

Diplomadolgozat

Juhász Péter

2023

TDK dolgozat

Juhász Péter

2020

Állatorvostudományi Egyetem
Anatómiai és Szövettani Tanszék

A spermidin hatása az öregedő hippocampusra

Készítette: Juhász Péter

III. évfolyamos állatorvostan-hallgató

Témavezető: Dr. Rác Bence

ÁTE, Anatómiai és Szövettani Tanszék

egyetemi docens

Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
Bevezetés.....	3
Célkitűzések	11
Anyag és módszer	12
Eredmények.....	16
Következtetések	22
Összefoglaló.....	25
Abstract	26
Irodalomjegyzék.....	27
Köszönetnyilvánítás	32

Rövidítések jegyzéke

AC: idős egerekből álló kontrollcsoport (aged control)

AD: Alzheimer-kór (Alzheimer Disease)

AS: idős, spermidinnel hozzátáplált egerekből álló vizsgálati csoport (aged + spermidine)

ATP: adenzin-trifoszfát

BBB: vér–agy gát (blood–brain barrier)

CA: *cornu ammonis hippocampi*

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica)

DBN1: drebrin

DG: *gyrus dentatus hippocampi*

KIR: központi idegrendszer

mtDNA: mitokondriális dezoxiribonukleinsav

PA: poliamin

PBMC: perifériás mononukleáris vérsejt (peripheral blood mononuclear cell)

PINK1: PTEN-indukált kináz

PSD: posztzinaptikus denzitás

ROS: reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)

SPD: spermidin

YC: fiatal egerekből álló kontrollcsoport (young control)

Bevezetés

Az orvostudomány és az egészségügyi eljárások lendületes fejlődésének köszönhetően világszerte tapasztalható a születéskor várható élettartam jelentős növekedése (Roser, 2013). Az élettartam kitolódásával párhuzamosan egyre nagyobb arányban jelentkezik az öregedéssel összefüggő betegségek, rendellenességek, amelyek sejtszintű metabolikus és biokémia elváltozásokra vezethetők vissza.

Számos tanulmány foglalkozik az öregedés sejtszintű folyamataival (López-Otín és mtsai, 2013; Hernandez-Segura és mtsai, 2018), melyek közt előkelő helyet kapott a mitokondriumok funkciójának zavara és a megváltozott intracelluláris kommunikáció is. A mitokondriumok a sejtek alapvető energiaközvetítő vegyületének, az ATP-nek bioszintetikus színhelyéül szolgálnak, így a számukban vagy szerkezetükben, és ebből adódóan a működésükben tapasztalható elváltozás súlyosan érinti a sejt metabolizmusát. Ezek a sejtorganellumok többféle patológiai folyamat következtében károsodhatnak az öregedés során. Leggyakoribb okokként említik a telomer szekvenciák kopását, a kóros mitokondriumokat eltávolító autofágia csökkenését, a belső membrán túlzott károsodását az oxidatív folyamatok során keletkezett ROS miatt, az mtDNS-ben felhalmozódó mutációkat, a mitokondriális fehérjék oxidációját, a légzési lánc komplexeinek szerkezeti destabilizációját és a membrán foszfolipidjeinek károsodását (López-Otín és mtsai, 2013; Wang és mtsai, 2011).

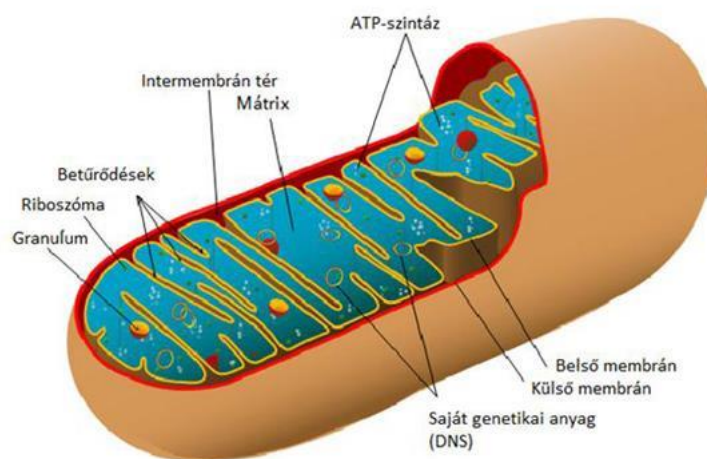
A biológiai öregedés érinti a szervezet sejt-sejt kapcsolatait is. Az endogén eredetű, ám idős korban gyakran hibás konformációban szintetizálódott, vagy rossz helyre kijuttatott fehérjék enyhe, krónikus, steril gyulladást indukálhatnak (Franceschi és mtsai, 2018). Ezek a gyulladáshoz vezető reakciók negatívan befolyásolják neuroendokrin rendszer intracelluláris kommunikációját (López-Otín és mtsai, 2013). Másrészt a kor előrehaladtával a központi idegrendszerben (KIR) az idegsejtek közti szinapszisok száma is megváltozik (Hatanpaa és mtsai, 1999; Dorszewska, 2013). Ennek oka az úgynevezett szinaptikus plaszticitás, vagyis az, hogy a neuronok a tanulási és emlékezési folyamatok során képesek új kapcsolatok létrehozására, fokozva ezzel a jelátvitel hatékonyságát. Idős korban azonban csökken az ún. tartós szinaptikus hatásnövekedés (long-term potentiation) hatékonysága, így a fiatal korban még elégséges intenzitású stimulusok később már nem

képesek fenntartani és megerősíteni az idegsejtek közti kapcsolatokat (Lister és mtsai, 2009). A változások valószínűleg közrejátszanak a tanulási és kognitív funkciók hanyatlásában. Ez a folyamat a természetes öregedés során is kifejezett a szinapszisok és szinaptikus fehérjékszámbeli redukciója miatt, viszont bizonyos kóros esetekben, például a DBN1 posztzinaptikus protein hiányában súlyosabb demencia alakul ki. Ez utóbbi esetet Hatanpaa és mtsai (1999) összefüggésbe hozták az Alzheimer-kór kialakulásával.

Az időskori demenciát okozó neurodegeneráció az említett sejtszintű elváltozások mellett lehet mikrovaskularis ischaemia, gyulladás, oxidatív stressz és citotoxikózis következménye is (Fotuhi és mtsai, 2012).

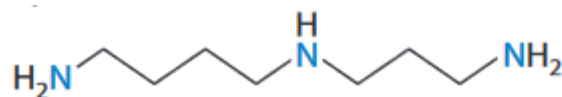
A mitokondriumok alapvető fontosságúak a sejtek a sejtek metabolizmusában. Külső membránjuk feszes, az organelum alakját biztosítja, míg a belső membrán a mátrixba mélyen benyúló betüremkedéseket, ún. cristákat képez (1. ábra). Ez utóbbi molekuláris összetétele is különbözik a megszokott egységmembrántól: 80%-ban fehérjékből, és 20%-ban lipid természetű anyagokból áll. Az eltérés oka, hogy benne foglalnak helyet az elektron-transzportlánc fehérje komplexei és az ATP-szintáz transzmembrán enzim. Az itt lejátszódó oxidatív foszforiláció biztosítja a sejt energiaellátásához szükséges ATP szintézisét.

A mitokondrium felépítése



1. ábra: Mitokondrium felépítésének sematikus ábrája
(forrás: <https://www.thoughtco.com/mitochondria-defined-373367>)

A felsorolt, idegrendszeri funkciócsökkenéshez vezető tényezők közül a természetes, fiziológiásnak tekinthető folyamatok ellen a szervezet képes bizonyos mértékben védekezni. Ilyen az ún. mitofágia, mely során a sejt a rendellenes mitokondriumokat saját maga, autofág módon lebontja (Wang és mtsai, 2011). A mitokondriumok homeosztázisának fenntartásáért szükséges, hogy a sejt folyamatosan eliminálja a hibás szerkezetű és működésű organelleumait. A szelektív mitofágiának, mely során a sejt felismeri és lebontja a rendellenes vagy feleslegessé vált mitokondriumait, emlős sejtekben több ismert módja is van (Fivenson és mtsai, 2018). A hibás mitokondrium külső membránjához egy kináz aktivitással rendelkező enzim, a PINK1 kapcsolódik, és foszfátcsoportokat kapcsol az ott lévő ubikvitin molekulákhoz. Ez a szignál a parkin nevű, citoszolban lévő enzim aktiválódásához, amely katalizálja a mitokondrium fehérjéinek ubikvitinációját. Ez a szerkezeti módosítás fontos lépése az intracellulárisan lebontásra szánt proteinek megjelölésének (Grumati és mtsai, 2017). Az ubikvitinált fehérjékkel rendelkező mitokondrium köré dupla membránnal rendelkező autofagoszóma szerveződik, amely ezután fuzionál egy lebontó enzimeket tartalmazó lizoszómával, és így megtörténik a hibás szerkezetű mitokondrium biodegradációja (Fivenson és mtsai, 2018). Az életkor előrehaladtával azonban hanyatlás jelentkezik a sejtek autofág aktivitásában, és tartósan lebontatlanul maradó hibás szerkezetű fehérjék és mitokondriumok felhalmozódása kapcsolatban áll a neurológiai, pszichikai és kognitív funkciókat érintő kóros elváltozásokkal (Vellai és mtsai, 2009; Ott és mtsai, 2016).



2. ábra: A spermidin szerkezeti képlete
(Madeo és mtsai, 2020)

A szervezetben természetesen is jelen lévő poliaminok, például putrescin, spermin, spermidin (SPD), jelentős szerepet játszhatnak az öregedési folyamatok lassításában. Ezek nitrogén tartalmú, is molekulatömegű, nyílt láncú kationos vegyületek (2. ábra). Alapvetően három különböző eredetű poliamin fordulhat elő a fejlettebb szervezetében. Bioszintézis útján keletkezett a szervezet saját enzimszere által (endogén), takarmány vagy táplálék által bejuttatott (exogén), illetve a bélcső különböző szakaszaiban élő szimbióta microbiota által szintetizált (Minois és mtsai, 2011).

