

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Singlár Zoltán

**A karotinoid táplálékkiegészítők hatásai az
izomteljesítményre és a kalcium-homeosztázisra**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A karotinoid táplálékkiegészítők hatásai az izomteljesítményre és a kalcium-homeosztázisra

Singlár Zoltán

Témavezető: Dr. Sztretye Mónika



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

Tartalom

Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés	7
Irodalmi áttekintés	8
A vázizom	8
A vázizom jellemzői	8
A vázizom morfológiai sajátosságai	11
A vázizom speciális membrán rendszerei	14
A vázizom elektro-mechanikai kapcsolata	16
Mitokondriumok	18
Öregedés és szarkopénia.....	21
Oxidánsok és antioxidánsok	23
Célkitűzés.....	34
Anyagok és módszerek	35
Állatok tartása	35
Astaxanthin és krill olaj táplálékkiegészítés.....	35
<i>In vivo</i> kísérletek	36
Testsúly mérés	36
Grip teszt	36
Barnes Maze teszt	36
Videók kiértékelése az AnimalTracker program segítségével	37
<i>In vitro</i> kísérletek.....	37
Izomerő mérés	38
Egyedi FDB izomrostok izolálása	39
Feszültség clamp mérés és konfokális mikroszkópia	39
Mitokondriális kalcium felvétel mérés	41
Molekuláris Biológia.....	41
RNS preparálás, Reverz Transzkripció (RT) és Kvantitatív Polimeráz Lánc Reakció (Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	41
Western Blot	42
Statisztikai elemzés	43
Eredmények.....	44
Az AX és krill olaj táplálékkiegészítés megnöveli az <i>in vivo</i> izomerőt	44
Az AX és krill olaj táplálékkiegészítés megnöveli az <i>in vitro</i> izomerőt.....	46

A kalciumtranziensek feszültségfüggése változatlan marad a karotinoid táplálékkiegészítés után	49
A retinol módosítja a Ca ²⁺ felszabadulást vázizomban	52
Változatlan Ca ²⁺ tranziensek és Ca ²⁺ fluxusok antioxidáns táplálékkiegészítés után	55
A karotinoid táplálékkiegészítés változó hatásai az aktivitás-függő mitokondriális kalciumfelvételre	56
A karotinoid táplálékkiegészítés változó hatásai a mitokondriális dinamikára	59
A krill olaj és a memória	62
Eredmények megbeszélése	65
Táplálékkiegészítők és vázizom teljesítmény	66
AX és mitokondriális Ca ²⁺ jelátvitel	66
AX és glükóz metabolizmus	68
Táplálékkiegészítők és izomteljesítmény idősödő korban	69
Táplálékkiegészítők és kalcium-homeosztázis idősödő korban	70
Táplálékkiegészítők és mitokondriális funkció	71
Krill olaj és a tanulási képesség	72
Konklúzió	74
Összefoglalás	75
Summary	76
Irodalmi jegyzék	77
Saját közlemények jegyzéke	92
Tárgyszavak-Key Words	94
Köszönetnyilvánítás	95

Rövidítések jegyzéke

AMPK:	ADENOZIN MONOFOSZFÁT KINÁZ
ATRA:	ALL-TRANSZ RETINSAV
AX:	ASTAXANTHIN
CBR1:	KANNABINOID RECEPTOR 1
CPT I:	KARNITIN PALMITOILTRANSZFERÁZ I
CRU:	KALCIUMOT KIBOCSÁTÓ EGYSÉG (CALCIUM RELEASE UNITS)
CTRL:	KONTROLL
CSQ:	KALSZEKVESZTRIN
DHA:	DOKOZAHEXAÉNSAV
DHPR:	DIHIDROPIRIDIN-RECEPTOR
DRP1:	DINAMINHOZ KÖTÖTT FEHÉRJE 1
ECC:	EXCITÁCIÓS KONTRAKCIÓS KAPCSOLAT
EDL:	M. EXTENSOR DIGITORUM LONGUS
EPA:	EIKOZAPENTAÉNSAV
FDB:	M. FLEXOR DIGITORUM BREVIS
Fis1:	FISSION 1
HRT:	FÉLRELAXÁCIÓS IDŐ
IMM:	BELSŐ MITOKONDRIÁLIS MEMBRÁN
LDL:	ALACSONY SŰRŰSÉGŰ LIPOPROTEINEK
MCU:	MITOKONDRIÁLIS KALCIUM UNIPORTER
MFF:	MITOCHONDRIÁLIS HASADÁSI FAKTOR
MFN1/2:	MITOFUZIN 1 ÉS 2
MICU1:	MITOCHONDRIÁLIS KALCIUM FELVÉTEL 1
mtCB1R:	MITOKONDRIÁLIS CB1-RECEPTOR
OMM:	KÜLSŐ MITOKONDRIÁLIS MEMBRÁN
OPA1:	OPTIC ATROPHY 1
PUFA:	TÖBBSZÖRÖSEN TELÍTETTLEN ZSÍRSAVAK
RAR:	RETINSAV RECEPTOR
RNS:	REACTÍV NITROGÉN GYÖKÖK

ROS:	REACTÍV OXIGÉN GYÖKÖK
RXR:	RETINOID X RECEPTOR
RyR:	RIANODIN RECEPTOR
SERCA:	SZARKO-(ENDO)PLAZMATIKUS RETIKULUM KALCIUM ATP-ÁZ
SOD:	SZUPEROXID DIZMUTÁZ
SR:	SZARKOPLAZMATIKUS RETIKULUM
TA:	M. TIBIALIS ANTERIOR
TCA:	TRIKARBONSAV CIKLUS
Tm:	TROPOMIOZIN
TTP:	TIME TO PEAK

Bevezetés

A vázizom a mozgás aktív szervrendszere, amely a testtartásért is felelős. Az emberi test tömegének körülbelül a 40-50%-át teszi ki, és egyben az egyik legmetabolikusabb "szerve" az emberi testnek. Tekintettel arra, hogy egy aktív szövetről van szó, működéséhez kellő mennyiségű ATP is szükséges, melyet az izmok energiatermelő "központjai", a mitokondriumok termelnek. Metabolizmusuk során melléktermékként reaktív oxigén és nitrogén gyökök (ROS és RNS) termelődnek. A ROS és RNS molekulák a sejt szignalizációban fontos szerepet töltenek be, mint regulátor molekulák, viszont szintézisük túlzott mértéke kibillentheti az oxido-redoxi egyensúlyunkat, melyet belső antioxidáns rendszerünk próbál fenntartani.

Egy egészséges emberi szervezetben a belső antioxidáns rendszer erős védelmi vonalat képes biztosítani a túlzott ROS termelés ellen, viszont nem szabad megfeledkeznünk a külső forrásból származó, táplálékkal felvehető antioxidáns vegyületekről sem, melyek közé tartozik a méltán híres C- és A-vitamin. A táplálékkal felvehető és a bennünk lévő antioxidánsok együttesen képesek visszaállítani a redox egyensúlyt, mely egy patológiás állapot során eltolódhat, oxidatív stresszt kialakítva.

A külső antioxidánsok közé tartoznak a karotinoidek, amelyek a különböző zöldségek és gyümölcsök vörös színéért felelősek. Az A-vitamin prekursora, a béta-karotin is egy ilyen molekula, de ebbe a csoportba tartozik egy nemrég rivaldafénybe kerülő karotinoid, az astaxantin, amely a *Haematococcus pluvialis* mikroalgában vagy a krillben is megtalálható. Különleges kémiai szerkezetének köszönhetően hatékonyan képes védeni a membránokat mind a belső, mind a külső ROS támadásoktól, nem úgy, mint mondjuk a membránokba párhuzamosan beékelődő béta-karotin, vagy csak a sejt külső részén lévő C-vitamin.

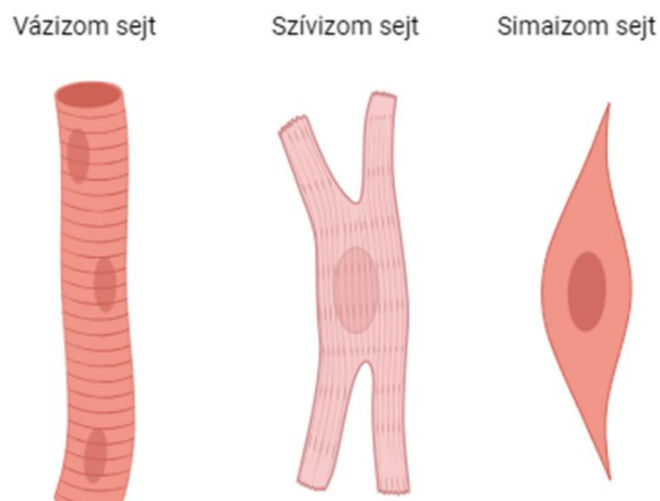
Az öregedés egy fiziológiás folyamat, amely a fizikai és szellemi képességek általános csökkenését okozza. A vázizomzatot nagymértékben érinti, mivel fokozatosan csökken az izomtömeg és az izomfunkció, fáradtság/kimerültség, gyengeség és a mozgásképesség romlása jelentkezik, ami rontja az idősök életminőségét.

Ennek ismeretében kíváncsiak voltunk arra, hogy az astaxantin hogyan befolyásolja fiatal, valamint idősödő egerek fizikai teljesítőképességét, ideértve az izomerőt, illetve kíváncsiak voltunk az egerek súlyváltozásaira is. Az izomerő mellett az egerek vázizmának kalcium-homeosztázisát is terveztük vizsgálni, valamint kíváncsiak voltunk az öregedő egerek tanulási képességére gyakorolt hatására is.

Irodalmi áttekintés

A vázizom

Az izomszövet különböző sejtípusból áll, melyek kontrakcióra vannak specializálódva. Mindegyik sejtípusban jelen van az aktin és miozin kontraktilis fehérje, de különbség van az eloszlásukban, aminosav-sorrendjükben, valamint az őket szabályozó fehérjék működésében. A "klasszikus" kontraktilis izomsejtek három típusát különböztetjük meg, amelyek eredetileg a mesodermából származnak (1. ábra).



1. **ábra.** Az izomsejtek különböző formái. (forrás: www.biorender.com)

Míg a simaizmok nem rendelkeznek szabályosan elhelyezkedő szarkomerákkal, a szív- és vázizom sejtek jól szervezett harántcsíktartalmat tartalmaznak, amely fénymikroszkóppal jól megfigyelhető. A simaizmok részt vesznek a belső szervek felépítésében, a szívizom felelős a vérkeringés folyamatos fenntartásáért, míg a csontvázhoz kapcsolódó vázizomzat biztosítja a testtartást és mozgást. A sima- és szívizmot az autonóm (vegetatív) idegrendszer irányítja, míg a vázizmot a perifériás idegrendszer szomatomotoros rostjai idegzik be, így akaratlagosan szabályozható.

A vázizom jellemzői

A 19. század végén vált köztudottá a tudományos irodalomban, hogy a vázizmot több rosttípus alkotja. Ranvier [1] különböztette meg először 1873-ban a vörös és fehér izmokat, ezután Grützner (1883) és Knoll (1891) [2] végezték hisztológiai tanulmányaikat, ahol

"átlátszó" és "homályos" egyedi izomrostokról számoltak be. Krüger [3] összefoglalta a két fő vázizomrost típus szöveti jellemzőit ezen korabeli ismeretek alapján.

Az 1920-as évek óta a tudósok egyre kifinomultabb technikákat alkalmaznak az izomrostok sokféleségének feltárására. A korai morfometriai és mikrofotográfiai méréseket mára hisztokémiai, immunhisztokémiai és fiziológiai-biomechanikai mikromódszerek egészítik ki. Ezek a technikák együttesen lehetővé teszik az izomrostok pontos azonosítását és jellemzését [4].

Az utóbbi években a molekuláris biológia fejlődése újabb betekintést engedett az izomrostok működésébe, amivel például azonosították a vázizomrostokban található proteinek különböző formáit és változatos kifejeződésüket. Ezek a felfedezések hozzájárultak ahhoz a megértéshez, hogy a rostok funkcionális paraméterei rendkívül változatosak, és széles skálán mozoghatnak. Engel (1962) [5] nyomán két rosttípust különböztethetünk meg, a miozin ATPáz aktivitás szerint. Az I. típusú rostok kis, míg a II. típusú rostok nagy ATPáz aktivitást mutatnak (*I. táblázat*). Bárány és kollégái [6] kutatásaikban azt találták, hogy a miozin ATPáz aktivitása erős összefüggést mutat az egyes izomrostok kontrakciós sebességével. Az izomrostok anyagcseréje alapján (oxidatív és glikolítikus) a gyors rostokat újabb két alcsoportba lehet sorolni. Az ATPáz működés és a metabolikus enzimaktivitás két anyagcsere-jellemzője összhangban van, és ezzel együttesen már három különböző izomrosttípust lehet megkülönböztetni: gyors glikolítikus (fast-twitch glycolitic, FG) gyors oxidatív-glikolítikus (fast-twitch oxidative glycolitic, FOG) és lassú oxidatív (slow-twitch oxidative, SO). Másik fontos alkotó elem, amiben a sejttípusok különböznek egymástól, azok a miozin izoformák, azon belül is a miozin fej részét alkotó nehéz láncú miozin (myosin heavy chains, MHC) eltérő izoformái.

