

A több évtizedes testedzés hatására végbemenő epigenetikai változások vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Aczél Dóra Tímea

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem
Sporttudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Radák Zsolt, egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Sydó Nóra, egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Atlasz Tamás, egyetemi docens, PhD

Budapest

2024

Tartalom

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Az öregedés.....	9
1.1.1. Az öregedés jelátvittele.....	10
1.2. Az évtizedeken át tartó testedzés szerepe az öregedésben.....	15
1.2.1. „Az öregedő telomerek”	16
1.2.2. A rendszeres testedzés hatása a telomerek hosszára	17
1.3. Az epigenetika	18
1.3.1. A DNS – metiláció	19
1.3.2. Epigenetikai változások tumoros megbetegedésekben, öregedésben.....	21
1.3.3. Az epigenetikai órák	23
2. Célkitűzések és hipotézisek.....	27
3. Anyag és módszer	29
3.1. Kutatásban részt vevő személyek	29
3.2. Antropometriai, terhelésélettani és kognitív vizsgálatok.....	30
3.3. Vérmintavétel, hematológia és biokémiai vizsgálatok	31
3.4. DNS izolálás	32
3.5. Metilációs vizsgálatok	32
3.5.1. A KL promóter régió metilációs vizsgálata.....	33
3.5.2. Az epigenetikai életkor kiszámítása	34
3.6. A sKL fehérje plazmaszintjének meghatározása	34
3.7. Telomerhossz-meghatározás.....	35
3.7.1. A RT-PCR alapú telomerhossz-meghatározás	35
3.7.2. A telomer hosszának becslése	36
3.8. A redox homeosztázis meghatározása	36
3.9. Statisztikai analízis	36
4. Eredmények.....	37
4.1. A sKL szint vizsgálata master sportolóknál.....	38
4.2. Szenior korú sportolók mért és becsült telomerhosszának vizsgálata	46
5. Diskusszió.....	57
6. Következtetések	64
7. Összefoglalás.....	66
8. Summary	68
9. Irodalomjegyzék.....	69

10.	Saját publikáció jegyzéke	94
11.	Köszönetnyilvánítás	97

Rövidítésjegyzék

5mc	5-metil-citozin
5-hmC	5-hidroximetilcitozin
AgeAccelGrim	DNAmGrimAge akcelerációja
AgeAccelPheno	DNAmPhenoAge akcelerációja
AMP	adenozin-monofoszfát
APP	β -amyloid prekursor fehérje
ATP	adenozin-trifoszfát
BAP	biológiai antioxidáns erő
CAT	szérum szeparátor alvadás aktivátor
CH ₃	metilcsoport
CpG	citozin guanin dinukleotid
DNAmGrimAge	DNA methylation GrimAge
DNAmPhenoAge	DNA methylation PhenoAge
DNAmTL	DNS-metiláció alapján becsült telomer hossz
DNMT	DNS-metiltranszferáz
d-Roms	reaktív oxigén metabolitok
ELISA	enzimhez kötött immunoszorbens próba
MF	master sportoló férfi
MN	master sportoló nő
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FGF23	fibroblaszt növekedési faktor 23
FGFR	fibroblaszt növekedési faktor receptor

FGFR1/2	fibroblaszt növekedési faktor receptor 1/2
FOXO	“forkhead” típusú transzkripciós faktor
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
IGF-1	inzulin szerű növekedési faktor -1
KF	kontroll férfi
KL	Klotho
KN	kontroll nő
KO	kiütött/hiányzó
ln sKL	a sKL természetes alapú logaritmus
mTOR	emlős sejtekben jelen lévő rapamycin célpontja
qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció
ROMK1	vese külső medulláris kálium csatorna 1
ROS	reaktív oxigén származékok
SCR	egykópiás referencia
SESN2	sestrin2
sKL	szekretált KL
TF	transzkripciós faktorok
tKL	transzmembrán KL
TL	mért telomerhossz
TRPV5	kation csatorna 5-ös alocsaládjának tagja
UCarr	Carratelli-egység
VO ₂ max	maximális oxigénfelvétel

Ábrajegyzék

1. ábra: A tKL lokalizációja a plazmamembránban, valamint a sKL sematikus ábrája a hasítás pillanatában (saját ábra)	13
2. ábra: A gén promóter szakaszának metilációja és annak hatása a génexpresszióra (saját ábra)	21
3. ábra: A KL promóter régiója; (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079856.g001)	34
4. ábra: A: A sKL fehérje és az életkor kapcsolata az evezős Master Világbajnokságon résztvevők és a kontroll csoport egyesített mintájában B: A sKL fehérje és az életkor kapcsolata az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban.....	39
5. ábra: A: A férfiak és a nők átlagos sKL szintjeinek összehasonlítása az evezős Master Világbajnokság résztvevői és a kontroll csoport egyesített mintájában B: A master sportoló és kontroll csoport sKL szintjeinek összehasonlítása férfiak esetében C: A master sportoló és kontroll csoport sKL szintjeinek összehasonlítása nők esetében	40
6. ábra: A: A sKL fehérje és a DNAmPhenoAge akcelerációja közötti kapcsolat az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban B: A sKL fehérje és a DNAmPhenoAge akcelerációjának kapcsolata a kontroll csoport mintáiban.....	42
7. ábra: A: A sKL fehérje és a DNAmGrimAge kapcsolata az evezős Master Világbajnokság résztvevőinek mintájában B: A sKL fehérje és a DNAmGrimAge kapcsolata a kontroll csoport mintájában	43
8. ábra: A: A sKL fehérje és a redox egyensúly közötti korreláció az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban B: A sKL fehérje és a redox egyensúly kapcsolata a kontroll csoport mintáiban.....	44
9. ábra: A: A sKL fehérje és H ₂ O ₂ közötti korreláció az evezős Master Világbajnokság résztvevői, valamint a kontroll csoport egyesített mintájában B: A sKL fehérje és a H ₂ O ₂ kapcsolata a kontroll csoport mintáiban	45
10. ábra: A TL és az DNAmTL kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és kontroll csoport egyesített mintájában.....	47

11. ábra: A: A TL és az életkor kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és kontroll csoport egyesített mintájában	
B: A TL és az életkor kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
C: A TL és az életkor kapcsolata a kontroll csoport mintáiban	48
12. ábra: A: A DNAmTL és az életkor kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és a kontroll csoport egyesített mintájában	
B: A DNAmTL és az életkor kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
C: A DNAmTL és az életkor kapcsolata a kontroll csoport mintáiban	49
13. ábra: Férfiak és nők TL-ainak összehasonlítása.....	50
14. ábra: Férfiak és nők DNAmTL-ainak összehasonlítása.....	50
15. ábra: A: A DNAmTL és a VO ₂ max kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
B: A DNAmTL és a VO ₂ max kapcsolata a kontroll csoport mintáiban.....	53
16. ábra: A: A TL és a DNAmPhenoAge kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
B: A TL és a DNAmPhenoAge kapcsolata a kontroll csoport mintáiban.....	54
17. ábra: A: A TL és a DNAmGrimAge kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
B: A TL és a DNAmGrimAge kapcsolata a kontroll csoport mintáiban	54
18. ábra: A: A TL és a redox háztartás kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
B: A TL és a redox háztartás kapcsolata a kontroll csoport mintáiban.....	56
19. ábra: A: A TL és a H ₂ O ₂ kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban	
B: A TL és a H ₂ O ₂ vizsgálata a kontroll csoport mintáiban	56
20. ábra: A KL gén metilációjának, valamint a sKL fehérje szintjének általunk feltárt kapcsolatai (saját ábra).....	57
21. ábra: Szenior sportolók és a kontroll csoport telomer hosszainak általunk feltárt kapcsolatai (saját ábra).....	58

Táblázatok jegyzéke

<i>1. táblázat: A vizsgálatban részt vevő személyek nemek szerinti felosztása, valamint átlag életkoraik±szórás.....</i>	<i>30</i>
<i>2. táblázat: A vizsgálat alanyainak tulajdonságai a sKL mérésnél.....</i>	<i>37</i>
<i>3. táblázat: Az antropometriai, terhelés és kognitív adatok kapcsolatai a sKL szinttel..</i>	<i>41</i>
<i>4. táblázat: A vizsgálat alanyainak tulajdonságai a telomer hossz mérésnél</i>	<i>46</i>
<i>5. táblázat: A master sportoló és kontroll csoportok telomer hosszainak nemenkénti összehasonlítása</i>	<i>51</i>
<i>6. táblázat: A becsült telomerhosszak, valamint az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok kapcsolatai.....</i>	<i>52</i>
<i>7. táblázat: Az epigenetikai órák és a DNAmTL kapcsolatai.....</i>	<i>55</i>

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

1.1. Az öregedés

Az öregedés egy természetes és automatikus biológiai folyamat, az élet elkerülhetetlen következménye. Az öregedő szervezetet, a szövetek és szervek funkcióinak fokozatos hanyatlása, romló életminőség és a halálozási kockázat növekedése jellemzi. Napjainkban, köszönhetően a jobb életkörülményeknek és a javuló egészségügyi ellátásnak, a születéskor várható átlagéletkor drámaian kitolódik, és így nő az idősök aránya a populációban.

Az öregedés, mindamelllett, hogy általános érvényű, jelentős egyedi sajátosságokat mutat. Az egyéni különbségekhez a genetikai tényezők mellett, az életmódbeli eltérések járulhatnak hozzá jelentős mértékben. Életünk során különböző külső és belső hatások érik a szervezetünket, amelyek mutációk formájában halmozódhatnak fel, és hagyhatnak nyomot a DNS-ünkben. Az öregedés hatással van a génexpresszióra, még hozzá oly módon, hogy amikor a genetikai anyag öregedése elér egy bizonyos küszöbértéket, a génexpresszió leáll. Ezek a károsodások összességében egyre inkább hátráltatják az egészséges működést, tumoros-, szív- és érrendszeri- valamint, neurodegeneratív megbetegedések kialakulásához, majd végső soron halálhoz vezethetnek.

Felmerül tehát a kérdés, hogy az öregedés behatóbb ismerete révén befolyásolható-e a folyamat? A legújabb kutatások azt sugallják, hogy az öregedés lassítható vagy akár vissza is fordítható a génaktivitás megváltoztatásával (*Karagiannis és mtsai 2019; Gähwiler és mtsai 2021*). Ehhez azonban pontosabban meg kell ismernünk az öregedési folyamatok kulcsszereplőit.

Az öregedési vizsgálatokra rövid élettartamuk miatt különösen alkalmasak az élesztők (*Kaeberlein és mtsai 2007*), a férgek/*Caenorhabditis elegans*-ok (*Tissenbaum 2012*), illetve a legyek/*Drosophilák* (*Brandt és Vilcinskas 2013*). Továbbá, az emberhez genetikailag közelebb álló gerinces modelleket, például egereket (*Quarrie és Riabowol 2004*), illetve afrikai türkiz vágóhalakat (*Harel és Brunet 2015*) is sikeresen alkalmaztak

öregedési vizsgálatokban. A fent említett fajokon végzett kísérletek nagymértékben hozzájárultak a terület pontosabb megértéséhez, mindazonáltal nem tudják teljes mértékben reprezentálni az emberi öregedés összetett természetét, és nem bizonyultak maradéktalanul hatásosnak az életkorral összefüggő betegségek feltárásában sem. Így az érdeklődés fokozatosan fordult a humán öregedési vizsgálatok felé. Az emberi modelleken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy főként a genetikai különbségek, valamint az életünk során szerzett szomatikus mutációk állhatnak az eltérő öregedési folyamatok hátterében. Mindezek mellett, a „nem genetikai faktoroknak” is fontos szerepet tulajdoníthatunk, alátámasztva ezzel az „epi”-genetikai mechanizmusok jelentőségét a hosszú élettartam szabályozásában (*Cournil és Kirkwood 2001*). Ilyen „faktorok” például a kalóriamegvonás (*Bordone és Guarente 2005*), az alapanyagcsere sebességének csökkentése (*Ruggiero és mtsai 2008*), a fokozott oxidatív stressz válasz (*Migliaccio és mtsai 1999*), a mitonukleáris fehérjék egyensúlyának helyreállítása (*Houtkooper és mtsai 2013*). A fent említett faktorok mind-mind összefüggésben állhatnak az élettartam hosszabbodásával. További érdekesség, hogy nők esetében a kutatók szerint a szaporodás, a termékenység, az utódok száma kompromisszumot jelent a hosszú élet tekintetében (*Westendorp és Kirkwood 1998*).

1.1.1. Az öregedés jelátvitel

Az öregedés jelátvitel, ha úgy vesszük, egyben a hosszú életé is. Az úthoz kapcsolódó géneket öregedő („aging”) vagy hosszú élet („longevity”) géneknek is nevezzük. Ha az út hatékony működése megőrződik, vagy a hibák időben kiküszöbölésre kerülnek, úgy az öregedés, ha nem is teljesen elkerülhetővé, de késleltethetővé válik. Ehhez azonban behatóbban kell ismernünk az öregedés jelátvitelét, és annak korral történő változásait. Az útba csatlakozó jelátviteli utak együttes, összehangolt, megőrződött működése szükséges a hosszú élethez.

A „bemenő jelek” alapján megállapíthatjuk, hogy az öregedésre hatással lehetnek 1) különböző táplálkozási sajátosságok, 2) bizonyos hormonok, valamint 3) az oxidatív stressz is (*Greer és Brunet 2008*). A jelátviteli utak végén sokszor közös, végső

végrehajtók, a transzkripció faktorok (TF) találhatóak, amelyek génexpresszió megváltoztatásával befolyásolják a sejtek működését.

1.1.1.1. Hormonok az öregedés jelátvitelében

Az öregedés szerepet játszó hormonok közül kiemelten fontos szereppel bír az inzulin és a növekedési hormon. Mindkettő plazmamembránban lokalizált tirozinkináz receptorokon keresztül hat. Jelátviteli útjaik, az inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1, insulin-like growth factor 1) és a forkhead transcription factors of the O class (FOXO) TF-okon keresztül „találkoznak” (*Greer és Brunet 2008*). Fontos látni tehát, hogy a fokozott glükóz bevitel nem csupán megnövekedett inzulin választ vált ki, ami a 2-es típusú cukorbetegsége hajlamosít, hanem az öregedést is gyorsíthatja (*Brewer és mtsai 2016*). Alátámasztja ezt az a megfigyelés is, hogy az inzulin receptor mutációja, illetve az IGF-1 allél hiánya, meghosszabbodott élettartammal társul (*Blüher és mtsai 2003; Holzenberger és mtsai 2003*).

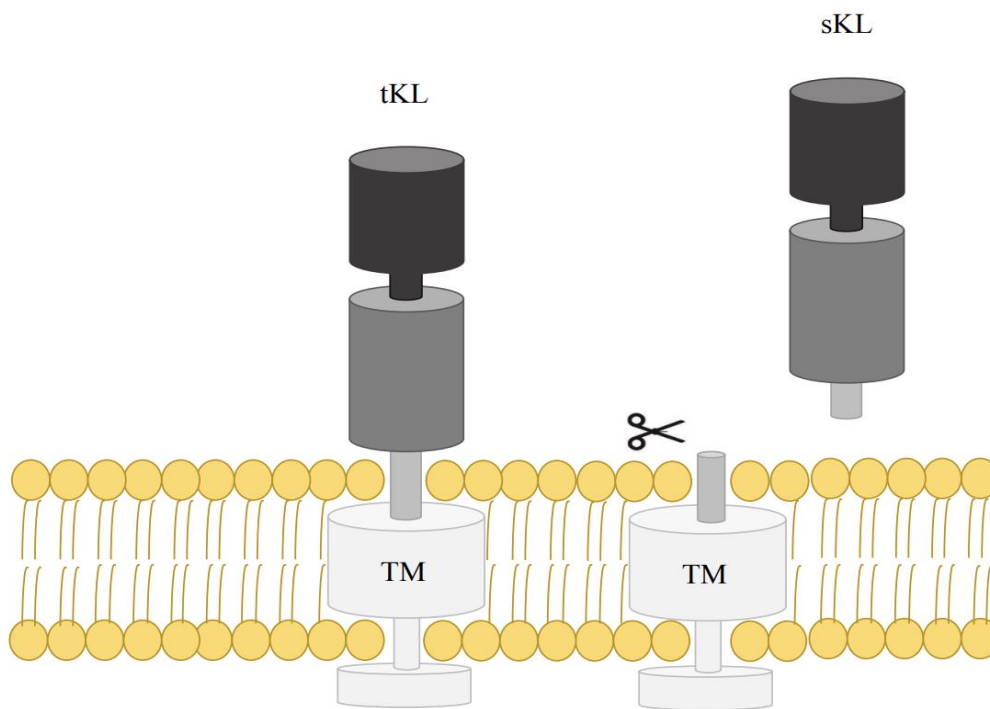
Az “örök fiatalság titka”:

Az öregedés jelátvitelére egy harmadik hormon is hatással van, ez pedig Klotho (KL). Neve, az élet fonalát fonó görög istennőtől, az egyik moirától jön, mivel az eddigi kutatások azt mutatják, hogy a fehérje az „örök fiatalság” őrzője lehet. A sKL fehérjét a hosszú élet jelentős biomarkereként tartják számon az irodalomban (*Kuro-o és mtsai 1997*). Negyven éves kor felett a KL fehérje mennyisége csökkenni kezd (*Yamazaki és mtsai 2010; Siahaniou és mtsai 2012*). Kuroso és mtsai a fehérje öregedésben betöltött szerepét vizsgálva megállapította, hogy a fehérje overexpressziója meghosszabbítja a kísérleti állatok élettartamát (*Kurosu és mtsai 2005*). Továbbá a kutatók úgy találták, hogy a KL mutációja egerekben és *Caenorhabditis elegans*-okban lerövidíti azok élettartamát (*Kuro-o és mtsai 1997; Château és mtsai 2010*). A KL hiányos egerekben 3-4 hetes korukig nem látható fenotípusos eltérés, viszont utána, az öreg állatokhoz hasonló képet mutatnak, valamint 8-9 hetes koruk körül elpusztulnak (*Kuro-o és mtsai 1997; Kuro-o 2008*). Emellett, kísérleti állatokban, a KL gén hiányához/alulaktivációjához társulva többféle rendellenességet is leírtak. Ilyenek a növekedési retardáció, a hypogonadotrop hypogonadizmus, a bőrsorvadás (*Kuro-o és mtsai 1997*), az osteopenia (*Kawaguchi és*

mtsai 1999), a kognitív károsodás (*Nagai és mtsai 2003*), és különböző hallásproblémák (*Kamemori és mtsai 2002*), amelyekről ismerjük, hogy emberi öregedés velejárói is egyben (*Kurosu és mtsai 2005; Kuro-o 2009*).

A KL gén emberben a 13-as kromoszómán található. A gén promóter régiója rendkívül gazdag CpG szigetekben (*Xu és Sun 2015*). Számos kutatócsoport beszámolt arról, hogy a promóter régió metilációs állapota összefügg a KL mRNS expressziójával (*Komaba és mtsai 2010; King és mtsai 2012; Azuma és mtsai 2012; Young és Wu 2012*). A kutatók szerint KL promóter régiója erős metilációs mintázattal bír számos tumor esetében, beleértve a méhnyak-, a vastag- és a végbélrákot, valamint a gyomor- és az emlőrákot (*Gan és mtsai 2011; Pan és mtsai 2011; Wang és mtsai 2011; Sun és mtsai 2012; Rubinek és mtsai 2012*).

A KL gén által kódolt egyik fehérjét, az α -KL-t (továbbiakban csak KL), legnagyobb mértékben a vesék és az agy plexus choroideus-ai állítják elő (*Kuro-o 1997*). A fehérje transzmembrán formájában (tKL) komplexet képez a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) receptorokkal, többek között obligát koreceptora a fibroblaszt növekedési faktor 23-nak (FGF23) (*Xu és Sun 2015*). A tKL továbbá, serkenti a foszfát kiválasztását a vizeletbe, valamint gátolja a D-vitamin képződését (*Torres 2007; Kuro-o 2009; Kuro-o 2010*) A KL- vagy FGF23-hiányos egerekben nemcsak foszfátretenciót, hanem idő előtti öregedési szindrómát is kimutattak, ami rávilágít egy lehetséges összefüggésre a foszfát metabolizmus és az öregedés között (*Kuro-o és mtsai 1997*). A tKL extracelluláris doménjét membránhoz kötött proteázok hasítják. Először szolubilis, majd egy szignál peptid ráhelyezése után, szekretált KL (sKL) keletkezik, ami a vérbe, a vizeletbe, valamint a cerebrospinalis folyadékba választódik ki (*Kuro-o és mtsai 1997; Shiraki-Iida és mtsai 1998; Matsumura és mtsai 1998; Imura és mtsai 2004*) (1. ábra).



1. ábra

A tKL lokalizációja a plazmamembránban, valamint a sKL sematikus ábrája a hasítás pillanatában (saját ábra)

A sKL keringő hormonként funkcionál, eljut azokba a szövetekben, szervekben, amelyek nem expresszálják a fehérjét (Kurosu és mtsai 2005; Wang és Sun 2009). A sKL számos sejtfelszínen lévő receptort és ioncsatornát szabályoz, mint amilyen például, a kation csatorna TRPV5 („cation channel subfamily V member 5”) vagy a ROMK1 („renal outer medullary potassium channel 1”) (Shiraki-Iida és mtsai 1998; Chang és mtsai 2005). A sKL, a transzmembrán formához hasonlóan, szintén hatással van a kalcium- és foszfát-anyagcserére (Cha és mtsai 2009; Hu és mtsai 2010), emellett jótékony hatással van a gyulladásozó folyamatokra (Kim és mtsai 2015). Számos kutatás igazolja, hogy a KL részt vesz az oxidatív stressz elleni védelemben is (Mitobe és mtsai 2005; Yamamoto és mtsai 2005; Zuo és mtsai 2008). Ismerjük például, hogy a KL overexpressziója csökkenti a hidrogén-peroxid (H₂O₂) által kiváltott apoptózist, a mitokondriális DNS-fragmentációt, a lipidperoxidációt és a Bax fehérje expresszióját (Wang és mtsai 2012).

A KL termelődését számos kórállapot befolyásolja. Több kutatócsoport is csökkent KL fehérjeszintet határozott meg a hipertónia kialakulásával összhangban (Wang Y és Sun

2009; Wang HL és mtsai 2010; Zhou és mtsai 2015). A KL szint csökkenése jelentős lehet krónikus veseelégtelenség esetén is (Sugiura és mtsai 2012; Shimamura és mtsai 2012; Koh és mtsai 2001). A sKL emellett gátolja az inzulin/IGF-1 jelátviteli utat (Wolf és mtsai 2008), kapcsolatba kerülve így a cukoranyagcserével is (Chen és mtsai 2007; Devaraj és mtsai 2012; Lin és Sun 2014). Érdekes továbbá, hogy az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó APP („ β -amyloid precursor protein”, az A β plakkl előalakja) gátolja a KL expresszióját (Li és mtsai 2010). A sKL tumorszuppresszorként is működhet, így epigenetikai csendesítése, rosszindulatú daganatok kialakulását idézheti elő (Lee és mtsai 2010). Továbbá ismerjük, hogy a KL biomarkerként alkalmazható szív- és érrendszeri megbetegedések esetén is (Chen és mtsai 2018; Amaro-Gahete és mtsai 2020). A KL overexpressziója nem csak az élettartamot képes meghosszabbítani 20-30%-kal (Kurosu és mtsai 2005), hanem elősegíti a kardiovaszkuláris rendszer védelmét, mégpedig az endothelialis diszfunkció javításával, a vérnyomás, a szív fibrózis és az artériás merevség csökkentésével (Richter és mtsai 2016; Lin és mtsai 2016; Chen 2020; Takenaka és mtsai 2021).

Adódik tehát a kérdés, hogy a KL szintjének állandóan tartása, vagy a fehérje visszapótlása, elősegítheti az egészségesebb öregedést és kedvező hatással lehet a betegségek megelőzésében egyaránt? Bár a KL pontos szerepe az “öregség fenotípus” kialakulásának gátlásában még nem ismert, úgy tűnik, hogy a kor előrehaladtával a KL gén metilációja változik, ami hatással lehet a fehérje expressziójára (King és mtsai 2012). Az életkor mellett az akut és a rendszeres testmozgás is megváltoztathatja a keringő hormon szintjét (Mostafidi és mtsai 2016; Iturriaga és mtsai 2021, Aczel és mtsai 2023).

1.1.1.2. Oxidatív stressz jelátviteli út

A bevitt tápanyag a biológiai oxidáció során alakul át a sejt számára hasznosítható energiává, vagyis ATP-vé, amelynek terminális lépése a mitokondriumokban zajlik. Ezek az organellek központi szerepet játszanak az öregedésben (Wallace 2005). A mitokondriumok alulműködése különböző anyagcsere és neurodegeneratív betegségeket eredményezhet, az öregedéshez hasonlóan (Druzhyňa és mtsai 2008). Amennyiben, a mitokondriumban zajló oxidációs reakciók károsodást szenvednek (lsd. öregedés), úgy

nem csak az energiatermelés csökken, hanem a folyamat melléktermékeként, reaktív oxigén származékok (ROS) szaporodnak fel (*Fakouri és mtsai 2019*). A felszabaduló szabadgyököket a redox háztartás enzimeit eliminálják, amelyek megfelelő működése tehát elengedhetetlen az egészséges öregedéshez, és így a hosszú élethez (*Sampayo és mtsai 2003*). Ha a háztartás egyensúlya megborul, a feleslegben lévő szabadgyökök természetes affinitásuk miatt, spontán reakcióba lépnek bizonyos molekulákkal, köztük a DNS bázisaival is.

1.2. Az évtizedeken át tartó testedzés szerepe az öregedésben

Régóta ismert a rendszeresen végzett fizikai aktivitás kiemelten fontos szerepe abban, hogy jó egészségünket és magas életminőségünket minél hosszabb tudjuk megtartani. Az autók és a tömegközlekedés megjelenésével, a kommunikáció leegyszerűsödésével, az ülő, és a túlterhelt, stresszes életmód miatt egyre nagyobb szerephez jutnak a rekreációs irányzatok, a szabadidős testmozgás. Tudjuk, hogy a sport, nemcsak a fizikai teljesítőképességet javítja, hanem megalapozza az egészséges testi, szellemi és lelki működést is (*Stubbs és mtsai 2018*).