Ezek a poliaminok jelentős hatása, hogy autofágiát indukálnak, segítve ezzel a mitokondriumok homeosztázisának fenntartását, azonban idős korra jelentősen lecsökken bioszintézisük (Gupta és mtsai, 2013). Eisenberg és mtsai (2009) élesztősejt-tenyésztésen végeztek kísérletet a spermidin hatásának vizsgálatára. Az élesztősejtekben a tenyésztés 5. napjára a spermidin koncentrációja 15%-ára esett vissza az endogén szintéziscsökkenő intenzitása miatt. A külsőleg pótolta spermidint a sejtek képesek voltak felvenni, és bennük szignifikánsan emelkedett az intracelluláris SPD szint a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. A exogén SPD-nel mesterségesen magas tartott poliamin koncentráció jelentős különbséget eredményezett az élesztősejtek élettartamában, a kezelt sejtek várható élettartama jelentősen emelkedett.

A SPD fejlettebb organizmusokon, vagy azok sejtjein is kifejti élettartamot megnövelő hatásukat. Az esetmuslicákban (*D. melanogaster*) napi táplálékkal adagolt spermidin kiegészítés közel harmadával növelte az élethosszt. (Eisenberg és mtsai, 2009). A kísérletet ezután humán sejtekkel is elvégezték. Az emberi perifériás mononukleáris vérsejtek (PMBC) sejtek közül 12 nap múlva a kontroll csoportban 15%-uk élt, míg a másik, exogén spermidin pótlást kapott csoportban a sejtek 50%-a volt túlélő. Az eredményekből arra következtettek, hogy a spermidin autofágiát indukáló hatása külsőleges pótlással fenntartható, és ez képes sejtszinten megnyújtani az élettartamot.

Az emlősökben a poliaminok az autofágia-serkentésen kívül számos módon szükségesek a normális sejtmetabolizmus fenntartásához (Pegg, 2016). DNS-hez kötődve hatással vannak annak stabilitására, proliferáló szövetekben megnö a szintjük, így hatással vannak a sejtek osztódására, részt vesznek az apoptózis irányításában, és ioncsatornákhöz kötődhetnek, befolyásolva a sejtek alapvető transzportfolyamatait (Iacomino és mtsai, 2012; Igarashi és mtsai, 2010; Pegg és mtsai, 1970).

A spermidin csökkenő szintje a fent említett sokrétű funkciója miatt hátrányosan érinti a szervezetet. Madeo és mtsai (2019) a csökkenő bioszintézis mellett megemlíti még a microbiota megváltozását, a csökkent transzportképességet és fokozott lebontást, mint az időskori alacsony poliaminszint okait. Megoldásként javasolják a spermidinben gazdag ételek, vagy a szintetikus előállított spermidin fogyasztását.

A poliaminokkal kapcsolatos legfontosabb táplálkozás-tudományi és élettani tudásunkat ma már számos tanulmányra alapozhatjuk (ld. Madeo és mtsai, 2020). A legmagasabb PA tartalmú humán élelmiszerek a zöldség-rügyek, a brokkoli, a narancs, a babfélék, és az érlelt sajtok. Általánosságban elmondható, hogy a növények és gombák PA tartalma meghaladja az állati eredetű táplálékokét, melyek közül legjelentősebb mennyiséget a zsigeri szervek tartalmazzák (Kalač, 2009). A bélsatorna proximális szakaszából való felszívódás emlősökben három fő mechanizmus útján történik: glipikán- vagy caveolin-mediált endocitózis az enterociták luminális membránján (Basu Roy és mtsai, 2008), paracellulárisan passzív diffúzióval, vagy legnagyobb mértékben transzmembrán carrier fehérjecsatornák segítségével (Ramos-Molina, 2019). A PA-ok a bélhámsejtekből a vérbe szívódnak fel, és ott fehérjékhez kötve szállítódnak. Egyik legjelentősebb hatáshelyük a KIR, ahová a vér–agy gát átlépésével tudnak bejutni (Shin és mtsai, 1985). Itt kifejtik neuroprotektív hatásukat, valamint az idegsejtek veziculumaikban tárolni is képesek a poliaminokat. A PA-ok acetilációs reakciók után a vesén keresztül választódnak ki a szervezetéből.

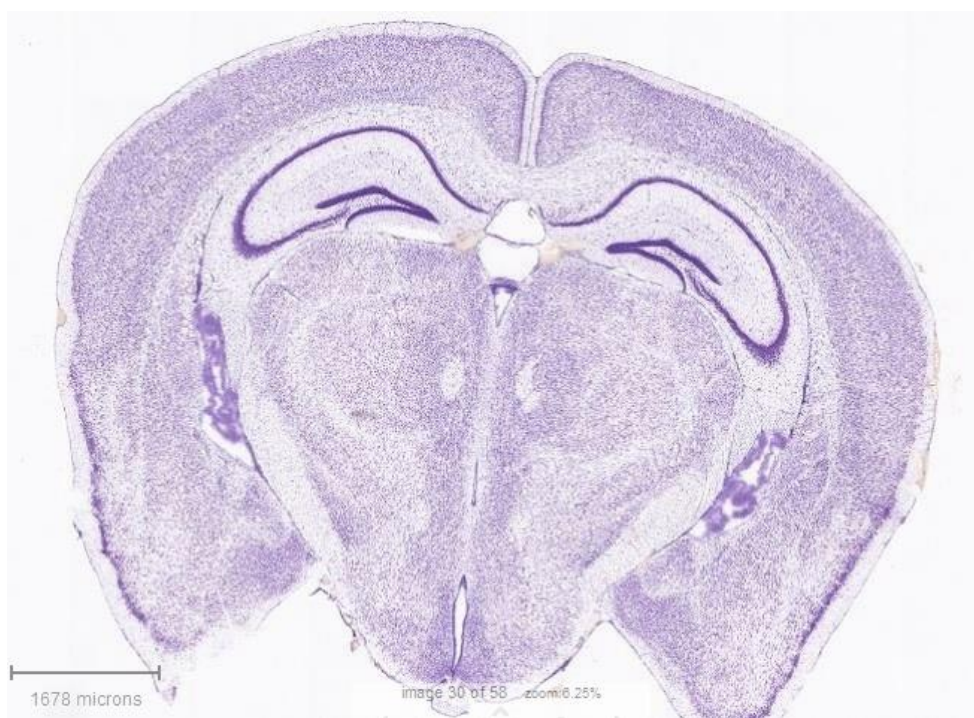
A poliaminok a véráram útján az egész szervezetbe eljutnak, és a legkülönbözőbb hatásokat fejtik ki (Madeo és mtsai, 2018). A cardiomyociták apoptózisának gátlásával, a mitofágia serkentése révén az endothelium oxidatív károsodás elleni védelmével jelentős a cardioprotektív hatása (Zhang és mtsai, 2017).

A spermidin immunrendszerre gyakorolt hatásai közül a legjelentősebbek a gyulladással kapcsolatos citokininek szuppressziója, így gyulladáscsökkentő hatást fejt ki, valamint stimulálja a tumorellenes immunsejteket. (Madeo és mtsai, 2018; Pietrocola és mtsai, 2016).

A spermidin szerteágazó hatásának pontos, molekuláris mechanizmusa nem teljesen tisztázott (Madeo és mtsai, 2018). Az élettartamot növelő hatását elsősorban a mitofágia serkentésének tulajdonítják (Madeo és mtsai, 2010), az idegrendszerre védő funkciójáról azonban főként klinikai tapasztalatok és mikroanatómiai vizsgálatok állnak rendelkezésre. Maglione és mtsai (2019) vizsgálták a spermidinnek a hippocampus CA3 régiójában lévő szinapszisokra gyakorolt hatását. A moha rostok és a CA3 sejtek szinapszisait vizsgálva azt találták, hogy a 18 hónapon át tartó spermidin pótlás szignifikánsan emelte a

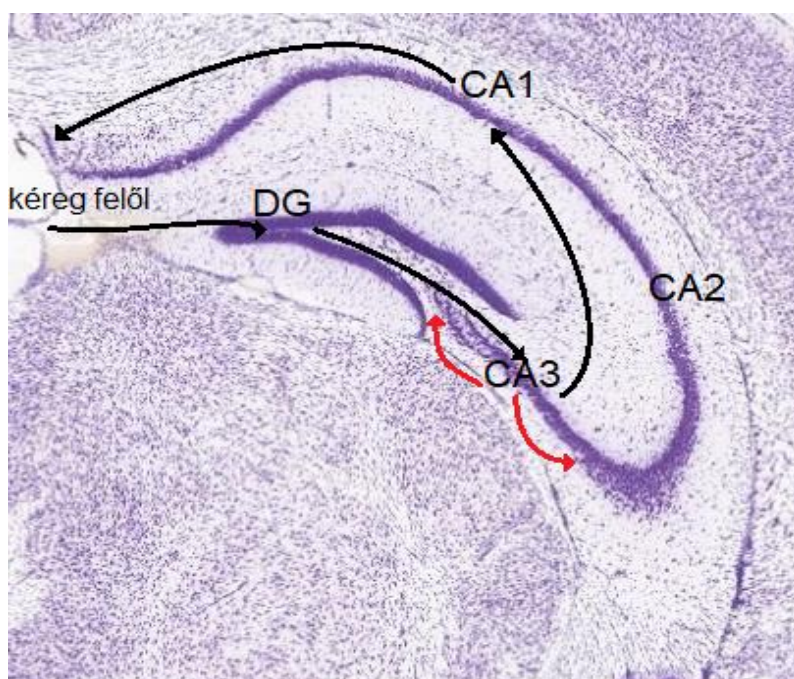
preszinaptikus vezikulumok denzitását, és a boutonokban helyet foglaló mitokondriumok számát, megvédve ezzel az idegsejtek közti kapcsolatokat a neurodegenerációtól.

A hippocampus a nagyagy archicortexének része, a temporális lebenyben helyeződik (3. ábra). Ennek az agyterületnek kifejezett szerepe van a tanulásban, a térbeli tájékozódásban (navigáció) emlékek kialakításában, tárolásában és előhívásában (Yassa és mtsai, 2011). Ez az összetett funkció többek közt anatómiai szerkezetével magyarázható (Knierim, 2015). A hippocampalis formáció két fő anatómiai része a *cornu ammonis* (CA) – amely további alrégiókra tagolódik – és a *gyrus dentatus* (DG). A CA szürkeállományát a neocortexéhez hasonló pyramissejtek alkotják, míg DG neuronjai a szemcsesejtek. A hippocampus memóriefunkciókban betöltött szerepe általánosnak tekinthető az emlősök körében, azonban alakja jelentősen eltérő lehet a különböző fajokban. A humán hippocampus metszete csikóhalra emlékeztető alakú (innen kapta a nevét), míg egerekben nyújtott ovális formájú. A ma is elfogadottnak tekintett szerkezetről az első ábrát Ramón y Cajal készítette (5. ábra).