Az I. típusú rostok felelősek a lassú és tartós összehúzódásért, ezért főleg a testünk tartásáért felelős izmokban találhatóak meg. Ezek a rostok kis átmérőjűek, hosszú kontrakciós-relaxációs ciklussal (100 ms hosszú kontrakciók), gazdag mioglobinnel, sok oxidatív enzimmel és mitokondriummal rendelkeznek.

A II. típusú rostok főleg a helyváltoztatásban szerepet játszó izmokban vannak jelen (például a végtagok izomzata). A kontrakció és a relaxáció is ms-ok alatt megy végbe. A II. típusú rostok három fő csoportba sorolhatók: II.A, II.B és II.D/X.

Jellemzők	I. típus (SO)	II. A típus (FOG)	II. X/D típus (FG)	II. B típus (FG)
Kontrakció	lassú tónusos		gyors fázisos	
Miozin ATP-áz aktivitása	alacsony	magas	magas	magas
SR Ca ²⁺ pumpa aktivitása	alacsony	magas	magas	magas
Oxidatív kapacitás - mitokondrium - kapilláris sűrűség - mioglobin tartalom	magas „vörös izom”	közepes	közepes	alacsony „fehér izom”
rostátmérfő	kicsi	közepes	közepes	nagy
metabolizmus	oxidatív	többnyire oxidatív	oxidatív és glikolitikus	többnyire glikolitikus
mechanikai válasz	lassú	lassú	gyors	gyors
MHC izoforma	MHC I	MHC II. A	MHC II. X	MHC II. B

1. táblázat. A vázizomrostok osztályozása.

A II.B típusú rostok, amelyek a "fehér" izom részei, kevés mioglobint és mitokondriumot tartalmaznak.

- A II.A típusú rostok egy részében a kontrakciós sebesség, a mioglobin mennyisége és a mitokondriumok száma összevethető a fehér izommal.
- A II.D/X típusú rostok egy átmeneti típus, amely a II.B és a II.A típusú rostok között helyezkedik el.

Fontos megjegyezni, hogy az emlősök anatómiaiailag elkülöníthető izmait mindig különböző típusú rostok alkotják, és az egyes izmok közötti különbségek a rosttípusok arányában nyilvánulnak meg. Példaként a mi általunk is használt egér *m. extensor digitorum longus* (EDL) gyors izomban a rostok aránya a következőképp alakul: 5,5% I. típus, 18,5% II.A típus, 76% II.B típus [7], míg a szintén gyors izomnak számító *m. flexor digitorum brevis* (FDB) esetében: 4,4% I. típus, 44% II.A típus és 51,6% II.X típus [8].

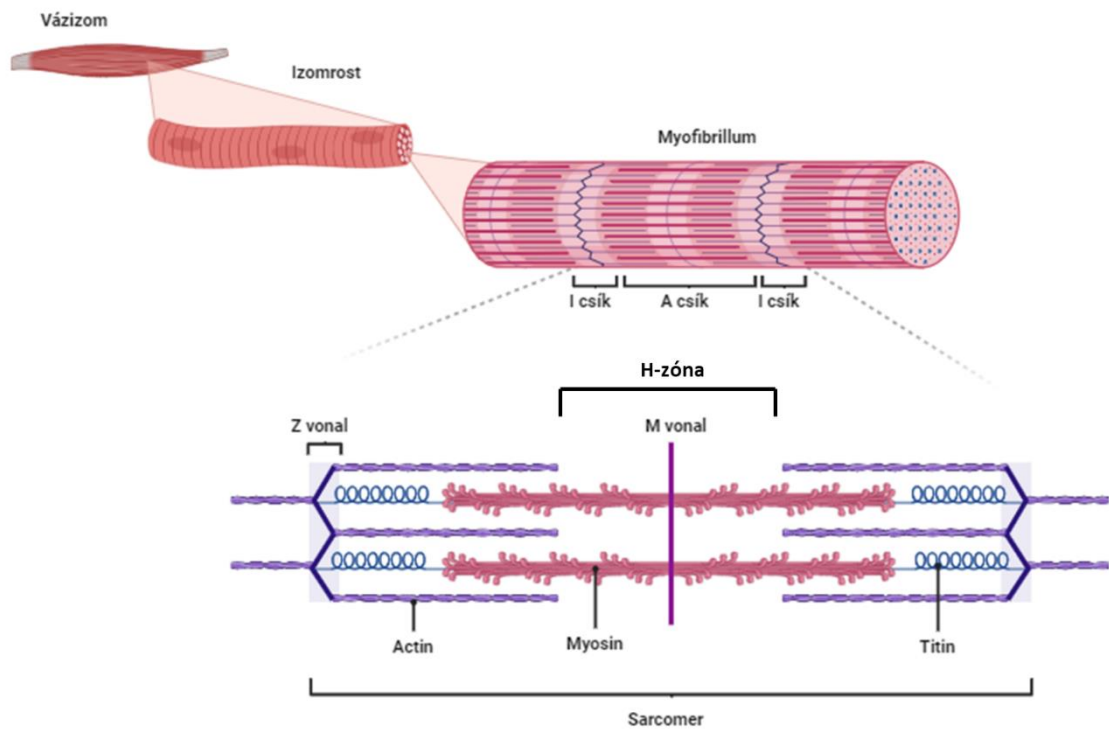
A vázizom morfológiai sajátosságai

A vázizom felépítése

Egy felnőtt szervezetben a vázizomzatot alkotó izomrostok sokmagvú, valódi syncytiumot alkotó óriássejtek (2. ábra). Az izomrostokat és izomrostkötegeket kötőszövetes rétegek veszik körül, ahol megtalálhatók az erek és idegek is. Az endomysium közvetlenül az izomrostokat veszi körül, a perimysium a fascikulusokat, míg az epimysium a teljes izmot borítja. Az izomsejteket sejtmembrán borítja, melynek speciális neve szarkolemma. Az izomrostokban a sejtmagok a szarkolemma alatt helyezkednek el. Az izomrostok citoplazmáját, amelyet vázizom esetében szarkoplazmának vagy myoplazmának nevezünk, jelentős részében a kontraktilis fehérjékből felépülő myofibrillumok teszik ki. A miozin molekulák alkotják a vastag filamentumok vázát, míg az aktin molekulák alkotják a vékony filamentumokat. A szarkoplazmában megtalálhatók az energiaszükségletet biztosító alkotók (glikolitikus enzimek, mitokondriumok), valamint a szarkolemma alatt elhelyezkedő sejtmagok. A myofilamentumok sűrűn csoportosulnak a myofibrillumokban, amelyeket egy komplex sejten belüli membránrendszer, nevezetesen a szarkoplazmatikus retikulum (SR) veszi körül. Egy izomrost több száz myofibrillumot tartalmaz, és mindegyiküket Z-lemezek választják el, létrehozva mintegy 2,5 µm hosszú szakaszokat, az ún. szarkomerákat [9]. A mikroszkópos megfigyelések során a szarkomerákban váltakozó világos és sötét sávok jelennek meg, amelyek a miozin (~15 nm átmérőjű, 1,6 µm hosszú) és az aktin filamentumok (~6-8 nm átmérőjű, 1,0 µm hosszú) különböző fénytörési tulajdonságainak a következményei. A szarkomerában az aktin és miozin filamentumok átfedése alkotja a sötétebb A (anizotróp) csíkot, míg a csak aktint tartalmazó területek a világosabb I- (izotróp) csíkot képezik. A H-zóna, más néven Hensen-zóna, a csak miozinból álló terület, amely a szarkomerának a közepén helyezkedik el, a M-vonal két oldalán (2. ábra).

Kontraktilis fehérjék

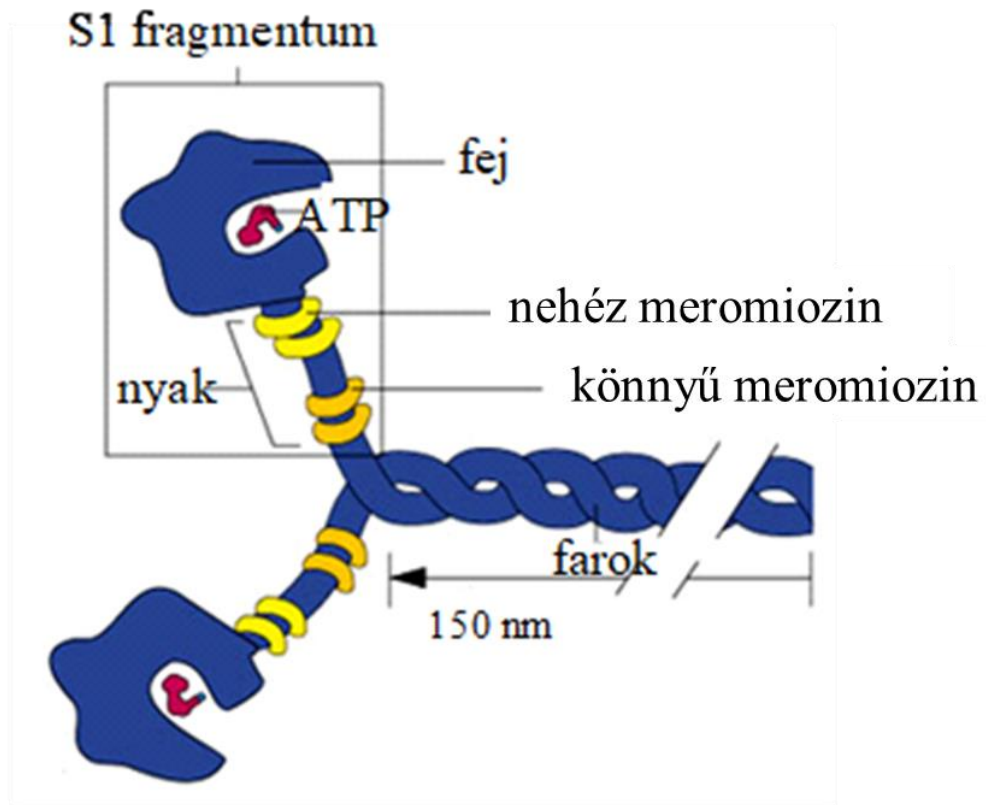
A vázizomban található fő motorfehérje a miozin, ami több szakaszból áll (3. ábra). A miozin első szakasza egy kettéágazó fejrészrel rendelkező fehérje, amely az S1 fragmentumot alkotja, és ATPáz aktivitással rendelkezik. Ez a fejrész izületszerűen kapcsolódik egy nyaki szakaszhoz, az S2 fragmentumhoz. A fejrész és a nyaki rész együttesen alkotja a nehéz meromiozint (Heavy MeroMyosin, HMM), amely mintegy 200 kDa tömegű. Az HMM-hez izületszerűen csatlakozik a farki rész, amely a könnyű meromiozint (Light MeroMyosin, LMM) jelenti, és 15-30 kDa tömegű. Körülbelül 200 miozin molekula dimerizációja után a dimerek farki részei egy bipoláris "vastag" filamentummá egyesülnek.



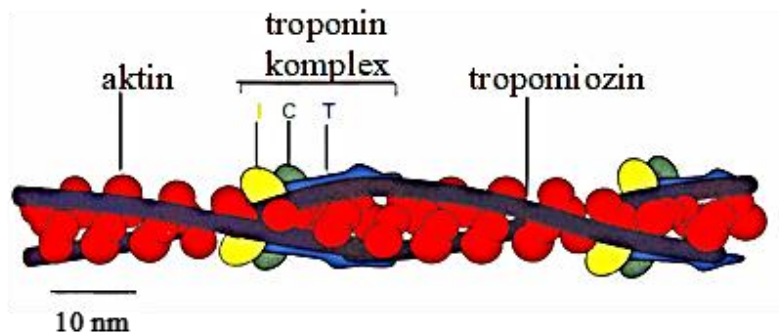
2. ábra. A vázizom felépítése. (forrás: www.biorender.com)

A vázizom vékony filamentumának fő komponense az aktin (4. ábra). Az aktin fehérje két variánsa fordulhat elő: globuláris monomerként (G-aktin, 42 kDa-os molekulatömegű), illetve fibrilláris polimerként (F-aktin, több száz polimer).