Az öregedés során tapasztalható fizikai teljesítőképesség csökkenése mellett motoros és kognitív funkciók hanyatlása is. Ezek a diszfunkciók súlyos terhet jelentenek, mind az egyén szintjén, mind a családok, és általában véve a társadalom szintjén is. Ismert, hogy a rendszeres fizikai aktivitás ellensúlyozza az öregedéssel együtt járó negatív hatásokat, csökkenti a mortalitást és a morbiditást, nyújtja az aktív élettartamot (*Rueggsegger és Booth 2018; Eckstrom és mtsai 2020*). Az öregedés és a testedzés kapcsolatáról tudjuk például, hogy a maximális oxigénfelvétel (VO₂max) értéke 50 éves kor felett negatív korrelációt mutat a halálozással (*Blair és mtsai 1989*). A rendszeres testmozgás hatékony például az életkor növekedésével együtt járó szív- és érfunkció romlása ellen, amelyek Magyarországon a vezető halálozási okok közé tartoznak. A testedzés eredményesen veszi fel a harcot az időskori csontritkulással is, javítja a koordinációt és segít az izomtömeg megtartásában, ami pedig az esések, balesetek elkerülése esetén hasznos. Emellett, a korrall összefüggésben, a vázizom egyre több oxidatív sérülést, szabadgyököt halmoz fel, amelyet a rendszeres testmozgás az antioxidáns kapacitás növelése által ellensúlyozni

képes (*Radak és mtsai 2007; Radak és mtsai 2008*). Számos tanulmány vizsgálta az inaktivitással és az öregedéssel összefüggésbe hozott agyi funkció romlást, amelyet a rendszeresen végzett fizikai aktivitás megelőzni képes (*Radak és mtsai 2001; van Praag 2009*).

Nem valószínű azonban, hogy ezekért a szisztémás hatásokért egy specifikus biomarker lenne felelős. Az öregedési folyamatok komplexitása miatt, annak „megfékezése” is generalizált megoldásokat feltételez, a tüneti kezelésekkel ellentétben. Általánosságban, a rendszeres testmozgás olyan élettani, biokémiai folyamatokra hat, amelyek a különböző szervezetekben, eltérő módon „harcolnak” az öregedés ellen (*Radak és mtsai 2019*).

1.2.1. „Az öregedő telomerek”

Az öregedés egyik fő kiváltó oka a telomerhosszak kritikus mértékű rövidülése (*Greider 1996*). A telomerek a kromoszómák végén lévő, ismétlődő, TTAGGG-ben gazdag, nem kódoló nukleotid szakaszok, amelyek emberben jellemzően 3 és 20 kilobázis hosszúságúak (*Hande 2004*). Feladatuk, hogy védik a DNS-t a sejtciklusonként bekövetkező rövidüléstől. Amíg ezek a körülbelül 100 bázispárnyi kiesések, kizárólag a géneket nem tartalmazó telomer régiót érintik, addig a DNS kódoló szakaszát nem éri károsodás. Bizonyos számú sejtosztódás után azonban, amikor a telomerek hosszának rövidülése már kritikus, az osztódó sejtek már nem tudnak megkettőződni, elérve így a celluláris öregedés állapotát (*Linskens és mtsai 1995*). Ez az emberi sejtekben nagyjából 50 sejtosztódást jelent (*Aubert és Lansdorp 2008; Srinivas és mtsai 2020*). Minél hosszabb tehát a telomer szakasz, annál több osztódásra képes a sejt anélkül, hogy génkészlete sérülne. Bár a telomeráz enzim képes de novo bázispárokat adni a telomer szakaszokhoz (*Greider és Blackburn 1989*), a telomerek a folyamatos sejtosztódások miatt, az életkorral rövidülnek (*Campisi 2005; Bize és mtsai 2009*) (2. ábra).

Érdekes tény, hogy az öregedési folyamatokban jelentős oxidatív stressz például, felgyorsítja a telomerek rövidülését (*Ibáñez-Cabellos és mtsai 2018*). Ennek oka elsősorban a guanin nukleotidok oxidációjában keresendő, mivel a nukleinsav bázisok közül ez rendelkezik a legalacsonyabb oxidációs potenciállal, ami különösen igaz a telomer régióban (*Radak és Boldogh 2010*).

Valójában szoros kapcsolat áll fenn a telomerek hossza és az életkorral összefüggő betegségek között (*Morin 1997; Fyhrquist és Saijonmaa 2012; Sikora 2013*). A telomerekről leírták, hogy hosszuk fordítottan korrelál számos életkorral összefüggő betegség kialakulásának kockázatával (*Kong és mtsai 2013; Rizvi és mtsai, 2014*), amilyen például az érlelmeszesedés, a stroke, az elhízás és a miokardiális infarktus is (*Yamada 2003; Fuster és Andrés 2006*). Továbbá, Cheng és mtsai azt is leírták, hogy, a telomerek „kopása” pozitív összefüggést mutat a cukorbetegséggel és az ahhoz kapcsolódó szövődmények kialakulásával (*Cheng és mtsai 2021*). Továbbá, több kutatás is mutatott ki daganatokban, mint például vastagbél tumorok esetében is, csökkent leukocita telomerhosszt (*Tanaka és mtsai 2014; Telomeres Mendelian Randomization Collaboration 2017*).

1.2.2. A rendszeres testedzés hatása a telomerek hosszára

Ismerjük, hogy a telomerek hosszára a testmozgás jótékony hatással bír (*Lee és mtsai 2013; Loprinzi és mtsai 2015, Seki és mtsai 2023*). Már egy 12 hetes, alacsony gyakoriságú, mérsékelt intenzitású, rövid távú edzésprogram is pozitívan befolyásolta a telomerek hosszát, és pozitívan korrelált a redox homeosztázissal (*Dim Mauro és mtsai 2016*). A mozgás feltételezhetően, vagy a telomeráz aktivitásának befolyásolásával, vagy oxidatív stressz szabályozásával, vagy gyulladáshoz vezető folyamatok elindításával/gátlásával, vagy a vázizom szatellita-sejt tartalmára hatva fejt ki hatását a telomerhosszra (*Arsenis és mtsai 2017*).

A tanulmányok egy része szerint, a rendszeresebb, illetve az intenzívebb fizikai aktivitás, hosszabb telomerhosszhoz társul. Az alábbi cikkek például, hosszabb telomer szakaszt írtak le sportolók esetében, nem sportoló társaikhoz viszonyítva (*Kadi és mtsai 2008; Cherkas és mtsai 2008; Krauss és mtsai 2011; Østhus és mtsai, 2012; Denham és mtsai 2013; Borghini és mtsai 2015,).* Továbbá, Werner és mtsai úgy találták, hogy ez a különbség jobban kiütözik az idősek esetén, ami arra utalhat, hogy a fizikai aktivitás pozitívan hat a telomerhossz életkorból adódó csökkenésére (*Werner és mtsai 2009*). Ehhez kapcsolódóan, Meinilä és mtsai bebizonyították, hogy a leukociták és a

vázizomsejtek telomerhossza pozitív kapcsolatban áll az egészséges életmóddal (*Meinilä és mtsai 2019*).

Másik oldalról, azonban szép számmal akadnak olyan cikkek, amelyek nem írnak le különbséget sportoló, illetve nem sportoló egyének között a telomerhosszak tekintetében (*Rae és mtsai 2010; LaRocca és mtsai 2010; Mathur és mtsai 2013*).

Így tehát a kapcsolat a fizikai aktivitás és a telomerhosszak között továbbra is ellentmondásos. További kutatásokra van tehát szükség annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a testmozgás telomerhosszra gyakorolt hatását közép- és időskorú egyéneknél. Valamint abban a kérdésben is, hogy pontosan milyen mechanizmusokon keresztül fejt ki hatását a testmozgás a telomerhosszakra?

1.3. Az epigenetika

Bár már régóta tudjuk, hogy a génműködést, nem kizárólag a gének szekvenciájában bekövetkező változások módosíthatják, a figyelem mégis leginkább csak az elmúlt húsz évben fordult az epigenetika felé. Az érdeklődés azért is nőtt meg, mivel világossá vált, hogy az epigenetika behatóbb ismerete elengedhetetlen lesz olyan területeken is, mint amilyen például az öregedés-, az össejt- és az evolúciókutatások, a klónozás, de ide tartozhat még tágabb körben akár a mezőgazdaság is.

Waddington már 1942-ben bevezette az „epigenetika” fogalmát. A szóban a „felett” jelentésű ógörög „epi” előtag arra utal, hogy a genetikai információ átadása, a DNS-szekvencia megváltozása nélkül történik. Az epigenetika tárgykörébe tehát olyan, mitotikusan és/vagy meiotikusan is átörökíthető folyamatok, környezeti hatások, táplálkozás-, edzés-, és öregedés általi DNS változások sorolhatók, amelyek oly módon vezetnek a fenotípust meghatározó gének expressziójának változásához, hogy közben a DNS-nukleotid sorrendjében nem történik módosítás.

Az epigenetikai folyamatok természetesek és nélkülözhetetlenek a szervezet megfelelő működéséhez. Probléma akkor van, ha ezek a folyamatok nem megfelelően mennek végbe, és így súlyos egészségügyi és viselkedési zavarokat okoznak. A genetikai változásokkal ellentétben az epigenetikai folyamatok reverzibilisek (*Weinhold 2006*). Bár

a metilációs mintázatok jelentős részét szüleinktől kaptuk örökül, hatással lehetnek rájuk különböző külső és belső tényezők egyaránt (*Fraga és mtsai 2005*). A szervezetet, fejlődése során, számos külső inger éri, mint amilyen például az elfogyasztott táplálék, a fizikai aktivitás és a stressz. Emellett, az epigenetikai folyamatokat, különböző környezeti ágensek is befolyásolhatják: nehézfémek, peszticidek, kipufogógázok, dohányfüst, policiklusos aromás szénhidrogének, a radioaktivitás, vírusok és baktériumok is (*Weinhold 2006*). Egypetjű ikreket vizsgálva kiderült, hogy az egyedfejlődésük korai szakaszában megegyező epigenetikai mintázatok, az eltérő környezeti hatások miatt, a korról változtak, amik a fenotípusos különbözőségekből mutatkoztak meg leginkább (*Fraga és mtsai 2005*). Előfordul azonban olyan is, hogy az epigenetikai változást nem környezeti, hanem belső faktorok okozzák. Ilyen például, a sejtosztódás során az epigenetikai mintázat nem tökéletes másolása az utód sejtben, illetve ezeknek a hibáknak a későbbi, folyamatos fenntartása („epigenetikai sodródás”) (*Fraga és mtsai 2005*). Továbbá, ilyen belső faktor még maga az öregedés is. Az öregedéssel kialakuló globális hipometiláció genetikai instabilitást és spontán mutációk kialakulását okozza (*Pal és Tyler 2016*). Napjainkban már ismert az is, hogy a legtöbb betegség hátterében, beleértve a daganatos megbetegedéseket, a kognitív diszfunkciókat, valamint különböző légzőszervi, szív- és érrendszeri, reprodukív és autoimmun megbetegedéseket, epigenetikai változások állnak.

Ezidáig, az epigenetikai folyamatok számos típusát azonosították, mint amilyen például az acetiláció, a metiláció, a foszforiláció és az ubiquitináció. Valószínűsíthetően ez a sor még nem teljes, ugyanis a kutatások előrehaladtával további epigenetikai mechanizmusok is napvilágot fognak látni.

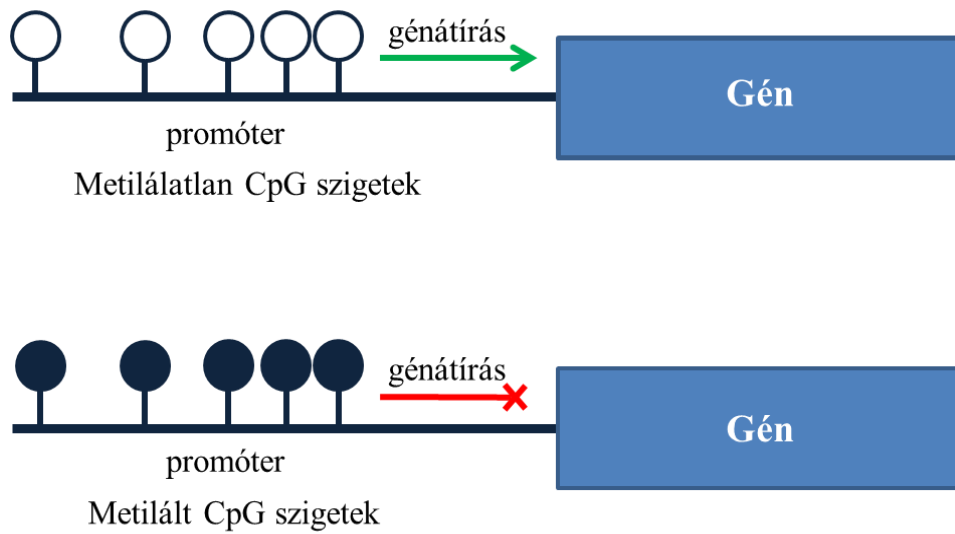
1.3.1. A DNS – metiláció

A DNS-en történő módosulások közül az egyik legjelentősebb, és ezért az egyik leggyakrabban kutatott is, a DNS-metiláció. Népszerűségét az adja, hogy a meglévő technológiákkal igen könnyen tanulmányozható: a PCR-hez kapcsolt biszulfid konverzió, a piroszekvenálás, a microarray-ek és a mély szekvenálás egyaránt alkalmas lehet a DNS-

metiláció vizsgálatára. A minta-előkészítés egyszerűsége, valamint a költséghatékony technikák miatt lehetővé válik nagyszabású vizsgálatok elvégzése is.

A DNS-metiláció, a DNS „építőköveit” jelentő nukleotidok, metilcsoporttal (CH₃) történő módosítását jelenti. Emberben a metiláció során kiemelten fontos szerephez jutnak azok a citozin bázisok, amelyek, foszfát csoportokon keresztül, guanin nukleotidokhoz képesek kötni, úgynevezett CpG dinukleotidokat eredményezve. Ezek a CpG-dinukleotid egységek a genomban egyenetlenül oszlanak el, zömmel az úgynevezett CpG-szigetek területén fordulnak elő (*Ehrlich és mtsai 1982; Bird 2002*). A CpG-szigetek jellemzően a különböző gének promóter, illetve regulátor régióban találhatóak meg nagy számban (*Clouaire és mtsai 2008*). A metiláció, a gombák és az emlősök esetében, főként ezeket, a szigeteken található citozinokat érinti (*Virani és mtsai 2012; Allis és Jenuwein 2016; Szigeti és mtsai 2018*). A humán szövetek egészséges testi sejtjeiben a CpG-dinukleotidok több mint, 70-80%-a metilált állapotban van, amely a teljes genom majdnem 1%-át jelenti (*Wilson és mtsai 2007*). Legjellemzőbb metilált bázis az eukarióták genomjában az 5-metilcitozin (5mc), ami azt jelenti, hogy a citozin ötödik szénatomjára kerül metilcsoport (*Blow és mtsai 2016*).

A metilációs változások egyaránt vezethetnek a génexpresszió fokozásához vagy az adott gén csendesítéséhez (*Weinhold 2006*). Alapvetően, a felhelyezett metilcsoportok, fizikailag gátolják a transzkripciós faktorok (TF) kötődését a DNS kettős spiráljához. Ebből következik, hogy míg az alacsony mértékben vagy teljesen metilálatlan DNS promóter szakaszokon a sejtmagba érkező TF-ok akadálytalanul elindíthatják a génátírást, addig a magas szinten DNS-metilált régiókban a TF-ok kötése a DNS szálhoz lehetetlenné válik, ami jellemzően a transzkripció gátlását eredményezi (*Siegfried és mtsai 1999*) (3. ábra).



2. ábra

A gén promóter szakaszának metilációja és annak hatása a génexpresszióra (saját ábra)

A DNS metilációs mintázata dinamikusan változik az egyén élete során. A metilációs változások létrejöttében különböző enzimek vesznek részt (*Zhao és mtsai 2016*). Először is, a citozin bázisok és a metilcsoportok közötti kovalens kötés kialakításában a DNS-metiltransferázoknak (DNMT) van fontos szerepük. Az enzimes család emlős rendszerekben három féle DNMT-t számlál: a metiláció fenntartásában szerepet játszó DNMT1, valamint a DNMT3a és 3b, amelyek de novo metiltransferázok (*Bester 1988*). A metiláció szabályozásában a DNMT-k mellett, részt vesznek még a metilált DNS-kötő fehérjék. Ezek a fehérjék metilált citozinokhoz képesek kötni, megakadályozva a TF-ok kötését, és blokkolva így géntranszkripciót (*Lyko 2018*). A DNS-metilcsoportok eltávolítását a ten-eleven-tranzlokációs (TET) metilcitozin dioxigenáz enzimes család tagjai végzik (*Tahiliani és mtsai 2009*).

1.3.2. Epigenetikai változások tumoros megbetegedésekben, öregedésben

A megfelelő metilációs mintázatok megléte a normális egyedfejlődés előfeltételei, azonban megváltozásuk kóros folyamatokat idézhet elő. Ma már tudjuk, hogy a daganatos

betegségek kialakulásában a genetikai tényezők mellett, epigenetikai változások is szerepet játszanak. Azonban, akadnak még megválaszolatlan kérdések azzal kapcsolatban, hogy az epigenetika pontosan hogyan járul hozzá betegségek kialakulásához és az öregedéshez? Azért is fontos kérdés ez, mivel a daganatképződés és öregedés során fellépő epigenetikai változások átfedéseket mutathatnak. Mivel ezek a folyamatok visszafordíthatók, így potenciális célpontjai lehetnek a jövő daganat-és öregedés elleni terápiáinak. Egy példa erre, hogy állatmodelleken már sikerrel alkalmazták az decitabin és azebularin nevű, DNS-metilációra ható, antitumorális gyógyszereket (*Taylor és Jones 1979; Zhou és mtsai 2002*).

Régóta ismerjük, hogy a daganatos megbetegedések előfordulása exponenciálisan növekszik az életkorral (*Campisi és Yaswen 2009*), valamint azt is, hogy daganatok etiológiájában a DNS-metiláció fontos szerepet játszik (*Esteller 2008*). A DNS-metiláció csökkenése/elvesztése, vagyis a hipometiláció, volt az egyik első epigenetikai jelenség, amit humán tumorok esetében leírtak. Feinberg és Vogelstein már 1983-ben megállapította, hogy a humán daganatszövetekben alacsonyabb a metilált citozinok aránya, a normál szövetekhez viszonyítva (*Feinberg és Vogelstein 1983*). Ez, számokban kifejezve: míg az egészséges genomban található kb. 28 millió CpG sziget, több mint 60%-a metilált, addig daganatos megbetegedések esetén, ez a szám 5-20%-ra csökken (*Pfeifer 2018*). Továbbá érdekes megfigyelés az is, hogy a teljes genom 5mC-tartalma fordítottan arányos a tumorok progressziójával (*Gama-Sosa és mtsai 1983*). Azóta, szinte minden típusú daganatban kimutatásra került, hogy a normál szövetekhez képest kevesebb 5mC van jelen, ami növeli a genomi instabilitását, segíti a daganatképződés előrehaladását. A tumorokra jellemző aberráns metilációs mintázat alatt, zömében a szabályozó régiók és az ismétlődő elemek hipometilációját, valamint esetenként, egyes, kiemelt helyek hipermetilációját értjük (*Jones és Laird 1999; Bird 2002; Ehrlich 2009; Vaissière és mtsai 2009*). Ez főként, bizonyos tumorszupresszor gének (például: adenomatous polyposis coli (APC)) promóter régiójában található CpG-szigetek fokozott metilációját jelenti, ami így a gének csendesítését okozza, és kialakítja a tumoros fenotípust (*Baylin és Jones 2016; Li és mtsai 2017*). Érdekes továbbá az is, hogy az eltérő lokalizációjú daganatok, eltérő CpG metilációs profilt mutatnak (*Esteller és mtsai 2001*).

Párhuzam figyelhető meg a daganatokban felhalmozódó szomatikus mutációk és az ebből adódó genomiális instabilitás, valamint az az “öregségi genotípus” között (*Hanahan és*

Weinberg 2011; López-Otín és mtsai 2013). A genomot érintő mutációk mellett a metilációs-mintázatok is változnak a koraival. A tumoros megbetegedéseknél bekövetkező metilációs változások nagyban hasonlítanak az öregedés folyamatában tapasztalhatókéhoz (Gautrey és mtsai 2014), valamint, az öregedéssel együtt járó metilációs változások egyúttal növelhetik is a tumoros megbetegedések valószínűségét (Chen és mtsai 2022). Az idő előrehaladtával bekövetkező módosulások feltérképezése segítséget nyújthat az öregedési folyamatok pontosabb megértésében, és mivel a változások többsége reverzibilis, így ígéretes célpontjai lehetnek az életkorral összefüggő betegségek elleni küzdelemnek.

Az öregedés során bekövetkező epigenetikai változások vizsgálatára a fentebb említett általános öregedési modellek használata nehézségekbe ütközik. Például az élesztőben egyáltalán nincs DNS-metiláció (Capuano és mtsai 2014). Továbbá a férgekben hiányzik a citozin metilációja, hanem zömmel az adenin nukleotid metilálódik (6mA) (Greer és mtsai 2015). Egyelőre azonban nem tisztázott, hogy az epigenetikai enzimek aktivitásában bekövetkező változások befolyásolják-e a „hosszú élet” gének expresszióját, vagy a „hosszú élet” gének változásai okozzák az epigenetikai eltéréseket a genomban. Fiatal egyedekben a DNS globális hipermetilációja mellett, a promóter régiók CpG-szigetei nem, vagy csak kis mértékben metiláltak. Az életkor előrehaladtával azonban a genom ismétlődő régióinak globális hipometilációja és bizonyos gének (főleg tumorszupresszorok) promóter régióinak hipermetilációja figyelhető meg (Cruickshanks és mtsai 2013; Pal és Tyler 2016).

1.3.3. Az epigenetikai órák

Az utóbbi évek kutatásai feltárták, hogy bizonyos DNS-metilációs biomarkerek alapján meghatározható a szövetek biológiai kora. Az epigenetikai életkor szoros összefüggést mutat a kronológiai öregedéssel, de számításba veszi a környezeti és életmódbeli hatásokat is. Például különböző öregedési betegségekben szenvedő egypetűjű ikreknél eltérő DNS-metilációt mutattak ki, ami aláhúzza, hogy a környezeti és életmódbeli tényezők jelentőségét az öregedési fenotípusokban (Fraga és mtsai 2005). Így tehát, az epigenetikai órákat az öregedés igen ígéretes molekuláris biomarkereinek tekintik.

Az öregedés epigenetikai biomarkereinek első generációját főleg a kronológiai életkor helyettesítésnek reményében fejlesztették ki. Kezdetben, Weidner és mtsai három olyan gént (ITGA₂B, ASPA, PDE₄C) azonosították, amelyek korfüggő metilációs szintjei alapján, vérmintából meghatározható vált a biológiai életkor (*Weidner és mtsai 2014*). Ezzel párhuzamosan, Horvath és Hannum olyan DNS-metiláción alapuló epigenetikai órákat fejlesztett ki, amelyek az életmódot is figyelembe véve, pontosabban tükrözik az öregedést, mint a kronológiai életkor (*Horvath 2013; Hannum és mtsai 2013*). Horvath és mtsai egy olyan epigenetikai órát (Horvath-óra) alkottak, ami megbízhatóan becsüli meg a metilációs kort, 353 CpG (úgynevezett óra-CpG) metilációja alapján (*Horvath 2013; Horvath 2015*). Hannum-ék munkacsoportja pedig, a DNS-metiláció változásának sebességét vizsgálta 19–101 éves alanyok véréből. Ők végül egy kisebb, 71 CpG-ből álló készletet azonosítottak, amely szintén nagy pontosságúnak bizonyult a biológiai életkor előrejelzésében (Hannum-kor) (*Hannum és mtsai 2013*). Nem is olyan meglepő, hogy az általuk azonosított CpG-k az öregedéssel kapcsolatos gének közelében fordulnak elő.

Az első generációs epigenetikai órák ugyan nagy mértékben korrelálnak a kronológiai korrallal, azonban, statisztikailag szignifikáns, de viszonylag gyenge összefüggéseket mutatnak klinikai biomarkerekkel és a halálkockázattal. Ezért nemrég, a kutatók belefogtak, úgynevezett második generációs órák kifejlesztésébe is, mint amilyen például a DNAmPhenoAge (*Levine és mtsai 2018*) és a DNAmGrimAge (*Lu és mtsai 2019*). Ezek a halálkockázat érzékenyebb markerei, és számos, az életkorral összefüggő betegség előrejelzésében is pontosabbnak bizonyultak (*Lu és mtsai 2019*).

1) A PhenoAge a biológiai életkor egyik olyan mérőszáma, amit kilenc klinikai jellemző, valamint a kronológiai életkor alapján alkottak meg. Ezt a „fenotípusos kort” sikerült prediktálni 513 CpG-t metilációs státusza alapján Levine-nek és mtsai-nak. Az új epigenetikai órának a DNAmPhenoAge nevet adták (*Levine és mtsai 2018*). Az óra alapján megbecsülhető, hogy a vizsgált egyén fiatalabb, vagy idősebb-e a kronológiai életkoránál (DNAmPhenoAge akcelerációja/AgeAccelPheno), azaz gyorsult (negatív előjelű) vagy lassult (pozitív előjelű) az öregedése, valamint azt is, hogy mennyi esélye van a halálra az elkövetkező 10 évben. A DNAmPhenoAge jó mutatója az öregséggel összefüggő egészségi állapotnak, a rákos megbetegedéseknek és az Alzheimer-kórnak is (*Levine és mtsai 2018; Aczel és mtsai 2022*). Előnye továbbá, hogy ezt a biomarkert ugyan teljes vérből származó adatok felhasználásával alkották meg, de minden eddig vizsgált

szövetben és sejtben erősen korrelál az életkorral (*Chen és mtsai 2016; Levine és mtsai 2018*).