3. ábra: Egér agyának coronalis metszete
(mouse.brain-map.org)

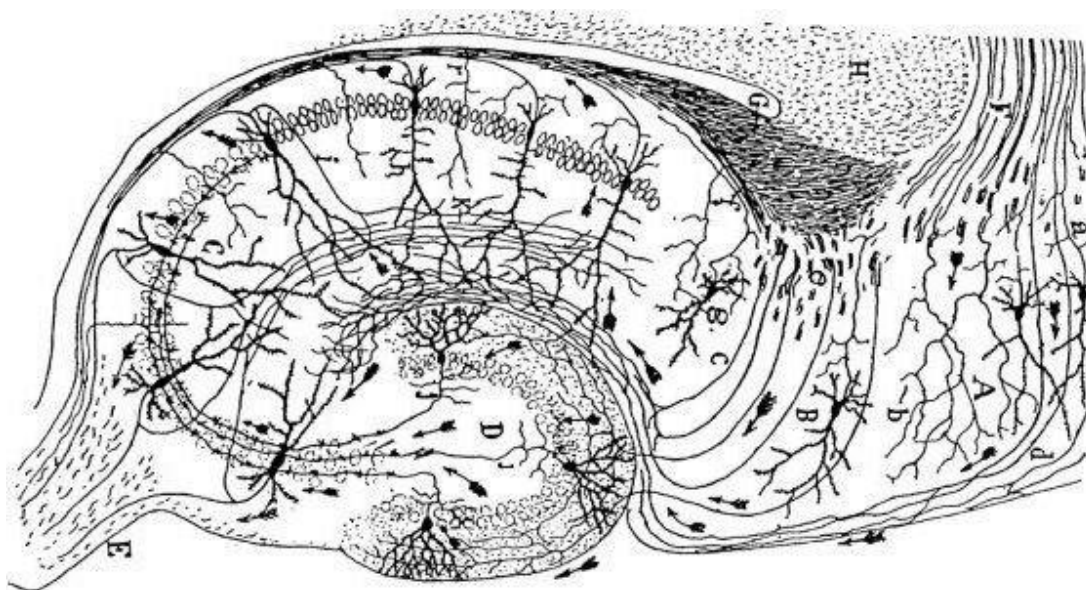
A hippocampus szinaptikus felépítése az ún. triszinaptikus hurok: a mediális temporális lebenyből érkező afferentáció a DG granulosajtjein szinaptizál. Ezek a sejtek a CA3 sejtekhez projektálnak a moharostokon keresztül, majd átkapcsolás után a Schaffer-féle kollaterálisok szállítják a CA1 sejtjeibe. A harmadik szinapszis után a pyramissejt az axonját a kéregbe projektálja, így az ingerület a hippocampális hurokból visszajut a temporális lebenybe. Az ingerület haladása, azonban nem egyirányú, ugyanis a CA3 területéről kollaterális térnek másik CA3 sejtekhez (4. ábra). Ez a visszacsatoló autoasszociatív stimuláció jelentős szerepet kap a tanulásban és az emlékképek eltárolásában.



4. ábra: Egér hippocampusának főbb régiói; fekete nyilak: triszinaptikus hurok, piros nyilak: szétterjedés a CA3 sejtekre (mouse.brain-map.org, átdolgozva Knierim nyomán)

Az idegi funkciók ellátásához nélkülözhetetlen a mitokondriumok megfelelő működése az energiaellátottság biztosításához: és a szinapszisok fenntartásához és a hatékony celluláris kommunikációhoz mind az általuk előállított energiára van szükség (Levy, 2003) (Picard és mtsai, 2014). Nincsen ez másképp a hippocampus esetében sem. Az időskorban jelentkező memóriazavarokat okozó elváltozások is elsősorban a

hippocampushoz köthetőek, és egyértelmű kapcsolat mutatkozik a hibás mitokondriális működés és a szinaptikus funkciók zavara között (Olesen és mtsai, 2020).



5. ábra: Ramón y Cajal 1911-ben készített rajza a humán hippocampusról
(https://www.researchgate.net/publication/329948704_Hippocampus_as_an_Echo_State_Network)
(Mutalik, 2018)

A KIR-ben lévő idegsejtek közti szinapszisok folyamatosan átépülnek. Ez a plaszticitás teszi lehetővé az új ismeretek tartós rögzítését. A szinaptikus hatásvövedés során két neuron között kialakulhatnak, majd megerősödnek a kapcsolatok. A nagyfokú plaszticitás háttérben a precízen szabályozott dendrittüskék belső fehérjevázáinak átépülése áll (Rácz, 2014).

A hippocampus tanulási, és memóriefolyamatokban betöltött szerepe már bizonyított. Ez okozza, hogy az idegrendszert az öregedés folyamata által általánosan érintő degeneráció, a mitokondriális és szinaptikus működés csökkenése ezen az agyterületen a kognitív funkciók hanyatlásaként manifesztálódik. Az exogén úton pótolta spermidin mitokondriumok védelme által kifejtett jótékony hatását már felismerték. Nincs azonban elégséges mennyiségű adat a spermidin hippocampális mitokondriumokra kifejtett morfológiai hatásáról. Az alaktani elváltozások tisztázása segíthetné a demencia klinikai megelőzésére, ill. kezelésére való törekvéseket, és a megfelelő táplálkozásról alkotott kép kialakulását.

Célkitűzések

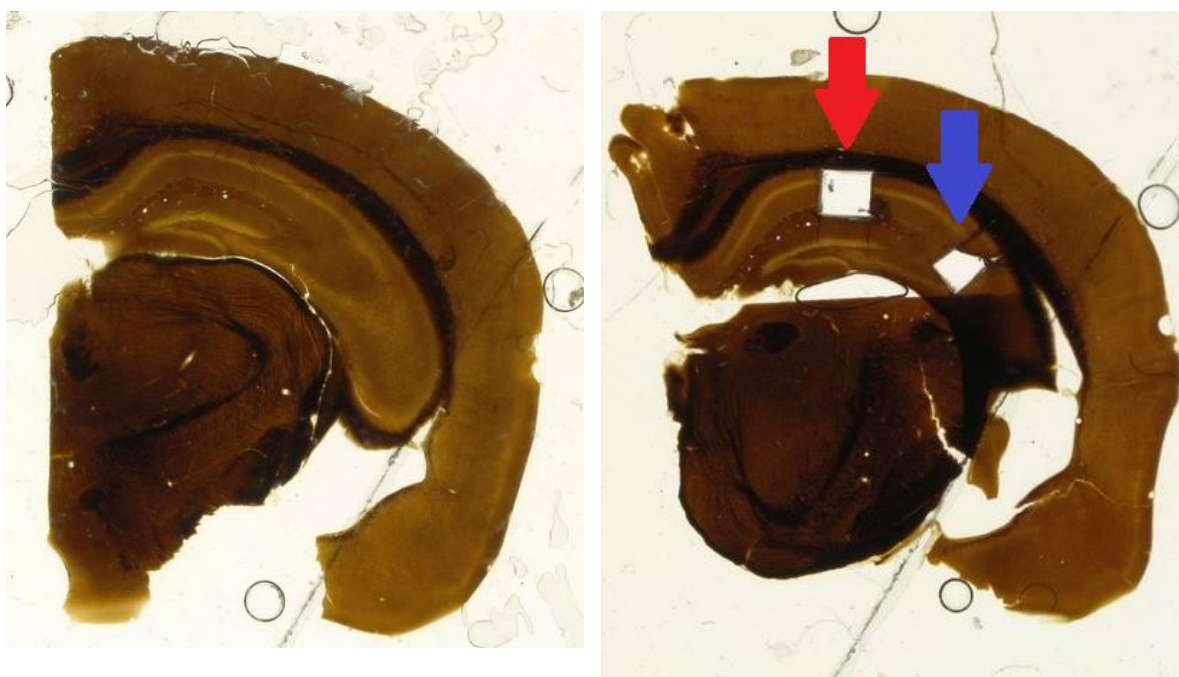
Kutatásunk célja, hogy kvantitatív elektronmikroszkópos módszerrel adatokat gyűjtsünk egér modellek *post mortem* vizsgálatával. Fiatal, idős és idős, de spermidin pótlással takarmányozott egerekből készített metszetek összehasonlításával alapvetően két kérdésre kerestünk választ:

1. Hogyan változik a hippocampus CA1 régiójában lévő mitokondriumok denzitása, alakja, mérete, valamint a belső cristáinak szerkezete az állatok öregedése során, és milyen hatással van erre a folyamatra a külső eredetű spermidin?
2. Milyen hatást gyakorol a spermidin az említett terület szinapszisainak felépítésére, méretére?

A hippocampus funkciója és a poliaminok metabolizmusa is hasonló a különböző emlősfajokban, így az egérmodellen szerzett eredmények várhatóan extrapolálhatók az emberi agy működésének tulajdonságaira.

Anyag és módszer

Vizsgálatainkat az osztrák Karl-Franzens Egyetemen (Graz) elvégzett táplálási kísérletsorozat után perfúziós módszerrel lefixált egerek agyán végeztük, amelyeket a budapesti Állatorvostudományi Egyetemre szállítottak. A kísérletek során az ÁTE telephelyén élő állat felhasználás nem volt, kizárólag a fixált szervek feldolgozása történt meg az Egyetem Anatómia és Szövettani Tanszékén. Az elektronmikroszkópos vizsgálatok is itt kerültek elvégzésre.