Az aktinhoz szorosan szabályozó fehérjék kapcsolódnak. Az egyik ilyen fehérje a tropomiozin (Tm), amely fonalszerűen tekeredik az aktin polimerrel. Egy Tm molekula hét aktin monomert (G-aktint) fed le. Ez az elhelyezkedés fontos szereppel bír az izom összehúzódás során kialakuló molekuláris események lebonyolításában. A Tm helyzete lehetővé teszi az aktin-miozin kölcsönhatás gátlását a rost nyugalmi állapotában. Két tropomiozin alegység létezik: az α -tropomiozin (molecular weight, MW=34 kDa) és a β -tropomiozin (MW=36 kDa).



3. ábra. A miozin felépítése. (forrás: <http://www.sci.u-szeged.hu>)



4. ábra. A vékony filamentum felépítése. (forrás: <http://www.sci.u-szeged.hu>)

A kalciumjelet dekódoló egység a troponin (Tn), amely három alegységből áll:

- a troponin-C (Tn-C, MW=18 kDa), felelős a Ca^{2+} -kötésért.
- a troponin-T (Tn-T, MW=37 kDa), kapcsolja a Tn-t a Tm-hez.

- a troponin-I (Tn-I, MW=24 kDa), megakadályozza az aktin és miozin közötti hídképződést a nyugalmi állapotban. A Tn-I gátló hatása megszűnik, amikor a Tn-C Ca^{2+} -ot köt.

A Tn-C négy Ca^{2+} -kötőhelyet tartalmaz. Kettő közülük specifikusan köti a Ca^{2+} -ot ($K_d=10^{-6}$ mol/l), de csak amikor a myoplazma kalciumszintje megemelkedik az SR-ből történő kalciumfelszabadulás után. A másik két kötőhely nem specifikus, és képesek kötni Ca^{2+} -t ($K_d=10^{-8}$ mol/l) és Mg^{2+} -t ($K_d=10^{-4}$ mol/l) egyaránt.

A vázizom speciális membrán rendszerei

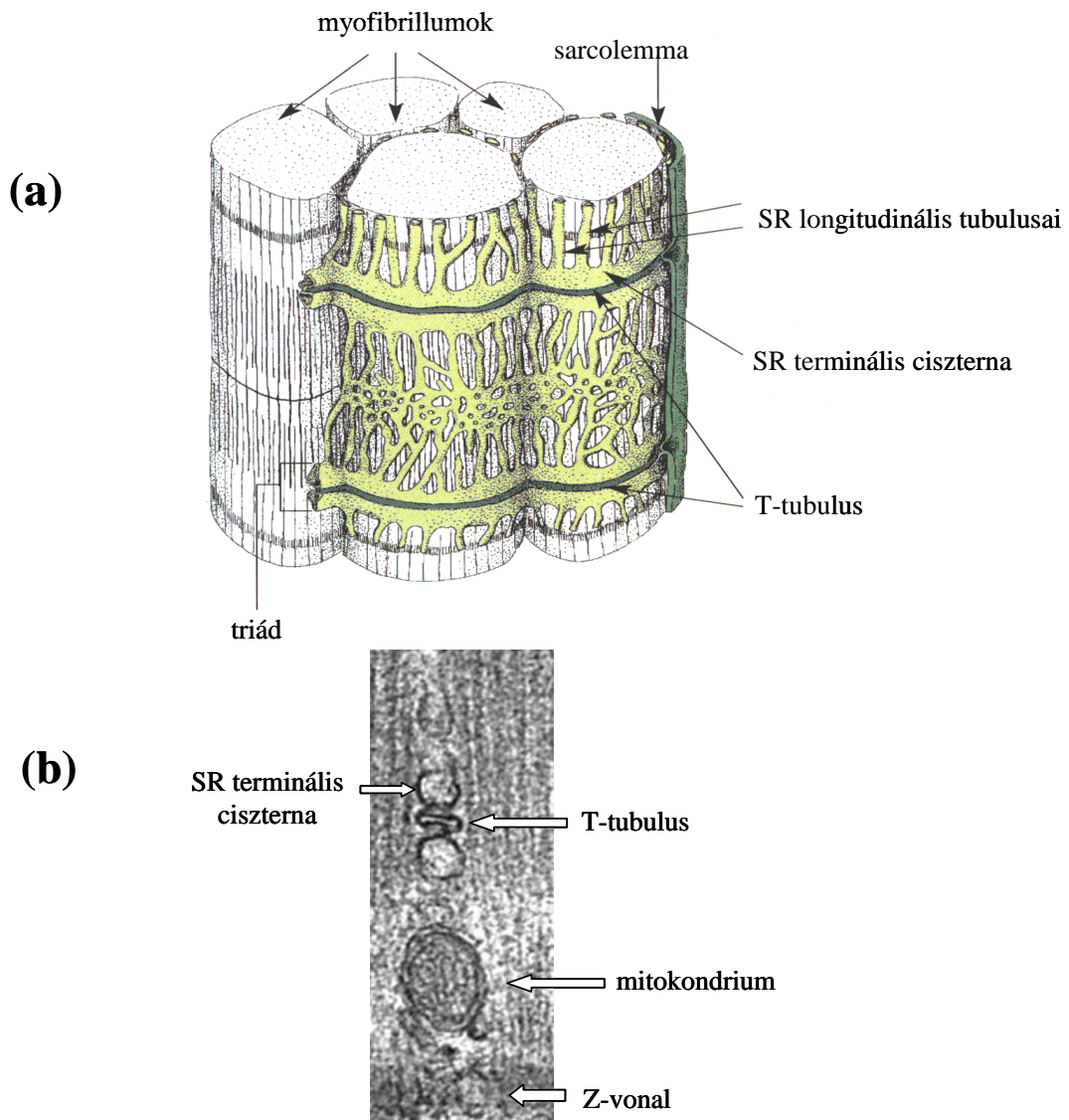
A szarkolemma

Az elektronmikroszkópos vizsgálatoknak köszönhetően fedezték fel az izomrost felszínén található három alkotóelemet: az endomysiumot, a lamina basalist és a szarkolemmát. Az endomysium, ami az izomrostot körülveszi, kollagén rostokból áll. A lamina basalis, vagyis az alaphártya, molekuláris kapcsolatban van a szarkolemmával, amelynek felületén több betüremkedés is előfordul. A szarkolemma fontos jellegzetességei közé tartoznak a kaveolák, amelyek speciális lipid csoportok, vagyis a membrán koleszterinben gazdag részei. A vázizomban a kaveolák csak az izomra jellemző Cav-3 fehérjét tartalmaznak. A szarkolemma két különböző kalciumkoncentrációjú közeg között képez egy határt: az extracelluláris tér ($[\text{Ca}^{2+}]_e = 2,5$ mM) és a citoplazma ($[\text{Ca}^{2+}]_i = 100$ nM nyugalmi állapotban). A szarkolemma szerkezete azonos további ingerelhető membránokkal, vagyis kettős lipid réteg alkotja, amelyben integráns fehérje molekulák találhatóak.

T-tubulus és szarkoplazmás retikulum

A kifejlett vázizomban az összehúzódásért felelős rendszer, a nagy tömege miatt a sejtek szélére szorítja ki az izomrostokon belüli sejtmagokat. A vázizomnak specifikus endoplazmatikus retikuluma van, amelyet szarkoplazmatikus retikulumnak (SR) nevezünk (*5a ábra*). Az SR longitudinális tubulusai a rost tengelyével párhuzamosan helyezkednek el és a Z-lemezek közelében terminális ciszternákká tágulnak. Az SR tubulusai és a szarkolemma betüremkedéseivel létrejövő transzverzális tubulusok (T-tubulusok) nagyon szoros fizikai közelségbe kerülnek egymással a triádokban (*5b ábra*). A T-tubulusok az A és I vonalak mentén helyezkednek el emlős vázizomban [10]. Mindkét oldalról az SR terminális ciszternái kapcsolódnak a T-tubulusokhoz, és így hárman alkotják a triádot. A triád fontos szerepet tölt be az excitációs-kontrakciós kapcsolatban. Az SR longitudinális tubulusa hálószerűen körbefonja a myofibrillumokat, és jelentős szerepet játszik az izom relaxációjában, mivel itt található az aktív transzportot végző szarko-(endo)plazmatikus retikulum kalcium ATP-áz

(SERCA) pumpák. A T-tubulusok különleges elrendeződése lehetővé teszi a teljes vázizomrostok egyidejű aktiválását. Ezen folyamatok az elektro-mechanikai kapcsolat révén történnek, amikor is az akciós potenciál a T-tubulusokon keresztül terjedve aktiválja az SR-ben található kalciumcsatornákat, ami kalciumfelszabadulást eredményez a szarkoplazmatikus retikulumból. Ez a kalcium szerepet játszik az izomösszehúzóds folyamatában.



5. ábra. (a) A szarkotubuláris rendszer (<http://www.sci.u-szeged.hu>) (b) a triád szerkezete (Royer és Ríos, 2009)

Az SR három fontos folyamatban játszik szerepet:

- 1.) Ingerlés hatására történő kalciumfelszabadulás: Az SR terminális ciszternáin található kalciumcsatornákon, a rianodin receptorokon (RyR) keresztül történik a kalcium felszabadulása az SR-ből. Amikor az akciós potenciál eléri a T-tubulusokat, ez stimulálja az ott elhelyezkedő dihidropiridin-receptorokat (DHPR), és a kalciumionok a koncentráció gradiens irányában áramlanak ki az SR-ből a citoplazmába. Ez a kalciumfelszabadulás kulcsfontosságú az izomösszehúzódnak kiváltásához.
- 2.) Kalcium visszajuttatása az SR-be: Az izom relaxációja alatt a kalciumionokat vissza kell juttatni az SR-be, hogy újra rendelkezésre álljanak a következő izomösszehúzódnakhoz. Ez a visszazállítás igen jelentős koncentráció gradienssel szemben történik, és aktív transzport révén valósul meg. A SERCA pumpa végzi a kalciumionok visszazállítását, amely során ATP-t használ fel.
- 3.) Kalcium tárolása: Az SR-ben található kalszekvesztrin (CSQ) nevű kalciumkötő fehérje kulcsfontosságú a kalcium tárolásában. A terminális ciszternákban elhelyezkedő CSQ képes nagy mennyiségű kalciumiont kötni és felszabadítani, így fontos szerepet játszik a kalcium-homeosztázis fenntartásában és az izomösszehúzódnakhoz nélkülözhetetlen gyors kalciumválasz kialakításában.

Főleg ezek a folyamatok biztosítják a kalcium szabályozását az izomsejtekben, ami elengedhetetlen az izomösszehúzódnak és relaxáció pontos szabályozásához. A kalciumionok koncentrációváltozásai a citoplazmában befolyásolják a miozin és az aktin kölcsönhatását, ami a kontrakció és relaxáció alapvető mechanizmusát képezi.