2) Hasonlóan jártak el Lu és mtsai is egy másik epigenetikai óra, a DNAmGrimAge megalkotása esetén, azzal a különbséggel, hogy ők a morbiditással vagy mortalitással összefüggő plazmafehérjék metilációját és a dohányzást vették számításba. A „GrimAge gyorsulása” (DNAmGrimAge akcelerációja/AgeAccelGrim), hasonlóan a DNAmPhenoAge akcelerációjához, a kronológia életkorra illesztett regresszió „maradéka”, vagyis a kronológiai és a Grim-kor különbsége (*Lu és mtsai 2019*).

3) A telomer hosszának DNS-metiláción alapuló becslése, a DNAmTL, is felülmúlja a mért telomerhosszt, a halálig hátralévő idő és az életkorral összefüggő betegségek előrejelzésének tekintetében (*Lu és mtsai 2019*). Lee és mtsai ezen túlmenően, egy hatalmas kohorszban (n=5713) kimutatták, hogy kapcsolat van a genomszintű metiláció, a telomerhossz és az epigenetikai öregedés között (*Lee és mtsai 2019*).

Továbbiakban is érdekes epigenetikai órák láttak napvilágot. Az életkor pontosabb előrejelzésére szolgálnak a humán agykérgi szövetekből (*Shireby és mtsai 2020*), a vázizomzatból (*Voisin és mtsai 2020*) vagy akár a gyermekkori szájhám szövetekből (*McEwen és mtsai 2020*) megalkotott órák. Továbbá, epigenetikai órákat hoztak létre a terhesség korának előrejelzésére, a köldökszinórból és a méhlepényből származó sejtek metilációs szintjei alapján (*Bohlin és mtsai 2016; Mayne és mtsai, 2017*).

Az epigenetikai órák segítséget nyújthatnak bizonyos fejlődésbiológiai, valamint öregedéssel és tumoros megbetegedésekkel kapcsolatos kérdések megválaszolásában (*Horvath és Raj 2018*), mivel az epigenetikai életkor gyorsulása/akcelerációja előre jelzi az életkorral összefüggő betegségek kialakulását, azok kimenetelét, esetlegesen a halálozást is (*Levine és mtsai 2018; Lu és mtsai 2019*). Éppen ezért, a DNS-metiláción alapuló epigenetikai órákat a betegségek kockázatának, valamint a várható élettartam és a halálozás előre jelzésére alkalmazhatnánk. Ilyen betegségek például, az elhízás, a 2-es típusú cukorbetegség, a szív- és érrendszeri betegségek, és az Alzheimer-kór is, amelyekben az említett órák „felgyorsulnak” (*Horvath és mtsai 2014; Levine és mtsai 2015; Ling és Rönn 2019; Aczel és mtsai 2022*). Ismerjük, hogy az idősebb szövetek nagyobb eséllyel vannak kitéve rosszindulatú elfajulásnak. Ezért is lehet fontos, hogy összefüggésbe hozzák a metilációs életkort, a tumorok kialakulásának kockázatával. (*Liu és mtsai 2016; D'Urso és mtsai 2017; Levine és mtsai 2018; Lu és mtsai 2019*;

Kresovich és mtsai 2019). Néhány példa erre a teljesség igénye nélkül: 1. Gyorsulást mutatott az epigenetikai óra a perifériás vérben, mellrák és férfiak vastagbélrákja esetén (*Durso és mtsai 2017; Rozenblit és mtsai 2022*). 2. A menopauza után kialakuló emlőrák eseteit vizsgálva, az epigenetikai gyorsulást a rák diagnózisa előtt legfeljebb 10 évvel már észlelték (*Ambatipudi és mtsai 2017*). 3. A Sister Study-ban 2764 igazoltan tumormentes nő metilációját vizsgálták, közülük 1566 főnél később mellrák alakult ki. Esetükben az epigenetikai életkor gyorsulása előre jelezte a későbbi emlőrák kialakulásának kockázatát (*Kresovich és mtsai 2019*). 4. A Melbourne Collaborative Cohort Study-ban perifériás vér DNS-metilációját vizsgálták, vastagbél-, gyomor-, vese-, tüdő-, prosztatata- és uroteliális daganatok, valamint B-sejtes limfómák esetében. A tanulmányban kapcsolatot mutattak ki a felgyorsult epigenetikai öregedés, a tumorok kialakulása, valamint a megnövekedett halálozási kockázat között (*Dugué és mtsai 2018*).

2. Célkitűzések és hipotézisek

Mindezeket alapul véve adódik a kérdés, hogy a rendszeres, sok éves edzés milyen mértékben befolyásolhatja a DNS-metilációját, vagyis az epigenetikai életkort? Általánosságban elmondható, hogy a kronológiai életkorhoz viszonyított magasabb epigenetikai életkor növeli a mortalitást. Továbbá, a magasabb epigenetikai életkor csökkent kognitív- és tüdőfunkcióval és szorítóerővel jár (*Spiegel és mtsai, 2014; Breen és mtsai 2020; Peterson és mtsai 2023*). Kimutatták, hogy mind az akut, mind a krónikus testmozgás megváltoztatja az epigenomot az ivarsejtekben, az agyszövetben, az izom-, vér- és zsírsjtekben, valamint a szív- és érrendszer sejtjeiben. A testmozgás által kiváltott epigenetikai módosítások így tehát potenciálisan ellensúlyozhatják azokat az epigenomban bekövetkező patofiziológiai változásokat, amit például a daganatok, a neurodegeneratív, a metabolikus, valamint a szív- és érrendszeri betegségek okoznak. Feltételezhető, hogy a testmozgás pozitív preventív és rehabilitációs hatásai is, legalább részben, az epigenetikai módosításoknak köszönhetőek, hiszen hozzájárulnak a szisztémás gyulladás csökkentéséhez. A különböző típusú és intenzitású edzések specifikus epigenetikai válaszokat mutatnak, amelyek közvetlenül mérhető az izomszövetben, de a keringésben is. Azt is kimutatták, hogy a specifikus edzésprogramokra (pl. ellenállási edzés) “jól reagálók” más epigenetikai mintázatot mutatnak, mint a “nem reagálók” (*Zimmer és mtsai 2016*). Így kutatásunk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a sport hatását az öregedés molekuláris folyamataira. Kíváncsiak voltunk az öregedés során bekövetkező epigenetikai változásokra is, különös tekintettel a DNS-metilációs mintázatokban megjelenő eltérésekre.

Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk:

1. Milyen hatással van sport a KL gén promóter régiójának metilációjára?
2. Milyen hatással van az edzés a “fiatalság fehérjéjének” szintjére master sportolóknak? A sKL fehérje szintje mutat-e összefüggést antropometriai, terhelésélettani és kognitív paraméterekkel?
3. Fennáll-e kapcsolat a keringő sKL és a DNS-metiláción alapuló epigenetikai órák között master sportolóknak?

4. Milyen kapcsolat áll fenn a fiziológiai teszteredmények, valamint a RT-PCR módszerrel mért (TL), és a DNS-metiláción alapuló becsléssel meghatározott TL (DNAmTL) értékek között?

5. Van-e kapcsolat a mért és becsült telomerhosszak és az epigenetikai órák között?

Kutatásunk jelentőségét gyakorlati oldalról az adja, hogy az „öregedést szabályozó” gének epigenetikai változásai hatással lehetnek az öregedés progressziójára, és így célpontjai lehetnek az öregedést lassító farmakológiai terápiáknak is.

Hipotézisek

Hipotéziseinket a következőképpen fogalmaztuk meg.

1. A „fiatalság fehérjét” vizsgálva feltételeztük, hogy:

1.1. Kapcsolat áll fenn a szenior sportolók “fiatalság fehérjének” szintje és a szervezet redox egyensúlya között (*Aczel és mtsai 2023*).

1.2. Az évtizedeken át végzett edzés módosítja a KL gén promóter régiójának metilációját, valamint szerepe van a sKL és a fizikai fittség kapcsolatában (*Aczel és mtsai 2023*).

1.3. Kapcsolat áll fenn a KL szintje és az epigenetikai órák között, és így a hormon szintje befolyásolhatja az epigenetikai öregedés gyorsaságát (*Aczel és mtsai 2023*).

2. A szenior korú sportolók telomerhosszát vizsgálva feltételeztük, hogy:

2.1. Az évtizedeken át tartó testedzés változást okoz a telomerek mért (TL) és becsült (DNAmTL) hosszában (*Seki és mtsai 2023*).

2.2. A fizikai erőnlét/fittség szintje befolyásolja a telomer hosszakat (*Seki és mtsai 2023*).

2.3. A kapcsolat módosul a telomerhosszak és epigenetikai órák között master sportolók esetében a kontroll csoporthoz képest (*Seki és mtsai 2023*).

3. Anyag és módszer

3.1. Kutatásban részt vevő személyek

A tanulmányt az Országos Népegészségügyi Központ, a Helsinki Nyilatkozatnak és a Magyarországon érvényes szabályozásnak megfelelően hagyta jóvá, TUKEB etikai engedélyünk száma 25167-6/2019/EÜIG. Vizsgálatunkhoz a 2019-ben megrendezésre kerülő, velencei Evezős Masters Világbajnokságon történt mintavétel. A 194 szenior versenyzőt a helyszínen szórólapok segítségével, illetve személyesen toboroztuk. Ezt, néhány hónappal később, egy 109 főből álló kontroll csoport mintavétele követte Budapesten, akiket újságban megjelent felhívások segítségével vontunk be a kutatásba. Az így gyűjtött önkéntesek, a versenyzőkkel ellentétben, edzetlenek voltak. Összesen 303 fő vett részt a vizsgálatokban. Az résztvevők életkora 37-85 év között volt. A kutatásban való részvétel önkéntes volt, a résztvevők írásos beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki. Minden résztvevő kérdőívet töltött ki az egészségi állapotára és életmódjára, táplálkozási szokásaira vonatkozóan, és természetesen a testmozgási szokásaikra vonatkozóan. A szenior evezős csoport nagyon heterogénnek bizonyult; sok sportolónak csak heti egy vagy két edzése volt, míg mások napi szinten végeztek edzőmunkát. A résztvevők közül 267 fő normál táplálkozást folytatott, 19 fő volt vegetáriánus és 17 fő egyéb típusú diétát követett (gluténmentes, paleo, laktózmentes, DM diéta).

A vizsgálatunkban résztvevő, közép-és időskorú személyeket master sportoló férfi (MF), master sportoló nő (EN), illetve kontroll (kontroll férfi (KF), kontroll nő (KN) csoportokba soroltuk (*1. táblázat*).

1. táblázat

*A vizsgálatban részt vevő személyek nemek szerinti felosztása, valamint
átlag életkorai \pm szórás*

	MF	KF	MN	KN
n (fő)	114	35	80	74
átlag életkor (évek)	60,8 \pm 11,3	59,3 \pm 13,9	57,6 (\pm 8,5)	64,3 \pm 11,5

3.2. Antropometriai, terhelésélettani és kognitív vizsgálatok

Mintagyűjtésünk egy többlépcsős tesztsorozat előzte meg. Az antropometriai vizsgálat során testtömeg és testmagasság mérést végeztünk, majd, az alanyok testtömeg-indexét is meghatároztuk.

A terhelésélettani tesztsorozat négy vizsgálatból állt; egy maximális kézi szorítóerő mérésből, egy maximális felugrás mérésből, egy Chester- step tesztből és egy kognitív tesztből:

- A maximális kézi szorítóerő mérés során a vizsgálati személyek, jobb, illetve bal kezükkel váltakozva, háromszor ismételve, körülbelül 2 másodpercen keresztül, a lehető legnagyobb erő kifejtéssel megszorítják az eszközt (CAMRY EH101 dinamométer, South El Monte, USA). A kapott értékeket átlagolva, és a testsúllyal elosztva, képet kaphatunk a test maximális erejéről (*Oksuzyan és mtsai 2010; Eika 2019; Bohannon 2019*).

- A maximális vertikális felugrási teszt során egy linear encoder (Muscle Lab, Norvégia) nevű készüléket használtunk. A teszt során az alanyoknak csípőre tartással, a lehető legmagasabbra kellett ugrania, mindezt ötször megismételve. Az eredmények átlagolása után a vizsgálatból az alsó testfél robbanékony erejére tudunk következtetni (*Lee és mtsai 1996*).

- A Chester-step teszt során a résztvevőknek maximum 5x2 percre kell egy 15 cm magas zsámolyra fel-le lépcsőzniük, csípőre tett kezekkel. Az első két perces intervallum és a rövid szünet (5 másodperc) letelte után a lépések üteme gyorsul. Az alanyok addig hajtják végre a feladatot, míg a pulzus értékük el nem éri az egyénileg, a Tanaka protokoll szerinti (208-0,7*életkor) becsült maximális pulzus érték 80%-át vagy le nem telik a 10 perces teszt. Az egyes intervallumok alatt elért pulzus értékekre egyenest illesztve megbecsülhető az egyének maximális pulzus értéke. A Chester-step teszt a fizikai fittség, a VO₂max becslésére alkalmazható (*Ramírez-Vélez és Izquierdo 2019*). Ezt erősíti meg, hogy az így becsült értékek a spiroergométeres vizsgálatok eredményeivel erős korrelációt mutatnak (*Sykes és Roberts 2004*). A maximális oxigénfelvétel az egyik legjobb életképességi/vitalitási paraméter, emellett a minél magasabb értéke a betegségek széles körében jelenthet prevenciót (*Hawkins és Wiswell 2003*).

- A munkamemória értékelésére számjegy terjedelm tesztet alkalmaztunk, ahol a nagyobb értékek, jobb rövid távú memóriát jeleznek (*Martinez-Diaz és mtsai 2020*). A teszt során az alanyoknak, négy darab 3-9 számjegyből álló számsorozat visszamondását kellett teljesíteniük. Ennek eredménye 3-tól 9-ig terjedhet, annak megfelelően, hogy mennyi számból álló számsorozatot sikerült az alanyok hibátlanul visszamondania.

3.3. Vérmintavétel, hematológia és biokémiai vizsgálatok

A vérvételt az alanyok könyökvénájából, K₂-EDTA, ACDA alvadás gátlót tartalmazó, valamint CAT (Serum Sep Clot Activator Tubes) szérumos vérvételi csövekbe végeztük, az antropometriai, terhelésélettani és kognitív tesztek elvégzése után, a Chester-step teszt elvégzése előtt. Az EDTA-s véralvadásgátlót tartalmazó és a CAT szérumos csövek hűtve, 2 órán belül a helyszínről elszállítva, laborunkban kerültek feldolgozásra. Az ACDA alvadásgátlót tartalmazó vérvételi csöveket pedig a helyszínen fugáltuk és szárazjégen tartva, nap végén kerültek laborunk -70 fokos hűtőjébe. A K₂-EDTA alvadás gátlóval, valamint az ACDA alvadás gátlóval kezelt vérmintákat 1600g sebességgel, 15 percre, 4 Celsius fokon centrifugáltuk (Sigma 1-16K (Refrigerated Microfuge) Osterode am Harz, Németország), majd a vérplazma komponensét eppendorf csövekbe pipettáztuk. Az így nyert plazma mintákat, valamint a maradék sejtes elemeket -70 Celsius fokon

tároltuk. A CAT szérumos vérvételi csövek tartalmát centrifugálás (3000 rpm, 10 perc, szobahőmérséklet, SERVOSpin Plus centrifuga, Németország) után két részre osztottuk. Egyik részéből 8 vérkémiiai paramétert (glükóz, koleszterin, LDL, HDL, triglicerid, májenzimek (GOT, GPT, gamma GT)) határoztunk meg.

3.4. DNS izolálás

Ezt követően laborunkban, a K2-EDTA alvadásgátlóval kezelt minták sejtes elemeiből, azon belül is a fehérvérsejteket tartalmazó „buffy coat” részből, DNS-t izoláltunk, DNS izoláló kit segítségével (Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA). A kitet a gyártó utasításainak megfelelően alkalmaztuk.

3.5. Metilációs vizsgálatok

A metilációs vizsgálat első lépése egy biszulfid konverzió. A folyamat lényege, hogy a metilált citozin bázisok, a metil-csoport jelenléte miatt, “változatlanul maradnak”. Míg, a nem-metilált citozin nukleotidok, a biszulfid konverzió hatására uracillá, majd későbbi lépésben timinné alakulnak. Attól függően, hogy a vizsgálni kívánt citozin metilált vagy nem-metilált, különbség adódik a DNS nukleotid sorrendjében. Az eljáráshoz kiindulásként 500 ng genomialis DNS-t hidrogén-szulfittal átalakítunk, amihez EZ-96 DNS-metilációs MagPrep Kit-et (Zymo Research, Irvine, CA, USA) és KingFisher Flex robot-ot (Thermo Fisher Scientific, Breda, Hollandia) használtunk. A mintákat véletlenszerű sorrendben szélesztettük. A biszulfid konverziót a gyártó protokollja szerint végeztük, a következő módosításokkal: a DNS megkötésére 15 µl MagBinding Beads-et használtunk. A konverziós reagens inkubálása a következő ciklus- protokoll szerint történt: 16 ciklus 95 °C-on 30 másodpercig, majd 50 °C-on 1 órán át. A ciklus után a DNS-t tíz percig 4 °C-on inkubáltuk.

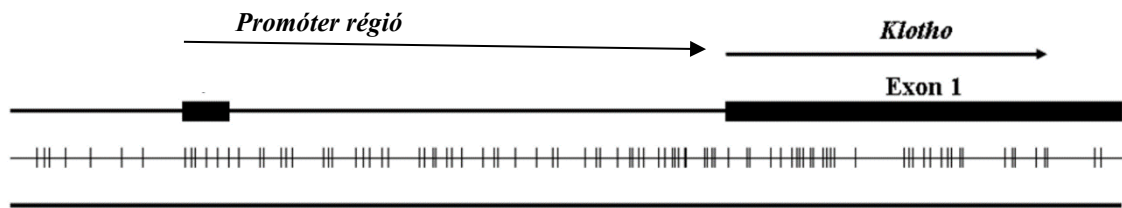
Ezután termék DNS-mintákat hibridizáltunk 850K Infinium MethylationEPIC BeadChip-re (Illumina Inc., San Diego, CA), a gyártó protokollja szerint, azzal a módosítással, hogy 8 µl biszulfittal kezelt DNS-t használtunk kiindulási anyagként. Ez a chip, több mint 850.000 ponton képes a CpG szigetek metilációját meghatározni. Lényegében, a

különböző színű flourofórral jelölt metilált, illetve nem metilált DNS-hez kötni képes primerek segítségével meghatározható az adott citozin metilációs státusza.

A DNS-metilációs adatok minőség-ellenőrzését Meffil és Ewastools csomagokkal, R verzió 4.0.0-val végeztük (*Min és mtsai 2018; Murat és mtsai 2020*). Azokat a mintákat, amik az Illumina által felállított minőségi kritériumoknak nem feleltek meg (beleértve a hosszabbítást, a hibridizációt és a biszulfid átalakítást is) kizártuk a vizsgálatból. A metilációs szint meghatározásához R-ben "Noob" normalizációt használtunk (*Triche és mtsai 2013*). A metilációs adatok feldolgozásához és az öregedés ütemének kiszámításához Horvath online korekalkulátorát alkalmaztuk (<https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>).

3.5.1. A KL promóter régió metilációs vizsgálata

A KL gén promóter régiójában 13 CpG-t vizsgáltunk, a 33.015.146 bp és 33.016.356 bp közötti szakaszon (3. ábra). Ezek genomialis elhelyezkedését EPIC Hg38 segítségével határoztuk meg. A szenior sportoló és kontroll csoportok nemenkénti metilációs elemzését DMRcate csomag segítségével végeztük R-ben. A szoftver segítségével, a metilációra utaló béta értékeket határoztuk meg, vagyis azt néztük mekkora a metilált citozin bázisok aránya. A háttér kiszűrését 1000-nél határoztuk meg, valamint a False Discovery Rate p-érték küszöbértékét 0,05-re állítottuk.



3. ábra

A KL gén promóter régiója

3.5.2. Az epigenetikai életkor kiszámítása

Az epigenetikai öregedést, azaz a DNAmPhenoAge-et és a DNAmGrimAge-et, a korábban leírtak szerint a Horvath és mtsai által megalkotott szoftverek segítségével kaptuk meg (Levine és mtsai 2018; Lu és mtsai 2019; <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>).

A PhenoAge és a GrimAge gyorsulása alatt az a 'raw residual' („nyers maradék”) érthető, ami a megfigyelt és a várt érték közötti különbségből adódik, akkor, amikor a metiláción alapuló korbecslést összevetjük a kronológiai életkorral. Az érték negatív előjelű, ha gyorsulásról, és pozitív előjelű, ha lassulásról beszélünk.

3.6. A sKL fehérje plazmaszintjének meghatározása

A sKL plazma szintjét ACDA alvadásgátlóval kezelt mintákból határoztuk meg. A vérmintákat 6000xg sebességgel, 15 percig, 4 Celsius fokon centrifugáltuk (Sigma 1-16K (Refrigerated Microfuge) Osterode am Harz, Németország), majd a vérplazma komponenst pipettával szeparáltuk, és a mérésig -80 Celsius fokon tároltuk. A mintákat és a reagenseket a protokollban leírtak szerint készítettük elő. A fehérjeszint méréséhez enzimhez kötött immunszorbens próbát (ELISA), ezen belül Human Klotho ELISA kit-et használtunk, a gyártó utasításai szerint (R&D Systems, DuoSet ELISA, Cat #DY5334-05, Minneapolis, MN, USA). A méréseket 96 lyukú mikrolemezen végeztük, amelyre duplikátumban mértük fel a standard sort, valamint egy példányban a mintákat. A

vizsgálati standard görbe tartománya 70-7000 pg/ml volt. Az optikai denzitást ELISA leolvasóval (Thermo LabSystems Multiskan EX, Vantaa, Finnország) 450 nm-en, illetve 595 nm-en olvastuk le, majd a háttér (595 nm) levonása után, a sKL mennyiségét pg/ml-ben kalkuláltuk. Az így kapott értékeknek a természetes alapú logaritmusát (ln) vettük a további analízisekhez (*Almroth és mtsai 2016*).

3.7. Telomerhossz-meghatározás

Vizsgálatunkban a telomerek hosszát kétféle módszerrel határoztuk meg:

3.7.1. A RT-PCR alapú telomerhossz-meghatározás

A teljes vérből származó genomiális DNS-minták átlagos telomerhosszát (TL) Cawthon-féle PCR-alapú módszerrel határoztuk meg (*Cawthon 2002*), kereskedelemben kapható PCR kit segítségével (ScienCell Research Laboratories inc., San Diego CA Catalog no. #8908). A kitet a gyártó ajánlása szerint használtuk. A PCR reakció során a telomer specifikus primerek felismerik és felsokszorozzák a telomer szekvenciákat. Minden DNS-mintánál, két egymást követő reakciót hajtottunk végre. Az első reakció egykópiás referencia (SCR) gén amplifikálására szolgált. Az itt alkalmazott primerpár egy 100 bp hosszúságú régiót ismer és sokszorosít fel a 17-es humán kromoszómán, és referenciaként szolgál a cél minták telomerhosszának kiszámításakor. A második reakció pedig már a telomer szekvenciára irányult. A PCR reakciókat 20 µl végtérfogatban végeztük, 5 ng referencia/genomiális DNS mintát (végső koncentráció = 0,625 ng/µl), 1-1 µl telomer primert, és 10 µl 2x Master Mixet használtunk. A PCR reakciókat PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) készüléken végeztük, a következő környezetben: először 95 °C 10 percig, majd 32 ciklus 95 °C-on 20 másodpercig, 52 °C 20 másodpercig, végül 72 °C 45 másodpercig. Ugyanazon mintán minden esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

3.7.2. A telomer hosszának becslése

A mérés mellett, a telomerek hosszát meg is becsülhetjük. Ehhez Lu és mtsai által kifejlesztett szoftver állt rendelkezésre, amely a metiláción alapuló telomerhossz (DNAmTL) becslésére szolgál (*Lu és mtsai 2019*).

3.8. A redox homeosztázis meghatározása

A vérben lévő hidrogén-peroxid (H_2O_2) mennyiséget spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg, d-Roms (reaktív oxigén metabolitok származékai) teszt segítségével, a korábban leírtak szerint (*Tsuchiya és mtsai 2008*). A d-Roms teszthez FREE Carpe Diem analizátort (Wismerll Co., Ltd., Tokyo, Japán) használtuk (*Tsuchiya és mtsai 2008*). Az így meghatározott koncentrációkat hagyományos egységekben (Carratelli-egységekben; UCarr) fejeztük ki, ahol 1 UCarr 0,8 mg/l H_2O_2 -nek felel meg. A plazma vas-redukáló képességét, vagyis a redox háztartást, a biológiai antioxidáns erő (BAP) teszt segítségével becsültük. Ezen teszt során, a vas-kloridot egy speciális kromogén szubsztráttal, egy tiocianát-származékkal összekeverve, a vérplazma mintákhoz (10 μ l), és 37 °C-on 5 percig inkubáljuk. A vasion redukációjára az 505 nm-en mért abszorbanciából lehet következtetni. A BAP-méréseket is FREE Carpe Diem analizátorral végeztük. A redox egyensúlyt a BAP/dROM arány (μ mmol/l/UCarr) alapján becsültük meg.

3.9. Statisztikai analízis

Az eredményeket statisztikai próbáknak vetettük alá. Az elemzések során Statistica 13 programot (TIBCO) alkalmaztuk. Először a változók normalitás vizsgálatát végeztük el Shapiro-Wilk teszttel, hogy a megfelelő paraméteres, illetve nem paraméteres próbákat alkalmazhassuk. Vizsgálataink során a csoportok közötti különbség kimutatására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. A kapcsolatok kimutatására Pearson-féle korrelációt végeztünk, ahol a KL szintek, valamint a telomer hosszak voltak a függő változók. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

4. Eredmények

A sKL fehérje szintjét 202 személyben határoztuk meg. Az alanyok adatait az alábbi táblázat mutatja be (2. táblázat).