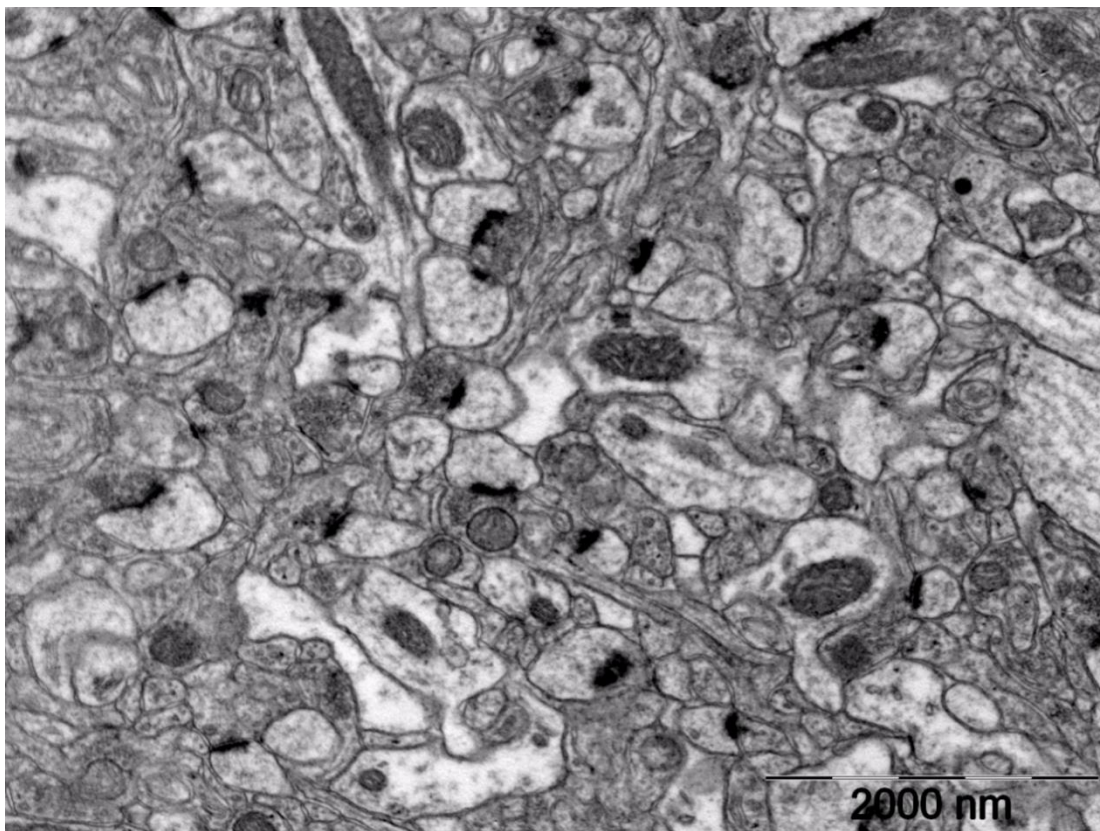


6. ábra: Elektronmikroszkópos mintavételhez Durcupan műgyantába ágyazott 1%-os OsO₄-oldattal kontrasztzott 60 µm vastag agymetszetek 12x nagyításban. A bal oldali képen az intakt, a jobb oldalon látható metszetből mind a CA1 (piros nyíl), mind pedig a CA3 régióból (kék nyíl) kivágásra került egy-egy terület elektronmikroszkópos feldolgozásra.

Az agyakat először fiziológiás sóoldattal (9g/l NaCl-oldat) kimosták, majd 7,4-es pH-jú 0,1M foszfát-pufferben (PB) oldott 2%-os glutáraldehid (GA, ElectronMicroscopySciences, PA, USA) és 4%-os paraformaldehid (PF, Sigma) keverékével fixálták. Az agyakat a koponyából történő eltávolítás után 4°C-on utófixálták egy éjszakán át 4%-os 0,1M-osPB-ben oldott 4%-os paraformaldehidben tartva őket. Az

agyakból, a koponya ún. Bregma-pontjához, mint referenciához viszonyított -4,00 mm-es síktól kezdve vibratómmal (Leica, Wetzlar, Németország) 60µm vastag coronalis metszeteket készítettünk. A szabadon-úszó vibratóm-metszeteket 0,1 M PB-ben történő többszöri mosás után 1%-os OsO₄-oldattal és 1%-os uranyl-acetáttal utófixáltuk, ill. kontrasztoltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük a metszeteket (50,70,90,96%-os, majd abszolút alkoholban), ezt követően alkohol-propilén-oxid 1:1 arányú elegyében, majd propilén-oxidban. Végül propilén és epoxy műgyanta (2:1, majd 1:2 arányú) keverékben, ezután pedig tisztán epoxy gyantába ágyasztuk (Durcupan, Sigma). Legalább 12 órás szobahőmérsékletű tárolás után Aclar (EMS, PA, USA) lapokra helyeztük a metszeteket, majd 60°C-on (termosztátban) polimerizáltattuk a gyantát 24-48 órán át.

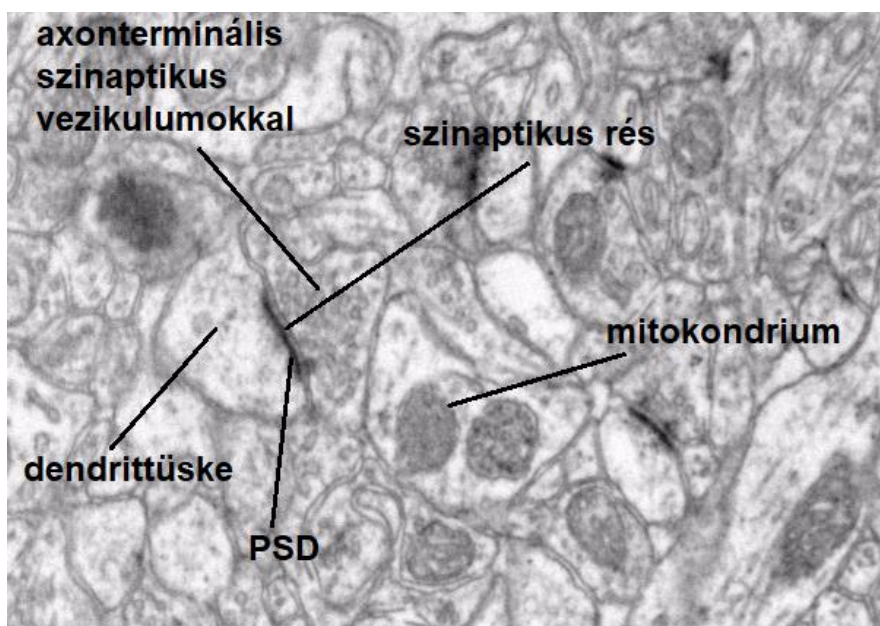
A gyanta polimerizációja után Leica S6D sztereomikroszkóp alatt a dorsalis hippocampus CA1 régiójának stratum radiatum és stratum pyramidale területéről trapezoidokat vágunk ki (6. ábra), műgyanta blokkra helyeztük, majd Reichertultramikrotómmal (Leica, Ultracut 2) 50–70 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk és 300 meshes réz rácsokra (gridekre) felvittük őket.



7. ábra: Az Image J szoftverrel vizsgált metszetek egyike

A metszeteket JEOL-1011 transzmissziós elektronmikroszkóppal 80kV gyorsítófeszültséggel vizsgáltuk (JEOL, Tokió, Japán) az Állatorvostudományi Egyetem Elektronmikroszkópos Laboratóriumában. A hippocampus stratum radiatum középső részének területeiről véletlenszerű mintavételezéssel készítettünk digitális felvételeket, MegaView 1024x1024 felbontású CCD digitális kamerával, 20.000x–70.000x-es nagyítási tartományban (7. ábra).

A kalibrált digitális elektronmikroszkópos felvételeken a mitokondriumokat és a szinapszisokat az NIH Image J program (ver. 1.52n) segítségével kvantifikáltuk. A felvételeken azonosítottuk a szinapszisokat és a mitokondriumokat, és az alábbi paramétereket lemértük: a mitokondriumok száma, az alakjukat leíró paraméterek (terület, kerület, cirkularitás, a bennük lévő cristák távolsága) a serkentő szinapszisok kialakításában résztvevő dendrittüskék száma, alakja és területe (8. ábra). A kapott adatokat Microsoft Excel táblázatokban összesítettük.



8. ábra: A szinapszisok és mitokondriumok morfológiája a CA1 neuropiljében

A vizsgálatok során tanulmányozott egerek három csoportból származtak: fiatal állatok (életkoruk 5 hónap, young control, YC), idős állatok (életkoruk 24 hónap) (aged control, AC), és idős, de spermidin tartalmú kiegészítővel táplált állatok (életkoruk 24 hónap, de 18 hónapos koruktól fogva kaptak spermidin kiegészítést [3 mM-os

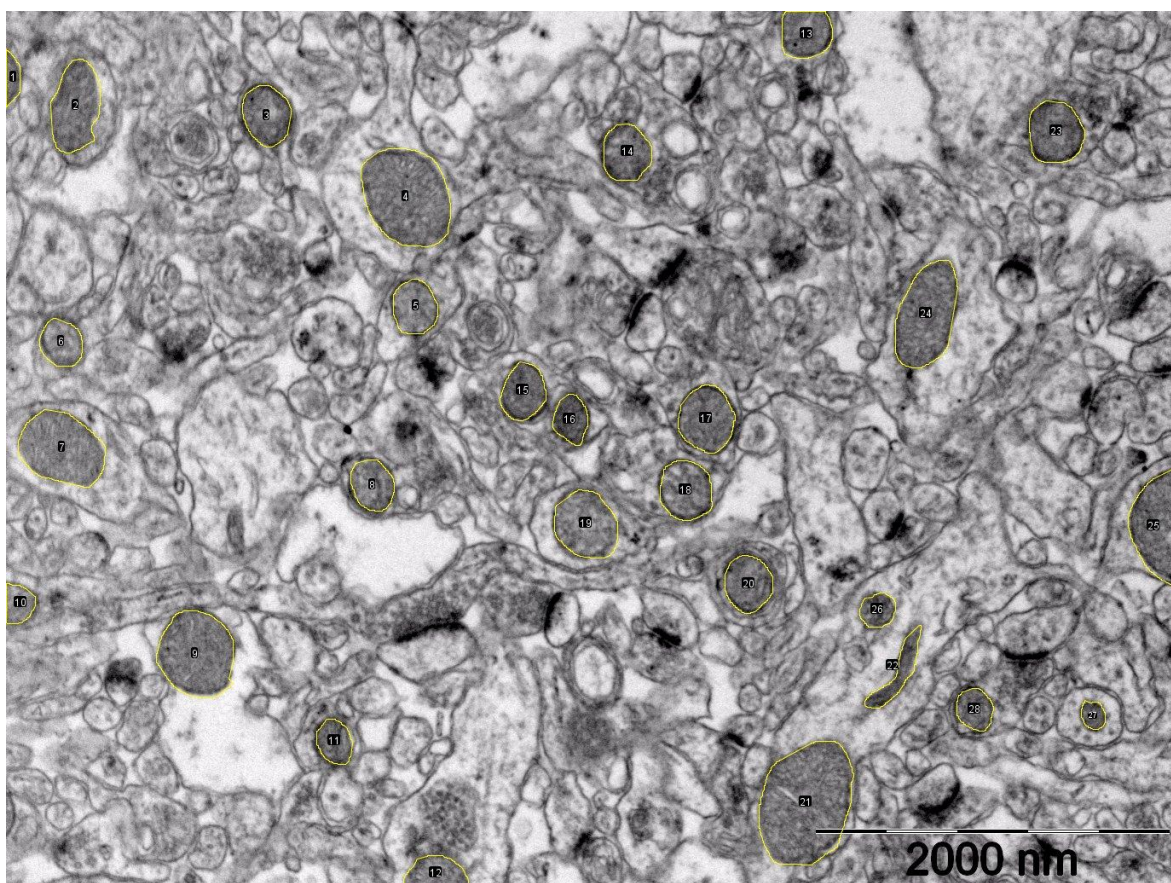
koncentrációban] ivóvízbe keverve; aged+spermidine, AS). A mérések elvégzésekor a metszeteket azonosító számsor nem tartalmazott utalást arra, hogy melyik csoportba tartozó állatból származik. Ezzel biztosítottuk, hogy a kinyert adatokat ne befolyásolja egy esetleges, előkövetkeztetésekből eredő, a vizsgálattól független hiba. A metszetek azonosítása a teljes kvantitatív mérés befejezése után történt, majd ezután rendeztük az azonos vizsgálati csoportba tartozó állatok adatait közös táblázatokba. Összesen 8 AC, 5 AS és 5 YC csoportba tartozó állatot vizsgáltunk, egyedenként 8 darab, 32 980 856 nm²-es felvételt a hippocampus stratum radiatum rétegéből.