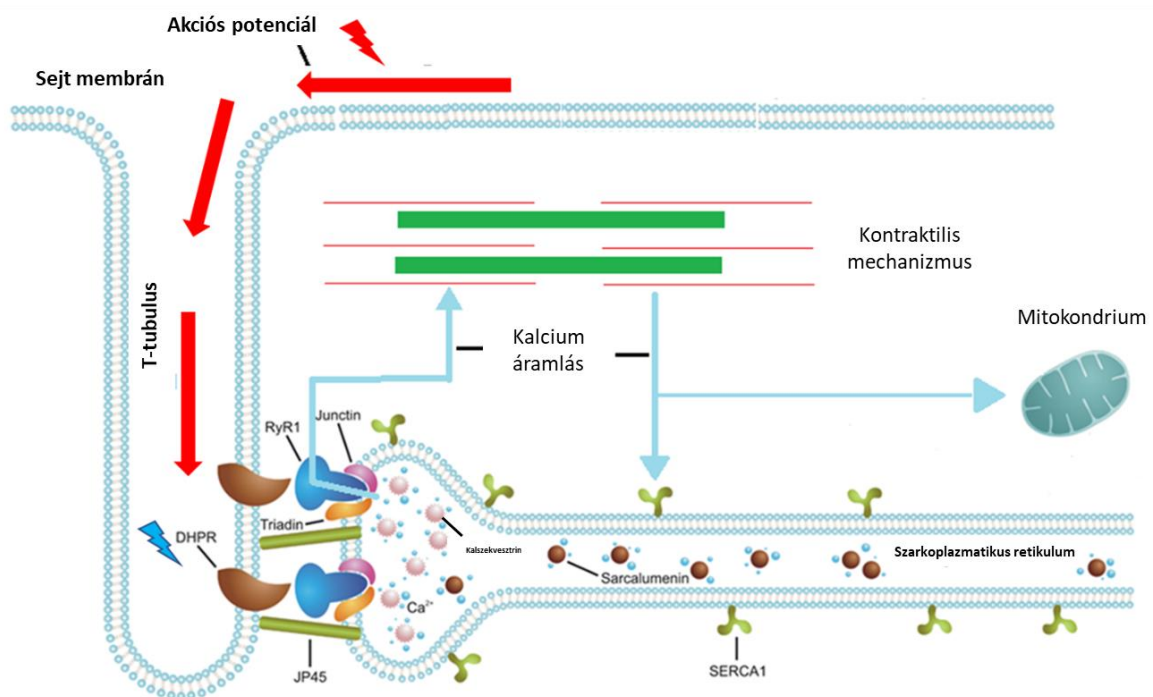
A vázizom elektro-mechanikai kapcsolata

Az izomösszehúzódnak és relaxációt a citoplazma Ca^{2+} szintjének gyors változása szabályozza. Egy fiziológiásan működő vázizomszövetben az összehúzódnak az elektro-mechanikai kapcsolattal (Excitation Contraction Coupling, ECC) jön létre, melynek során az akciós potenciál (elektromos jel) Ca^{2+} -felszabadulást (mechanikai válasz) eredményez (6. ábra). Ennek a jelátalakításnak a helyszínei a fentebb említett triádok, ahol az ECC során mechanikai kölcsönhatások alakulnak ki a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} -csatornák ($\text{Ca}_v1.1$) vagy másnéven dihidropiridin-receptorok (DHPR), és az 1-es típusú rianodin receptorok (RyR1, az SR membránban található Ca^{2+} csatorna között). A T-tubulus membránjának depolarizációját követően a DHPR feszültségérzékelő fehérjei konformációs változáson

mennek keresztül, ami a közvetlen mechanikai kapcsolatnak köszönhetően a RyR1 kalciumcsatornák megnyílásához vezet. A Ca^{2+} ezt követő gyors és masszív felszabadulása a mioplazmába indítja el az izomösszehúzódást. A mioplazmatikus térbe kijutó Ca^{2+} ionok a troponin C-hez kötődnek, ami a kontrakciós mechanizmust indítja el. Az aktin és miozin egymáson való elmozdulása idézi elő az izom kontrakcióját és az erő kifejtését.

A SERCA pumpa, illetve mitokondriumok általi Ca^{2+} felvétel teszi lehetővé az izomrelaxációt [11], előkészítve az izmot az ECC következő ciklusára.

In situ a RyR1 receptor több reguláló enzimmal van kapcsolatban. Ezek az enzimek az SR belső tere (pl. CSQ vagy Sarcalumenin), a membránja (pl. triadin, junctin, junctophilin (JP45)), a sejtter (pl. FKBP12, sorcin, calmodulin), vagy a sarcolemma (pl. DHPR α 1-alegysége) irányából kerülnek kapcsolatba a RyR1-el (6. ábra). A RyR1 így egy igen összetett receptorkomplexet épít fel.



6. ábra. A vázizom elektro-mechanikai kapcsolata. (forrás módosítva Sztretye és mtsai. 2019 nyomán)

Mitokondriumok

A mitokondrium kulcsfontosságú az izom megfelelő működésében, mert fontos ATP forrás, illetve befolyással bír a redox státuszra, módosíthatja a pH szintet és a kalcium háztartásban is fontos szerepe van, mint puffer rendszer. ATP és kalcium hiányában az izmok nem képesek összehúzódni, így a mitokondriumok bármilyen nemű változása miopátiához vagy más elégtelen vázizomműködéshez kapcsolt betegséghez vezethet. A vázizomrostokban található mitokondriumokat három csoportba lehet sorolni:

(a) hosszanti mitokondriumok, amelyek sorokban helyezkednek el a miofibrillumok között (főként oxidatív, lassú-rostokban);

(b) szubsarkolemmális mitokondriumok, amelyek csoportokban helyezkednek el a felszíni membrán alatt a kapillárisok közelében (így gyakrabban fordulnak elő a jobban vaszkularizált izmok oxidatív rostjaiban);

(c) transzverzális mitokondriumok, amelyek két ferde sorban helyezkednek el mindkét oldalon a Z-vonalak mentén, körül ölelve a miofibrillumokat az I-sávban [12].

A vázizomzat mitokondriumi a mitokondriális Ca^{2+} uniporterén (MCU), egy 40-kDa molekula tömegű Ca^{2+} szelektív csatornán keresztül aktívan hozzájárulnak az SR-ből felszabadult Ca^{2+} térbeli és időbeli eloszlásához. A citoszolikus Ca^{2+} szint emelkedése elősegíti az MCU-k megnyílását, így lehetővé téve a Ca^{2+} áramlást a magas elektrokémiai gradiens alapján a citoplazmából a mitokondriális mátrixba. A Ca^{2+} a mitokondriumban serkenti több enzim aktivitását a trikarboxil-sav (TCA) ciklusban és az elektrontranszport láncban, ideértve a piruvát dehidrogenáz, az izocitrát dehidrogenáz, az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz enzimeket, valamint az F_1/F_0 ATPáz ATP-szintetizáló aktivitását [13]. Így a mitokondriumok szabályozzák a citoplazmatikus Ca^{2+} koncentrációt [14], és energetikailag kapcsolódnak az izom anyagcseréjéhez.

A vázizomzatban a Ca^{2+} alapú szabályozás lényeges szereplője a MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1) fehérje, amely a MCU komplex moduláló, kapuzó alkotóegysége. Funkcióvesztő mutációi súlyos klinikai izomfenotípusok kialakulásához vezethetnek betegekben (például súlyos izomgyengeség vagy krónikus fáradtság) [15,16].

A mitokondriális hálózat dinamikáját a fúzió (fusion) és a hasadás (fission) közötti kifinomult egyensúly szabályozza. A fúzió lehetővé teszi a mitokondriális populáción belüli tartalmi keveredést, ezáltal megakadályozza az alapvető összetevők tartós elvesztését. A

hasadás új mitokondriumok létrehozásához szükséges, de lehetővé teszi a sérült mitokondriumok eltávolítását is, így elősegítheti az apoptózist nagyfokú sejtstressz esetén.

A Mitofuzin 1 és 2 (Mfn1/2) részt vesz a külső mitokondriális membrán (outer mitochondrial membrane, OMM) fúziójában, míg az optic atrophy 1 (OPA1) a belső mitokondriális membrán (inner mitochondrial membrane, IMM) fúzióját segíti. A mitokondriumok hasadását a mitokondriális hasadás 1 (fission 1, Fis1), a dinaminhoz kapcsolódó fehérje 1 (Drp1) és a mitokondriális hasadási faktor (mitochondrial fission factor, Mff) fehérjék irányítják [17]. A Mfn2 jelen van a mitokondriumokban és a vázizomzat SR membránjaiban is. Kimutatták, hogy kulcsszerepet játszik olyan mitokondriális tevékenységekben, mint például a morfológia, lokalizáció, fluktuáció, transzport és a funkcionális SR-mitokondriális Ca^{2+} kapcsolat [18]. Az öregedés az Mfn2 szintjének folyamatos csökkenésével jár együtt, és ennek következtében az Mfn2 hiánya a mitofágia romlását és az oxidatív stressz fokozódását okozza, ami végül a hibás mitokondriumok felhalmozódásához vezetett az egér vázizomokban [19]. A közelmúltban végzett vizsgálatok rávilágítottak az endokannabinoid rendszer, nevezetesen a kannabinoid receptor 1 (CB1) mitokondriális oxidatív aktivitást szabályozó szerepére [20]. A mitokondriális CB1-receptorok (mtCB1Rs) megtalálhatók a központi idegrendszer neuronjaiban és hasonló arányban a perifériás szövetekben, például a harántcsíkolt izmokban is, ahol az OMM-ben helyezkednek el [21]. Felmerült, hogy a mtCB1R-ek aktiválódása részt vesz az izom oxidatív aktivitásának szabályozásában, valószínűleg a piruvát-metabolizmusban részt vevő kapcsolódó enzimeken keresztül, amelyek a Krebs-ciklus aktivitásának fő alkotóelemei [21].

Több betegség is támadhatja a mitokondriumot, egyik példa a Barth szindróma, amely egy X-kromoszómához kötött recesszív génmutáció következménye. Ez a szindróma izomgyengeséget és kardiomiopátiát okoz, valamint a tafazzin (egy mitokondriális acetiltranszferáz) diszfunkciója miatt negatívan befolyásolja a mitokondriumok morfológiáját. He és munkatársai [22] hibás tafazzint hordozó miocitákat kezeltek mito-Tempoval, egy mitokondrium-specifikus antioxidánsal. Azt tapasztalták, hogy a kezelés hatására a tafazzin szint fiziológiás szintre emelkedett, a mitokondriális ROS termelés csökkent, és a sejten belüli ATP szint megnövekedett.

A patológiás állapotok mellett, az öregedés is egy olyan tényező, amely hatással van a mitokondriumok működésére. Az öregedés és korrallal járó betegségek kialakításában a mitokondriumot tekintik a legfőbb mediátornak, ugyanis a sejtorganellel nem megfelelő működése hozzájárul több humán betegség kialakulásához. Mivel az antioxidánsok képesek a

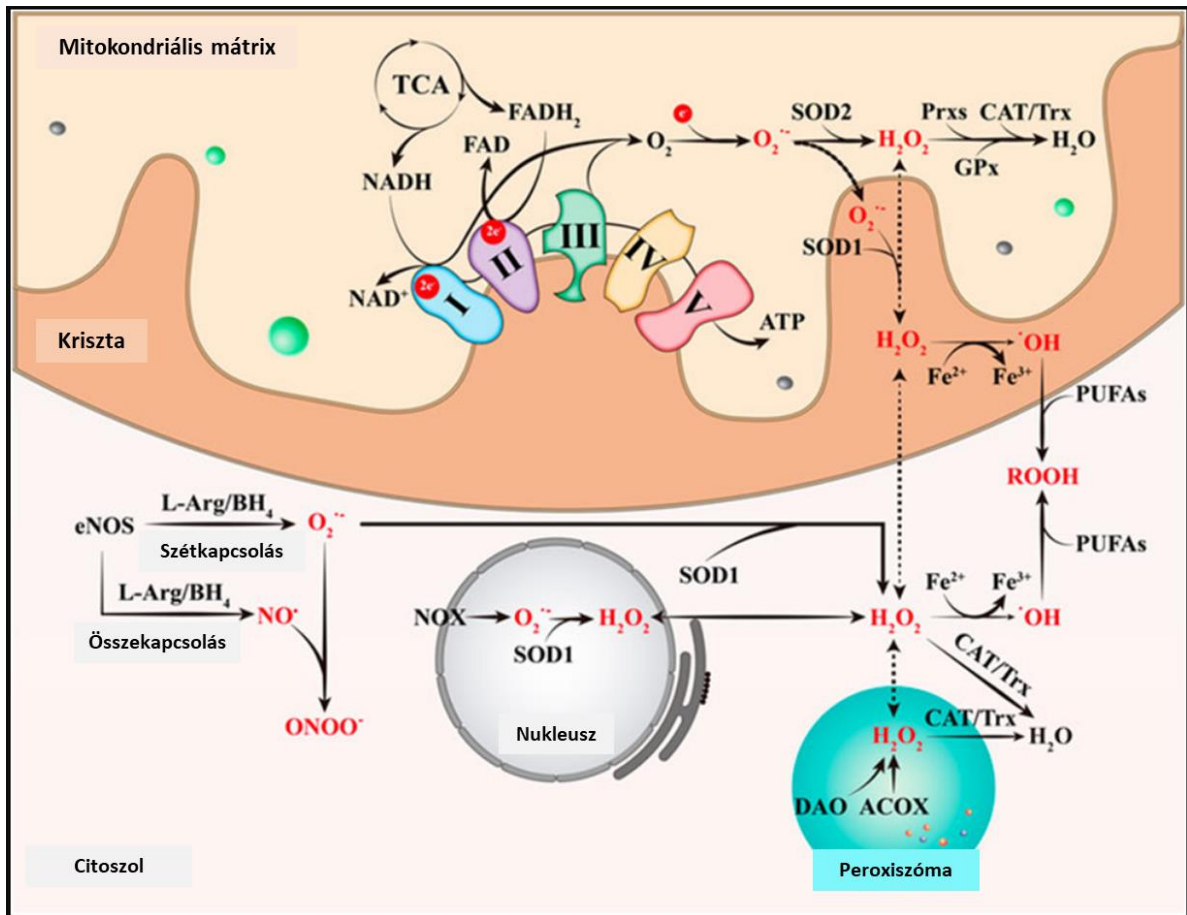
ROS túltermelés visszaszorítására, így feltételezés szerint az öregedés folyamatát is képesek lehetnek lelassítani. Ezért számtalan tanulmány vizsgálja nem csak a belső antioxidáns rendszer működését, hanem a külső antioxidáns kezelés öregedésre és korral járó betegségekre való hatásait.