2. táblázat

A vizsgálat alanyainak tulajdonságai a sKL mérésnél

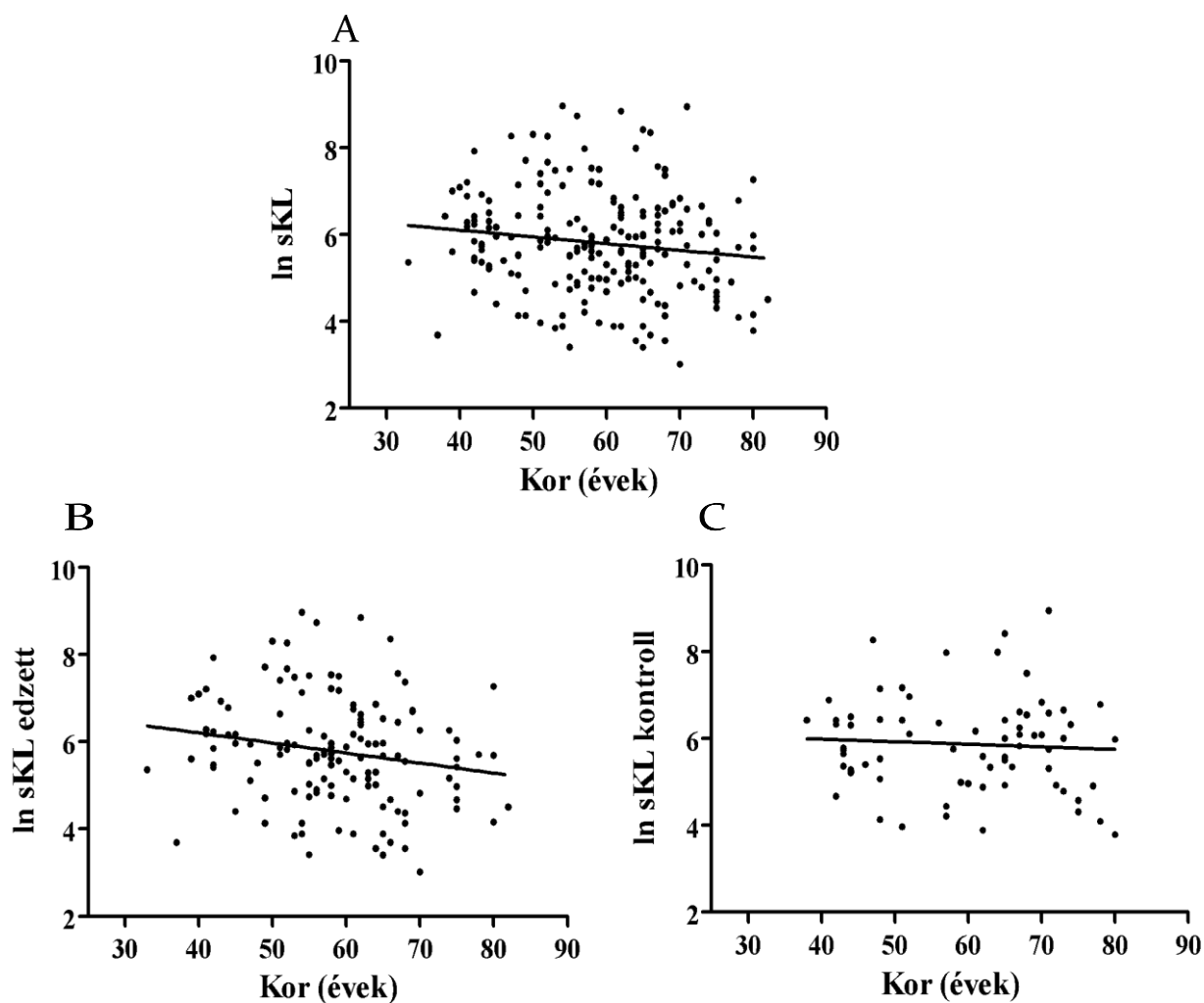
	Master sportoló csoport	Kontroll csoport
n (fő)	131	71
Életkor (évek), átlag±szórás	58,4±10,3	59,5±12,0
Férfi (fő)	80	27
Férfi életkor (évek), átlag±szórás	59,1±10,8	55,6±13,4
Nő (fő)	51	44
Nő életkor (évek), átlag±szórás	57,2±9,4	61,9±10,5
ln sKL, átlag±szórás	5,78±1,24	5,87±1,1
VO ₂ max (ml/kg/perc), átlag	45,0	34,7
Testtömegindex (kg/m ²), átlag	24,8	27,0
Max. felugrási magasság (cm), átlag	31,1	25,3
Max. kézi szorító erő/testsúly, átlag	0,58	0,48
Kognitív teszt, átlag	6,4	6,0
DNAmPhenoAge, átlag	46,5	49,0
DNAmPhenoAge akcerelárációja, átlag	-0,38	0,82
DNAmGrimAge, átlag	58,4	59,5
DNAmGrimAge akcerelárációja, átlag	-0,20	0,02
Redox egyensúly, átlag	6,3	5,3
H ₂ O ₂ , átlag	369,5	420,7
Edzéssel töltött évek száma, átlag	23,9	12,1

Férfiak/ Nők edzéssel töltött évek száma, átlag	25,2/20,9	10,7/12,0
Heti edzés óraszám, átlag	7,2	2,7
Férfiak/ Nők heti edzés óraszám, átlag	6,5/8,1	2,8/2,2

4.1. A sKL szint vizsgálata master sportolóknál

A férfiak esetében a master sportoló csoport, illetve a kontroll csoport átlagéletkora nem különbözött szignifikánsan egymástól (MF vs. KF; $p=0,5297$). Nőknél ellenben, a kontroll csoport szignifikánsan idősebbnek bizonyult (MN vs. KN; $p<0,0001$).

Kohorszunkban a sKL fehérje szérumszintje az életkor előrehaladtával csökkenést mutatott, vagyis negatívan korrelált az életkorról (4A. ábra; parciális $r = -0,14$; $p=0,0439$). Szignifikáns negatív kapcsolat áll fent az evezős Masters Világbajnokságon részt vevők életkora és a sKL szérumszintje között is (4B. ábra; parciális $r = -0,19$; $p=0,0295$). Ellenben nem volt kimutatható összefüggés a sKL és az életkor között a kontroll csoport esetében (4C. ábra; parciális $r = -0,065$; $p=0,5925$).



4. ábra

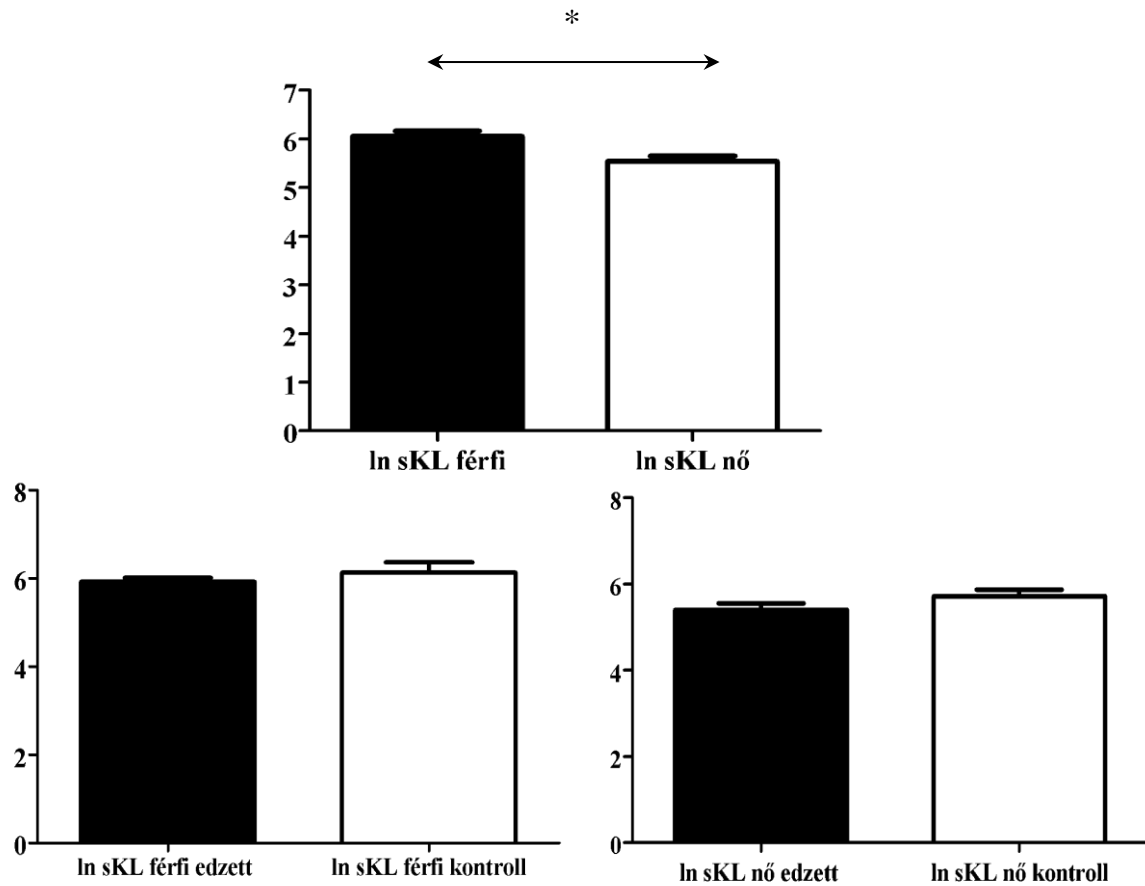
A: A sKL fehérje és az életkor kapcsolata az evezős Master Világbajnokságon résztvevők és a kontroll csoport egyesített mintájában, $n=202$

B: A sKL fehérje és az életkor kapcsolata az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban, $n=131$

C: A sKL fehérje és az életkor kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=71$

A nemek közötti különbséget vizsgálva, a férfi nemhez szignifikánsan magasabb sKL értékek társultak (5A. ábra; férfi: $6,05 \pm 0,12$ pg/ml; nő: $5,55 \pm 0,11$ pg/ml; $p=0,002^*$). A master sportoló és kontroll csoportok között nem adódott szignifikáns különbség a sKL szintek tekintetében egyik nem esetében sem (5B. ábra; férfi master sportoló: $5,92 \pm 0,09$

pg/ml; férfi kontroll: $6,13 \pm 0,23$ pg/ml; $p=0,4080$; 5C. ábra; nő master sportoló: $5,39 \pm 0,15$ pg/ml; nő kontroll: $5,71 \pm 0,15$ pg/ml; $p=0,1459$).



5. ábra

A: A férfiak és a nők átlagos sKL szintjeinek összehasonlítása az evezős Master Világbajnokság résztvevői és a kontroll csoport egyesített mintájában, Jelölt értékek: $\text{átlag} \pm \text{SE}$, a nyíl a szignifikáns különbséget mutatja, *: $p < 0,05$; $n=202$

B: A master sportoló és kontroll csoport sKL szintjeinek összehasonlítása férfiak esetében, jelölt értékek: $\text{átlag} \pm \text{SE}$, $p < 0,05$; $n=107$

C: A master sportoló és kontroll csoport sKL szintjeinek összehasonlítása nők esetében, jelölt értékek: $\text{átlag} \pm \text{SE}$, $p < 0,05$; $n=95$

Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok a következőképpen mutattak összefüggést a sKL szintjével: nagyobb maximális kézi szorító erő magasabb sKL szinttel

társult a master sportoló csoportot vizsgálva (parciális $r= 0,24$; $p=0,0058$). Ellenben nem mutatott összefüggést a kontroll csoport maximális kézi szorító ereje a sKL szinttel (parciális $r= 0,19$; $p=0,1142$). Nem áll fent kapcsolat a kognitív teszt eredményei, a vertikális felugrási teszt eredményei, valamint a Chester-step teszttel becsült VO₂max értékek és a sKL szintek között, egyik csoport esetében sem (3. táblázat).

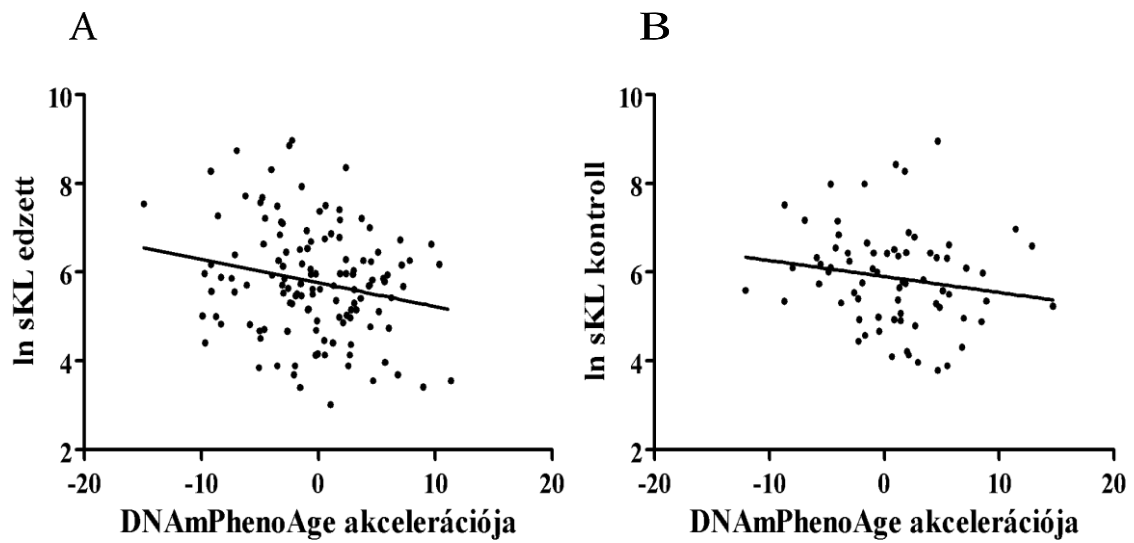
3. táblázat

Az antropometriai, terhelés és kognitív adatok kapcsolatai a sKL szinttel, $p<0,05$; $n=202$

	Master sportoló csoport	Kontroll csoport
Max. kézi szorító erő teszt	$r= 0,24$ * $p=0,0058$	$r= 0,19$ $p=0,1142$
Max. felugrási teszt	$r= 0,13$ $p=0,1513$	$r= 0,16$ $p=0,1943$
Kognitív teszt	$r= 0,10$ $p=0,2368$	$r= 0,15$ $p=0,2232$
Becsült VO₂max	$r= 0,01$ $p=0,8807$	$r= 0,05$ $p=0,7008$

A cukorháztartás (random vércukorszint) és a sKL kapcsolatát vizsgálva, szignifikáns kapcsolatot nem, csak negatív tendenciát találtunk a master sportoló csoport esetében (parciális $r= -0,15$; $p= 0,0900$). E szerint minél magasabb volt a vércukor szint, a sKL szintje annál alacsonyabb volt.

A sKL szint, és a DNAmPhenoAge, valamint a DNAmGrimAge közötti összefüggést vizsgálva az adatok azt mutatták, hogy a sKL összefüggésben áll a PhenoAge-gel, méghozzá úgy, hogy a magasabb sKL szint, lassult DNAmPhenoAge akcelerációval társult a master sportoló csoportban (6A. ábra; parciális $r= -0,21$; $p=0,0192$). Ez az összefüggés azonban nem állt fent a kontroll csoport esetében (6B. ábra; parciális $r= -0,17$; $p=0,1587$).

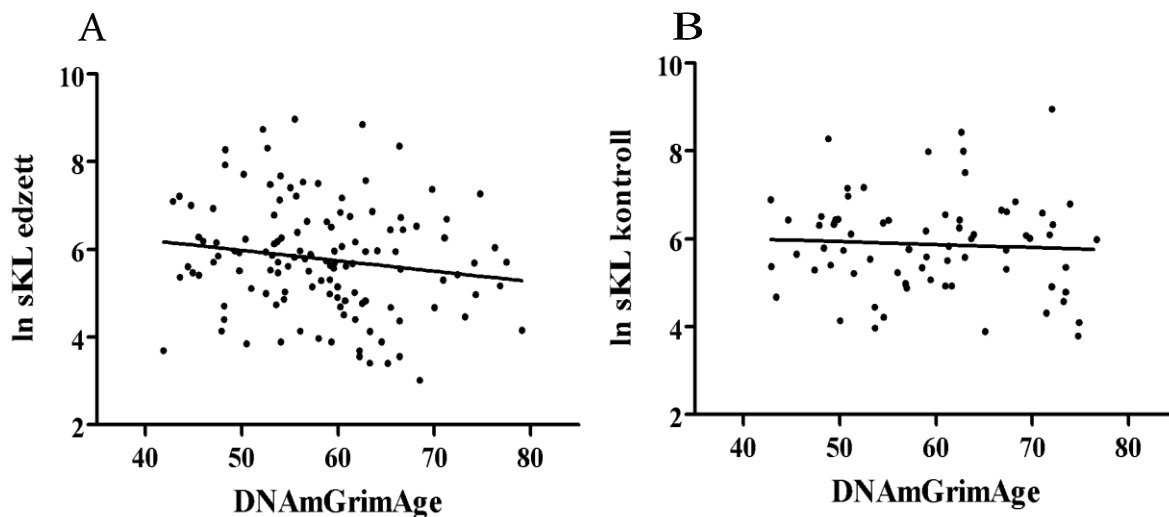


6. ábra

A: A sKL fehérje és a DNAmPhenoAge akcelerációja közötti kapcsolat az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban, n=131

B: A sKL fehérje és a DNAmPhenoAge akcelerációjának kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, n=71

A DNAmGrimAge és a sKL kapcsolatát vizsgálva, negatív tendencia látható a master sportoló csoportban (7A. ábra; master sportoló csoport: parciális $r = -0,16$; $p = 0,0740$; 14. ábra; kontroll csoport: parciális $r = -0,06$; $p = 0,6370$). A DNAmGrimAge akcelerációja azonban semmilyen kapcsolatot nem mutatott a sKL szintjével, egyik csoport esetében sem (7B. ábra; master sportoló csoport: parciális $r = 0,02$; $p = 0,8133$; kontroll csoport: $r = 0,02$; $p = 0,8580$).

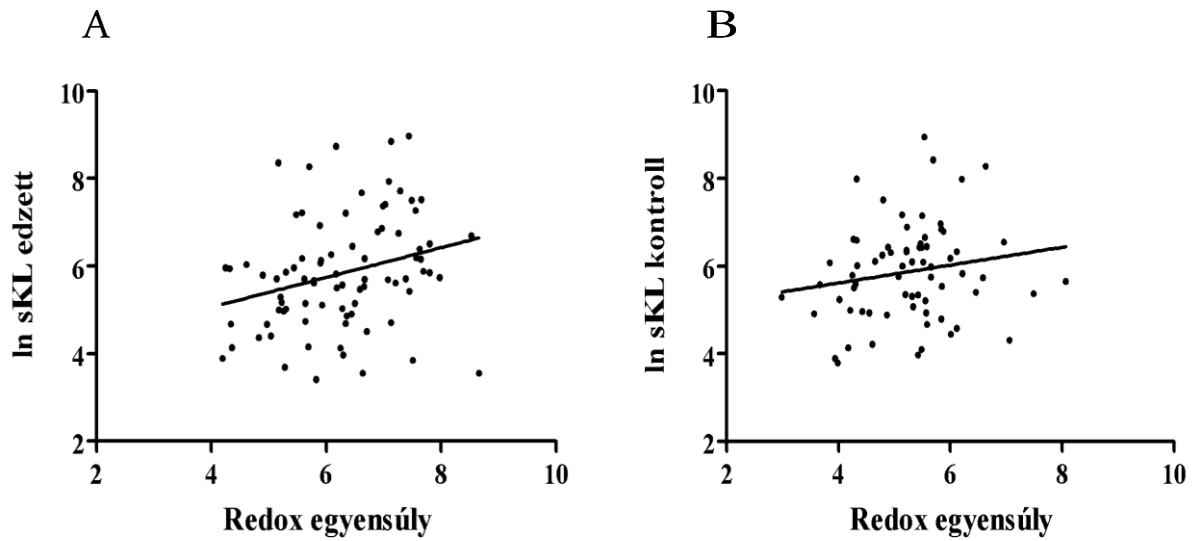


7. ábra

A: A sKL fehérje és a DNAmGrimAge kapcsolata az evezős Master Világbajnokság résztvevőinek mintájában, $n=131$

B: A sKL fehérje és a DNAmGrimAge kapcsolata a kontroll csoport mintájában, $n=71$

Az általunk mért redox egyensúly, és a sKL szintje szignifikáns pozitív összefüggést mutatott a master sportoló csoportot vizsgálva (8A. ábra; parciális $r=0,28$; $p=0,0115$). Azonban a kontroll csoport esetében nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a redox egyensúly és sKL szintje között (8B. ábra; $r=0,17$; $p=0,1497$).

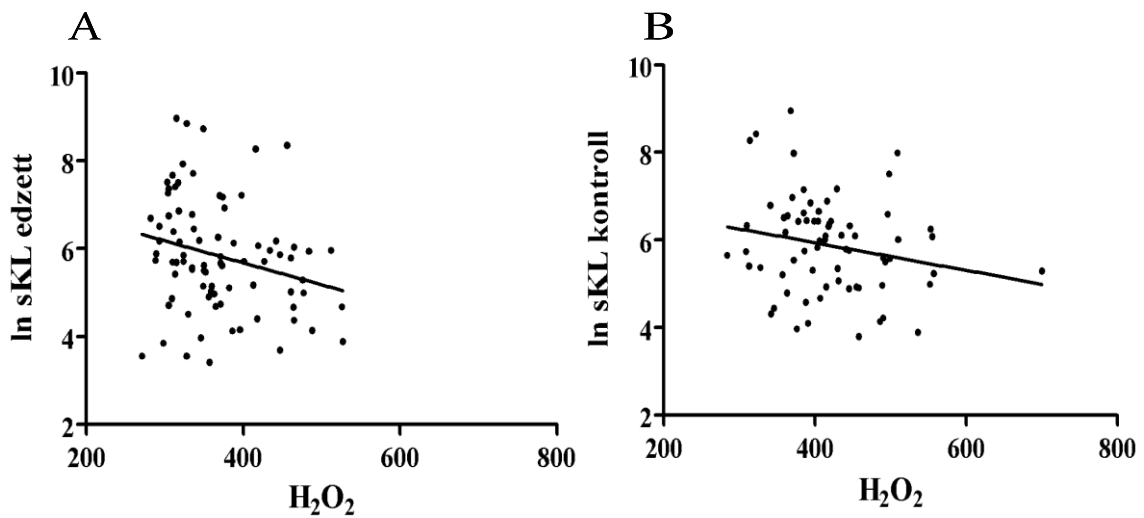


8. ábra

A: A sKL fehérje és a redox egyensúly közötti korreláció az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban, $n=131$

B: A sKL fehérje és a redox egyensúly kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=71$

Master sportolónál a H_2O_2 szint minél magasabb, a sKL szintje annál alacsonyabb volt (9A. ábra; parciális $r = -0,25$; $p=0,0242$), ám az összefüggés nem mutatkozott a kontroll csoportnál (9B. ábra; parciális $r = -0,21$; $p=0,0802$).



9. ábra

A: A sKL fehérje és a H_2O_2 közötti korreláció az evezős Master Világbajnokságon résztvevők mintáiban, $n=131$

B: A sKL fehérje és a H_2O_2 kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=71$

Az alanyok DNS metilációját 850.000 helyen vizsgáltuk. A KL gén promóter régiójában 13 CpG-t metilációs szintjét (béta-érték) határoztuk meg. Ezek alapján azt találtuk, hogy a sKL szint életkorral összefüggő csökkenése, a KL gén promóter régiójának magasabb metilációjához társult. Férfiak esetén pedig, a korrall történő korrigálás után, eltérő régió specifikus metilációs mintázatot találtunk a master sportoló, illetve a kontroll csoport között, amely a női nem esetében nem állt fent.

4.2. Szenior korú sportolók mért és becsült telomerhosszának vizsgálata

A továbbiakban a szenior korú sportolók, illetve a kontroll csoport mért (TL), illetve DNS-metiláció alapján becsült (DNAmTL) értékeit vizsgáltuk. A teljes vérben lévő genomban mért átlagos telomerhosszak összevetését 241 főn végeztük el (4. táblázat).