A kapott adatokat összegyűjtöttük, Excel táblázatban metszetenként kiszámítottuk a mitokondriumok átlagos területét, átlagos kerületét, átlagos cirkularitását, az összterületüket, valamint az általuk elfoglalt területet a metszet területéhez viszonyítva. Összesen több, mint 3200 mitokondriomot mértünk meg. A szinapszisok tekintetében az azokat kialakító posztszinaptikus dendrittüskéket számoltuk.

Az eredményeket vizsgálati csoportonként rendeztük, és statisztikailag elemeztük. Ehhez egy utas ANOVA (one-way ANOVA) és Tukey-féle post hoc tesztek alkalmaztunk az astatsa.com online statisztikai kalkulátor segítségével. Az ábrák elkészítéséhez a Prism 8 (GraphPad, San Diego, USA) nevű programot használtuk.

Eredmények

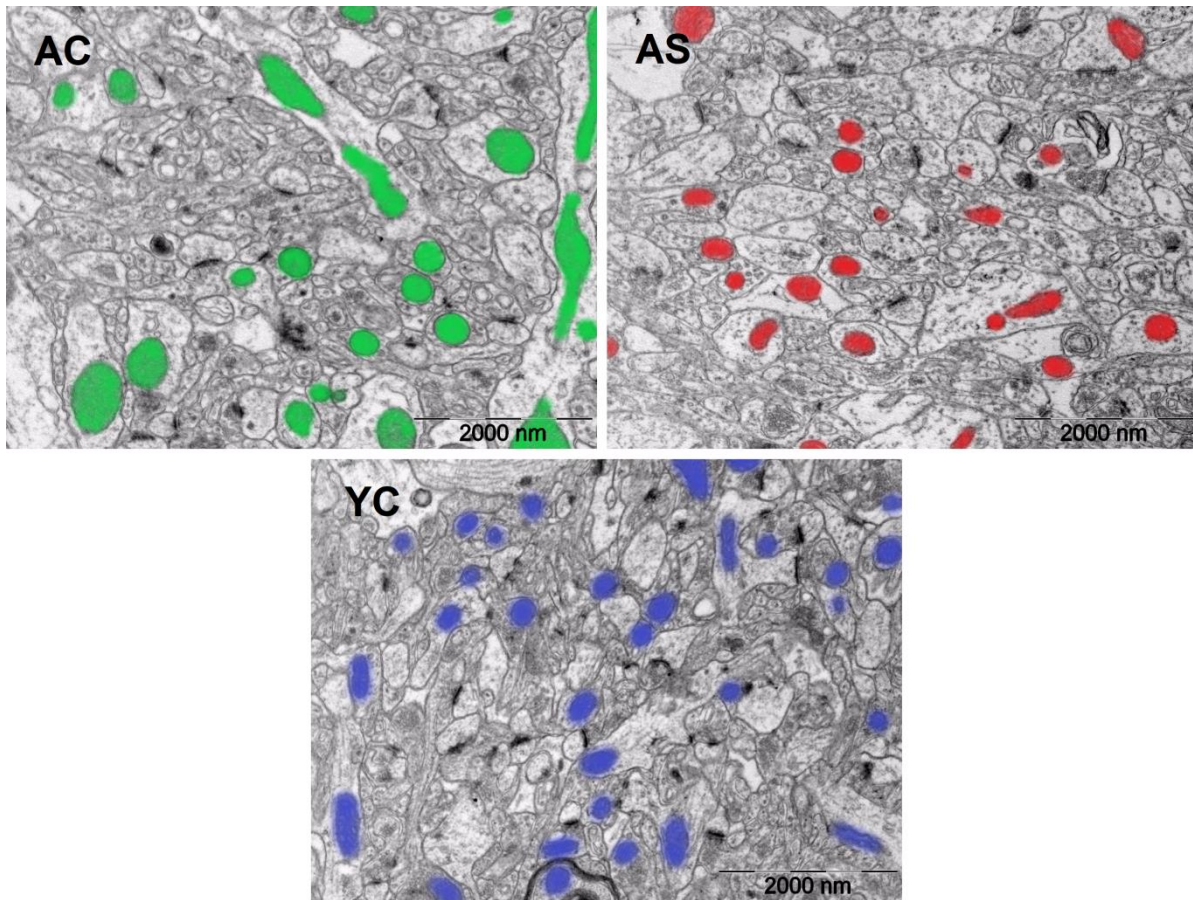
A kutatás során a grazi egyetemről érkezett egéragyakat készítettük elő kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatra, és a metszetekről felvételeket készítettünk a szoftveres méréshez (9. ábra).



9. ábra: Számozással megjelölt mitokondriumok a 678-as számú egér 80-as jelzésű metszetén (a mérések után azonosítva: a YC csoportba tartozó egyed)

A kutatás során több aspektusát vizsgáltuk meg a hippocampus CA1 stratum radiatum neuropil területének: a szinapszisok számát, a mitokondriumok átlagos területét, illetve a mitokondriumok által elfoglalt átlagos neuropil területet, valamint a belső membránjaik cristáinak szerkezetét is.

Mitokondriumok denzitása

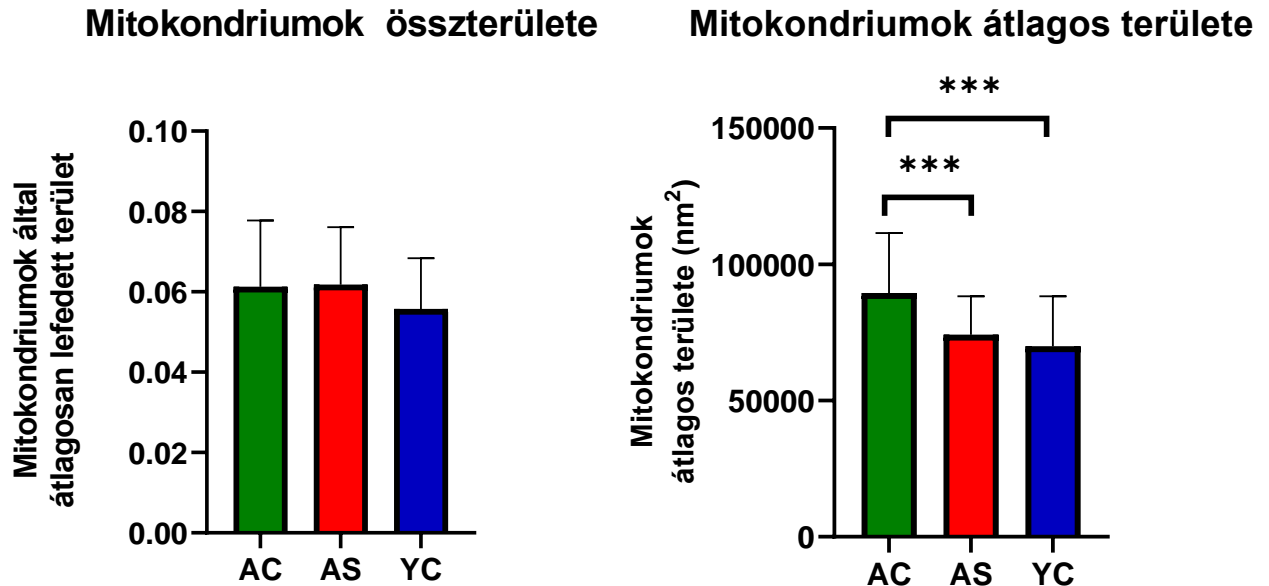


10. ábra: Mitokondriumok színesen jelölve a három vizsgálati csoportból készült metszeteken

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, eltér-e a vizsgálati csoportokban a mitokondriumok denzitása, statisztikailag összehasonlítottuk a mitokondriumok átlagos területét, és a mitokondriumok által lefedett területet (10. ábra). Azt találtuk, hogy a mitokondriumok által a neuropilben elfoglalt terület (AC: 6,182%; AS: 6,125%; YC: 5,570%) nem különbözik egymástól szignifikánsan semelyik vizsgálati csoportban (AC–AS: $p=0,9811$; AC–YC: $p=0,1302$; AS–YC: $p=0,1065$), így nem különbözik jelentősen a mitokondriumok összterfoglata a stratum radiatum idegszövetében.

A mitokondriumok átlagos területe azonban szignifikáns eltérést mutat az idős kontroll és a fiatal állatok csoportja, valamint az idős kontroll csoport és az idős, spermidin kiegészítővel táplált egerek között, míg nem különbözik szignifikánsan a fiatal, és az idős,

exogén spermidinhez juttatott állatok között (AC–AS: $p < 0,001$; AC–YC: $p < 0,001$; AS–YC: $p = 0,5328$) (11. ábra).