Reaktív oxigén gyökök

Az elmúlt évszázadok során az emberek átlagos élettartama fokozatosan növekedett, aminek következménye, hogy a világ népessége idősödővé vált. Ahogy az életkor halad előre, egyre nagyobb valószínűséggel jelentkeznek krónikus betegségek, csökkennek a kognitív képességek és megnő a rokkantság kockázata. Az "Öregedés Szabadgyök-elméletét" a múlt század 50-es éveiben Hartman fogalmazta meg [23], a sejtek és a molekulák szintjén magyarázva az öregedés mechanizmusát. Az elmélet szerint a sejtek anyagcseréje során keletkező reaktív oxigén- és szabadgyökök (reactive oxygen species, ROS) károsítják a sejtalkotókat, és az ezekből adódó károsodások felelősek az öregedésért. Azonban ez az elmélet önmagában nem nyújt kielégítő magyarázatot az öregedés kialakulására, ugyanakkor ezt a jelenséget sem hagyhatjuk figyelmen kívül, hiszen számos adat bizonyítja, hogy a reaktív oxigén- és szabadgyökök felelősek az öregedő fenotípus és a korral járó betegségek kialakulásáért [24–26].

Az intracelluláris ROS leggyakoribb formái közé tartoznak a szuperoxid anion ($O_2^{\bullet-}$), a hidroxil gyök ($\bullet OH$), a hidrogén peroxid (H_2O_2) és a lipid hidroperoxidok (LOOH) [27]. A ROS molekulák legnagyobb hányada a vázizomban termelődik kontrakció közben, de nyugalmi állapotban is [28]. A legfőbb ROS molekula a $O_2^{\bullet-}$ forma, ami sok sejtalkotóban termelődik a sejt működése során, beleértve a peroxisómákat, az endoplazmatikus retikulumot, valamint a mitokondriumokat [29]. Sok citoszolikus enzim, mint például a NADPH oxidázok és a monoamin oxidázok, helyileg is létrehozhatnak $O_2^{\bullet-}$ molekulákat [30]. Az emlős sejtekben az ATP fő forrása a mitokondriális elektrontranszport lánc, amely legalább 11 különböző helyen tud $O_2^{\bullet-}$ molekulákat előállítani a belső mitokondriális membrán mindkét oldalán (7. ábra) [31]. Fiziológiai körülmények között az I. és III. komplexumokat tartják jelenleg a fő $O_2^{\bullet-}$ termelő helyeknek [32]. Mivel az $O_2^{\bullet-}$ túl erősen töltött ahhoz, hogy könnyen átlépje a belső mitokondriális membránt, helyileg szerepet játszhat a mitokondriumok működésében [33].

A reaktív oxigén gyökök az ECC mechanizmus számos részvevőjét befolyásolhatják hátrányosan több tanulmány szerint. Mind a DHPR-re, mind a RyR1-re hatással vannak a ROS ágensek, ezért a sejt redox állapota jelentősen befolyásolhatja a vázizom kalcium-homeosztázisát, és így az izom kontrakcióját is.



7. ábra. A ROS molekulák legfőbb forrásai. (forrás: Chen és mtsai, 2022 Chakrabarty, R.P. és N.S. Chandel eredeti ábrájából).

Az elektrontranszport lánc I. és III. komplexumait tartják az $O_2^{\bullet-}$ fő termelőhelyeinek. Az $O_2^{\bullet-}$ gyorsan és spontán módon H_2O_2 -vé alakul, amit a SOD2 katalizál. Ezután a Prxs, GPx, CAT és Trx katalizálják a H_2O_2 átalakítását H_2O -vá. A H_2O_2 könnyen áthatol a sejtmembránon és Fe^{2+} -vel reagálva $\bullet OH$ -t hoz létre, ami az ROS legerősebb oxidálószere. Ezen kívül, a SOD1 katalizálja a sejtmagban a NOX által termelt $O_2^{\bullet-}$ átalakítását H_2O_2 -vé; az ACOX és DAO is képes H_2O_2 létrehozására a peroxiszómában.

Rövidítések: TCA, trikarbonsav-ciklus; SOD1, szuperoxid diszmutáz 1; SOD2, szuperoxid diszmutáz 2; ATP, triphoszfát; Prxs, peroxidredoxin; CAT, kataláz; Trx, tiorredoxin; GPx, glutation-peroxidáz; PUFAs, többszörösen telítetlen zsírsavak; ROOH, szerves hidroperoxidok; DAO, d-aminosav-oxidáz; ACOX, acil-CoA oxidáz; NOX, NAPDH-oxidáz; L-Arg, L-arginin; BH4, tetrahydrobiopterin.

Öregedés és szarkopénia

Az öregedés egy fiziológiás folyamat, amely a fizikai és szellemi képességek általános csökkenését okozza. A vázizomzatot nagymértékben érinti, mivel fokozatosan csökken az

izomtömeg és az izomfunkció, fáradtság/kimerültség, gyengeség és a mozgásképeség romlása jelentkezik, ami rontja az idősök életminőségét. Napjainkban a világ népességének egyre nagyobb hányada idős korú, és ez az arány az előrejelzések szerint 2050-ig meg háromszorozódik.

A mai napig számos elméletet állítottak fel az öregedés élettani magyarázatára, mint például a genetikai hajlam, a programozott öregedés, a DNS-romlás, az endokrin működési zavar, a szabadgyökök arányának növekedése és a mitokondriális diszfunkció [34–36]. Az öregedés sejtszintű mechanizmusának és pathogenezisének megértése alapvető feladat a megelőző és terápiás stratégiák kidolgozása, az egészséges öregedés biztosítása és az érintettek életminőségének javítása érdekében. Az öregedés folyamán tapasztalt sejtszintű változások közvetlen hatással vannak a vázizomzat működésére, ami hozzájárulhat az izomerő és az általános fizikai teljesítmény csökkenéséhez. Idős izomban a feszültségérzékelés és az L-típusú kalcium csatornák áramainak csökkenése összefüggésbe hozható a nem megfelelő feszültség függő Ca^{2+} felszabadulás és a specifikus izomerő csökkenéssel. Boncompagni és munkatársai 2006-ban egy másik hipotézist állítottak fel az öreg egerekből származó rostok aberrált Ca^{2+} -homeosztázisra [37]. Humán izombiopsziákban azt figyelték meg, hogy a kalcium kibocsátó egységek (Calcium Release Units, CRU) száma csökkent idős embereknél (kb. 40–50% -os csökkenést írtak le a fiatal felnőttek izmához viszonyítva), és szerintük ez lehet felelős az izomerő csökkenéséért. Ezt a megfigyelést később egér [38] és humán izombiopsziákban [39] végzett egyéb tanulmányok is alátámasztották. Miután megvizsgálták a mitokondriumokat, jelentős csökkenést tapasztaltak mind a CRU-k teljes számában/sűrűségében, mind a CRU–mitokondrium párok számában az öreg egerek/emberek izmaiban. Ezekkel a szerkezeti változásokkal párhuzamosan megfigyelhető volt az SR Ca^{2+} -felszabadulás csökkenése az ECC során, a mitokondriális Ca^{2+} -felvétel károsodásával és az oxidatív stressz növekedésével együtt [38].

Az izomerő csökkenés egy másik magyarázata lehet az SR megváltozott Ca^{2+} kibocsátása is, amit a RyR1 oxidatív stressz általi módosulása válthat ki. Marks és kollégái azt találták, hogy a RyR1 oxidáció/nitroziláció megnövekedett a kor előrehaladtával, az FKBP12 disszociációval és az SR-ból történő Ca^{2+} szivárgás megjelenésével együtt. Az elektromosan kiváltott Ca^{2+} felszabadulás csúcsértéke és az izomerő lecsökkent az idősödő egerekből származó izmokban [40].

A szarkopénia az öregedéssel együtt járó vázizom tömegének csökkenését is jelenti, ami napjainkban egy jelentős egészségügyi kihívás. A szarkopéniát az izomtömeg és az izomerő

csökkenése, a fáradtságra való fokozott hajlam és a csökkent izomösszehúzóási sebesség jellemzi [41]. Az izomtömeg csökkenése főként a rostok számának és méretének csökkenése miatt következik be [42]; ugyanakkor az összejt-kimerülés következményeként megjelenő neuromuszkuláris junkciók degenerációja [43] is megfigyelhető, ami miatt bekövetkezik a motoros egységek elvesztése [44].

A Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásának zavara és a fokozott oxidatív stressz és ROS termelés olyan mechanizmusok, amelyek hozzájárulnak az izomerő korfüggő csökkenéséhez. Delbono és kollégái kimutatták, hogy az életkorral összefüggő izomerő csökkenése a DHPR és RyR1 fehérjék között funkcionális zavarra vezethető vissza [45].

Oxidánsok és antioxidánsok

A sejtorganelumok vagy citoplazmatikus enzimek által termelt $\text{O}_2^{\cdot-}$ gyorsan átalakul H_2O_2 -vé, és ezt a folyamatot a szuperoxid diszmutáz (SOD) izoformák katalizálják (7. ábra) [30]. A H_2O_2 számít az elsődleges redox szignalizációs molekulának a biológiai jelenségek redox szabályozásában [33]. Habár a H_2O_2 intracelluláris koncentrációja alacsony szinten (1-100 nM) van, a teljes sejtes koncentrációja sokkal magasabb, mint a 10 pikoM koncentrációban lévő $\text{O}_2^{\cdot-}$ [46]. Ugyanakkor a koncentrációja szigorú dinamikus egyensúlyi állapotban van a sejtekben fiziológias körülmények között.

Az emberi szervezet endogén antioxidáns rendszere

Alapállapotban a metabolizáló sejtjeinkben a ROS termelés és az ellenük irányuló, belső vagy külső forrásból származó antioxidánsok között precíz egyensúly alakult ki. Fiziológias körülmények között a ROS és a reaktív nitrogén gyökök (reactive nitrogen species, RNS) fontos szerepet töltenek be a sejt jelátviteli folyamataiban. Ilyenkor a termelt gyökök koncentrációja alacsony, és az általuk okozott sejtkárok gyorsan regenerálódnak. Például jelátviteli molekulaként a H_2O_2 közvetlenül oxidálja a ként tartalmazó aminosavakat (ciszteint és metionint). Ezek létfontosságúak a fehérje funkciója, aktivitása, stabilitása, sejtszintű elhelyezkedése és kölcsönhatásai szempontjából. Így szabályozzák az olyan fiziológiai folyamatokat a sejtekben és szervekben, mint például a sejtaktiváció, proliferáció, differenciálódás, migráció, fúzió és angiogenezis [47,48].

A sejtek endogén antioxidáns rendszerének tagja a kataláz, szuperoxid diszmutáz, laktoperoxidáz és glutation peroxidáz enzimek is. Ezek megakadályozzák a prooxidáns hatású gyökök termelését, így segítik a sejtjeinken fenntartani az egyensúlyt.

Oxidatív stresszről akkor beszélhetünk, amikor a prooxidánsok és antioxidánsok közötti egyensúly felborul, és ennek következtében a sejt belső kontrollja és redox jelátvittele nem funkcionál megfelelően [49]. Prooxidánsnak számítanak azok a faktorok, melyek segítik a ROS termelést, és így közvetetten hozzájárulnak a sejtalkotó molekulák roncsolásához, úgy mint fehérje oxidációhoz, lipid peroxidációhoz és DNS sérüléshez [50]. Mivel a reaktív oxigéngyökök legfőbb forrása a mitokondrium, a mitokondriális DNS-t (mtDNA) vélik a legkiszolgáltatottabbnak ROS támadás esetén [36].

Antioxidánsok

Antioxidánsnak számít bármilyen anyag, amely a reaktív oxigén gyököket képes megkötni, vagy gátolja a sejtben zajló oxidációs folyamatokat [51].