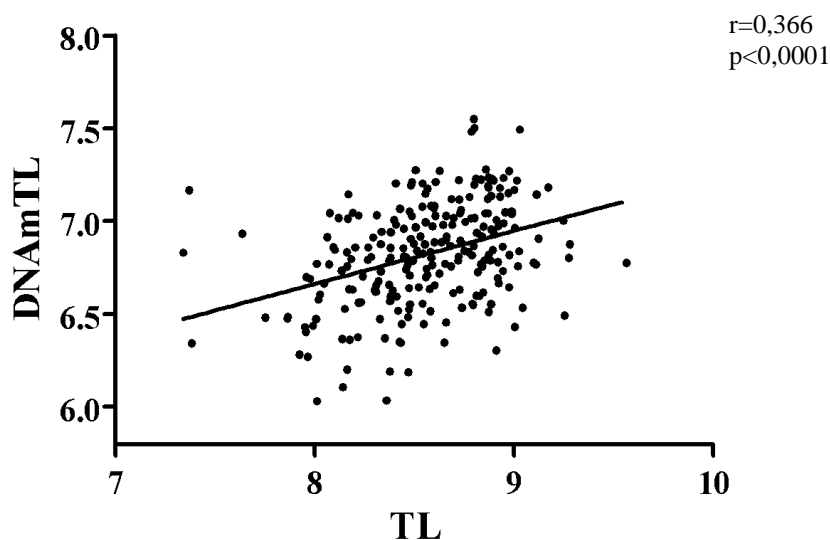
4. táblázat

A vizsgálat alanyainak tulajdonságai a telomer hossz mérésénél

	Master sportoló csoport	Kontroll csoport
n (fő)	146	95
Életkor (évek), átlag±szórás	59±9,7	62±12,3
Férfi (fő)	78	30
Férfi életkor (évek), átlag±szórás	60,0±10,6	60,5±14
Nő (fő)	68	65
Nő életkor (évek), átlag±szórás	57,1±8,4	63,4±11,4
TL, átlag± szórás	8,57±0,36	8,56±0,34
DNAmTL, átlag±szórás	6,85±0,27	6,79±0,29
VO ₂ max (ml/kg/perc), átlag	44,7	33,7
Testtömegindex (kg/m ²), átlag	24,5	27,0
Max. felugrási magasság (cm), átlag	30,6	24,1
Max. kézi szorító erő/testsúly, átlag	0,57	0,46
Kognitív teszt, átlag	6,4	5,9
DNAmPhenoAge, átlag	47,0	51,3
DNAmPhenoAge akcerelárációja, átlag	-0,43	0,63
DNAmGrimAge, átlag	58,5	62,1
DNAmGrimAge akcerelárációja, átlag	-0,25	0,33

Redox egyensúly, átlag	6,1	5,3
H ₂ O ₂ , átlag	376,6	422,4
Edzéssel töltött évek száma, átlag	22,4	12,2
Férfiak/ Nők edzéssel töltött évek száma, átlag	23,9/20,5	11,1/12,7
Heti edzés óraszám, átlag	7,4	2,4
Férfiak/ Nők heti edzés óraszám, átlag	6,7/8,2	2,6/2,3

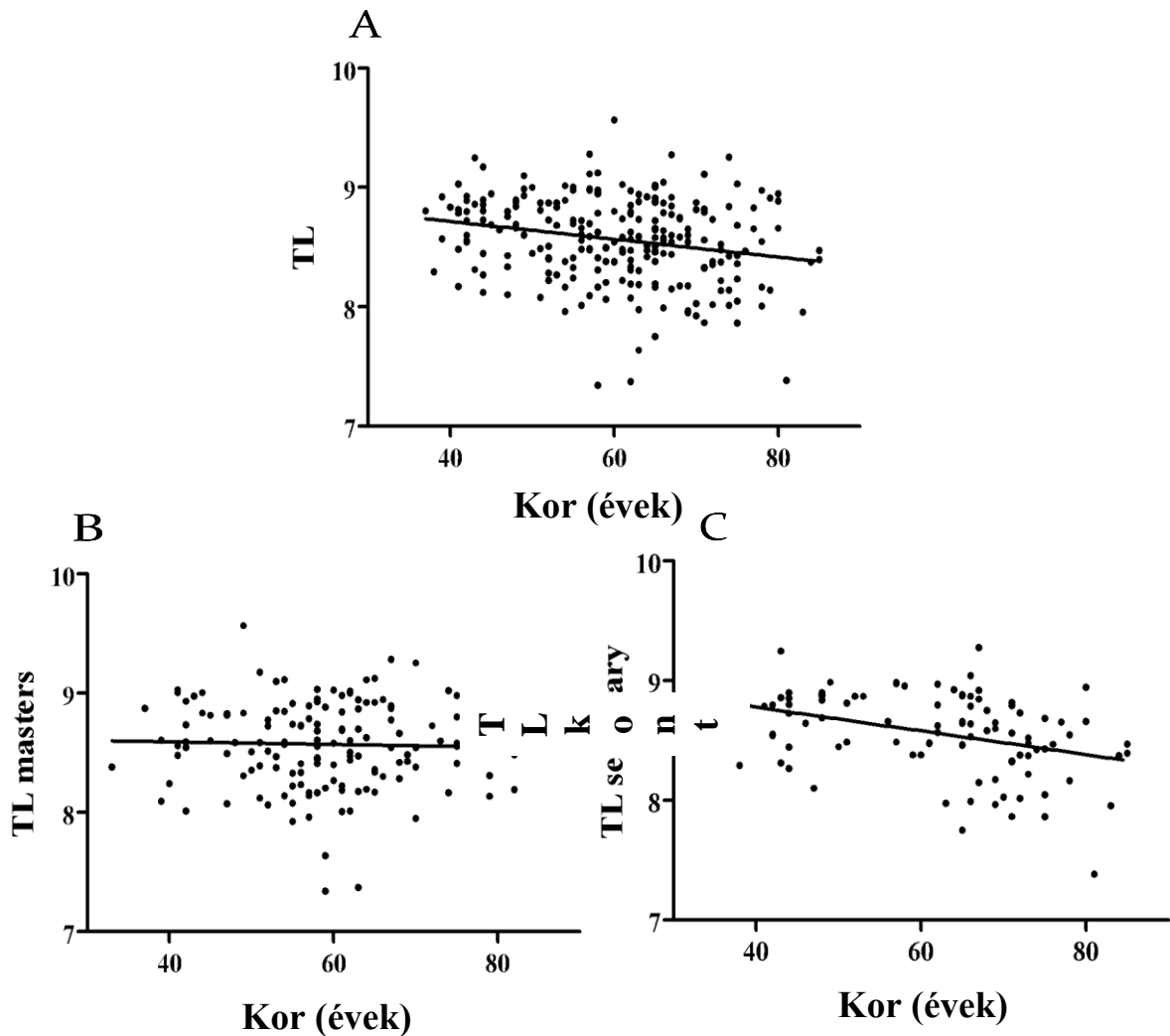
A mért és becsült telomerhosszakat összevetve szignifikáns kapcsolatot találtunk (10. ábra; parciális $r=0,366$; $p<0,0001$).



10. ábra

A TL és az DNAmTL kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és a kontroll csoport egyesített mintájában, $n=241$

Az egész kohorszot nézve, a mért telomerhosszak (TL) negatív korrelációt mutattak az életkorral (11A. ábra; parciális $r= -0,23$ $p=0,0003$). Azonban a TL és az életkor kapcsolata a szenior sportolók esetén már nem volt kimutatható (11B. ábra; parciális $r= -0,03$; $p=0,7142$), míg a kontroll csoportban továbbra is fennállt a negatív korreláció (11C. ábra; parciális $r= -0,35$; $p=0,0004$).



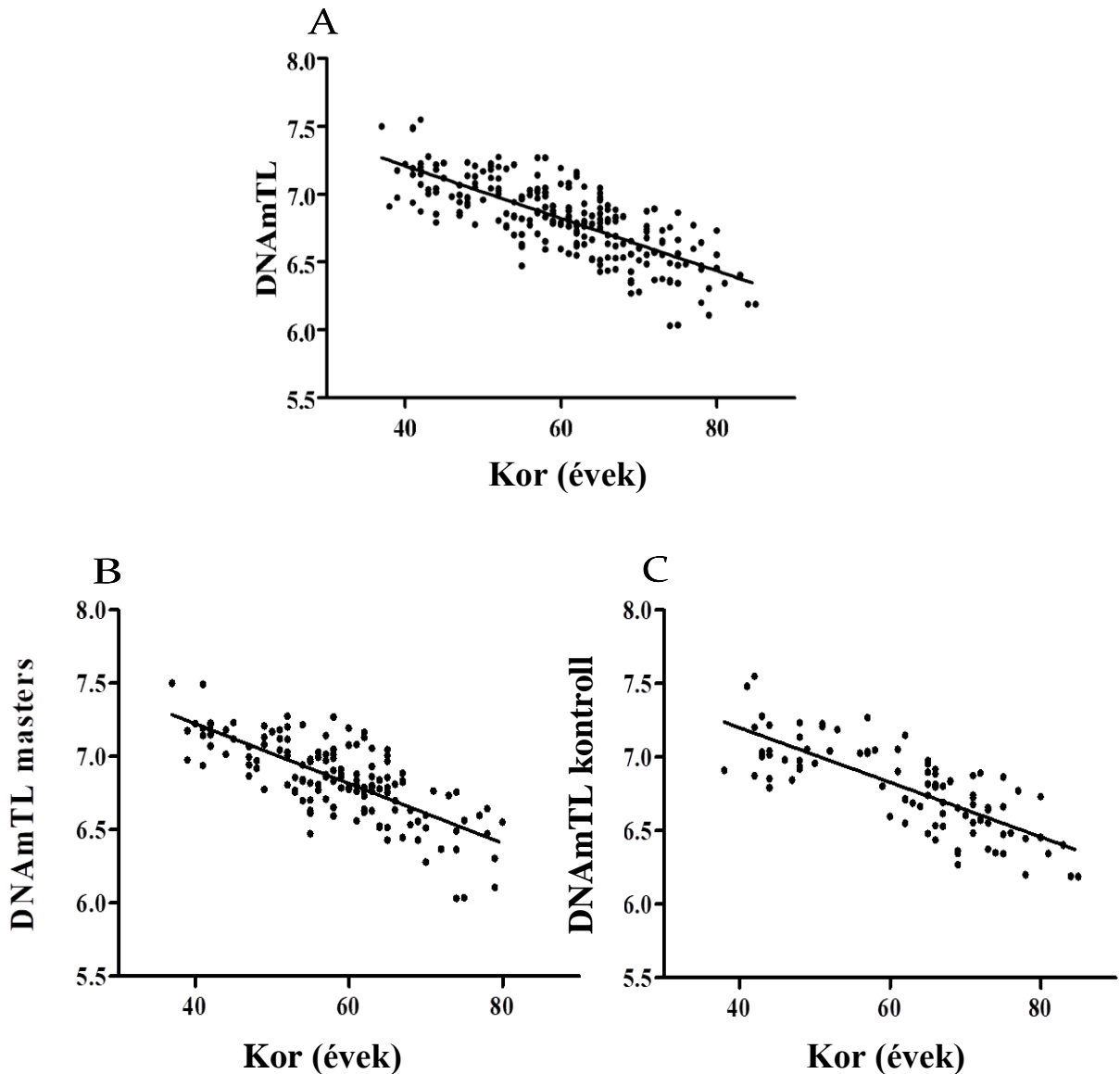
11. ábra

A: A TL és az életkor kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és a kontroll csoport egyesített mintájában, $n=241$

B: A TL és az életkor kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=146$

C: A TL és az életkor kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=95$

Vizsgálatunkban a becsült telomerhossz (DNAmTL) és az életkor között szintén erős, negatív korrelációt találtunk (12A. ábra; parciális $r = -0,75$; $p < 0,0001$). Ez a kapcsolat az egyes csoportok esetén, külön-külön is megmaradt (12B. ábra; DNAmTL szenior sportolók: parciális $r = -0,74$; $p < 0,0001$; 12C. ábra; DNAmTL kontroll: parciális $r = -0,77$; $p < 0,0001$).



12. ábra

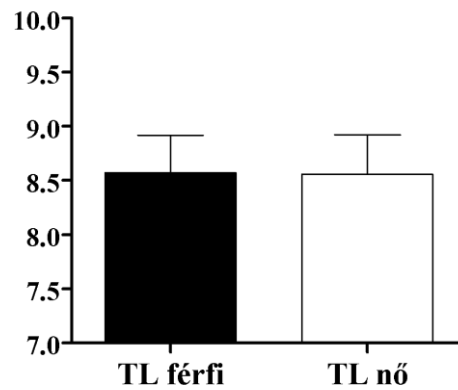
A: A DNAmTL és az életkor kapcsolata a vizsgált szenior korú sportolók és a kontroll csoport egyesített mintájában, $n=241$

B: A DNAmTL és az életkor kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=146$

C: A DNAmTL és az életkor kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=95$

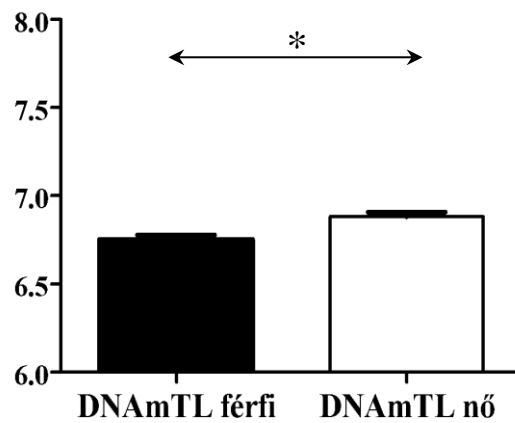
Nemek tekintetében, a mért és a becsült telomerhosszak, valamint az életkor közötti összefüggés mindkét esetben, erősebbnek bizonyult a nők esetében: TL nők: parciális $r=-0,73$; $p<0,05$; TL férfiak: parciális $r=-0,66$; $p<0,05$; valamint DNAmTL nők: parciális $r=-0,78$; $p<0,0001$; DNAmTL férfiak: parciális $r=-0,76$; $p<0,0001$. Férfiak és nők mért

telomerhosszainak átlagai megegyeztek egymással (13. ábra; TL nők: 8,56; TL férfiak: 8,57; $p=0,8168$), míg szignifikánsan hosszabbnak bizonyultak a becsült telomerhosszak a nők esetében (14. ábra; DNAmTL nők: 6,9; DNAmTL férfiak: 6,7; $p=0,0002$).



13. ábra

Férfiak és nők TL-ainak összehasonlítása, jelölt értékek: átlag \pm SE, $p<0,05$, $n=241$



14. ábra

Férfiak és nők DNAmTL-ainak összehasonlítása, jelölt értékek: átlag \pm SE, a nyíl a szignifikáns különbséget mutatja, *: $p<0,05$, $n=241$

Férfiak és nők esetében az alábbi különbségek adódtak az szenior sportolók és a kontroll csoportok között a telomerhosszak tekintetében (5. táblázat).

5. táblázat

A master sportoló és kontroll csoportok telomer hosszainak nemenkénti összehasonlítása, $p < 0,05$; $n = 241$

	MF	KF	MN	KN
TL (átlag)	8,62	8,43	8,51	8,61
p	*0,0106		0,0954	
DNAmTL (átlag)	6,77	6,70	6,93	6,83
p	0,2694		*0,0259	

Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok, valamint a DNAmTL között az alábbi összefüggéseket mutattuk ki (6. táblázat):

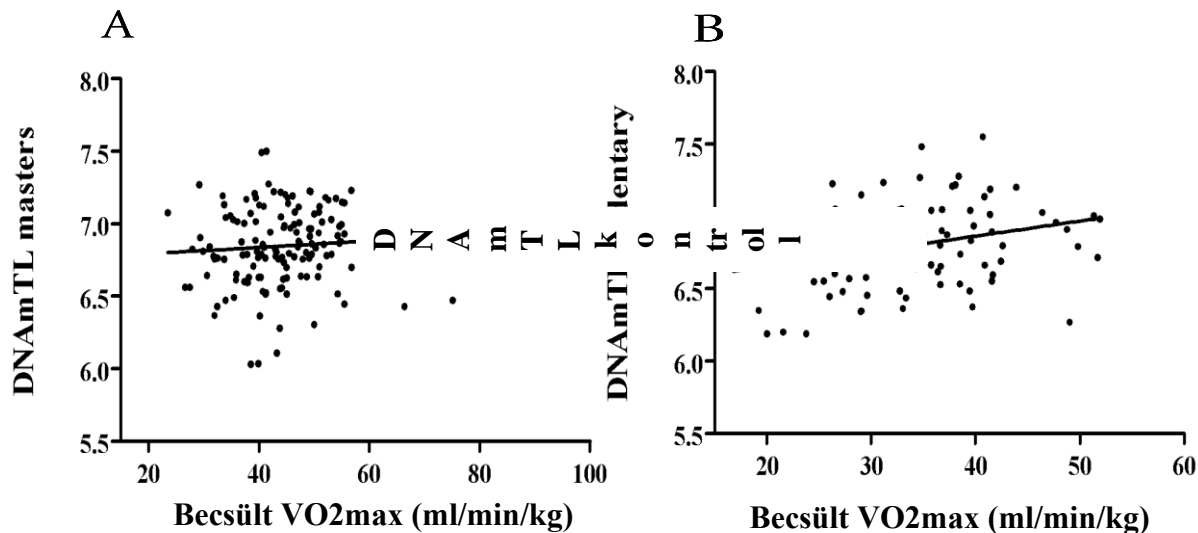
6. táblázat

A becsült telomerhosszak, valamint az antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok kapcsolatai, $p < 0,05$; $n = 241$

Antropometriai és terhelésélettani és kognitív adatok	Pozitív korreláció	Negatív korreláció	Nincs korreláció
Testtömeg index (BMI) master sportoló			$r = 0,11$ $p = 0,1773$
Testtömeg index (BMI) kontroll			$r = 0,99$ $p = 0,3177$
Max. felugrási magasság (cm) master sportoló	$r = 0,23$ $*p = 0,0030$		
Max. felugrási magasság (cm) kontroll	$r = 0,35$ $*p = 0,0003$		
Szorító erő/testsúly master sportoló			$r = 0,05$ $p = 0,5211$
Szorító erő/testsúly kontroll	$r = 0,22$ $*p = 0,0276$		
Kognitív teszt eredmény master sportoló			$r = 0,02$ $p = 0,8275$
Kognitív teszt eredmény kontroll	$r = 0,27$ $*p = 0,0063$		

A maximális oxigén felvételi kapacitás, vagyis a VO_{2max} , sem a master sportoló, (parciális $r = -0,1$; $p = 0,2286$) sem pedig a kontroll csoport (parciális $r = 0,12$; $p = 0,2488$) mért TL-aival nem mutatott kapcsolatot. Azonban, a becsült VO_{2max} értékek pozitívan korreláltak a DNAmTL-szal a kontroll csoport esetében (15B. ábra; parciális $r = 0,29$;

$p=0,0067$), amely pozitív kapcsolatot a master sportoló csoportnál már nem állt fent (15A. ábra; parciális $r=0,08$; $p=0,3414$).

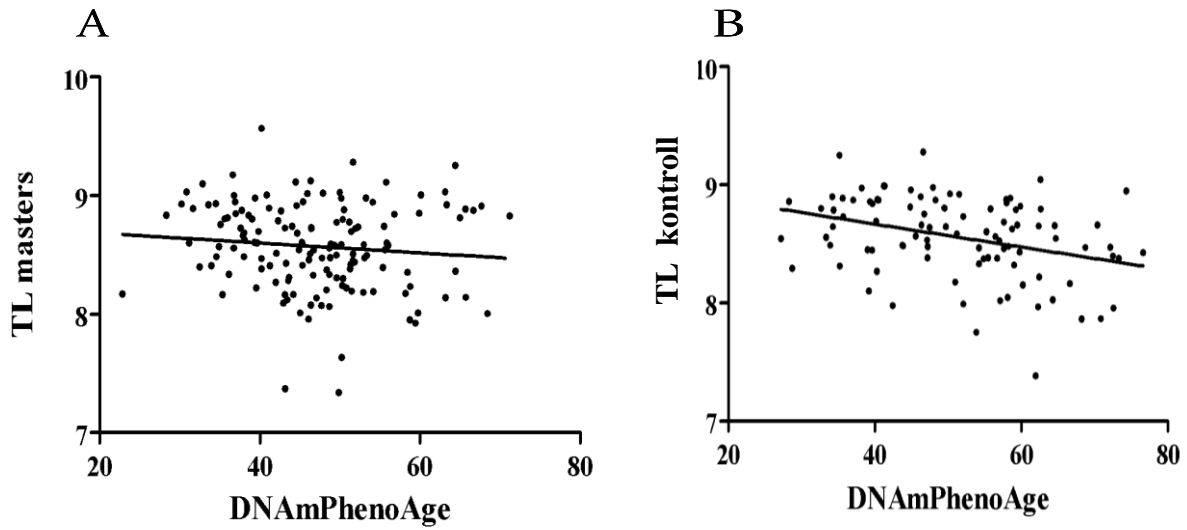


15. ábra

A: A DNAmTL és a VO2max kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=146$

B: A DNAmTL és a VO2max kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=95$

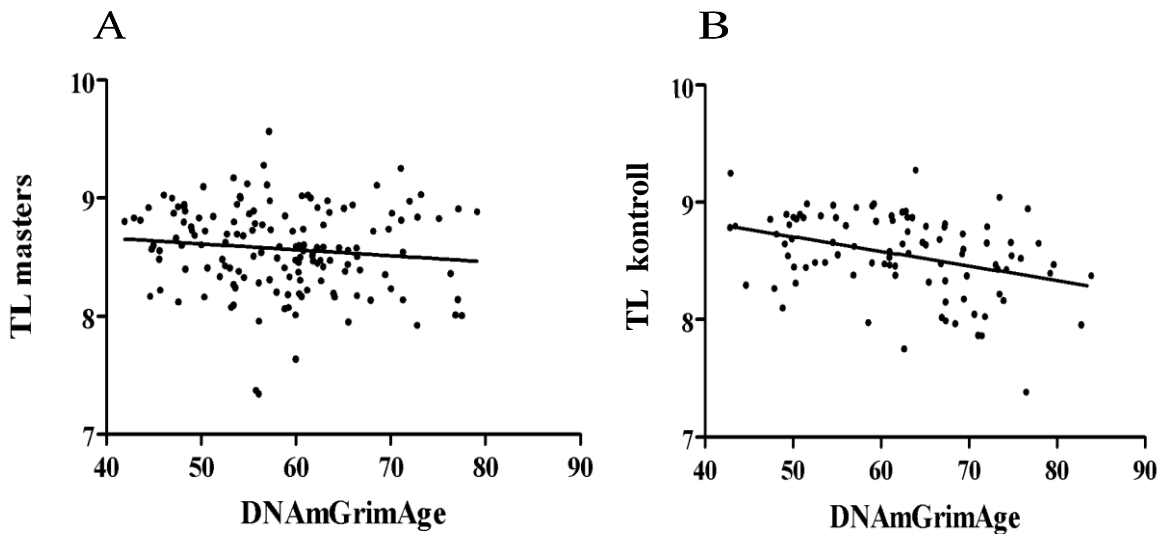
Nem volt kimutatható kapcsolat master sportolók mért TL-ai és az epigenetikai órák között (16A. ábra; DNAmPhenoAge: TL master sportoló: parciális $r= -0,11$ $p=0,2014$; 17A. ábra; DNAmGrimAge: TL master sportoló: parciális $r= -0,12$ $p= 0,1574$). Ezzel ellentétben, a kontroll csoportnál, negatív kapcsolatot állapítottunk meg a TL-ak és az epigenetikai öregedés markerei között (16B. ábra; DNAmPhenoAge: TL kontroll: $r= -0,34$; $p=0,0007$; 17B. ábra; DNAmGrimAge: TL kontroll: parciális $r= -0,36$, $p= 0,0004$).



16. ábra

A: A TL és a DNAmPhenoAge kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=146$

B: A TL és a DNAmPhenoAge kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=95$



17. ábra

A: A TL és a DNAmGrimAge kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=146$

B: A TL és a DNAmGrimAge kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=95$

A DNS alapú TL becslés valamint, a DNAmPhenoAge és DNAmGrimAge között erős kapcsolatot találtunk, ami nem változott a master sportolóknál sem. A DNAmPhenoAge

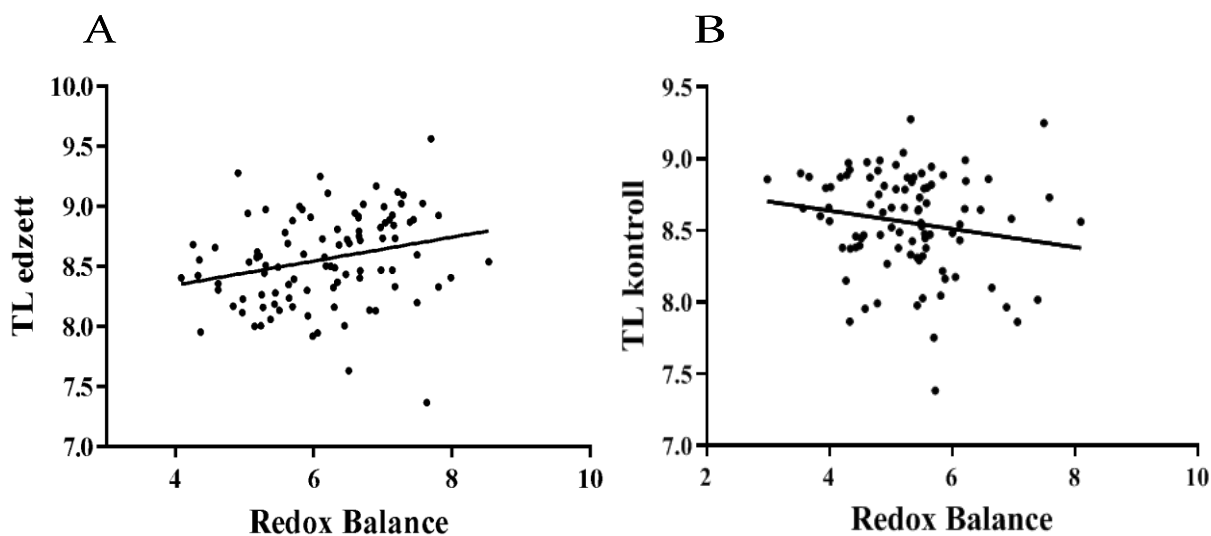
gyorsulása és DNAmTL kapcsolata a szenior sportolók esetében nem bizonyult szignifikánsnak. A DNAmGrimAge gyorsulásának kapcsolatát vizsgálva a DNAmTL-lel, az eredmények azt mutatták, hogy a hosszabb telomerek lassult, öregedéssel társultak, mind a master sportolók, mind a kontrollok esetében (7. táblázat).

