkció, az LDL, a HDL és a testtömeg-index (BMI) közötti korrelációk sem érték el statisztikai szignifikanciát ($\text{FDR} < 0,05$). Bár a vizsgált összefüggések nem zárhatók ki teljesen, a mintaméret és a biológiai variabilitás korlátozhatta az eredmények kimutathatóságát.

Az epigenetikai öregedést mérő DNAmFitAge epigenetikai óra és tíz sEV minta fehérjeszintje között összefüggést találtunk, ami arra utal, hogy a testmozgás hatására képződő EV-k szerepet játszhatnak az epigenetikai öregedés szabályozásában.

Nem találtunk összefüggést a vezikulákban lévő fehérjék és a rendszeres testmozgásban eltöltött évek száma, valamint az alapvető táplálkozási szokások között, azonban a heti edzésórák pozitívan korreláltak a Koagulációs faktor V-tel, a C4b kötő fehérje alfa láncával, és a Komplement C1q alegység B-vel.

Az alfa-2-antiplazmin (A2AP), amely a fibrinolízis fő gátlója, a magas fittségi csoport tagjainak 9/20 mintájában volt jelen sEV-kben, míg a közepes-alacsony fittségi csoportban nem detektáltuk.

Az SH3BGRL3 fehérje csak négy magas fittségi csoportba tartozó mintában volt jelen, a közepes-alacsony fittségi mintákban pedig nem mutattuk ki.

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük a módszertan kidolgozása során felállított hipotéziseinkről:

Feltételezzük, hogy a minták alapos preanalitikai vizsgálata segít az sEV izolálásra legalkalmasabb minták kiválasztásában. **IGAZ**

Feltételezzük, hogy a 70 nm-es pórusnagyságú oszlop kisebb kontaminációval, hatékonyabban izolál sEV-ket tömegspektrometriás mérésre, mint a 35 nm-es oszlop. **IGAZ**

Feltételezzük, hogy a frissen levett vérből készült PFP, és a hosszabb távon fagyasztva tárolt PFP egyaránt alkalmas az sEV izolálásra. **IGAZ**

Eredményeink alapján a következő megállapításokat tehetjük az edzettségi szint és a kis méretű extracelluláris vezikulák (sEV) kapcsolatának vizsgálatára vonatkozó hipotéziseinkről:

Feltételezzük, hogy az sEV minták proteomikai elemzése során kapcsolatot találunk a vezikulákban található fehérjék, és az epigenetikai öregedés üteme között. **IGAZ**

Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a két csoport sEV mennyiségi meghatározásában. **NEM IGAZ**

Feltételezzük, hogy szignifikáns különbség mutatható ki a fehérjeszintek és a fiziológiai fitsségi mutatók között az edzettségi szint függvényében. **NEM IGAZ**

5.2. Összefoglalás

Manapság egyre népszerűbbek a szabadidős sporttevékenységek, és gyakran hangsúlyozzák a rendszeres mozgás egészségre gyakorolt jótékony hatásait. A kutatások folyamatosan vizsgálják a fizikai aktivitás szerepét a betegségek megelőzésében és az öregedési folyamatok lassításában. Bár ismert, hogy a rendszeres testmozgás kedvezően befolyásolja az egészséget, a mögöttes mechanizmusok még nem teljesen feltártak. Lehetséges közvetítő szereplők az extracelluláris vezikulák, amelyek szabadon keringenek a véráramban, és membránjukba csomagolva nukleinsavakat, fehérjéket és lipideket szállítanak, így hozzájárulhatnak a testmozgás szisztémás hatásaihoz.

Kutatásunk során szeretnénk volna megvizsgálni azt, hogy egy magas- és egy közepesen alacsony fitsségű csoport alanyaitól izolált kis méretű extracelluláris vezikulákat tartalmazó mintában milyen proteomikai különbségek jelennek meg. Ezzel szeretnénk volna a fenti kérdésre keresett válasz ismereteit bővíteni. Először egy megfelelő metodika megalkotása volt a célunk, amivel megfelelő minőségű és mennyiségű kis méretű extracelluláris vezikulát tudunk izolálni az alanyok vérmintáiból.

Vizsgálatunk során egészséges alanyok vérplazmájából izoláltunk kis méretű extracelluláris vezikulákat az általunk kifejlesztett protokoll segítségével. Az izolált minták proteomikai vizsgálatát elvégeztük, majd adatainkat szoftveresen értékeltük.

Összegzésként megállapítottuk, hogy a különböző fitsségi szintű csoportokból származó extracelluláris vezikulák proteomikai tartalma korrelál a DNAmFitAge akcelerációval, ami az edzés által indukált epigenetikai öregedés modulációjára utal. Specifikus fehérjetartalmuk szerepet játszik a gyulladás, az immunrendszer szabályozása, az anyagcsere és a sejtes regeneráció folyamatában. Eredményeink rávilágítanak arra,

hogy a fizikai állapot és a DNS-metiláció alapú öregedés modulációja összefügg, az edzés preventív hatása pedig részben az extracelluláris vezikulák közvetítésével valósulhat meg.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

György B, Szatmári R, Ditrói T, Torma F, Pálóczi K, Balbisi M, Visnovitz T, Koltai E, Nagy P, Buzás EI, Horvath S, Radák Z. (2025) The protein cargo of extracellular vesicles correlates with the epigenetic aging clock of exercise sensitive DNAmFitAge. *Biogerontology*, 26:35.

György B, Pálóczi K, Balbisi M, Turiák L, Drahos L, Visnovitz T, Koltai E, Radák Z. (2024) Effect of the 35 nm and 70 nm Size Exclusion Chromatography (SEC) Column and Plasma Storage Time on Separated Extracellular Vesicles. *Curr Issues Mol Biol*, 46:4337-4357.

Egyéb közlemények:

Jokai M, Torma F, McGreevy KM, Koltai E, Bori Z, Babszki G, Bakonyi P, Gombos Z, **György B**, Aczel D, Toth L, Osvath P, Fridvalszky M, Teglas T, Posa A, Kujach S, Olek R, Kawamura T, Seki Y, Suzuki K, Tanisawa K, Goto S, Kerepesi C, Boldogh I, Ba X, Davies KJA, Horvath S, Radak Z. (2023) DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation. *Geroscience*, 45:2805-2817.

Aczel D, **György B**, Bakonyi P, BukhAri R, Pinho R, Boldogh I, Yaodong G, Radak Z. (2022) The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*, 11:1028.

György B, Torma F, Babszky G, Jókai M, Gombos Z, Bakonyi P, Búzás E, Pálóczi K, Szabó T, Radak Z, Koltai E. (2021) Time frame of the extracellular vesicles release after high intensity exercise. *MAGYAR SPORTTUDOMÁNYI SZEMLE*, 22:77-81.

Bakai-Bereczki I, Herczeg M, **György B**, Naesens L, Herczegh P. (2015) Synthesis of a sialic acid derivative of ristocetin aglycone as an inhibitor of influenza virus. *Chemical Papers*, 69:1136-1140.