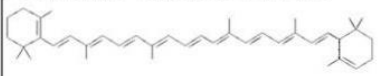

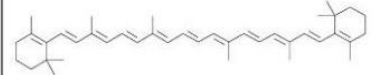

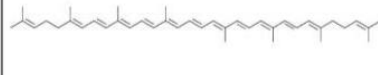

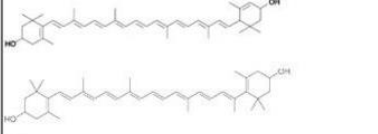

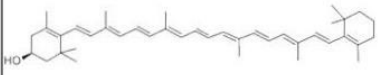
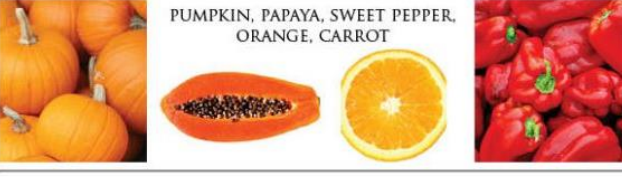
Az antioxidánsok pozitív hatásaira már akkor felfigyeltek, amikor Bagi és munkatársai megmutatták, hogy a C-vitamin hosszú távú alkalmazása patkányokban lecsökkentette az izoprosztán szintet [52]. Ezen kívül a C-vitamin bizonyítottan lecsökkenti az α -tocopheroxyl gyök szintjét sejtmembránokon azáltal, hogy visszaredukálja α -tokoferollá, ami egy E-vitamin féle. Illetve az alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) szintjét is csökkenti [53].

Az A-vitamin (retinol) szintén részt vesz a redox-folyamatokban, és potenciális antioxidánsnak tekinthető a testmozgás okozta oxidatív stresszben. Azonban egyes vizsgálatokban a hatása nem volt előnyös, mivel a vázizomzatban növelte az oxidatív stresszt, ami szövetkárosodáshoz vezetett [54,55]. Az E-vitamin protektív hatásait is sokan megmutatták, mely során a vitamin direkt hatással van az oxigén gyökökre.

Ennek megfelelően az antioxidánsok hatásköre igen széles. Közvetlenül képesek a szabadgyökök megkötésére, gátolhatják a ROS termelődést, valamint lecsökkenthetik a peroxid koncentrációt és a membrán oxidatív állapotát is visszaállíthatják [56]. Az antioxidánsok másik hatásmechanizmusa a szervezet antioxidatív génjeinek az aktiválása, az LDL koleszterin oxidációjának a megakadályozása, és így antiapoptotikus védelmet biztosítanak az agynak, a szívnek és a májnak [57].

A karotinoidok és hatásmechanizmusuk

A karotinoidok az A-vitamin prekurzorai, amik természetes pigmentjei a gyümölcsöknek és zöldségeknek (8. ábra). Nagyszámú konjugált kötéseinek köszönhetően biztosítják a sárga, narancs vagy vörös színt a természetben [58].

TYPE	CAROTENOID FOOD SOURCES
ALPHA-CAROTENE 	 <p>CARROTS, PUMPKIN, WINTER SQUASH, PLANTAINS, COLLARD GREENS</p>
BETA-CAROTENE 	 <p>CARROTS, LEAFY GREENS, SWEET POTATO, CANTALOUPE, PUMPKIN</p>
LYCOPENE 	 <p>TOMATOES, PAPAYA, GRAPEFRUIT, WATERMELON</p>
LUTEIN/ ZEAXANTHIN 	 <p>LEAFY GREENS, SUMMER/ WINTER SQUASH, BRUSSEL SPROUTS, YELLOW CORN</p>
BETA-CRYPTOXANTHIN 	 <p>PUMPKIN, PAPAYA, SWEET PEPPER, ORANGE, CARROT</p>

SOURCE: USDA DATABASE FOR FLAVONOID CONTENT OF SELECTED FOODS

8. ábra. Természetes karotinoidok és azok „sokszínű” természetes előfordulása.
 (forrás: <https://www.aicr.org/resources/blog/carotenoid-foods-may-protect-against-certain-breast-cancers/>)

Kémiai szerkezetük szerint két fő csoportba sorolhatjuk őket:

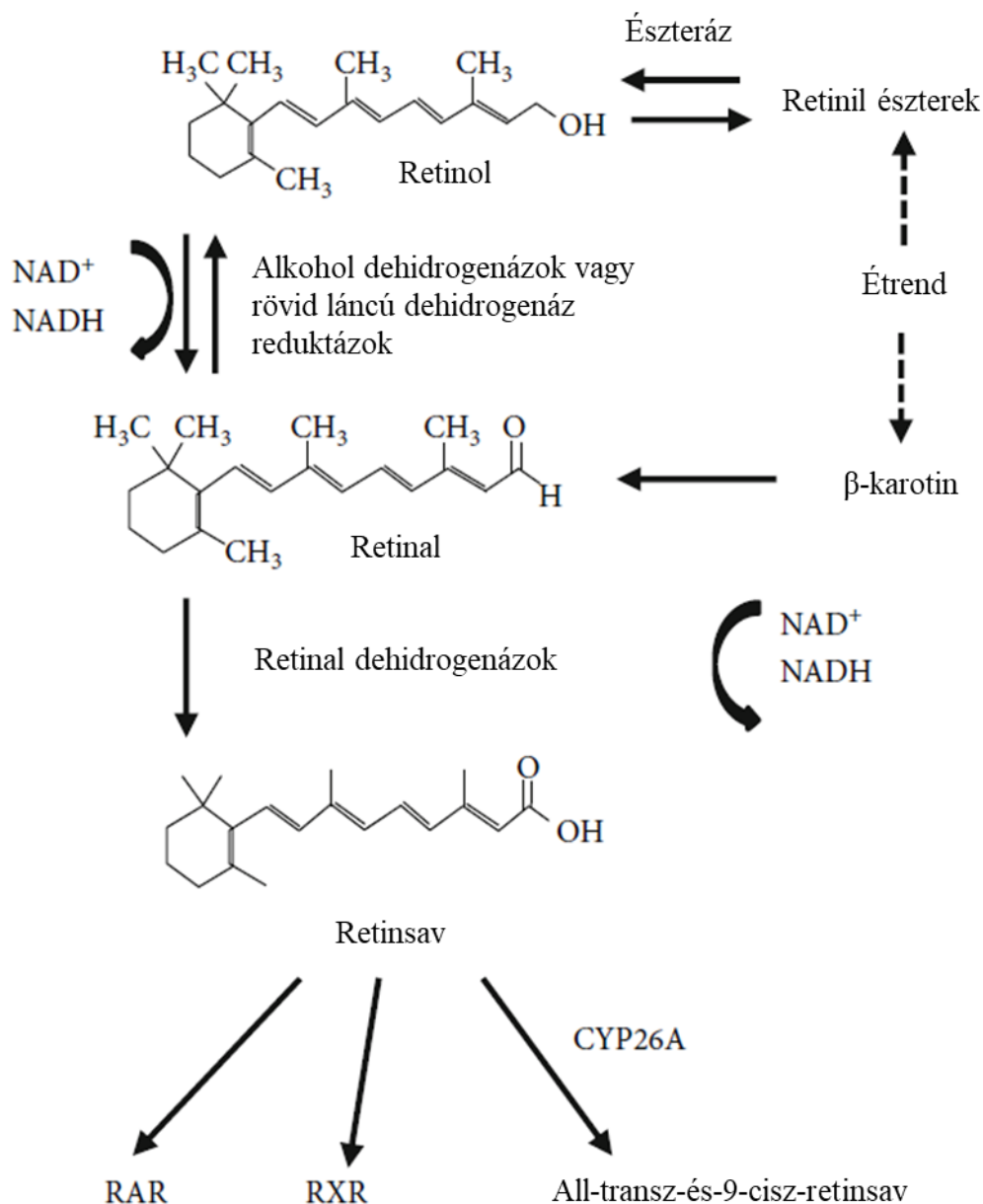
- 1.) karoténok, más néven karotinoidok, csak hidrogént és szenet tartalmaznak;
- 2.) xantofillok, amelyek többféle oxigéntartalmú funkciós csoportot tartalmaznak úgy mint az epoxi, methoxi, hydroxi, carbonil és carboxi.

A karotinoidok kiemelt figyelmet kaptak az utóbbi évtizedekben, erős antioxidáns, regeneratív, antiproliferatív, antiinflammatorikus és potenciálisan öregedésgátló hatásaiknak köszönhetően, amiért geroprotektoroknak is nevezik őket.

Az A-vitamin (retinol) részt vesz a szervezet redox folyamataiban, és mint potenciális antioxidáns a fizikai terhelés által kiváltott ROS termelés ellen hathat. Az A-vitamin

származékai, gyűjtőnéven retinoidok, kulcsfontosságú szerepet játszanak a gerincesek fejlődésében. Mivel a retinoidokat a szervezetünk *de novo* nem képes szintetizálni, ezért csak táplálék útján tudjuk a szervezetünkbe juttatni, úgy mint tej, máj és tojás, valamint répa, tök, kelbimbó, narancs és más vörös gyümölcs és zöldségek fogyasztásával [59]. Szerepet játszanak bizonyos epitél sejtek differenciációs folyamatában, valamint a látás, növekedés, reprodukció és fertőzés elleni védelemben is fontosak [60]. A retinol a keringésben mikromoláris koncentrációban megtalálható természetes retinoid, amit a retinol kötő protein szállít és ahonnan bármely sejt képes felvenni, raktározni, illetve potenciálisan retinsavvá alakítani. A sejteken belül a retinolt a rövid láncú dehidrogenáz/reduktázok retinallá konvertálják egy reverzibilis reakció során. A reakcióút első lépése a retinol retinaldehiddá való konverziója, mely egyben NADH termeléssel is jár, a végső lépés pedig a retinsav kialakítása, melyet a citoszolikus aldehid dehidrogenáz végez (9. ábra). A retinsav képes aktiválni a sejtmagi receptorokat, a retinsav receptor családot (retinoic acid receptor, RAR) és retinoid X receptorokat (retinoid X receptor, RXR). Három különböző RXR receptort fedeztek fel eddig (alfa, béta és gamma) [61]. Az alfa és béta receptorok expressziója széleskörűbb, megtalálhatóak az agyban, a vesében valamint a bőrben is, míg a gamma receptorok expressziója a leglimitáltabb, főleg az agyban, a hipofízis elülső lebenyében és a vázizomban fejeződik ki [62].

A retinsav az A-vitamin aktív metabolitja, mely jelentős hatással bír a zsír és energia anyagcserére a szervezetben, ugyanis az adenzin monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK) és Akt foszforilációs állapotát képes befolyásolni [63]. Korábban kimutatták, hogy myotubulusokban a glükóz felvételt képes befolyásolni [64]. Azt is leírták, hogy az all-transz retinsav (atRA) lecsökkentette az egerek testtömegét és zsírösszetételét anélkül, hogy változott volna az élelem bevitel [65]. Ezen kívül az egerekben javult az inzulin érzékenység és glükóz felvétel, valamint javította a vázizom zsírsav oxidációját és irizin termelését [66].



9. ábra. A retinol-retinsav átalakítási folyamata. (forrás: Sztretye és mtsai. 2019)

Geroprotektív karotinoidok: astaxanthin (AX) és krill olaj

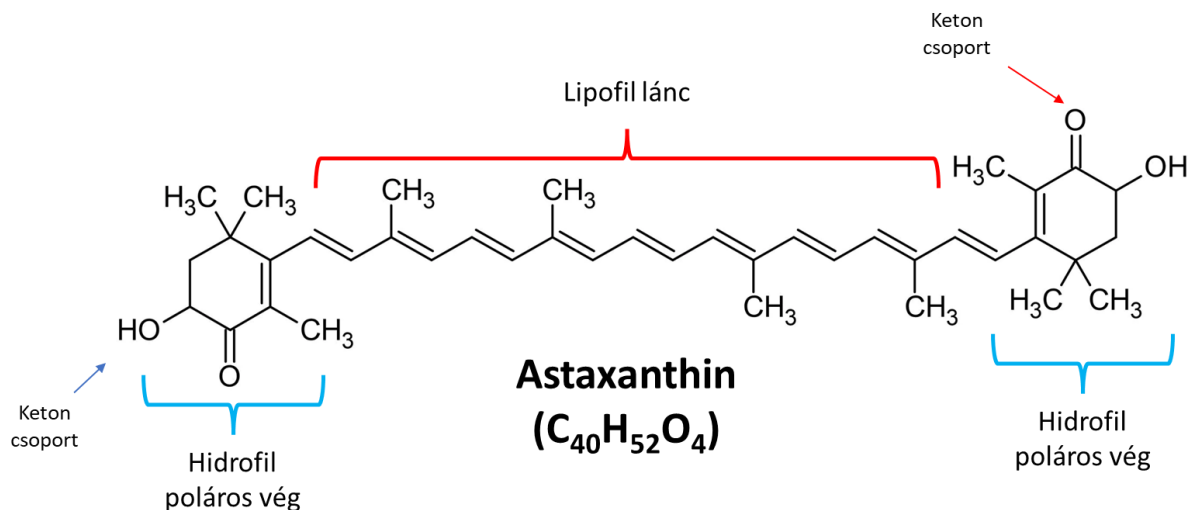
A xantofillok csoportjába tartozik az utóbbi időben kiemelt figyelmet élvező astaxanthin (AX) (10. ábra), amit először Kuhn és Soerensen izolált homárból [67]. Főleg algafélék termelik, például a *Hematococcus pluvialis*, de termelődik *Chlorella zofingiensis*, *Chlorococcum*, valamint a *Phaffia rhodozyma* élesztőben is. Ez a különleges karotinoid felelős a lazac és rákfélék élénkvrös, valamint a flamingó rózsaszín színéért is. Az AX *de novo* nem termelődik, ezért külső forrásból, többnyire táplálékból kell bevinni.