7. táblázat

Az epigenetikai órák és a DNAmTL kapcsolatai, $p < 0,05$; $n = 241$

DNAmTL	Master sportoló	Kontroll
DNAmPhenoAge	$r = -0,75$; $p < 0,0001$	$r = -0,79$; $p < 0,0001$
PhenoAgeAccel	$r = -0,16$; $p = 0,062$	$r = -0,26$; $p = 0,0126$
DNAmGrimAge	$r = -0,76$; $p < 0,0001$	$r = -0,82$; $p < 0,0001$
GrimAgeAccel	$r = -0,28$; $p = 0,0006$	$r = -0,20$; $p = 0,0497$

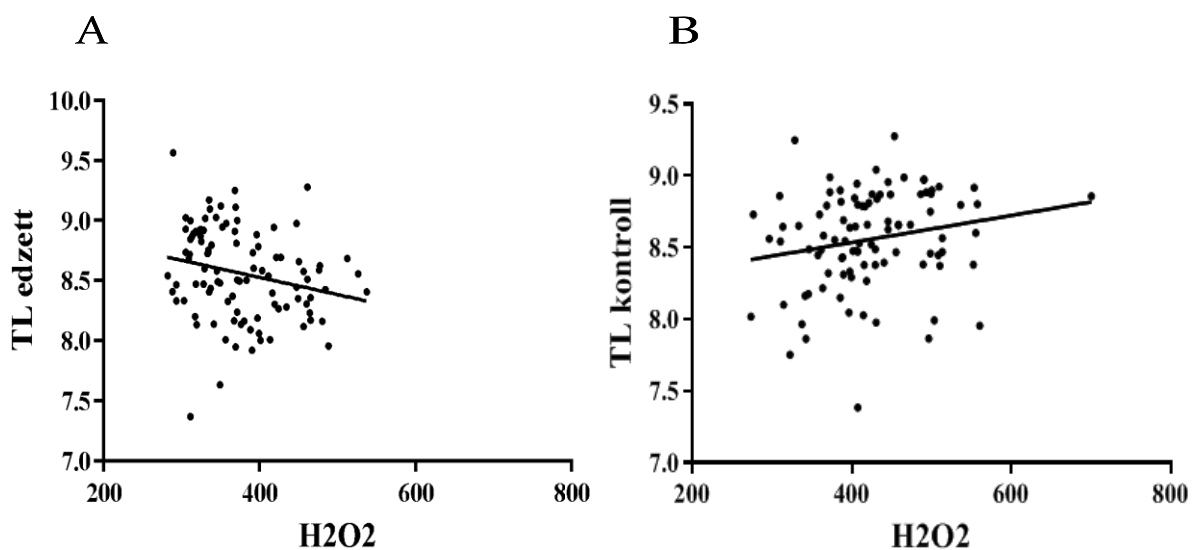
A redox háztartás, valamint a telomerhosszak kapcsolata a következőképpen alakult: A mért TL hosszak pozitív kapcsolatot mutattak a redox háztartással sportolók esetében (18. ábra; parciális $r = 0,26$; $p = 0,0106$), míg a kontroll csoport esetében nem állt fenn kapcsolat (parciális $r = 0,17$; $p = 0,0925$). A TL és H_2O_2 kapcsolata szenior sportolóknál szignifikánsan negatívnak bizonyult (19. ábra; parciális $r = -0,23$; $p = 0,0213$), míg nem a sportolóknál csak pozitív tendenciát láthatunk (parciális $r = 0,20$; $p = 0,0517$). Nem állt fenn összefüggés a becsült DNAmTL és a redox háztartás esetén.



18. ábra

A: A TL és a redox háztartás kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=131$

B: A TL és a redox háztartás kapcsolata a kontroll csoport mintáiban, $n=71$



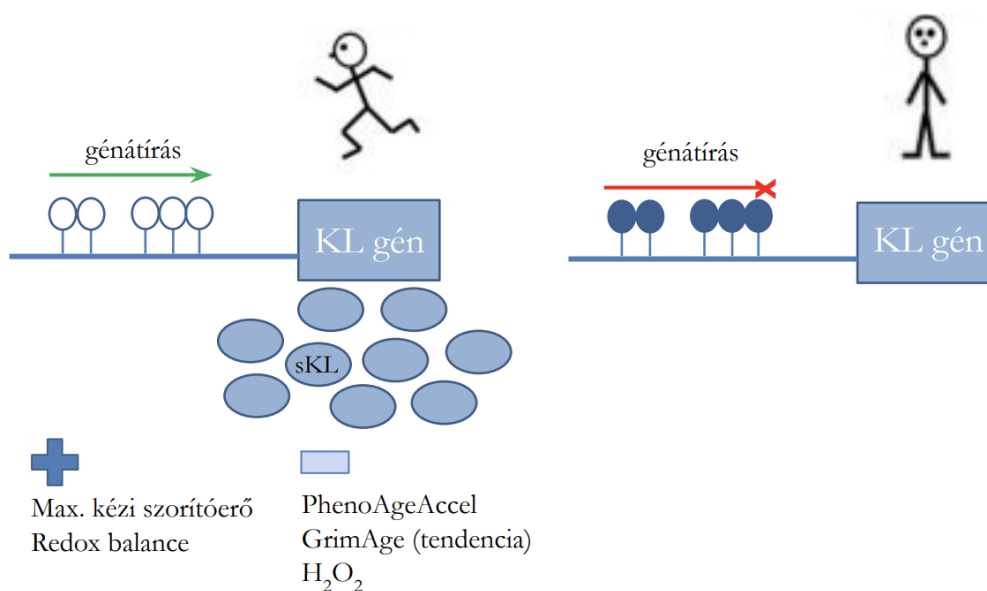
19. ábra

A: A TL és a H₂O₂ kapcsolata szenior korú sportolók mintáiban, $n=131$

B: A TL és a H₂O₂ vizsgálata a kontroll csoport mintáiban, $n=71$

5. Diszkusszió

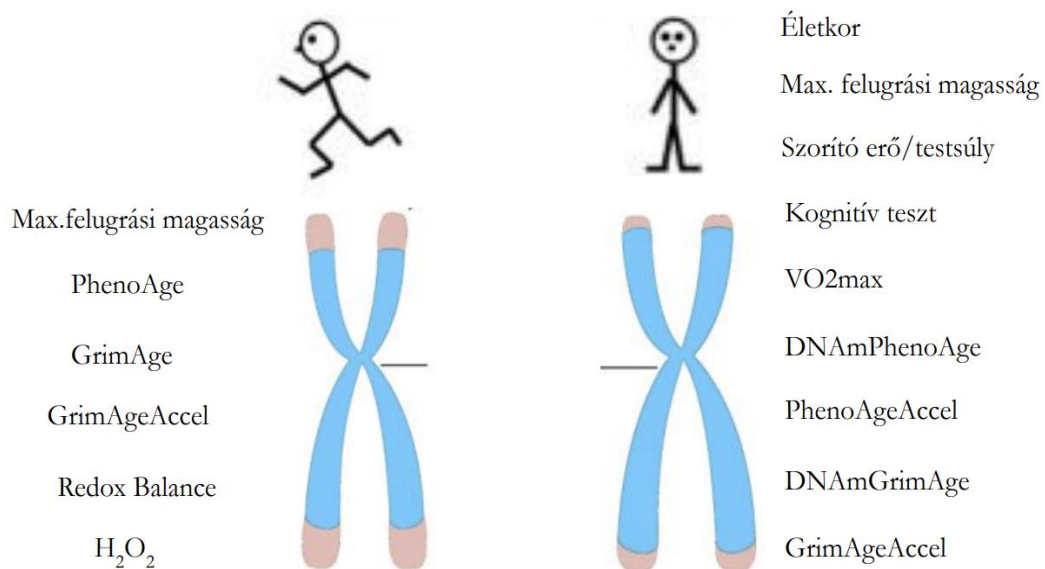
Kutatásunkban evezős masters sportolók öregedési és epigenetikai paramétereit vizsgáltuk, azonos korú és nemű kontroll csoporthoz viszonyítva molekuléris technikákkal. Az ELISA módszerrel mért sKL szintje, a vizsgált kohorszban, erős negatív kapcsolatot mutatott az életkorral master sportolók esetén. A sKL szint életkorral összefüggő csökkenése, a KL gén promóter régiójának eltérő régió specifikus metilációs mintázatához társult férfi master sportolóknál. A Klotho fehérje szintje szignifikáns kapcsolatot mutatott a maximális kézi szorítóerővel, de nem volt kimutatható kapcsolat a maximális felugrási és a becsült VO₂max értékekkel, valamint a kognitív funkciókkal. Masters sportolóknál, a magasabb sKL szint lassult DNAmPhenoAge akcelerációval társult. A DNAmGrimAge és a sKL kapcsolatát vizsgálva ugyanennél a csoportnál, negatív tendencia volt látható. Érdekes összefüggéseket láthattunk a sKL és a szervezet redox egyensúlyával kapcsolatban: a master sportolók csoportjában mért redox egyensúly és a sKL szintje szignifikáns pozitív összefüggést mutatott, míg a H₂O₂ szintje negatívan korrelált a sKL szintjével (20. ábra).



20. ábra

A KL gén metilációjának, valamint a sKL fehérje szintjének általunk feltárt kapcsolatai (saját ábra)

Masters sportolók PCR módszerrel mért TL-ait vizsgálva nem láttunk kapcsolatot az életkorral, negatív kapcsolat azonban, a kontroll csoport esetén fenállt. A becsült DNAmTL a master sportoló és kontroll csoportokban egyaránt negatívan korrelált az életkorral. Ami a nemek közötti különbséget illeti, férfi master sportolóknál szignifikánsan hosszabb telomerhosszakot mértünk, míg a DNAmTL a női kontroll csoportnál volt szignifikánsan hosszabb. Érdekes látni, hogy minél magasabbak voltak a becsült VO₂max értékek, annál hosszabbak voltak a becsült telomerhosszak a kontroll csoportban. Szignifikáns pozitív kapcsolat állt fent a DNAmTL, valamint a maximális felugrási magasság és a kézi szorítóerő/testsúly hányados értékek között. Az epigenetikai órák a TL-szal kizárólag a kontroll csoportnál mutattak szignifikáns negatív kapcsolatot. A DNS alapú TL becslés valamint a DNAmPhenoAge és DNAmGrimAge között erős negatív kapcsolatot találtunk mind master sportolóknál, mind a kontroll csoportnál. Master sportolóknál a TL-ak pozitív kapcsolatot mutattak a redox háztartással, valamint negatívan korreláltak a H₂O₂ -vel (21. ábra).



21. ábra

Szenior sportolók és a kontroll csoport telomer hosszainak általunk feltárt kapcsolatait (saját ábra)

Az öregedés egyik legszembeötlőbb hatása a fiziológiai funkciók megváltozása. Azonban ismerjük, hogy a rendszeres fizikai aktivitás ellensúlyozza az öregedéssel együtt járó negatív hatásokat, csökkenti a morbiditást és a mortalitást és nyújtja az aktív élettartamot. Továbbá azt is tudjuk, hogy az öregedés előrehaladásának sebessége a genetikai tényezők mellett, a környezet és az életmód, és így a rendszeres testmozgás, által is erősen befolyásolt (*Radak és mtsai 2019*). Az edzés elmaradása ugyanakkor, súlyos betegségek kialakulásához vezethet (*Booth és mtsai 2012*).

Ugyan a genetika ugyan erősen befolyásolja az edzetséget, edzhetőséget, azonban a rendszeresen végzett testmozgás nagyban javíthatja a felmenőink által meghatározott paramétereket (*Radak és Taylor 2022*). Kutatásunk eredményei azt mutatják, hogy a sKL fehérje mennyisége nagymértékben függ a DNS edzés által módosított metilációjától. Ez azért is jó hír, mivel a DNS epigenetikai módosulását az életmód befolyásolni tudja, és így az életkorral összefüggő megnövekedett KL gén metiláció, és ezzel összefüggésben a keringő KL fehérje csökkenése, életmódbeli változtatásokkal mérsékelhető lehet. Eredményeink összhangban vannak Azumo és mtsai megállapításával, miszerint a KL promóter régiójának metilációja összefüggésbe hozható a keringő KL szintjével (*Azuma és mtsai 2012*). Emellett, a KL promóter régiójának metilációját és a keringő KL szintjének kapcsolatát mutatták ki perifériás vérsejtjeiben kardiovaszkuláris betegségben szenvedőknél. A betegekben erősen metilált KL promóter régióhoz alacsony keringő KL szint társult. Továbbá, a KL gén expressziója fordítottan volt arányos a proinflammatorikus markerek, mint például az interleukin-10, a tumor nekrozis faktor szintjével, de egyenes volt arányos az anti-inflammatorikus fehérjékkel (*Martín-Núñez és mtsai 2022*). Fiatal és idős egereken végzett vizsgálatok alapján a sKL szintjében, szignifikáns növekedés volt kimutatható akut testmozgásra válaszul (*Avin és mtsai 2014*). A KL knockout (KO), KL overexpresszált (EFmKL46) és vad típusú egerek közül a KO állatok szignifikánsan gyengébbek voltak a vad típusú és az overexpresszált állatokhoz képest. Érdekes módon, a futás sebességében nem adódott különbség a csoportok között, de a KO állatok körülbelül 60%-kal rövidebb ideig bírták a terhelést (*Phelps és mtsai 2013*). Bár a keringő KL szintje és a fizikai fittség (VO₂max) között nem volt kimutatható a kapcsolat, egy korábbi (*Semba és mtsai 2012*), és a jelen vizsgálat is azt mutatta ki, hogy a jobb maximális kézi szorító eredményekhez, magasabb sKL szintek társulnak a master sportoló csoportban. Továbbá, fiatal és idős egyéneken végzett klinikai kísérleti

eredmények arra utalnak, hogy a keringő KL szintje akut edzés hatására upregulálódik, de a válasz függhet a fittségi szinttől (*Avin és mtsai 2014*). Az izomerő és a KL kapcsolatáról korábban már azt is leírták, hogy az alacsony KL szint a térdfesztető izom gyengébb működésével függ össze (*Semba és mtsai 2016*). Érdekes módon azonban, a keringő KL szint nem korrelál az ember négyfejű comb izomzatában mért KL szintekkel (*Patel és mtsai 2016*). Mivel az erőt, az izomtömeg mellett az anabolikus hormonok szintje is befolyásolja, nem zárható ki, hogy ezen hormonok magasabb szintje, összefügg a KL szintjével. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy növekedési hormon beadása megemeli a keringő KL szintjét (*Sato és mtsai 2019*). Valamint, növekedési hormon hiányos gyermekeket GH-val kezelve, a növekedés sebességének gyorsulása szignifikánsan összefüggött a keringő KL szinttel és az IGF-1 szintjével egyaránt (*Guarnotta és mtsai 2022*). A növekedési hormon útvonala az IGF-1-en keresztül kapcsolódik a glükóz metabolizmus útvonalához. Kutatásunk során vizsgáltuk a sKL szintje és a vércukorszint közötti esetleges összefüggést, ahol szignifikáns kapcsolatot nem is, de negatív tendenciát láttunk a master sportoló csoport tagjainál. Korábbi kutatások vizsgálták a KL szintjét korai stádiumú diabéteszes nefropátiában, és sikerült is kimutatni a KL protektív hatását hiperglikémiában. Az említett hiperglikémiás állapotban a membránhoz kötött KL szintje csökkent a veseszövetben, a szérum KL szintje ellenben növekedett, míg a vizeletben jóval alacsonyabb kiválasztott KL fehérje szint volt mérhető. A KL feltehetőleg a veseszövet nagy részét alkotó podociták FGF receptorain (FGFR) keresztül hat. A KL szubsztitúció visszaállította a hiperglikémia miatt csökkent FGFR-k, különösen az FGFR1/FGFR2 szintjét (*Typiak és mtsai 2021*).

A sKL szint életkorral összefüggő csökkenését már régóta ismerjük (*Kuro-o és mtsai 1997; Yamazaki és mtsai 2010; Siahaniidou és mtsai 2012*), azonban a sKL és a DNS-metiláción alapuló epigenetikai órák kapcsolatát eddig még nem vizsgálták. Mint már korábban is láthattuk, a DNAmPhenoAge és a DNAmGrimAge órákat azért alkották meg, hogy felmérjék a környezeti hatásoknak és az életmódnak, az öregedés folyamatára, a morbiditásra, és a mortalitásra gyakorolt hatását (*Raj és Horvath 2020*). A kutatások alátámasztják, hogy szoros összefüggés áll fent az epigenetikai órák gyorsulása, valamint a mortalitás, a szív- és érrendszeri betegségek, a daganatos megbetegedések, és a cukorbetegség között (*Oblak és mtsai 2021*). Kutatásunkban a sKL alacsonyabb szintje összefüggött a DNAmPhenoAge gyorsulásával a master sportoló csoport esetében,

még hozzá, úgy, hogy a “felgyorsult PhenoAge”, alacsonyabb keringő KL szinttel társult. Úgy tűnik tehát, hogy a magasabb sKL szint lassíthatja a DNS metiláción alapuló öregedést.

Érdekes továbbá, hogy pozitív összefüggés mutatható ki a master sportoló csoport sKL szintje és a redox háztartás között, amely kapcsolatot nem láthatjuk a kontroll csoportnál. Ezek szerint tehát, az évtizedeken át testedzést végzők esetén, a magasabb sKL szint, jobb redox egyensúlyhoz társul. Összhangban áll ezzel az is, hogy a H₂O₂ szintje a master sportoló csoportban a sKL szintjével szignifikánsan kapcsolatos, de ellentétesen változott, amit korábbi kutatások is alátámasztottak már (*Kuro-o 2008; Kuro-o, 2019*).

Ismert továbbá, hogy a csökkent sKL szint számos humán betegségben kimutatható, növelheti a magas vérnyomás (*Drew és mtsai 2021*) a krónikus vesebetegségek (*Donate-Correa és mtsai 2021*), az intersticiális tüdőbetegségek (*Buendia-Roldan és mtsai 2019*), a cukorbetegség talaján kialakuló retinopátia (*Corcillo és mtsai 2020*) és az Alzheimer-kór kialakulásának kockázatát (*Paroni és mtsai 2019*) valamint a daganatos megbetegedések progresszióját is gyorsíthatja (*Shmulevich és mtsai 2020*). A keringő hormon szintje továbbá befolyásolhatja olyan kardiovaszkuláris betegségek kialakulását is, mint amilyen például a pangásos szívelégtelenség, a koronáriás szívbetegségek és a miokardiális infarktusz (*Xu és mtsai 2022*). Érdekes módon a rendszeres testmozgás jótékonyan befolyásolja az összes itt felsorolt betegséget (*Radak és mtsai 2008; Radak és mtsai 2018; Radak és mtsai 2020; Aczel és mtsai 2022*), ami arra utalhat, hogy a testmozgás egyes szisztémás hatásait az edzés által megemelt sKL közvetítheti. A KL fehérje alacsony szintje a betegségeken kívül, a halálozáshoz is kapcsolódik, még hozzá oly módon, hogy növeli annak kockázatát (*Kresovich és Bulka 2022*).

Az emberi sejtek öregedését, aminek egyik mérőszáma a telomerek hossza, erősen befolyásolják különböző környezeti és életmódbeli tényezők. Tudjuk, hogy a telomerhosszak összefüggést mutatnak a betegségek kialakulásának kockázatával, valamint a halálozással (*Schneider és mtsai 2022*). Vizsgálatunkban a mért és becsült átlagos telomerhosszak, valamint az életkor között kimutatott összefüggés a korábbi kutatásokkal összhangban áll, és alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a telomer hossza a kor előrehaladtával csökken (*Aubert és Lansdorp 2008; Giardini és mtsai 2014*). Érdekes azonban, kizárólag kohorszunk kontroll csoportjában láthatunk szignifikáns

kapcsolatot a telomer hossza és az életkor között, a master sportoló csoportban ez a kapcsolat már nem áll fenn.

A jelenlegi vizsgálat eredményei is igazolták azt a korábbi feltevést, miszerint (*Barrett és Richardson 2011*) a nemek között különbség van a telomerek hosszának tekintetében. Vizsgálatunkban a mért és a becsült telomerhosszak, valamint az életkor közötti összefüggés mindkét esetben, erősebbnek bizonyult a nők esetében. Ismert, hogy a hosszabb életű sejtvonalakban az aktív X-kromoszómának hosszabb telomerje van, mint az inaktív X kromoszómának (*Surrallés és mtsai 1999*). Továbbá, a férfiak Y-kromoszómája kevésbé védett, és így hajlamosabb a telomer rövidülésére (*Gou és mtsai. 2020*). A nemek közötti különbséget az eltérő telomeráz aktivitás is okozhatja (*Kyo és mtsai 1999*), vagy, hogy a telomerek hosszára az ösztrogénnek is hatása van, amiről Lin és munkatársai számoltak be. Esetükben az ösztrogén terápiában részesült, posztmenopauzás nőknél, hosszabb telomert mértek, alacsonyabb telomeráz aktivitás mellett (*Lin és mtsai 2011*).

A kognitív funkciók és fizikai teljesítmény életkorral összefüggő romlása ugyan életszerű, de mértéke nagymértékben összefügg a fizikai erőnlét szintjével (*Booth és Roberts 2008*). Ezért is fontosak telomerhossz és a fiziológiai funkciók közötti összefüggések (*Nordfjäll és mtsai 2008; Colon és mtsai 2019; Buttet és mtsai 2022*), amiket kutatásunkban mi is vizsgáltunk. Kohorszunkban az egyes antropometriai, terhelésélettani és kognitív adatok, valamint a telomer hossza között kapcsolat van, ebből következik, hogy ezek a mutatók hatással lehetnek az öregedésre. Nordfjäll és mtsai negatív kapcsolatot tártak fel az obezitás és a telomerhossz között nők esetében (*Nordfjäll és mtsai 2008*). Továbbá, egy másik kutatócsoport, a mediterrán diéta és a telomer hossza között állapított meg pozitív kapcsolatot (*Canudas és mtsai 2020*). Jelen kutatás alapján kimutatható összefüggés van a maximális felugrási magasság és a telomerek hossza között. Érdekes, hogy a szorító erő és a kognitív teszt eredményei, kizárólag a kontroll csoportban mutattak pozitív kapcsolatot a telomerhosszal. Irodalmi adatok szerint a hosszabb telomerhosszhoz a későbbi életszakaszban erősebb kézi szorítóerő eredmények társulnak (*Chang és mtsai 2021*).

2010 óta tudjuk, amit azóta több tanulmány is megerősített, hogy a magasabb szintű kardiovaszkuláris fittség, vagyis a magasabb VO₂max, hosszabb telomerhez társul

(LaRocca és mtsai 2010; Østhus és mtsai 2012; Colon és mtsai 2019; Brandao és mtsai 2020). Egy, a közelmúltban végzett vizsgálat is arra a következtetésre jutott, hogy a testmozgás pozitív hatással van a telomerek hosszára (Schellnegger és mtsai 2022). Érdekes, és továbbra sem tisztázott azonban az a kérdés, hogy a különböző edzésmódszerek (edzés intenzitása, időtartama, a gyakorlatok típusai stb.) pontosan milyen hatással lehetnek a telomerek hosszára? Az életmódból adódó tényezőket vizsgálva kimutattuk, hogy az Evezős Masters Világbajnokság résztvevői esetében, a becsült VO₂max értékekhez szignifikánsan hosszabb becsült telomer értékek társultak, amik alátámasztják a fizikai fittség és a hosszú évtizedeken át tartó testedzés fontosságát. Azonban, a kutatás keresztmetszeti jellege miatt a fizikai fittség szintje és a telomer hosszúsága közötti összefüggést óvatosan kell kezelni. Az eddigi keresztmetszeti és longitudinális vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az állóképességi gyakorlatok rendszeres végzése, hosszabb telomert eredményez, ám a mögöttes mechanizmusok még nem ismertek. Valószínűsíthetően, összefüggésben állhat fent az antioxidáns rendszerek testmozgás által kiváltott fokozott működésével (Radak és mtsai 2013), mivel a megnövekedett oxidatív stressz rövidebb telomerekkel jár (D’Mello és mtsai 2015). Vizsgálatunkban a redox háztartás erős pozitív, valamint a H₂O₂ negatív kapcsolata a telomer hosszakkal sportolók esetében, szintén ezt igazolja. A testmozgás egészségfejlesztő hatásai jól dokumentáltak (Quan és mtsai 2020; Hortobágyi és mtsai 2022), de tudomásunk szerint eddig még nem bizonyították, hogy ezek a változások összefüggésbe hozhatók-e a telomerhosszal és az epigenetikával, azon belül is a DNS-metilációval? Bár Surrallés és munkatársai már 1999-ben kimutatták, hogy a telomerek rövidülése hatással lehet a hiszton acetilációra (Surrallés és mtsai 1999), azóta is, újabb és újabb megválaszolatlan kérdésekkel kerülnek elő a témában. Azóta tudjuk már, hogy az epigenetikai biomarkerek pontosabban tükrözik az egyén öregedését, mint a kronológiai életkor (Lee és mtsai 2019), és azt is kimutatták már, hogy ezek markerek a telomerhosszúsággal állnak kapcsolatban (Lu és mtsai 2019). Eredményeink azt mutatták, hogy a TL kapcsolatban áll a DNS-metiláción alapuló epigenetikai öregedési biomarkerekkel, így ez alapján nem zárható ki az sem, hogy a több évtizedes edzés által kiváltott DNS-metiláció hosszabb telomerrel járna. Azonban határa a jelen tanulmánynak, hogy keresztmetszeti vizsgálat keretében készült.

6. Következtetések

Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az évtizedeken át tartó testedzés hatását az öregedés molekuláris folyamataira. Az öregedés tág témaköréhez a „fiatalság génjének” és telomerhosszak vizsgálata felől közelítettünk. Vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a sport a „fiatalság génjére”, ezen belül is a KL gén promóter régió metilációjának változásaira master sportolóknál. Azonban nemcsak a promóter régió metilációjában, hanem az általunk szintén mért, átíródott/transzlálódott fehérje szintekben is adódtak különbségek évtizedes edzés hatására. Az antropometriai, terhelésélettani és kognitív paraméterek jól mutathatják az egyén aktuális állapotát minden tekintetben, ezért vizsgáltuk sKL-val való kapcsolatukat. Ezen vizsgálat összefüggést mutatott ki szenior sportolók maximális kézi szorító ereje és a „fiatalság fehérjeje” között.

A master sportoló csoportban, a sKL szintjének életkorral történő csökkenése mellett, a DNAmPhenoAge gyorsulásával negatív kapcsolatot, a DNAmGrimAge esetében pedig, ugyanolyan irányú tendenciát láttunk. A biológiai életkor ezen mutatói és sKL szintje között kimutatott összefüggés egy új mozaikdarab beillesztését teszi lehetővé a „nagy egészbe”, ami az öregedési kutatásokat illeti.

Továbbiakban az öregedés egy másik markerét, a telomerhosszt vizsgáltuk master sportolóknál. Eredményeink alapján látható, hogy a telomer hosszának DNS metiláció alapján történő becslése érzékenyebb módszer, a telomer hossza és a fizikai fittség közötti kapcsolat vizsgálatára, mint az RT-PCR alapú TL hossz mérés. A telomerek hosszának az életkor előrehaladtával történő csökkenése a sport hatására „eltűnik”, vagyis feltételezésünk szerint a sport felülírja ezt. Ugyanez a hatás érvényesül a maximális kézi szorító erő, a VO₂max, a kognitív teszt eredményei, valamint az epigenetikai órák, a DNAmPhenoAge, és DNAmGrimAge, esetében is.

Hipotéziseinket megvizsgálva a következőket állapíthatjuk meg:

1. A „fiatalság fehérjét” vizsgálva feltételeztük, hogy:

1.1. Kapcsolat áll fent a szenior sportolók “fiatalság fehérjének” szintje és a szervezet redox egyensúlya között.

IGAZ

1.2. Az évtizedeken át végzett edzés módosítja a KL gén promóter régiójának metilációját, valamint szerepe van a sKL és a fizikai fittség kapcsolatában.