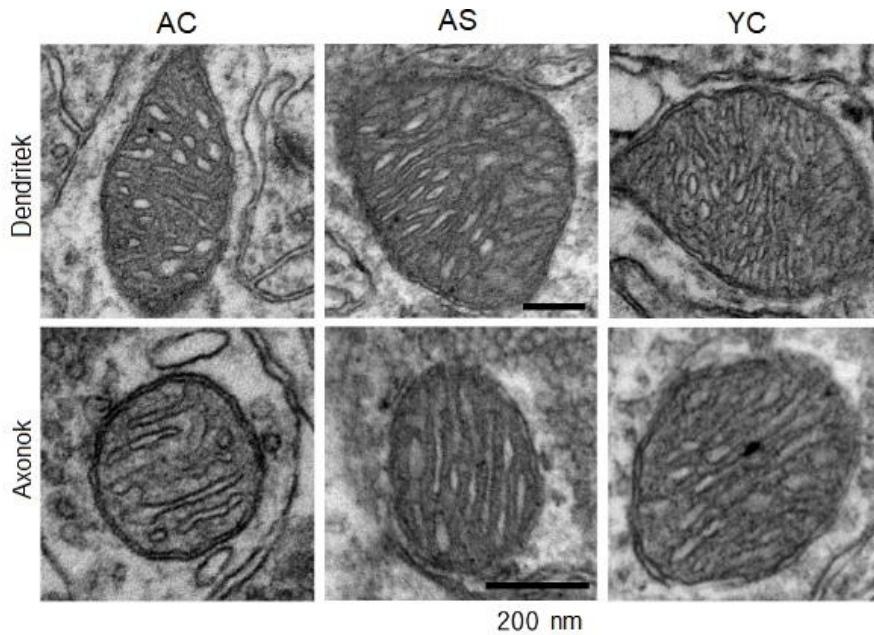
11. ábra: A mitokondriumok összterülete a metszet egészéhez viszonyítva, ill. az átlagterületük

A neuropilben a mitokondriumok által lefedett terület nem különbözik szignifikánsan, az organellek egyenkénti területének átlaga viszont igen, így feltételezhető, hogy az eltérést a mitokondriumok száma és azok méretcsökkenése okozza.

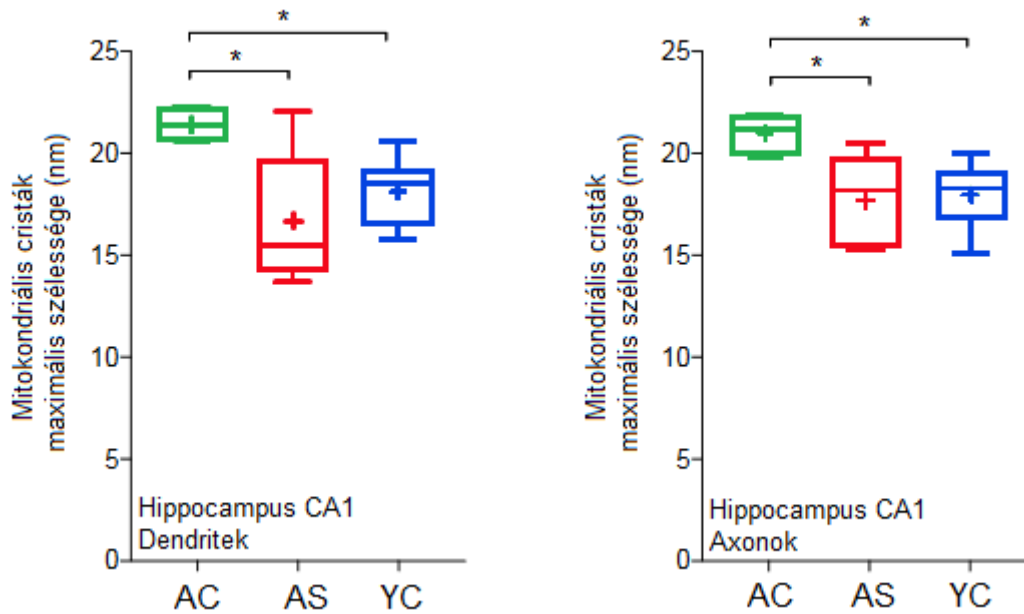
Mitokondriális cristák

A mitokondriumok belső membránja mélyen a mátrixba nyomulnak létrehozva ezzel a nagy felületű lemezes szerkezetet, a cristákat (12. ábra). Megmértük a cristák egymás mellett fekvő membránlemezei közötti távolságot, és azt találtuk, hogy az AC csoport egyedeiből származó metszeteken szignifikánsan eltér mind az AS, mind a YC állatokétól (AC–AS: $p < 0,1$; AC–YC: $p < 0,1$). Ez a különbség megfigyelhető mind az axonokban, amelyek a preszinaptikus, mind pedig a dendritekben, amelyek pedig a posztszinaptikus részét képezik a neuronok közötti kapcsolatoknak (13. ábra). A dendrittűskékben jellemzően

nem fordul elő mitokondrium. A cristák kitágulása az elektronmikroszkópos képeken jól megfigyelhető az AC csoport egyedeiben.



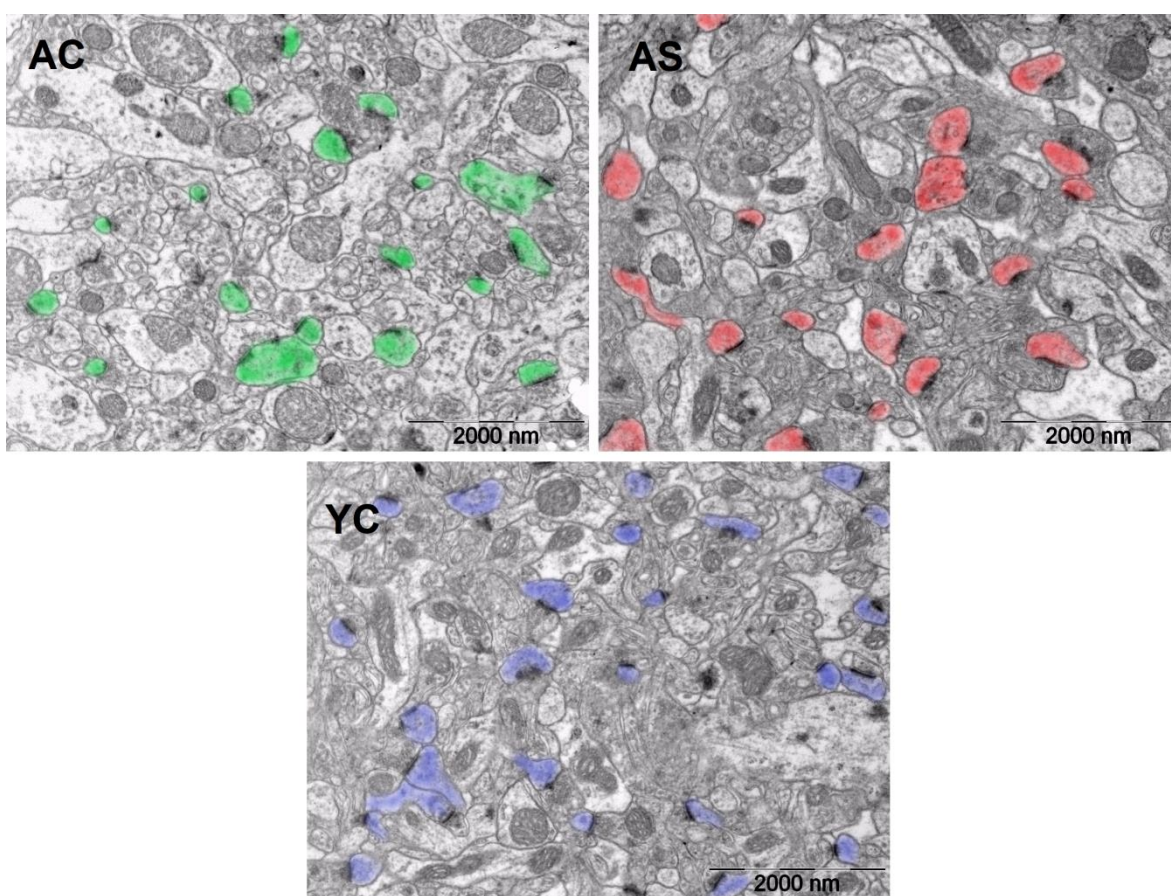
12. ábra: Mitokondriumok nagy nagyításban, megfigyelhetők a belső membrán alkotta cristák



13. ábra: A hippocampus CA1 régiójában a dendritek és axonok mitokondriumaiban a cristák maximális szélességének átlaga

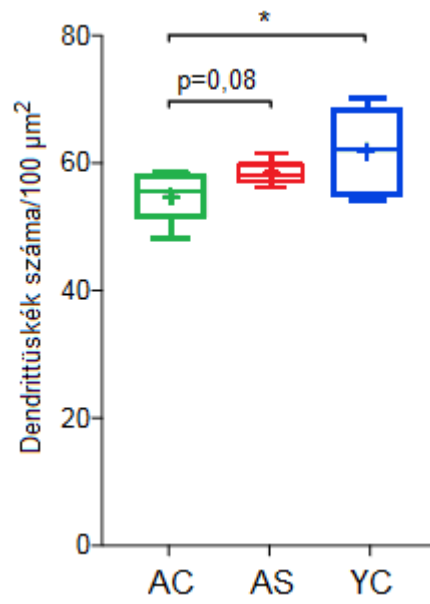
Szinapszisok száma

A szinapszisok számának vizsgálatához megszámoztuk a metszeten látható dendrittüskéket, amelyek egyértelműen beazonosítható módon részt vettek szinaptikus kapcsolat kialakításában és rendelkeztek posztzinaptikus denzitással (14. ábra). A kapott adatokat úgy elemeztük, hogy a metszetenként kapott számokat (dendrittüske/ $32,981 \mu\text{m}^2$) felszorzottuk és a statisztikai összehasonlításhoz a tüskék átlagos $100 \mu\text{m}^2$ -enkénti számát használtuk fel.



14. ábra: A posztzinaptikus neuronok dendrittüskéi színesen jelölve a három vizsgálati csoportból származó metszeten

A szinapszisok száma szignifikáns eltérést mutat az AC és a YC csoport egyedei között ($p < 0,01$). Nem mutatható ki azonban szignifikáns eltérés a spermidinnel kezelt és a kontroll idős állatok között (AC–AS: $p = 0,08$), azonban a trend figyelemre méltó (15. ábra).