Az AX legfőbb forrása a krill olaj, ami a Csendes-óceánban elterjedt *Euphausia superba* kisméretű rákféléből nyerhető ki [68] és feldolgozástól függően 0,1 és 1,5 mg/ml között tartalmaz astaxanthint [69]. A krill olaj az AX mellett tartalmaz A- és E-vitamint, ásványi anyagokat, ω -3 telítetlen zsírsavakat (ω -3 polyunsaturated fatty acids, ω -3 PUFAs), foszfolipideket és flavonoidokat is. Ezért manapság a krill olajat is vizsgálják, mint lehetséges egészséget javító táplálék kiegészítő. A PUFA-k, mint például az eikozapentaénsav (eicosapentaenoic acid, EPA) és dokozahexaénsav (docosahexaenoic acid, DHA-t), olyan hosszú láncú ω -3 szabad zsírsavak, amit közvetlenül felhasználhat a szervezetünk, a foszfolipid formában lévő zsírsavakkal ellentétben.

Egyedi a lipidtartalma (0,5- 3,6%) [70], ugyanis a krill olaj nem csak triglicerideket tartalmaz, hanem 30–65%-ban foszfolipideket is, amik szintén közkedvelt étrendkiegészítők. A krill olaj fő foszfolipide a foszfatidil-kolin, amelyhez a zsírsavak 40%-a kötődik, mint például az EPA és a DHA [71]. A krill olajban található EPA és DHA ω -3 zsírsavak több hasznos tulajdonságot mutattak egyes krónikus betegségek kezelésében, ideértve a kardiovaszkuláris, neurológiai és gyulladós betegségeket, valamint a rák megelőzését és a bélflóra egészségének elősegítését [72]. A krill olaj többszörösen telítetlen zsírsav tartalmának köszönhetően természetes gyógymód lehet az említett betegségek tüneteinek enyhítésére a hagyományos terápiák kombinálásával.

A krill olajat 2008-ban engedélyezte az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (FDA), 2009-ben Európában is jóváhagyást kapott élelmiszerként, majd 2014-ben Kína következett. Végül, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság terhes és szoptató nők számára is jóváhagyta 2014-ben.

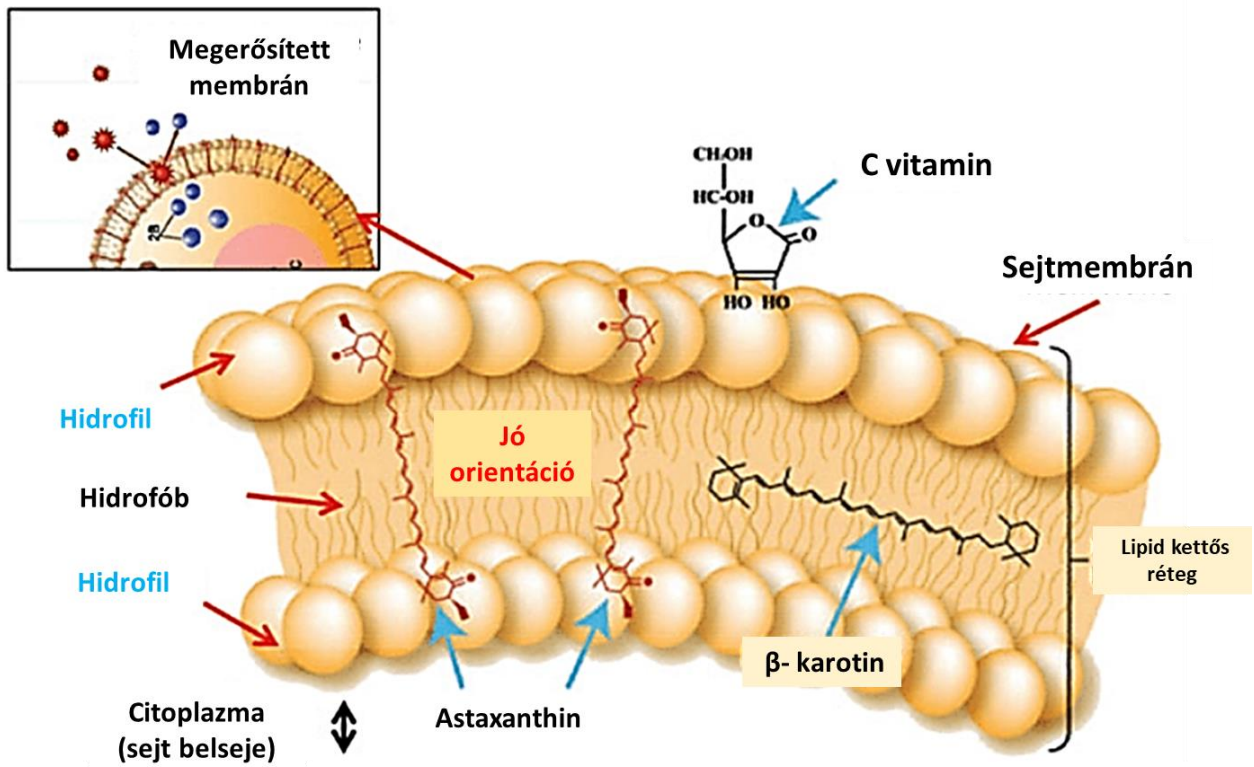
Több tanulmány vizsgálta a krill olaj kognitív funkciókra kifejtett hatását. Lee és munkatársai tanulmányozták a krill olajból izolált foszfatidil-szerin (PS) adagolásának memória- és tanulásfunkcióra gyakorolt hatását öreg patkányokban. Kimutatták, hogy a PK 20 vagy 50 mg/kg/nap adagolása 7 napig szignifikánsan javította a menekülési látencia időt a Morris-vízi labirintusban azokhoz a patkányokhoz képest, akik 50 mg/kg/nap szójababból izolált foszfatidil-szerint kaptak [73]. Továbbá a PK kezelésnek köszönhetően visszaszorult a kolinerg immunreaktivitás, a muszkarin receptorok és kolintranszporterek elvesztése, amelyek amúgy általában megfigyelhetők az öreg patkányok hippocampusában [74]. Ezek alapján Lee és munkatársai felvetették a krill olaj használatát, mint lehetséges neuroprotektív táplálék kiegészítő.



10. ábra. Az astaxanthin kémiai szerkezete. (forrás: módosítva <https://www.abcam.com/en-hu/products/biochemicals/astaxanthin-antioxidant-agent-ab144193#overlay=images>)

Az AX zsíroldékony vegyület, ám ω -3-ban gazdag zsírokkal együtt is könnyen felszívódik. Különleges kémiai szerkezetének köszönhetően képes a sejtek membránjába beépülni olyan orientációban, amivel a lipid kettősréteg mindkét oldalát képes a ROS támadástól védeni (11. ábra) [75]. Ez azért fontos, mert az E-vitamin és β -karotin csak a sejten kívül, míg a méltán híres C-vitamin csak sejten kívül véd. Az astaxanthint több mint húsz éve használják táplálékkiegészítőként, például a lazacok tápjában (vörös színt adva a lazac húsának), de emberi fogyasztásra is. Az általánosan elfogadott ajánlott fogyasztási mennyiség 12 mg naponta, ami akár 20 évig is biztonságosan fogyasztható [76]. Számos jótékony hatását írták le, hiszen az astaxanthin fogyasztása javította a vérkeringést, megnövelte a vörös vörösvérsejtek membrán flexibilitását [77].

Az AX rákellenes [78], antidiabetikus [79], gyulladáscsökkentő [80], immunerősítő [78] antioxidáns [81], valamint neuro, kardiovaszkuláris, szem és bőr védő hatásának köszönhetően kiemelt kutatási célpont az utóbbi években [82]. Az astaxanthin képes csökkenteni az hiperglikémia által kiváltott oxidatív stresszt hasnyálmirigy β -sejtekben, valamint fiziológiás tartományba viszi a cukorbetegség glükóz és szérumban lévő inzulin szintjét [83]. Továbbá érlemeszesedés ellen is ajánlották, mint terápiás táplálék kiegészítő [84]. Barros és munkatársai kimutatták, hogy az AX képes áthatolni a vér-agy gáton, ezáltal az emlősök több agyi területét is képes elérni [82].



11. ábra. Az astaxanthin elhelyezkedése a sejtmembránon belül. (forrás: <https://www.4upharma.com>)

Gao és munkatársai [85] csirkéken vizsgálták a *Haematococcus pluvialis*-ből származó természetes AX étrendkiegészítő antioxidáns és a lipid anyagcserére kifejtett hatását, valamint az AX tojótúkok tojássárgájában való felhalmozódását. Megállapították, hogy a teljes antioxidáns kapacitás, valamint a szuperoxid-diszmutáz szint és a glutation-peroxidáz szint is szignifikánsan megnőtt a tojótúkok plazmájában, a májukban és a tojássárgájukban.

Az AX hatásai vázizomban

A vázizom fiziológiai működése során mitokondriális vagy azon kívüli forrásokból, mint például NADPH-ből származó nitrogén oxigén gyökök (nitric oxigen species, NOS) és ROS keletkezik. Edzés során a szervezetünk fenntartja a megfelelő oxidatív egyensúlyt, amit egy kifinomult belső antioxidáns rendszerrel ér el. Mindehez olyan antioxidáns hatású fehérjék szükségesek, mint a glutation peroxidáz, szuperoxid dizmutáz, thioredoxinok, peroxiredoxinok és a kataláz. Ezek képesek a ROS mennyiségének lecsökkentésére és a belső antioxidáns

rendszer szubsztrátjai, mint a glutation, meg is tudják kötni a ROS/RNS anyagokat. Rendszeres edzés során a belső antioxidáns védekező rendszer is feljavul és olyan patológiás körülmények között, mint a diabétesz vagy rák, ez lehet a leghatékonyabb egészséget védő mechanizmusunk. Ennek megfelelően az antioxidánsok használata gyógyászati ​​kezelésekben elterjedt, illetve sporttevékenységet folytató személyek is használják, és megnövelt teljesítményt várnak a fogyasztásuk során. Ezek a kezelések módosíthatják a vázizom jelátviteli rendszerét, ezáltal az erő kifejtés mértékét, a glükóz felvételt, az inzulin érzékenységet, ion pumpa funkciókat, valamint a mitokondriális biogenezist. A legtöbbet használt antioxidánsok a jól ismert C- és E-vitamin, csak általánosan fejtik ki hatásukat. Mivel egyes esetekben e vitaminok használata nemhogy nem csökkenti, hanem még növeli is a ROS termelést, valamint humán betegségek kialakulásának esélyét [86], szükség van specifikusabban működő antioxidánsok használatára.

Egereknél Yoshihara és munkatársai [87] összefoglalóan tárgyalják az AX-kiegészítés vázizomra ható antioxidáns hatásait. Emberben, az AX vázizomra kifejtett pozitív hatásait számos tanulmány bizonyítja. Sawaki és munkatársai kimutatták, hogy 6 mg AX egy hónapig tartó fogyasztása lecsökkentette a tejsav szintet a vázizomban 1200 m-es sprint futás után [88]. Wolf és munkatársai kimutatták, hogy az AX megnövelte a mitokondriumok respirációs rátáját azáltal, hogy megnövelte az oxigén mitokondriális membrán diffúzióját és így a sejtek energiatermelése megnőtt [89]. Több adat is utal arra, hogy az AX képes védeni a mitokondriumokat az oxidatív stressztől a membránpermeabilitásának köszönhetően. Ezért az AX kiemelkedő szerepet játszhat az aktív életmódot folytató emberek és sportolók számára, akiknek fontos a magasabb teljesítmény és gyorsabb felépülés.