RÉSZBEN IGAZ

1.3. Kapcsolat áll fenn a KL szintje és az epigenetikai órák között, és így a hormon szintje befolyásolhatja az epigenetikai öregedés gyorsaságát.

RÉSZBEN IGAZ

2. A szenior korú sportolók telomerhosszát vizsgálva feltételeztük, hogy:

2.1. Az évtizedeken át tartó testedzés változást okoz a telomerek mért (TL) és becsült (DNAmTL) hosszában.

IGAZ

2.2. A fizikai erőnlét/fittség szintje befolyásolja a telomer hosszakat.

IGAZ

2.3. A kapcsolat módosul a telomerhosszak és epigenetikai órák között master sportolók esetében a kontroll csoporthoz képest.

IGAZ

7. Összefoglalás

Az emberiséget régóta foglalkoztatja a múltó idő, az elmúlás gondolata. Nem csoda tehát, hogy a történelem során számos „csodaszer” látott napvilágot, amik az akkori hiedelemrendszer szerint többé, kevésbé felvették a harcot az öregedéssel. A modern kori társadalomban pedig egyre nagyobb az igény az egészségben eltöltött, hosszú évekre. Ebből kifolyólag kutatások nagy számban célozzák meg az öregedési folyamatok pontosabb megértését, részletesebb feltárását. Új távlatot ad az öregedési kutatásoknak az, hogy a genetikai vizsgálatok mellett, az epigenetikai módszerek is egyre szélesebb körben válnak elérhetővé.

Kutatásunk során vizsgáltam az öregedési folyamatok két fontos résztvevőjét, a „fiatalság génjét” és a telomereket.

A keringő KL életkorral összefüggő csökkenése részben a KL gén fokozott metilációjának köszönhető. A sKL szint negatívan összefügg a kronológiai életkorral a master sportoló csoportban, de a kontroll csoportban nem. A sKL szintjei, emellett összefüggésbe hozható az edzettség számszerűsítésre használt paraméterekkel. A keringő KL mennyisége függ az edzettségtől, az edzés által kiváltott DNS-metilációs változásoktól, valamint a test általános erejétől is. Továbbá, a magasabb sKL szint szignifikánsan kapcsolt az PhenoAge epigenetikus biomarker decelerációjával a master sportoló csoportban. A jelen kutatás rávilágít arra, hogy a magasabb edzettségi státusz lelassítja az epigenetikai öregedés folyamatát, amelyben szerepe lehet a KL gén metilációs állapotának. Az edzettséghez kapcsolódó DNS-metiláción alapuló életkor előrehaladását lassító hatások újszerűek, de jól illeszkednek a korábbi epidemiológiai vizsgálatok eredményeihez. A tanulmány eredményei továbbá hangsúlyozzák a fizikai szint fontosságát fittség az öregedési folyamatban.

Továbbá megállapítottuk, hogy a TL fordítottan korrelál a kronológiai életkorral. Ugyan a RT-PCR módszerrel nem tudtunk összefüggést kimutatni a telomerhossz és a VO₂max, a függőleges ugrás és a munkamemória között, addig ezek a fiziológiai vizsgálati eredmények összefüggést mutattak a becsült telomerhosszal. Az epigenetikai órák gyorsulás fordítottan összefügg a mért és a becsült telomerhosszal. Ebből úgy tűnik tehát, hogy a testmozgásnak vagy a fiziológiai fittségnek nincs közvetlen kedvező hatása a

telomer rövidülésére, azonban a DNS-metiláció mértéke nagyban összefügg a telomerhosszal.

8. Summary

Mankind has long been preoccupied with the idea of passing time, of passing away. No wonder, then, that throughout history there have been many "miracle cures" which, according to the belief system of the time, more or less fought ageing. And in modern society, there is a growing demand for long, healthy years. Consequently, a large number of research efforts are aimed at a better understanding and more detailed exploration of ageing processes. The increasing availability of epigenetic methods, in addition to genetic studies, is giving a new perspective to ageing research.

We have investigated two important players in the ageing process, the 'youth gene' and telomeres.

The age-related decrease in circulating KL is partly due to increased methylation of the KL gene. The sKL level was negatively correlated with chronological age in the trained group but not in the control group. Levels of sKL, moreover, correlated with parameters used to quantify fitness. The amount of circulating KL also depends on fitness, exercise-induced DNA methylation changes, and overall body strength. Furthermore, higher sKL levels were significantly associated with a deceleration of the PhenoAge epigenetic biomarker in the exercise-trained group (*Figure 20*). The present study highlights that higher fitness status slows down the epigenetic aging process, in which the methylation status of the KL gene may play a role. The effects of fitness-related DNA methylation on slowing age progression are novel but fit well with the results of previous epidemiological studies. The results of this study further emphasize the importance of physical fitness in the aging process.

Furthermore, we found that TL is inversely correlated with chronological age. Although we were unable to detect a correlation between telomere length and VO₂max, vertical jump and working memory using RT-PCR, these physiological test results showed a correlation with estimated telomere length. Epigenetic clock acceleration was inversely related to measured and estimated telomere length (*Figure 21*). Thus, it appears that exercise or physiological fitness has no direct positive effect on telomere shortening, but that the rate of DNA methylation is highly correlated with telomere length.

9. Irodalomjegyzék

Aczel D, Torma F, Jokai M, McGreevy K, Boros A, Seki Y, Boldogh I, Horvath S, Radak Z (2023) The Circulating Level of Klotho Is Not Dependent upon Physical Fitness and Age-Associated Methylation Increases at the Promoter Region of the Klotho Gene. *Genes (Basel)*, 14:525.

Aczel D, Gyorgy 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.

Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, 17:487-500.

Almroth G, Lönn J, Uhlin F, Brudin L, Andersson B, Hahn-Zoric M (2016) Sclerostin, TNF-alpha and Interleukin-18 Correlate and are Together with Klotho Related to Other Growth Factors and Cytokines in Haemodialysis Patients. *Scand J Immunol*, 83:58-63.

Ambatipudi S, Horvath S, Perrier F, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Calvez-Kelm FL, Durand G, Byrnes G, Ferrari P, Bouaoun L, Sklias A, Chajes V, Overvad K, Severi G, Baglietto L, Clavel-Chapelon F, Kaaks R, Barrdahl M, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Naska A, Masala G, Agnoli C, Polidoro S, Tumino R, Panico S, Dollé M, Peeters PHM, Onland-Moret NC, Sandanger TM, Nøst TM, Weiderpass E, Quirós JR, Agudo A, Rodriguez-Barranco M, Castaño JMH, Barricarte A, Fernández AM, Travis RC, Vineis P, Muller DC, Riboli E, Gunter M, Romieu, Herceg Z (2017) DNA methylome analysis identifies accelerated epigenetic ageing associated with postmenopausal breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer*, 75:299-307.

Amaro-Gahete FJ, Jurado-Fasoli L, Sanchez-Delgado G, García-Lario JV, Castillo MJ, Ruiz JR (2020) Relationship between plasma S-Klotho and cardiometabolic risk in sedentary adults. *Aging (Albany NY)*, 12:2698-2710.

Arsenis NC, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L (2017) Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. *Oncotarget*, 8:45008-45019.

Aubert G, Lansdorp PM (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev*, 88:557-79.

Avin KG, PM Coen, Huang W, Stolz DB, Sowa GA, Dubé JJ, Goodpaster BH, O'Doherty RM, Ambrosio F (2014) Skeletal muscle as a regulator of the longevity protein, Klotho. *Front Physiol*, 5:189.

Azuma M, Koyama D, Kikuchi J, Kikuchi J, Yoshizawa H, Thasinas D, Shiizaki K, Kuroo M, Furukawa Y, Kusano E (2012) Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB J*, 26:4264–4274.

Barrett ELB, Richardson DS (2011) Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell*, 10:913-21.

Baylin SB, Jones PA (2016) Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8:a019505.

Bester TH (1988) Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*; 74: 9–12.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16:6-21.

Bize P, Criscuolo F, Metcalfe NB, Nasir L, Monaghan P (2009) Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proc Biol Sci*, 276:1679-83.

Blair SN, Kohl HW 3rd, Paffenbarger Jr RS, Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW (1989) Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *JAMA*, 262:2395-401.

Blow MJ, Clark TA, Daum CG, Deutschbauer AM, Fomenkov A, Fries R, Froula J, Kang DD, Malmstrom RR, Morgan RD, Posfai J, Singh K, Visel A, Wetmore K, Zhao Z, Rubin EM, Korlach J, Pennacchio LA, Roberts RJ (2016) The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *PLoS Genet*, 12:e1005854.

Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended Longevity in Mice Lacking the Insulin Receptor in Adipose Tissue, *Science*. 299:572-4.

Bohannon RW (2019) Grip Strength: An Indispensable Biomarker For Older Adults. *Clinical interventions in aging*, 14 1681-1691.

Bohlin J, Håberg SE, Magnus P, Reese SE, Gjessing HK, Magnus MC, Parr CL, Page CM, London SJ, Nystad W (2016) Prediction of gestational age based on genome-wide differentially methylated regions. *Genome Biol*, 17:207.

- Bordone L, Guarente L (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:298-305.
- Borghini A, Giardini G, Tonacci A, Mastorci F, Mercuri A, Mrakic-Sposta S, Moretti S, Andreassi MG, Pratali L (2015) Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis*, 30:711-6.
- Booth FW, Roberts CK (2008) Linking performance and chronic disease risk: indices of physical performance are surrogates for health. *Br J Sports Med*, 42(12):950-2.
- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ (2012) Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*, 2:1143-211.
- Brandao CFC, Nonino CB, de Carvalho FG, Nicoletti CF, Noronha NY, Martin RS, de Freitas EC, Junqueira-Franco MVM, Marchini JS (2020) The effects of short-term combined exercise training on telomere length in obese women: a prospective, interventional study. *Sports Med Open*, 6:5.
- Brandt A, Vilcinskas A (2013) The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model for Aging Research. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 135:63-77.
- Breen M, Nwanaji-Enwerem JC, Karrasch S, Flexeder C, Schulz H, Waldenberger M, Kunze S, Ollert M, Weidinger S, Colicino E, Gao X, Wang C, Shen J, Just AC, Vokonas P, Sparrow D, Hou L, Schwartz JD, Baccarelli AA, Peters A, Ward-Caviness CK (2020) Accelerated epigenetic aging as a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease and decreased lung function in two prospective cohort studies. *Aging (Albany NY)*, 12: 16539–16554.
- Brewer RA, Gibbs VK, Smith DL Jr (2016) Targeting glucose metabolism for healthy aging. *Nutr Healthy Aging*. 4: 31–46
- Buendia-Roldan I, Machuca N, Mejía M, Maldonado M, Pardo A, Selman M (2019), Lower Levels of α -Klotho in Serum Are Associated with Decreased Lung Function in Individuals with Interstitial Lung Abnormalities. *Scientific reports*, 9:10801
- Buttet M, Bagheri R, Ugbolue UC, Laporte C, Trousselard M, Benson A, Bouillon-Minois J-B, Dutheil F (2022) Effect of a lifestyle intervention on telomere length: A systematic review and meta-analysis. *Mech Ageing Dev*, 206:111694.

Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120:513-22.

Campisi J, Yaswen P (2009) Aging and cancer cell biology. *Aging Cell*, 8:221-5.

Canudas S, Becerra-Tomás N, Hernández-Alonso P, Galié S, Leung C, Crous-Bou M, De Vivo I, Gao Y, Gu Y, Meiniñá J, Milte C, García-Calzón S, Martí A, Boccardi V, Ventura-Marra M, Salas-Salvadó J (2020) Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*, 11:1544-1554

Capuano F, Müllleder M, Kok R, Blom HJ, Ralser M (2014) Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Anal Chem*, 86:3697-702.

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 30:e47.

Cha SK, Hu MC, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang CL (2009) Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal $k(+)$ excretion by *klotho*. *Molecular pharmacology*, 76:38-46.

Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG (2005) The β -glucuronidase *klotho* hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*, 310:490–493.

Chang X, Chua KY, Wang L, Liu J, Yuan J-M, Khor C-C, Heng C-K, Koh W-P, Dorajoo R (2021) Midlife Leukocyte Telomere Length as an Indicator for Handgrip Strength in Late Life. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 76:172-175.

Château MT, Araiz C, Descamps S, Galas S (2010) *Klotho* interferes with a novel *fgf*-signalling pathway and insulin/*igf*-like signalling to improve longevity and stress resistance in *caenorhabditis elegans*. *Aging*, 2:567-81.

Chen A, Sun Y, Cui J, Zhao B, Wang H, Chen X, Mao Y (2018) Associations of sclerostin with carotid artery atherosclerosis and all-cause mortality in Chinese patients undergoing maintenance hemodialysis. *BMC Nephrol*, 19:264.

Chen BH, Marioni RE, Colicino E, Peters MJ, Ward-Caviness CK, Tsai PC, Roetker NS, Just AC, Demerath EW, Guan W, Bressler J, Fornage M, Studenski S, Vandiver AR, Moore AY, Tanaka T, Kiel DP, Liang L, Vokonas P, Schwartz J, Lunetta KL 20, Murabito JM, Bandinelli S, Hernandez DG, Melzer D, Nalls M, Pilling PC, Price TR, Singleton AB, Gieger C, Holle R, Kretschmer A, Kronenberg F, Kunze S, Linseisen J, Meisinger C, Rathmann W, Waldenberger M, Visscher PM, Shah S, Wray NR, McRae AF, Franco OH, Hofman A, Uitterlinden AG, Absher D, Assimes T, Levine ME, Lu AT, Tsao PS, Hou L, Manson JAE, Carty CL, LaCroix AZ, Reiner AP, Spector TD, Feinberg AP, Levy D, Baccarelli A, van Meurs J, Bell JT, Peters A, Deary IJ, Pankow JS, Ferrucci L, Horvath S (2016) DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. *Aging (Albany NY)*, 8:1844-1865.

Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR (2007) Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, pp. 19796-19801

Chen L, Ganz PA, Sehl ME (2022) DNA Methylation, Aging, and Cancer Risk: A Mini-Review. *Front Bioinform*, 2:847629.

Chen L, Ge B, Casale FP, Vasquez L, Kwan T, Garrido-Martín D, Watt S, Yan Y, Kundu K, Ecker S, Datta A, Richardson D, Burden F, Mead D, Mann AL, Fernandez JM, Rowston S, Wilder SP, Farrow S, Shao X, Lambourne JJ, Redensek A, Albers CA, Amstislavskiy V, Ashford S, Berentsen K, Bomba L, Bourque G, Bujold D, Busche S, Caron M, Chen SH, Cheung W, Delaneau O, Dermitzakis ET, Elding H, Colgiu I, Bagger FO, Flicek P, Habibi E, Iotchkova V, Janssen-Megens E, Kim B, Lehrach H, Lowy E, Mandoli A, Matarese F, Maurano MT, Morris JA, Pancaldi V, Pourfarzad F, Rehnstrom K, Rendon A, Risch T, Sharifi N, Simon MM, Sultan M, Valencia A, Walter K, Wang SY, Frontini M, Antonarakis SE, Clarke L, Yaspo ML, Beck S, Guigo R, Rico D, Martens JHA, Ouwehand WH, Kuijpers TW, Paul DS, Stunnenberg HG, Stegle O, Downes K, Pastinen T, Soranzo N (2016) Genetic Drivers of Epigenetic and Transcriptional Variation in Human Immune Cells. *Cell*, 167:1398-1414.e24.

Chen WY (2020) Soluble alpha-klotho alleviates cardiac fibrosis without altering cardiomyocytes renewal. *Int J Mol Sci*, 21:2186.

Cheng F, Carroll L, Joglekar MV, Januszewski AS, Wong KK, Hardikar AA, Jenkins AJ, Ma RCW (2021) Diabetes, metabolic disease, and telomere length. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 9:117-126.

Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Lu X, Spector TD, Aviv A (2008) The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med*, 168:154-8.

Clouaire T, Stancheva I (2008) Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65:1509-22.

Colon M, Hodgson A, Donlon E, Murphy JEJ (2019) Effects of Competitive Triathlon Training on Telomere Length. *J Aging Phys Act*, 27:510-514.

Corcillo A, Fountoulakis N, Sohal A, Farrow F, Ayis S, Karalliedde J (2020) Low Levels of Circulating Anti-Ageing Hormone Klotho Predict the Onset and Progression of Diabetic Retinopathy. *Diabetes & vascular disease research*, 17:1479164120970901

Cournil A, Kirkwood TB (2001) If you would live long, choose your parents well. *Trends Genet*, 17:233-5.

Cruickshanks HA, McBryan T, Nelson DM, Vanderkraats ND, Shah PP, van Tuyn J, Rai TS, Brock C, Donahue G, Dunican DS, Drotar ME, Meehan RR, Edwards JR, Berger SL, Adams PD (2013) Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat Cell Biol*, 15:1495-506.

Denham J, Nelson CP, O'Brien BJ, Nankervis SA, Denniff M, Harvey JT, Marques FZ, Codd V, Zukowska-Szzechowska E, Samani NJ, Tomaszewski M, Charchar FJ (2013) Longer leukocyte telomeres are associated with ultra-endurance exercise independent of cardiovascular risk factors. *PLoS One*, 8:e69377.

Devaraj S, Syed B, Chien A, Jialal I (2012) Validation of an immunoassay for soluble klotho protein: decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease. *Am J Clin Pathol*, 137, pp. 479-485

Dimauro I, Scalabrin M, Fantini C, Grazioli E, Valls MRB, Mercatelli N, Parisi A, Sabatini S, Di Luigi L, Caporossi D (2016) Resistance training and redox homeostasis: Correlation with age-associated genomic changes. *Redox Biol*, 10:34-44.

Donate-Correa J, Ferri CM, Martín-Núñez, E, Pérez-Delgado N, González-Luis A, Mora-Fernández C, Navarro-González JF (2021) Klotho as a Biomarker of Subclinical Atherosclerosis in Patients with Moderate to Severe Chronic Kidney Disease. *Scientific reports*, 11:15877

D'Mello MJJ, Ross SA, Briel M, Anand SS, Gerstein H, Paré G (2015) Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet*, 8:82-90.

Drew DA, Katz R, Kritchevsky S, Ix JH, Shlipak MG, Newman AB, Hoofnagle AN, Fried L.F, Sarnak M, Gutiérrez OM, Semba RD, Neyra JA (2021) Soluble Klotho and Incident Hypertension. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 16:1502–1511

Druzhyna NM, Wilson GL, LeDoux SP (2008) Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev*, 129:383-90.

Dugué P-A, Bassett JK Dugué PA, Bassett JK, Joo JE, Baglietto L, Jung CH, Wong EM, Fiorito G, Schmidt D, Makalic E, Li S, Moreno-Betancur M, Buchanan DD, Vineis P, English DR, Hopper JL, Severi G, Southey MC, Giles GG, Milne RL (2018) Association of DNA Methylation-Based Biological Age With Health Risk Factors and Overall and Cause-Specific Mortality. *Am J Epidemiol*, 187:529-538.

D'Urso A, Brickner JH (2017) Epigenetic transcriptional memory. *Curr Genet*, 63:435-439.

Durso DF, Bacalini MG, Sala C, Pirazzini C, Marasco E, Bonafé M, do Valle ÍF, Gentilini D, Castellani G, Faria AMC, Franceschi C, Garagnani P, Nardini C (2017) Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer. *Oncotarget*, 8:23237-23245.

Eckstrom E, Neukam S, Kalin L, Wright J (2020) Physical Activity and Healthy Aging. *Clin Geriatr Med*, 36:671-683.

- Ehrlich M (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1:239-59.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids, Res* 10:2709-21.
- Eika F, Blomkvist AW, Rahbek MT, Eikhof KD, Hansen MD, Søndergaard M, Ryg J, Andersen S, Jorgensen MG (2019) Reference data on hand grip and lower limb strength using the Nintendo Wii balance board: a cross-sectional study of 354 subjects from 20 to 99 years of age. *BMC Musculoskelet Disord*, 20:21.
- Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358:1148-59.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61:3225-9.
- Fakouri NB, Hansen TL, Desler C, Anugula S, Rasmussen LJ (2019) From Powerhouse to Perpetrator-Mitochondria in Health and Disease. *Biology (Basel)*, 8:35.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 111:47-54.
- Ferrucci L, Horvath S (2018) An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10:573–91.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:10604-9.
- Fuster JJ, Andrés V (2006) Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res*, 99:1167-80.
- Fyhrquist F, Saijonmaa O (2012) Telomere length and cardiovascular aging. *Ann Med*, 1:S138-42.

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11:6883-94.

Gähwiler EKN, Motta SE, Martin M, Nugraha B, Hoerstrup SP, Emmert MY (2021) Human iPSCs and Genome Editing Technologies for Precision Cardiovascular Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol*, 9:639699.

Gan LH, Pan J, Chen SJ, Zhong J, Wang LJ (2011) DNA methylation of ZIC1 and KLOTHO gene promoters in colorectal carcinomas and its clinicopathological significance [in Chinese]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 40:309–314.

Gautrey HE, van Otterdijk SD, Cordell HJ, Newcastle 85+ Study Core Team; Mathers JC, Strathdee G (2014) DNA methylation abnormalities at gene promoters are extensive and variable in the elderly and phenocopy cancer cells. *FASEB J*, 28:3261-72.

Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MIN (2014) Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 125:1-40.

Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizábal-Corrales D, Hsu C-H, Aravind L, He C, Shi Y (2015) 5DNA methylation on N(6)-Adenine in *C. elegans*. *Cell*; 161:868–878.

Greer EL, Brunet A. (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24:7410-25.

Greer EL, Brunet A. (2008) Signaling networks in aging. *J Cell Sci*, 121:407-12.

Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, 65:337-65.

Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337:331-7.

Guarnotta V, Pizzolanti G, Petrancosta R, Radellini S, Baiamonte C, Giordano C (2022) Gender-Specific Soluble α -Klotho Levels as Marker of GH Deficiency in Children: A Case-Control Study. *Journal of endocrinological investigation*, 45:1247–1254.

Guo X, Dai X, Zhou T, Wang H, Ni J, Xue J, Wang X (2020) Mosaic loss of human Y chromosome: what, how and why. *Hum Genet*, 139:421-446.

- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144:646-74.
- Hande MP (2004) DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*, 104:116-22.
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*, 49:359–67.
- Harel I, Brunet (2015) A The African Turquoise Killifish: A Model for Exploring Vertebrate Aging and Diseases in the Fast Lane, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 80:275-9.
- Hawkins S, Wiswell R (2003) Rate and mechanism of maximal oxygen consumption decline with aging: implications for exercise training. *Sports Med*, 33:877-88.
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélóën A, Even PC, Cervera, Bouc YL (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421:182-7.
- Hortobágyi T, Vetrovsky T, Balbim GM, Silva NCBS, Manca A, Deriu F, Kolmos M, Kruuse C, Liu-Ambrose T, Radák Z, Váczi M, Johansson H, Santos PCRD, Franzén E, Granacher U (2022) The impact of aerobic and resistance training intensity on markers of neuroplasticity in health and disease. *Ageing Res Rev*, 80:101698.
- Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14:R115.
- Horvath S (2015) Erratum to: DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 16:96.
- Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schönfels W, Ahrens M, Heits N, Bell JT, Tsai P-C, TD Spector, Deloukas P, Siebert R, Sipos B, Becker T, C Röcken, Schafmayer C, Hampe J (2014) Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111:15538-43.

Horvath S, Raj K (2018) DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet*, 19:371-384.

Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams RW, Auwerx J (2013) Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature*, 497:451-7.

Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW (2010) Klotho: A novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24:3438-50.

Ibáñez-Cabellos JS, Pérez-Machado G, Seco-Cervera M, Berenguer-Pascual E, García-Giménez JL, Pallardúa FV (2018) Acute telomerase components depletion triggers oxidative stress as an early event previous to telomeric shortening. *Redox Biol.*, 14: 398–408.

Imura A, Iwano A, Tohyama O, Tsuji Y, Nozaki K, Hashimoto N, Fujimori T, Nabeshima Y (2004) Secreted klotho protein in sera and csf: Implication for post-translational cleavage in release of klotho protein from cell membrane. *FEBS letters*, 565:143-7.

Iturriaga T, Yvert T, Sanchez-Lorente IM, Diez-Vega I, Fernandez-Elias VE, Sanchez-Barroso L, Dominguez-Balmaseda D, Larrosa M, Perez-Ruiz M, Santiago C (2021) Acute impacts of different types of exercise on circulating α -klotho protein levels. *Frontiers in physiology*, 12:716473.

Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 21:163-7.

Kadi F, Ponsot E, Piehl-Aulin K, Mackey A, Kjaer M, Oskarsson E, Holm L (2008) The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 40:82-7.

Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet*, 3:e84.

Kamemori M, Ohyama Y, Kurabayashi M, Takahashi K, Nagai R, Furuya N (2002). Expression of klotho protein in the inner ear. *Hearing research*, 171:103-10.

Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K (2019) Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*, 99:79-114.

Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, Kuro-o M (1999) Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *klotho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *The Journal of clinical investigation*, 104:229-37.

King GD, Rosene DL, Abraham CR (2012) Promoter methylation and age-related downregulation of *klotho* in rhesus monkey. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 34:1405-19.

Kong CM, Lee XW, Wang X (2013) Telomere shortening in human diseases. *FEBS J*, 280:3180-93.

Krauss J, Farzaneh-Far R, Puterman E, Na B, Lin J, Epel E, Blackburn E, Whooley MA (2011) Physical fitness and telomere length in patients with coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study. *PLoS One*, 6:e26983.

Kresovich JK, Bulka CM (2022) Low Serum *Klotho* Associated With All-cause Mortality Among a Nationally Representative Sample of American Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 77:452-456.

Kresovich JK, Xu Z, O'Brien KM, Weinberg CR, Sandler DP, Taylor JA (2019) Methylation-Based Biological Age and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst*, 111:1051-1058.

Kuro-o M (2008) *Klotho* as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biological chemistry*, 389:233-41.

Kuro-o M (2009) *Klotho* and aging. *Biochim Biophys Acta.*,1790:1049-58.

Kuro-o M (2010) *Klotho*. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 459:333-43.

Kuro-o M (2019) The *Klotho* proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 15:27-44.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S,

Nagai R, Nabeshima YI (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390:45-51.

Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Suppression of aging in mice by the hormone klotho. *Science*, 309:1829-33.

Kim JH, Hwang KH, Park KS, Kong ID, Cha SK (2015) Biological role of anti-aging protein klotho. *Journal of lifestyle medicine*, 5:1-6.

King GD, Rosene DL, Abraham CR (2012) Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey. *Age (Dordr)*, 34:1405–1419.

Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y (2001) Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 280:1015–1020.

Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K-I, Nakagawa K, Tsugawa N, Okano T, Kitazawa R, Fukagawa M, Kita T (2010) Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int*, 77:232–238.

Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M (1999) Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*, 59:5917-21.

LaRocca TJ, Seals DR, Pierce GL (2010) Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity. *Mech Ageing Dev*, 131:165-7.

Lee J, Jeong D-J, Kim J, Lee S, Park J-H, Chang B, Jung S-I, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim J-S, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim C-J, Lee M-S (2010) The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer*, 9:109.

Lee JY, Bang HW, Ko JH, Kim JH, Lee DC (2013) Leukocyte telomere length is independently associated with gait speed in elderly women. *Maturitas*, 75:165-9.

- Lee JH, Bodmer R, Bier E, Karin M (2010) Sestrins at the crossroad between stress and aging. *Aging*, 2: 369–74.
- Lee JH, Budanov AV, Karin M (2013) Sestrins Orchestrate Cellular Metabolism to Attenuate Aging. *Cell Metab*, 18:792–801.
- Lee MS, Tanaka K, Nakagaichi M, Nakadomo F, Watanabe K, Takeshima N, Hiyama T, Chodzko-Zaiko W (1996) The relative utility of health-related fitness tests and skilled motor performance tests as measures of biological age in Japanese men. *Appl Human Sc*, 15:97-104.
- Lee Y, Sun D, Ori APS, Lu AT, Seeboth A, Harris SE, Deary IJ, Marioni RE, Soerensen M, Mengel-From J, Hjelmberg J, Christensen K, Wilson JG, Levy D, Reiner AP, Chen W, Li S, Harris JR, Magnus P, Aviv A, Jugessur A, Horvath S (2019) Epigenome-wide association study of leukocyte telomere length. *Aging (Albany NY)*, 11:5876-5894.
- Levine ME, Lu AT, Bennett DA, Horvath S (2015) Epigenetic age of the pre-frontal cortex is associated with neuritic plaques, amyloid load, and Alzheimer's disease related cognitive functioning. *Aging (Albany NY)*, 7:1198-211.
- Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Assimes TL, Ferrucci L, Horvath S (2019) DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)*, 11:303-327.
- Li B-Q, Liu P-P, Zhang C-H (2017) Correlation between the methylation of APC gene promoter and colon cancer. *Oncol Lett*, 14:2315-9.
- Lin J, Kroenke CH, Epel E, Kenna HA, Wolkowitz OM, Blackburn E, Rasgon NL (2011) Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. *Brain Res*, 1379:224-31.
- Lin Y, Chen J, Sun Z (2016) Antiaging gene klotho deficiency promoted high-fat diet-induced arterial stiffening via inactivation of AMP-activated protein kinase. *Hypertension*, 67:564–73.

- Ling C, Rönn T (2019) Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*, 29:1028-1044.
- Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, Hammer RE, Südhof TC, Zheng H (2010) Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:17362–17367.
- Lin Y, Sun Z (2015) In vivo pancreatic β -cell-specific expression of antiaging gene Klotho: a novel approach for preserving β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes*, 64:1444-58.
- Linskens MH, Harley CB, West MD, Campisi J, Hayflick L (1995) Replicative senescence and cell death. *Science*, 267:17.
- Liu F, Wang L, Perna F, Nimer SD (2016) Beyond transcription factors: how oncogenic signalling reshapes the epigenetic landscape. *Nat Rev Cancer*, 16:359-72.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell*, 153:1194-217.
- Loprinzi PD, Loenneke JP, Blackburn EH (2015) Movement-Based Behaviors and Leukocyte Telomere Length among US Adults. *Med Sci Sports Exerc*, 47:2347-52.
- Lyko F (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet*, 19:81-92.
- Martínez-Díaz IC, Escobar-Muñoz MC, Carrasco L (2020) Acute Effects of High-Intensity Interval Training on Brain-Derived Neurotrophic Factor, Cortisol and Working Memory in Physical Education College Students. *Int J Environ Res Public Health*, 17:8216.
- Martín-Núñez E, Pérez-Castro A, Tagua VG, Hernández-Carballo C, Ferri C, Pérez-Delgado N, Rodríguez-Ramos S, Cerro-López P, López-Castillo Á, Delgado-Molinos A, López-Tarruella VC, Arévalo-Gómez MA, González-Luis A, Martín-Olivera A, CC Morales-Estévez, Mora-Fernández C, Donate-Correa J, Navarro-González JF (2022) Klotho Expression in Peripheral Blood Circulating Cells Is Associated with Vascular and Systemic Inflammation in Atherosclerotic Vascular Disease. *Scientific reports*, 12: 8422

Mathur S, Ardestani A, Parker B, Cappizzi J, Polk D, Thompson PD (2013) Telomere length and cardiorespiratory fitness in marathon runners. *J Investig Med*, 61:613-5.

Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y (1998) Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 242:626-30.

Mayne BT, Leemaqz SY, Smith AK, Breen J, Roberts CT, Bianco-Miotto T (2017) Accelerated placental aging in early onset preeclampsia pregnancies identified by DNA methylation. *Epigenomics*, 9:279-289.

McEwen LM, O'Donnell KJ, McGill MG, Edgar RD, Jones MJ, MacIsaac JL, Lin DTS, Ramadori K, Morin A, Gladish N, Garg E, Unternaehrer E, Pokhvisneva I, Karnani N, Kee MZL, Klengel T, Adler NE, Barr RG, Letourneau N, Giesbrecht GF, Reynolds JN, Czamara D, Armstrong JM, Essex MJ, de Weerth C, Beijers R, Tollenaar MS, Bradley B, Jovanovic T, Ressler KJ, Steiner M, Entringer S, Wadhwa PD, Buss C, Bush NR, Binder EB, Boyce WT, Meaney MJ, Horvath S, Kobor MS (2020) The PedBE clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117:23329-23335.

Meinilä J, Perälä MM, Kautiainen H, Männistö S, Kanerva N, Shivappa N, Hébert JR, P Iozzo, Guzzardi MA, Eriksson JG (2019) Healthy diets and telomere length and attrition during a 10-year follow-up. *Eur J Clin Nutr*, 73:1352-1360.

Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG (1999) The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402:309-13.

Min JL, Hemani G, Smith GD, Relton C, Suderman M (2018) Meffil: efficient normalization and analysis of very large DNA methylation datasets. *Bioinformatics*, 34:3983-3989.

Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shirota S, Tsuchiya K, Nihei H (2005) Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol*, 101:e67–e74.

- Morin GB (1997) Telomere control of replicative lifespan. *Exp Gerontol*, 32:375-82.
- Murat K, Grüning B, Poterlowicz PW, Westgate G, Tobin DJ, Poterlowicz K (2020) Ewastools: Infinium Human Methylation BeadChip pipeline for population epigenetics integrated into Galaxy. *Gigascience*, 9:giaa049.
- Mostafidi E, Moeen A, Nasri H, Ghorbani Hagjo A, Ardalan M (2016) Serum klotho levels in trained athletes. *Nephro-urology monthly*, 8:e30245.
- Nagai T, Yamada K, Kim HC, Kim Y, Noda Y, Imura A, Nabeshima Y, Nabeshima T (2003) Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: A role of oxidative stress. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17:50-2.
- Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G (2008) Telomere length is associated with obesity parameters but with a gender difference. *Obesity (Silver Spring)*, 16:2682-9.
- Oblak L, van der Zaag J, Higgins-Chen AT, Levine ME, Boks MP (2021) A Systematic Review of Biological, Social and Environmental Factors Associated with Epigenetic Clock Acceleration. *Ageing research reviews*, 69:101348.
- Oksuzyan A, Maier H, McGue M, Vaupel JW, Christensen K (2010) Sex Differences in the Level and Rate of Change of Physical Function and Grip Strength in the Danish 1905-Cohort Study. *Journal of Aging and Health*, 2010;22(5):589-610.
- Østhus IB Ø, Sgura A, Berardinelli F, Alsnes IV, Brønstad E, Rehn T, Støbakk PK, Hatle H, Wisløff U, Nauman J (2012) Telomere length and long-term endurance exercise: does exercise training affect biological age? A pilot study. *PLoS One*, 7:e52769.
- Pal S, Tyler JK (2016) Epigenetics and aging. *Sci Adv*, 2:e1600584-e.
- Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ (2011) Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol*, 32:729–735.

Paroni G, Panza F, De Cosmo S, Greco A, Seripa D, Mazzoccoli G (2019) Klotho at the Edge of Alzheimer's Disease and Senile Depression. *Molecular neurobiology*, 56: 1908–1920

Patel MS, Donaldson AV, Lewis A, Natanek SA, Lee JY, Andersson YM, Haji G, Jackson SG, Bolognese BJ, Foley JP, Podolin PL, Bruijnzeel PLB, Hart N, Hopkinson NS, Man WD-C, Kemp PR, Polkey MI (2016) Klotho and smoking--An interplay influencing the skeletal muscle function deficits that occur in COPD. *Respir Med*, 113:50-6.

Pfeifer GP (2018) Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci*, 19:1166.

Phelps M, Pettan-Brewer C, Ladiges W, Yablonka-Reuveni Z (2013) Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. *Biogerontology*,14:729-39.

Peterson MD, Collins S, Meier HCS, Brahmsteadt A, Faul JD (2023) Grip strength is inversely associated with DNA methylation age acceleration. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 14: 108–115.

van Praag H (2009) Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci*, 32:283-90.

Quan H, Koltai E, Suzuki K, Jr Aguiar AS, Pinho R, Boldogh I, Berkes I, Radak Z (2020) Exercise, redox system and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866:165778.

Quarrie JK, Riabowol KT (2004) Murine models of life span extension. *Sci Aging Knowledge Environ*, 2004:re5

Radak Z, Boldogh I (2010) 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 49:587-96.

Radak Z, Chung HY, Sataro G (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44:153-9.

- Radak Z, Koltai E, Taylor AW, Higuchi M, Kumagai S, Ohno H, Goto S, Boldogh I (2013) Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic Biol Med*, 58:87-97.
- Radak Z, Kumagai S, Taylor AW, Naito H, Sataro G (2007) Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32:942-6.
- Radak Z, Suzuki K, Posa A, Petrovszky Z, Koltai E, Boldogh I (2020) The Systemic Role of SIRT1 in Exercise Mediated Adaptation. *Redox biology*, 35:101467.
- Radak Z, Taylor AW (2022) Issues on Trainability. *Front Physiol*, 12:790196.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev*, 7:90-107.
- Radak Z, Torma F, Berkes I, Goto S, Mimura T, Posa A, Balogh L, Boldogh I, Suzuki K, Higuchi M, Koltai E (2019) Exercise effects on physiological function during aging. *Free Radic Biol Med*, 132:33-41.
- Rae DE, Vignaud A, Butler-Browne GS, Thornell LE, Sinclair-Smith C, Derman EW, Lambert MI, Collins M (2010) Skeletal muscle telomere length in healthy, experienced, endurance runners. *Eur J Appl Physiol*, 109:323-30.
- Raj K, Horvath S (2020) Current Perspectives on the Cellular and Molecular Features of Epigenetic Ageing. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 245:1532–1542.
- Ramírez-Vélez R., Izquierdo M (2019) Precision Physical Activity and Exercise Prescriptions for Disease Prevention: The Effect of Interindividual Variability Under Different Training Approaches. Lausanne: Frontiers Media doi: 10.3389/978-2-88963-063-9
- Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-Nestler M (2016) Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflugers Arch*, 468:1621–35.
- Rizvi S, Raza ST, Mahdi F (2014) Telomere length variations in aging and age-related diseases. *Curr Aging Sci*, 7:161-7.

Rozenblit M, Hofstatter E, Liu Z, O’Meara T, Storniolo AM, Dalela D, Singh V, Puzstai L, Levine M (2022) Evidence of accelerated epigenetic aging of breast tissues in patients with breast cancer is driven by CpGs associated with polycomb-related genes. *Clinical Epigenetics*.

Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundeleovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I (2012) Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 133:649–657.

Rueggsegger GN, Booth FW (2018) Health Benefits of Exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8:a029694.

Ruggiero C, Metter EJ, Melenovsky V, Cherubini A, Najjar SS, Ble A, Senin U, Longo DL, Ferrucci L (2008) High basal metabolic rate is a risk factor for mortality: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63:698-706.

Sampayo JN, Gill MS, Lithgow GJ. Oxidative stress and aging – the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan. *Biochemical Society Transactions*. 2003;31(6):1305-7.

Sato T, Komaba H, Nagatani T, Watanabe T, Kishida Y, Fukagawa M (2019) The Pituitary Is a Candidate Organ That Modulates Circulating Klotho Levels. *Journal of the Endocrine Society*, 3:52–61.

Schneider CV, Schneider KM, Teumer A, Rudolph KL, Hartmann D, Rader DJ, Strnad P (2022) Association of Telomere Length With Risk of Disease and Mortality. *JAMA Intern Med*, 182:291-300.

Schellnegger M, Lin AC, Hammer N, Kamolz L-P (2022) Physical Activity on Telomere Length as a Biomarker for Aging: A Systematic Review. *Sports Med Open*, 8:111.

Seki Y, Aczel D, Torma F, Jokai M, Boros A, Suzuki K, Higuchi M, Tanisawa K, Boldogh I, Horvath S, Radak Zs (2023) No strong association among epigenetic modifications by DNA methylation, telomere length, and physical fitness in biological aging. *Biogerontology*, 24:245-255.

Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, Guralnik JM, Ferrucci L (2012) Relationship of Low Plasma Klotho with Poor Grip Strength in Older

Community-Dwelling Adults: The InCHIANTI Study. *European journal of applied physiology*, 112:1215–1220.

Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Simonsick E, Turner R, Miljkovic I, Harris T, Schwartz AV, Asao K, Kritchevsky S, Newman AB Health ABC Study (2016) Low Plasma Klotho Concentrations and Decline of Knee Strength in Older Adults. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 71:103–108.

Shimamura Y, Hamada K, Inoue K, Ogata K, Ishihara M, Kagawa T, Inoue M, Fujimoto S, Ikebe M, Yuasa K, Yamanaka S, Sugiura T, Terada Y (2012) Serum levels of soluble secreted α -Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. *Clin Exp Nephrol*, 16:722-9.

Shiraki-Iida T, Aizawa H, Matsumura Y, Sekine S, Iida A, Anazawa H, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y (1998) Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein. *FEBS letters*, 424:6-10.

Shireby GL, Davies JP, Francis PT, Burrage J, Walker EM, Neilson GWA, Dahir A, Thomas AJ, Love S, Smith RG, Lunnon K, Kumari M, Schalkwyk LC, Morgan K, Brookes K, Hannon E, Mill J. (2020) Recalibrating the epigenetic clock: implications for assessing biological age in the human cortex. *Brain*, 143:3763-3775.

Shmulevich R, Nissim, TB, Wolf I., Merenbakh-Lamin K, Fishman D, Sekler I, Rubinek T (2020) Klotho Rewires Cellular Metabolism of Breast Cancer Cells through Alteration of Calcium Shuttling and Mitochondrial Activity. *Oncogene*, 39,:4636–4649

Siahanidou T, Garatzioti M, Lazaropoulou C, Kourlaba G, Papassotiriou I, Kino T, Imura A, Nabeshima Y, Chrousos G (2012) Plasma soluble α -klotho protein levels in premature and term neonates: correlations with growth and metabolic parameters. *Eur J Endocrinol*, 167:433-40.

Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H (1999) DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*, 22:203-6.

Sikora E (2013) Rejuvenation of senescent cells-the road to postponing human aging and age-related disease? *Exp Gerontol*, 48:661-6.

- Spiegel AM, Sewal AS, PR. Rapp (2014) Epigenetic contributions to cognitive aging: disentangling mindspan and lifespan. *Learn Mem*, 21: 569–574
- Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R (2020) Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)*, 12:558.
- Sugiura H, Yoshida T, Shiohira S, Kohei J, Mitobe M, Kurosu H, Kuro-o M, Nitta K, Tsuchiya K (2012) Reduced Klotho expression level in kidney aggravates renal interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302:F1252–F1264.
- Sun CY, Chang SC, Wu MS (2012) Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int*, 81:640–650.
- Surrallés J, Hande MP, Marcos R, Lansdorp PM (1999) Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am J Hum Genet*, 65:1617-22.
- Stubbs B, Vancampfort D, Smith L, Rosenbaum S, Schuch F, Firth J (2018) Physical activity and mental health. *Lancet Psychiatry*, 5:873.
- Sykes K, Roberts A (2004) The Chester step test—a simple yet effective tool for the prediction of aerobic capacity. *Physiotherapy*, doi.org/10.1016/j.physio.2004.03.008
- Szigeti KA, Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B (2018) Role and alterations of DNA methylation during the aging and cancer. *Orv Hetil*, 159:3-15.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324:930-5.
- Takenaka T, Hasan A, Marumo T, Kobori H, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M (2021) Klotho supplementation attenuates blood pressure and albuminuria in murine model of IgA nephropathy. *J Hypertens*, 39:1567–76.
- Tanaka H, Beam MJ, Caruana K (2014) The presence of telomere fusion in sporadic colon cancer independently of disease stage, TP53/KRAS mutation status, mean telomere length, and telomerase activity. *Neoplasia*, 16:814-23.

Taylor SM, Jones PA (1979) Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17:771-9.

Telomeres Mendelian Randomization Collaboration (2017) Association Between Telomere Length and Risk of Cancer and Non-Neoplastic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Oncol*, 3:636-651.

Tissenbaum HA (2012) Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 67:503-10.

Torres PU, Prié D, Molina-Blétry V, Beck L, Silve C, Friedlander G (2007) Klotho: An antiaging protein involved in mineral and vitamin d metabolism. *Kidney international*, 71:730-7.

Triche Jr TJ, Weisenberger DJ, Van Den Berg D, Laird PW, Siegmund KD (2013) Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays. *Nucleic Acids Res*, 41:e90.

Tsuchiya M, Sato EF, Inoue M, Asada A (2008) Open abdominal surgery increases intraoperative oxidative stress: can it be prevented? *Anesth Analg*, 107:1946–52.

Typiak M, Kulesza T, Rachubik P, Rogacka D, Audzeyenka I, Angielski S, Saleem MA, Piwkowska A (2021) Role of Klotho in Hyperglycemia: Its Levels and Effects on Fibroblast Growth Factor Receptors, Glycolysis, and Glomerular Filtration. *Int J Mol Sci*, 22:7867.

Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, Ferro G, Paliwal A, Hainaut P, Brennan P, Tost J, Boffetta P, Herceg Z (2009) Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*, 69:243-52.

Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, B Seizinger, N Kley (1999) PA26, a Novel Target of the P53 Tumor Suppressor and Member of the GADD Family of DNA Damage and Growth Arrest Inducible Genes. *Oncogene*, 18:127–37.

Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS (2012) Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR J*, 53:359-69.

Voisin S, Harvey NR, Haupt LM, Griffiths LR, Ashton KJ, Coffey VG, Doering TM, Thompson JM, Benedict C, Cedernaes J, Lindholm ME, Craig JM, Rowlands DS, Sharples AP, Horvath S, Eynon N (2020) An epigenetic clock for human skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 11:887-898.

Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, 39:359-407.

Wang HL, Xu Q, Wang Z, Zhang Y-H, Si L-Y, Li X-J, Yang Q-H, Xiao H (2010) A potential regulatory single nucleotide polymorphism in the promoter of the *Klotho* gene may be associated with essential hypertension in the Chinese Han population. *Clin Chim Acta*, 411:386–390.

Wang L, Wang X, Wang X, Jie P, Lu H, Zhang S, Lin X, Lam EK, Cui Y, Yu J, Jin H (2011) *Klotho* is silenced through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Am J Cancer Res*, 1:111–119.

Wang Y, Kuro-o M, Sun Z (2012) *Klotho* gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells via the cAMP-PKA pathway. *Aging Cell*, 11:410–417.

Wang Y, Sun Z. (2009) Current understanding of *klotho*. *Ageing Res Rev*, 8:43–51

Wang Y, Sun Z. (2009) *Klotho* gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension*, 54:810–817.

Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel K-H, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*, 15:R24.

Weinhold B (2006) Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*, 114:A160-A7.

Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U (2009) Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*, 120:2438-47.

- Westendorp RG, Kirkwood TB (1998) Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*, 396:743-6.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL (2007) DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1775: 138–162.
- Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T (2008) Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene*, 27:7094-105.
- Xu J-P, Zeng R-X, He M-H, Lin S-S, Guo L-H, Zhang M-Z (2022) Associations Between Serum Soluble α -Klotho and the Prevalence of Specific Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*, 9:899307.
- Xu Y, Sun Z (2015) Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev*, 36:174-93.
- Yamada N (2003) Telomere shortening, atherosclerosis, and metabolic syndrome. *Intern Med*, 42:135-6.
- Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *The Journal of biological chemistry*, 280:38029-34.
- Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, Hasegawa H, Yamashita T, Nakatani K, Saito Y, Okamoto N, Kurumatani N, Namba N, Kitaoka T, Ozono K, Sakai T, Hataya H, Ichikawa S, Imel EA, Econs MJ, Nabeshima Y (2010) Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*, 398:513-8.
- Young GH, Wu VC (2012) KLOTHO methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. *Kidney Int*, 81:611–612.
- Zimmer P, Schenk A, Bloch W (2016) Chapter 29 - Epigenetics in Exercise Science and Sports Medicine, 515-530

Zhao Y, Sun H, Wang H (2016) Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell Biosci*, 6: 45.

Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP (2002) Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol*, 321:591-9.

Zhou X, Chen K, Lei H, Sun Z (2015) Klotho gene deficiency causes salt-sensitive hypertension via monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2-mediated inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 26:121–132.

Zuo Z, Lei H, Wang X, Wang Y, Sonntag W, Sun Z (2011) Aging-related kidney damage is associated with a decrease in klotho expression and an increase in superoxide production. *Age (Dordr)*, 33:261–274.

10. Saját publikáció jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Aczel D, Torma F, Jokai M, McGreevy K, Boros A, Seki Y, Boldogh I, Horvath S, Radak Zs (2023) The Circulating Level of Klotho Is Not Dependent upon Physical Fitness and Age-Associated Methylation Increases at the Promoter Region of the Klotho Gene. *Genes*, 14:2

Seki Y, Aczel D, Torma F, Jokai M, Boros A, Suzuki K, Higuchi M, Tanisawa K, Boldogh I, Horvath S, Radak Zs (2023) No strong association among epigenetic modifications by DNA methylation, telomere length, and physical fitness in biological aging. *Biogerontology*, 24:2

Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Jokai M, Torma F, McGreevy K, Koltai E, Bori Z, Babszki G, Bakonyi P, Gombos Z, Gyorgy 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, Sataro G, Kerepesi Cs, Boldogh I, Ba

X, Davies KJA, Horvath S, Radak Zs (2023) DNA methylation clock DNAmFitAge shows regular exercise is associated with slower aging and systemic adaptation. *Geroscience*, 45:5

Bakonyi P, Kolonics A, Aczel D, Zhou L, Mozaffaritarab S, Molnár K, László L, Kutasi, B, Tanisawa K, Park J, Yaodong G, Pinho RA, Radak Zs (2023) Voluntary exercise does not increase gastrointestinal motility but increases spatial memory, intestinal eNOS, Akt levels, and Bifidobacteria abundance in the microbiome. *Frontiers in physiology*, 14

Aczel D, Gyorgy B, Bakonyi P, Bukhari R, Pinho R, Boldogh I, Yaodong G, Radak Zs, 2022, The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer's Disease, *Antioxidants*, 11:5

Babszky G, Torma F, Aczel D, Bakonyi P, Gombos Z, Feher J, D Szabo D, Ligeti B, Pongor S, Balogh L, Pósa A, Radak Zs (2021) „COVID-19 Infection Alters the Microbiome: Elite Athletes and Sedentary Patients Have Similar Bacterial Flora”. *Genes*, 12:1577.

Gombos Z, Koltai E, Torma F, Bakonyi P, Kolonics A, Aczel D, Ditroi T, Nagy P, Kawamura T, Radak Zs. (2021) „Hypertrophy of Rat Skeletal Muscle Is Associated with Increased SIRT1/Akt/MTOR/S6 and Suppressed Sestrin2/SIRT3/FOXO1 Levels”. *International Journal of Molecular Sciences*, 22:7588.

Takacs F, Kardos I, Czeti A Aczel D, Illes S, Balogh A, Gaal-Weisinger J, Szaloki G, Barna G, (2020) A minimális reziduális betegség vizsgálata krónikus limfoid leukémiában. *Hematológia-Transzfuziológia*, 53:1

Gango A, Alpar D, Galik B, Marosvari D, Kiss R, Fesus V, Aczel D, Nagy N, Nagy A, Krizsan Sz, Reiniger L, Farkas P, Kozma A, Adam E, Tasnady Sz, Reti M, Matolcsy A, Gyenesei A, Matrai Z, Bodor Cs (2020) Dissection of Subclonal Evolution by Temporal Mutation Profiling in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated with Ibrutinib, *Int J Cancer*, 146:85-93

Aczel D, Matrai Z, Kiss R, Balogh A, Illes S, Bodor Cs, Alpar D (2019) Ibrutinibrezisztencia krónikus limfocitás leukémiában. Hematológia-Transzfuziológia, 52:2

Kiss R, Alpar D, Gango A, Nagy N, Eyupoglu E, Aczel D, Matolcsy A, Csomor J, Matrai Z, Bodor Cs (2019) Spatial clonal evolution leading to ibrutinib resistance and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica, 104:1

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Radák Zsoltnak, aki tudásával és folyamatos támogatásával biztosította a háttérrel PhD munkámhoz.

Leírva is megköszönném a TE Molekuláris Edzésélettani Kutató Központ dolgozóinak, akik segítettek az évek alatt a munkámat.

Végezetül, szeretném külön kifejezni a köszönetemet a családomnak és a barátaimnak is, akikhez évek során mindig bizalommal fordulhattam tanácsért, támogatásért.