15. ábra: Szinapszisok alkotásában résztvevő dendrittűskék sűrűsége a CA1 neuropiljében

Következtetések

Ultrastrukturális vizsgálataink alapján igazolni tudtuk a spermidin néhány hatását a hippocampus elektronmikroszkópos szerkezetére. A mitokondriumok által elfoglalt neutropil terület nem különbözik a vizsgálati csoportokban. Ebből arra következtetünk, hogy a PA-ok elsődleges hatása nem a mitokondriumok osztérfogatának szabályozása, hiszen ezt a paramétert nem befolyásolta szignifikánsan sem a táplálék eredetű SPD, sem pedig a korral előrehaladtával jelentkező endogén PA szintézis csökkenése.

A mitokondriumok átlagos területe szignifikáns eltérést mutatott az AC–AS és az AC–YC csoportok között, valamint nem különbözött az AS–YC egyedek között. A fiatal, és a spermidinnel hozzátáplált egerekben az azonos mitokondrium osztérfogatot átlagosan kisebb mitokondriumok hozták létre, mint az idős, kontroll egyedekben, így az előző csoportokban magasabb volt a mitokondriumok száma. Azokban az állatokban, amelyekben magas koncentrációban volt jelen a SPD (AS: exogén SPD és YC: endogén SPD), ott több, kisebb területű mitokondrium foglalt helyet az idegsejtekben, mint alacsony SPD koncentráció esetén. A PA-ok endogén szintézisének csökkenése tehát a mitokondriumok átlagos területének növekedését okozza, a táplálékkal bejuttatott SPD azonban képes a szervezet által termelt poliaminok elmaradt hatását kompenzálni, és az AS csoportban így szintén szignifikánsan, a fiatal állatokra is jellemző módon kisebb méretűek a CA1 mitokondriumai. Az idegszövet ultrastruktúrája a mitokondriumok denzitását tekintve idős, de spermidin kiegészítővel táplált egerekben hasonló marad a fiatalkori szerkezethez. A poliaminok hatása a mitokondriumok osztódására, és a hibás mitokondriumok autofágiájára tehát morfológiailag a fiatalkori ultrastruktúra fennmaradását okozza (Madeo és mtsai, 2018).

A mitokondriumok belső membránjának betűródéseiből létrejövő cristák működésbeli hatékonysága összefügg a szélességükkel: minél keskenyebb egy crista, annál hatékonyabb, illetve annál több cristának jut hely a mitokondriumban (Cogliati és mtsai, 2016). A kor előrehaladtával a mitokondriális cristák megszállásnak, méretük szignifikánsan eltér AC–YC között. A spermidin kiegészítővel etetett idős egerek cristáinak szerkezete azonban szintén szignifikánsan eltér az idős kontroll csoporttól, és hasonló fiatal egyedekéhez. A poliamin hozzátáplálás tehát a cristák fiatalkori

szerkezetének fenntartásával is hozzájárul idegszövet energiaellátottságának biztosításához.

A szinapszisok száma az öregedéssel párhuzamosan megfogyatkozott a vizsgált állatokban (AC–YC). Ennek oka a szinaptikus plaszticitás idős korban megmutatkozó csökkenése. Ennek egyik tényezője feltételezhetően szintén az endogén PA szintézis elégtelensége (Bhukel és mtsai, 2017). Nem sikerült azonban jelentős szignifikáns eltérést kimutatni az AC és az AS csoportok között ($p=0,08$), bár a P-érték egyértelmű trendre utal. Ez nem jelenti, hogy az exogén spermidin nem lenne hatással a szinaptikus plaszticitás megőrzésében, megfigyelhető ugyanis a trend, mely szerint a spermidin hozzátáplálással elérhető, hogy az egységnyi területen lévő szinaptikus dendrittüskék számának minimuma meghaladja a kontroll csoportban ennek a paraméternek a mediánját. Feltételezhető, hogy a tartós SPD kiegészítés a szinaptikus szerkezetre is jótékony hatással bír.

A mitokondriumok, mint az sejtszintű energiatermelés központjai, biztosítják az neuronok megfelelő működését, a szinapszisok, pedig az idegsejtek közötti kommunikációt. Az öregedés következtében ezen struktúrák számbeli és morfológiai anomáliái az idegszövet működésbeli visszaesését és következményesen a kognitív funkciók hanyatlását okozzák (López-Otín és mtsai, 2013). A spermidin jótékony hatást gyakorol a hippocampus ultrastruktúrájára a mitokondriumok és a szinapszisok tekintetében is.

Az csökkenő endogén szintézis mellett táplálékkal pótolta PA-ok a hippocampusban képesek elősegíteni a fiatalkori idegszövet- és neuropil-szerkezetre hasonló ultrastruktúra kialakulását idős egerekben, azonban adataink alapján nem okoznak a fiatalkorival megegyező, vagy annál jobb teljesítményre képes szerkezet kialakulását (a mitokondriumok összterfoglata nem lesz több spermidin hozzátáplálás esetén sem).

A spermidin hatását számos tanulmány, és saját méréseink is igazolják rágcsálófajokon. Az eredmények azonban extrapolálhatók a többi emlősre, ill. emberekre is, amit klinikai vizsgálatok is igazoltak, és ezek továbbra is folytatódnak (Schwarz és mtsai, 2018) (Wirth és mtsai, 2018) (Wirth és mtsai, 2019). Ezek a kutatások bizonyították, hogy az időskori kognitív hanyatlás és memóriazavar mérsékelhető a poliaminok

pótlásával. A mi vizsgálatunk az ennek a folyamatnak a háttérében álló sejtszintű morfológiai magyarázatot kereste.

A kutatás során nyert adatokra, és a rendelkezésre álló szakirodalomra támaszkodva javasolható a magas spermidintartalmú táplálék fogyasztása, és szükséges lenne ennek a megközelítésnek az integrálása az emberi, ill. állati egészséges táplálkozásról alkotott véleményébe.

A spermidin kiegészítővel táplált modellállatokat a jövőben érdemes lenne vizsgálni abból a szempontból, hogy a poliamin kiegészítés más szerveinek, például a máj mitokondriumainak fenntartásával kifejthet-e kedvező hatást az általános anyagcserére. Emellett a kognitív funkciók tekintetében Alzheimer-kór modellként szolgáló állatok spermidinnel történő hozzátáplálás követő post mortem szövettani vizsgálatokkal megfigyelhetnénk, hogy a poliaminok milyen hatással vannak a már kialakult, súlyosabb neurológiai kórképek kezelésében, és alkalmasak-e terápiás szerként való használatra.

Összefoglaló

A modern orvostudomány tevékenységének hála a civilizált világban szignifikánsan nő az átlagéletkor, azonban a tanulás- és memóriefunkciók zavara negatív tényezőként jelentkezik az időskori tünetek között. Az életkor előrehaladtával szinte minden élőlényben csökkennek a kognitív funkciók, melynek egyik feltételezhető oka az idegrendszerben is jelenlévő endogén poliaminok szintjének csökkenése. A spermidin – a szervezetben természetesen jelenlévő poliamin – táplálék általi pótlása ígéretes eredményeket mutat az időskori demencia enyhítésében. A bélcsatornából felszívódva a spermidin átjut a vér–agy gáton, és a központi idegrendszerben fejti ki neuroprotektív hatásait. Kutatásunkban fiatal, idős és idős, de spermidin kiegészítéssel táplált egerek hippocampus CA1 régió neuropiljének ultrastruktúráját vizsgáltuk kvantitatív transzmissziós elektronmikroszkópiával. Ez az agyterület kiemelkedően fontos a kognitív, tanulási és memóriefunkciók kialakításában. Vizsgálataink során a három vizsgált csoportban a neuropilben található mitokondriumok sűrűségére, alakjára, méretére is fókuszáltunk. Megállapítottuk, hogy a spermidin kiegészítés jótékonyan befolyásolta a szinapszisok jellemzőin túl a hippocampusbeli mitokondriumok denzitását, mely az öregedés során a kontroll állatokban jelentősen lecsökken. Adataink alapján arra következtetünk, hogy a spermidin terápia alkalmazható az életkorfüggő kognitív hanyatlás lassítására.

Abstract

Due to the recent advance in modern medicine, the average age of the human population has increased significantly, however, learning and cognitive disabilities are common negative factors among symptoms in the aged population. One pivotal factor in the obvious decline in cognitive function during aging is presumed to be the reduced synthesis of endogenous polyamines in the nervous system. The production of spermidine – an aliphatic polyamine – is also being reduced during aging, but its exogenous administration by food seems to be effective in relieving multiple signs of dementia. After absorption, spermidine can pass the blood–brain barrier and exert its neuroprotective effects. In this study we used quantitative transmission electron-microscopy of the hippocampal region of mice divided into three groups: young, old-aged and old spermidine supplemented. The hippocampus plays an essential role in many aspects of cognitive functions, including learning and memory. Besides analyzing the synaptic neuropil, we also focused on the density, shape and size of mitochondria in the neuropil, and compared the three groups. We found that spermidine helped to restore synaptic features in aged animals, and also the number of mitochondria, which was significantly decreased in old animals, compared to young ones. Taken together our result strongly suggest, that supplementation can be effectively used to slow cognitive decline caused by aging.

Irodalomjegyzék

Bartsch, T., & Wulff, P. (2015) The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.084>

Basu Roy, U. K., Rial, N. S., Kachel, K. L., & Gerner, E. W. (2008) Activated K-RAS Increases Polyamine Uptake in Human Colon Cancer Cells Through Modulation of Caveolar Endocytosis. *Molecular carcinogenesis*, 47(7), 538–553. <https://doi.org/10.1002/mc.20414>

Bhukel, A., Madeo, F., Sigrist, S. J. (2017) Spermidine Boosts Autophagy to Protect from Synapse Aging. *Autophagy* 13 (2) 444–45. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1265193>

Bratic, A., & Larsson, N.-G. (2013) The role of mitochondria in aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 951–957. <https://doi.org/10.1172/JCI64125>

Cogliati, S., Enriquez J. A., és Luca Scorrano L. (2016) Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 41 (3) 261–73. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>

Dorszewska, J. (2013) Cell biology of normal brain aging: Synaptic plasticity-cell death. *Aging clinical and experimental research*, 25, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s40520-013-0004-2>

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Madeo, F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>

Feng, Z., Lin, M., & Wu, R. (2011) The Regulation of Aging and Longevity. *Genes & Cancer*, 2(4), 443–452. <https://doi.org/10.1177/1947601911410223>

Fotuhi, M., Do, D., & Jack, C. (2012) Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature Reviews. Neurology*, 8(4), 189–202. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.27>

Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018) Inflammaging: A new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature Reviews. Endocrinology*, 14(10), 576–590. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>

Grumati, P., & Dikic, I. (2018) Ubiquitin signaling and autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(15), 5404–5413. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000117>

Gupta, V. K., Scheunemann, L., Eisenberg, T., Mertel, S., Bhukel, A., Koemans, T. S., Kramer, J. M., Liu, K. S. Y., Schroeder, S., Stunnenberg, H. G., Sinner, F., Magnes, C., Pieber, T. R., Dipt, S., Fiala, A., Schenck, A., Schwaerzel, M., Madeo, F., & Sigrist, S. J. (2013) Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nature Neuroscience*, 16(10), 1453–1460. <https://doi.org/10.1038/nn.3512>

Hatanpää, K., Isaacs, K. R., Shirao, T., Brady, D. R., & Rapoport, S. I. (1999) Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(6), 637–643. <https://doi.org/10.1097/00005072-199906000-00008>

Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, és Marco Demaria. „Hallmarks of Cellular Senescence”. *Trends in Cell Biology* 28, sz. 6 (2018) 436–53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

Iacomino, G., Picariello, G., & D’Agostino, L. (2012) DNA and nuclear aggregates of polyamines. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1823(10), 1745–1755. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.033>

Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010) Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>

Kalac, P. (2009) Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, 7. <https://doi.org/10.32725/jab.2009.007>

Knierim, J. J. (2015) The hippocampus. *Current Biology: CB*, 25(23), R1116–1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>

Levy, M., Faas, G. C., Saggau, P., Craigen, W. J., & Sweatt, J. D. (2003) Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17727–17734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212878200>

Lister, J. P., & Barnes, C. A. (2009) Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Archives of Neurology*, 66(7), 829–833. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.125>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J. M. P., Madeo, F., & Kroemer, G. (2016) Metabolic Control of Longevity. *Cell*, 166(4), 802–821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031>

Madeo, F., Bauer, M. A., Carmona-Gutierrez, D., & Kroemer, G. (2018) Spermidine: A physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? *Autophagy*, *15*(1), 165–168. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1530929>

Madeo, F., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., & Kroemer, G. (2010) Spermidine: A novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy*, *6*(1), 160–162. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10600>

Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F., & Kroemer, G. (2018) Spermidine in health and disease. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6374). <https://doi.org/10.1126/science.aan2788>

Madeo, F., Hofer, S. J., Pendl, T., Bauer, M. A., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., & Kroemer, G. (2020) Nutritional Aspects of Spermidine. *Annual Review of Nutrition*, *40*, 135–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-120419-015419>

Maglione, M., Kochlamazashvili, G., Eisenberg, T., Rácz, B., Michael, E., Toppe, D., Stumpf, A., Wirth, A., Zeug, A., Müller, F. E., Moreno-Velasquez, L., Sammons, R. P., Hofer, S. J., Madeo, F., Maritzen, T., Maier, N., Ponimaskin, E., Schmitz, D., Haucke, V., & Sigrist, S. J. (2019) Spermidine protects from age-related synaptic alterations at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Scientific Reports*, *9*(1), 19616. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56133-3>

Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011) Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*, *3*(8), 716–732.

Mutalik, P. „Hippocampus as an Echo State Network”, 2018 <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18553.72807>

Muriel Deutsch Lezak, Diane B. Howieson, Erin D. Bigler, & Daniel Tranel. (2012) *Neuropsychological Assessment*.

Murman, D. L. (2015) The Impact of Age on Cognition. *Seminars in Hearing*, *36*(3), 111–121. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1555115>

Olesen, M. A., Torres, A. K., Jara, C., Murphy, M. P., & Tapia-Rojas, C. (2020) Premature synaptic mitochondrial dysfunction in the hippocampus during aging contributes to memory loss. *Redox Biology*, *34*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101558>

Ott, C., König, J., Höhn, A., Jung, T., & Grune, T. (2016) Macroautophagy is impaired in old murine brain tissue as well as in senescent human fibroblasts. *Redox Biology*, *10*, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.015>

Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2012) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Frontiers in Genetics*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00297>

Pegg, A. E., Lockwood, D. H., & Williams-Ashman, H. G. (1970) Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymic synthesis during androgen-induced prostatic growth. *The Biochemical Journal*, *117*(1), 17–31. <https://doi.org/10.1042/bj1170017>

Pegg, Anthony E. (2016) Functions of Polyamines in Mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14904–14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>

Picard, M., & McEwen, B. (2013) Mitochondria impact brain function and cognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321881111>

Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D. P., Baracco, E. E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Senovilla, L., Marino, G., Aranda, F., Durand, S., Sica, V., Chery, A., Lachkar, S., Sigl, V., Bloy, N., Kroemer, G. (2016) Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell*, 30(1), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.016>

RÁCZ B. (2014) Az agy mikroanatómiája. *Élet és tudomány*, 39, 1225–1227.

Ramos-Molina, B., Queipo-Ortuño, M. I., Lambertos, A., Tinahones, F. J., & Peñafiel, R. (2019) Dietary and Gut Microbiota Polyamines in Obesity- and Age-Related Diseases. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00024>

Roser, M., Ortiz-Ospina, E., & Ritchie, H. (2013) Life Expectancy. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/life-expectancy>

Shin, W. W., Fong, W. F., Pang, S. F., & Wong, P. C. (1985) Limited blood-brain barrier transport of polyamines. *Journal of Neurochemistry*, 44(4), 1056–1059. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb08724.x>

Schwarz, C., Stekovic, S., Wirth, M., Benson, G., Royer, P., Sigrist, S. J., Pieber, T., Dammbroek, C., Magnes, C., Eisenberg, T., Pendl, T., Bohlken, J., Köbe, T., Madeo, F., & Flöel, A. (2018) Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. *Aging*, 10(1), 19–33. <https://doi.org/10.18632/aging.101354>

Wang, K., & Klionsky, D. J. (2011) Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*, 7(3), 297–300. <https://doi.org/10.4161/auto.7.3.14502>

Wirth, M., Benson, G., Schwarz, C., Köbe, T., Grittner, U., Schmitz, D., Sigrist, S. J., Bohlken, J., Stekovic, S., Madeo, F., & Flöel, A. (2018) The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: A randomized controlled trial. *Cortex; a Journal Devoted to the Study of the Nervous System and Behavior*, 109, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2018.09.014>

Wirth, M., Schwarz, C., Benson, G., Horn, N., Buchert, R., Lange, C., Köbe, T., Hetzer, S., Maglione, M., Michael, E., Märschenz, S., Mai, K., Kopp, U., Schmitz, D., Grittner, U., Sigrist, S. J., Stekovic, S., Madeo, F., & Flöel, A. (2019) Effects of spermidine

supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge)-study protocol for a randomized controlled trial. *Alzheimer's Research & Therapy*, 11(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0484-1>

Wunderlich L., Szarka A. (2014) *A biokémia alapjai*. Budapest, Typotex Kiadó. p. 30.

Yassa, M. A., & Stark, C. E. L. (2011) Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences*, 34(10), 515–525. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.006>

Youle, R. J., & Narendra, D. P. (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>

Zhang, H., Wang, J., Li, L., Chai, N., Chen, Y., Wu, F., Zhang, W., Wang, L., Shi, S., Zhang, L., Bian, S., Xu, C., Tian, Y., & Zhao, Y. (2017) Spermine and spermidine reversed age-related cardiac deterioration in rats. *Oncotarget*, 8(39), 64793–64808. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18334>

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Rácz Bencének a folyamatos szakmai és emberi támogatásért, amit a vizsgálatok elvégzése és a dolgozat megírása közben nyújtott!

Köszönet illeti Magyar Tünde és Pop Renáta asszisztenseket a laboratóriumban nyújtott segítségükért, a feldolgozandó anyag precíz előkészítésért, illetve az ÁTE Anatómiai és Szövetani, valamint Patológiai Tanszékét, amiért az elektronmikroszkópos laboratóriumban helyet biztosítottak a vizsgálati felvételek elkészítéséhez. Köszönöm Prof. Dr. Sótonyi Péter tanszékvezető úrnak, hogy lehetőséget adott a kutatómunka kivitelezésére. Köszönöm Giuseppe Mark Marcellónak, hogy felhasználhattam az általa készített elektronmikroszkópos felvételeket is.

Szeretném megköszönni Frank Madeónak, Tobias Eisenbergnek és Sebastian Hofernek, a grazi egyetem kutatóinak, hogy rendelkezésünkre bocsátották az elektronmikroszkópos adatgyűjtésre szánt vizsgálati anyagot.

Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti a családomat és a barátaimat, akik a háttérből végig támogattak.

JELENTŐ TDK DOLGOZATBAN BEMUTATOTT EREDMÉNYEK AZ **EFOP-3.6.2-16-2017-00012** „FUNKCIONÁLIS, EGÉSZSÉGES ÉS BIZTONSÁGOS ÉLELMISZER TERMÉKPÁLYA MODELL KIDOLGOZÁSA A SZÁNTÓFÖLDTŐL AZ ASZTALIG ELV ALAPJÁN, TEMATIKUS KUTATÁSI HÁLÓZATBAN” PÁLYÁZAT TÁMOGATÁSÁVAL VALÓSULT MEG, TOVÁBBÁ „AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM **ÚNKP-20-2** KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.”



NYILATKOZAT

Alulírott Juhász Péter nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe
"A spermidin hatása az öregedő"
hippocampusra tartalmi és formai
szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2020 évi TDK konferencián
szerepelt dolgozatommal.

Budapest, ~~201~~ 2023. 11. 07.

Juhász Péter

a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Juhász Péter
 Neptun-kódja: WIR927
 A témavezető neve és beosztása: Dr. Rácz Bence, egyetemi tanár
 Tanszék: Anatómiai és Szövetteni Tanszék
 A diplomadolgozat címe: A spermidin hatása az öregedő hippocampusra

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	02.	14.	A hippocampus anatómiája	
2.	2023.	02.	28.	Poliaminok	
3.	2023.	04.	04.	szabadalmi keresés	
4.	2023.	04.	18.	szabadalmi keresés	
5.	2023.	04.	25.	az irodalmi áttekintés javítása	

Érdemjegy az első félév végén: jeles (5)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023.	09.	05.	Statisztika, online	
2.	2023.	09.	12.	Statisztika, online	
3.	2023.	09.	19.	A dolgozat szövegének véglegesítése	
4.	2023.	09.	26.	bemutató készítése	
5.	2023.	10.	19.	a diplomadolgozat bemutatása	

Érdemjegy a második félév végén: jeles (5)



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Juhász Péter*



témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *K. J.* Átvétel dátuma: *2023. 11. 07.*