Egereken végzett edzéskísérletek alapján bebizonyosodott, hogy az AX táplálék kiegészítés hatékonyan csökkenti a testmozgás megnövekedett anyagcseréjével járó mellékhatásokat, valamint javítja az állatok teljesítményét és regenerációját. Aoi és munkatársai kísérlete során az egerek fáradékonysága csökkent 4 hetes AX kezelés után [90]. Az egerek szervezete AX hatására jobban függött a lipid metabolizmustól, mint a glükóztól, ezáltal növekedett az egerek ellenálló képessége és csökkent a zsírszövet mérete. A szerzők az AX másik jótékony hatását is megfigyelték, ugyanis megvédte az olyan ROS molekulák által célzott fehérjéket, mint például a karnitin-palmitoil-transzferázI (CPT I) fehérjét, aminek stressz által okozott módosítását az AX ellensúlyozta [91]. Liu és munkatársai [92] azt feltételezték, hogy az AX fogyasztása növeli a PGC-1 α szintjét a vázizomban, ami javítja az edzés közbeni mitokondriális aerob metabolizmust és elősegíti a lipid felhasználást. Polotow [93] kísérletében 45 napig tartó AX etetés után azt tapasztalta, hogy növekedett a

mitokondriumok glutation tartalma Wistar patkányokban, ami csökkentette az oxidatív stresszt és kisebb mértékű fáradékonyságot eredményezett edzés közben.

Ugyanakkor megemlítendő, hogy van némi ellentmondás az AX jótékony hatásait tekintve, hiszen Res és munkatársai [94] nem tapasztalták a felsorolt eredményeket a kutatásuk során amikor edzett férfiakban vizsgálták a 4 hetes AX kezelés hatásait. Nem észleltek javulást a sportolók kitartó képességében hosszabb edzési időben még a magasabb AX adag (20 mg/nap, 4 hétig) alkalmazása során sem. Egy másik tanulmány szerint azonban a magas karotin tartalmú étrend hatékonynak bizonyult a szarkopénia negatív hatásainak mérséklésében a DNS-károsodás csökkentése révén alacsony fizikai teljesítmény esetén idős emberek körében [95]. Bebizonyosodott, hogy az AX tartalmú étrend megváltoztatta a PGC-1 α szintet, ezáltal az *in vivo* mitokondriális biogenezis is javult [92]. Egy másik kutatásban a krill olaj kezelés az mTORC1 szignalizációs útvonalra is hatással volt C2C12 myoblastokban [96], viszont fiatal, edzést általában nem végző egészséges egyéneknél 3g krill olaj (ami 0,5 g AX tartalommal bírt) alkalmazása 8 héten át nem befolyásolta az izomerőt. Idős egyéneknél (65 és 85 év között) 12 mg AX tartalmú étrend (ami 10 mg tokotrienolt és 6 mg cinket is tartalmazott), jelentősen megnövelte a teljesítőképességet az állóképességi edzéseknél, ami mellett az izomerő és izomtömeg is megnövekedett a placebo kezelést kapó kontroll csoporthoz képest [97].

Egy friss tanulmányban Yu és munkatársai kimutatták, hogy az AX kezelés hozzájárul a mitokondriális integritás és működés megőrzéséhez hő okozta vázizom sérülés esetén patkányokban. Az AX alkalmazása megakadályozta a mitokondriális fragmentációt és depolarizációt, csökkentette a sejthalált, valamint növelte a PGC-1 α és a mitokondriális transzkripciós faktor A expresszióját [98]. Embereknél is végeztek hasonló vizsgálatokat annak érdekében, hogy bemutassák a testmozgás okozta izomsérülés hogyan képes az AX mérsékelni. Az egyik tanulmányban 3 hétig edzett férfiakon excentrikus terhelést alkalmaztak, majd különböző izomsérülési indikátorokat (izomláz, kreatin kináz szint és izom teljesítmény) teszteltek. Az eredmények alapján az antioxidáns táplálékkiegészítés nem mutatott kedvező hatást a fent említett mutatókra [99]. Egy másik tanulmányban a szív troponin felszabadulását vizsgálták kerékpárosoknál állóképességi edzés után. Ebben a kísérletben az AX kezelés nem befolyásolta az antioxidáns kapacitást (húgysav, malondialdehid) és a gyulladást (magas-szenzitivitású C-reaktív protein), és nem változtatta meg az edzés okozta kreatin kináz felszabadulást. Ugyanakkor edzést általában nem végző egészséges férfiaknál az AX pozitív antioxidáns hatásai jelentkeztek, ahol a táplálékkiegészítő fogyasztása szignifikánsan növelte a szénhidrát oxidációt és az oxigénfelhasználást az edzés során, valamint csökkentette a plazma

inzulinszintjét [100]. Összeségében, ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AX-ban gazdag ételek pozitívan befolyásolhatják a szénhidrát és zsír aerob anyagcseréjét pihenés és edzés közben egyaránt. Továbbá az AX kiegészítés hatékonyan csökkenti az oxidatív stressz és gyulladás jeleit. Az antioxidáns táplálékkiegészítők alkalmazásában az izomsérülés enyhítésére számos szempontot figyelembe kell venni. Bár úgy tűnik, hogy ezek a kiegészítők csökkentik az izomsérülés bizonyos jeleit, az továbbra is kérdéses, hogy mennyi az optimális fogyasztandó adag és meddig érdemes a kezelést folytatni. Továbbá fel kell még tennünk azt a kérdést is, hogy az AX hatásossága specifikus-e azon személyekre, akik korábban fizikai tréningben nem részesültek.

Célkitűzés

Az izommunka révén termelődő reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepet játszhatnak az izmok elektro-mechanikai kapcsolatában résztvevő különböző komponensek károsításában, beleértve a DHPR-t és a RyR-t. Ezen kívül, feltételezések szerint a ROS hatással lehet a mitokondriális kalciumfelvételre is. Az még tisztázásra szorul, hogy a külső forrásból származó, táplálkozás során bejuttatott antioxidánsok milyen hatással bírnak a vázizom elektro-mechanikai kapcsolatra, illetve a mitokondriális kalcium-homeosztázisra.

PhD munkám első felében célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam az AX etetésben részt vett fiatal felnőtt egészséges egerekben történt változásokat az izomerő, az elektro-mechanikai kapcsolat és a mitokondriális kalcium-homeosztázis szempontjából. Ehhez a célhoz az alábbi kérdéseket fogalmaztuk meg:

- Az AX etetés milyen mértékben befolyásolja az egerek fizikai teljesítő képességét, beleértve az izomerő mértékét?
- Hogyan befolyásolja az AX etetés a súlygyarapodást?
- Hogyan befolyásolja az AX az egerek vázizmának kalcium-homeosztázisát, ideértve az elektro-mechanikai kapcsolat működését és a mitokondriális kalcium-homeosztázist?

PhD kutatásom második szakaszában vizsgálni kívántam az AX és a krill olaj táplálék kiegészítés háttérében álló potenciális molekuláris mechanizmusokat idősödő egerek vázizmában. Vizsgálatainkhoz így a következő célokat fogalmaztuk meg:

- Milyen hatással van az AX és krill olaj táplálékkiegészítés az idősödő egerek fizikai teljesítő képességére, beleértve az izomerő mértékét?
- Hogyan befolyásolja az AX és krill olaj az idősödő egerek vázizmának kalcium-homeosztázisát, ideértve az elektro-mechanikai kapcsolat és a mitokondriális kalcium-homeosztázist?
- Hatással van-e a krill olaj táplálékkiegészítés az öregedő egerek tanulási képességére?

Anyagok és módszerek

Állatok tartása

Az állatkísérletek során betartottuk az Európai Közösség ide vonatkozó irányelveit (86/609/EGK). A Debreceni Egyetem Intézményi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta a kísérleti protokollt (3-1/2019/DEMAB). A C57/Bl6 kevert nemű egereket rácsos tetővel rendelkező műanyag ketrecekben helyeztük el, és normál szobahőmérsékleten (22-25°C) tartottuk. Az egerek számára korlátlanul hozzáférhető ivóvíz és élelem volt biztosítva. A helyiség megvilágítása automatikus módon 12 órás sötét és 12 órás világos ciklusban történt.

Astaxanthin és krill olaj táplálékkiegészítés

A kísérleteink során AstaReal A1010-et (AstaReal Co., Ltd., Nacka, Svédország) használtunk, egy astaxanthin tartalmú természetes biomassza anyagot, amelyet a *Haematococcus pluvialis* mikroalgák szárított és zúzott spóráiból állítanak elő. Az AstaReal A1010 egy pasztörözött készítmény, amely 5-5,6% -a észterezett AX-t tartalmaz, vízben oldhatatlan vörös por formájában, az algákra jellemző szaggal.

Az AX fiatal, egészséges szervezetekre kifejtett hatásának vizsgálatához tizennyolc, 4-6 hónapos kevert nemű C57/Bl6 egeret véletlenszerűen két csoportra osztottunk. Az AX diéta (per os) 4 héten át tartott (AX csoport), míg az azonos származású egyedek standard egértápot kaptak (CTRL csoport). A speciális tápot a standard egértáphoz 4 g/kg AstaReal A1010 (100% etanolban oldott) hozzáadásával készítettük el, így a végleges koncentráció 0,02% AX volt. Ez a koncentráció az irodalom alapján lett kiválasztva Aoi és munkatársai nyomán [101].

A kísérleteink egy részében krill olajat használtunk (Rimfrost Inc. Alesund, Norvégia). Munkánkban 25 g/kg koncentrációban alkalmaztuk a krill olajat annak érdekében, hogy elérjük a korábbi kísérletekben használt 0,02%-os AX koncentrációt. Mindkét készítményt a gyártók ingyen bocsájtották rendelkezésünkre kutatási célra.

Az AX és krill olaj öregedő szervezetekre kifejtett hatásának vizsgálatához kevert nemű C57/Bl6 egeret alkalmaztunk, akik 13 és 17 hónapos kor között voltak. A véletlenszerűen kialakított AX-al etetett és CTRL csoport mellett kialakítottunk egy harmadik csoportot is (Krill), akik krill olajjal kiegészített rágsálótápot kaptak, 25 g/kg végkoncentrációban szintén 4 héten át.

In vivo kísérletek

Testsúly mérés

Az etetési protokoll megkezdése előtt (1. nap) és a négy hetes etetési időszak után (28. nap) mértük meg a CTRL, AX és Krill csoportba tartozó egerek testsúlyát. A testtömeg változását az élelem-fogyasztással együtt követtük, rögzítettük és csoportonként átlagoltuk.

Grip teszt

Az egereket vízszintesen tartva egy kapacitív erőmérőhöz csatlakoztatott rúdhoz tartottunk, amit a mellső lábaival megragadott; a hátsó végtagokat nem engedték, hogy bármilyen felülethez érjen. Amikor az egér a mellső lábával megbízhatóan megragadta a rudat, óvatosan elhúztuk az állatot az eszköztől a farkánál fogva, amíg el nem engedte azt. Ezáltal a kapaszkodó képességét, az úgynevezett grip-et, vagyis markolási vagy fogóerőt mértük. Akkor regisztráltuk a mért maximális erőt, mielőtt az állat elengedte a rudat. Az adatokat egy a mérő rendszerhez kötött számítógépen tároltuk. A tesztet 10-15 alkalommal ismételtük meg a mérés során, amiket átlagolva kaptuk meg az *in vivo* izomerő értékét. Az így kapott fogóerőt az állatok testtömegére normalizáltunk. A méréseket az etetési időszak előtt és után végeztük el. A változásokat mindig az adott csoport kontrolljához viszonyítottuk.

Barnes Maze teszt

Az öregedő egerek krill olajal történő táplálékkiegészítés tanulásra és memóriára gyakorolt hatásának értékelésére a Barnes Maze protokollt [102] alkalmaztuk. A teszthez egy 92 cm-es kör alakú fa platformot használtunk, amelyen 20 db lyukat (5 cm átmérőjű) egyenlően elosztottunk az él mentén. Egy adott lyuk alá egy alommal megtöltött műanyag dobozt szereltünk fel. A platformot úgy helyeztük el, hogy három különálló vizuális tájékozódási pont vegye körül. A platform elhelyezkedését nem változtattuk meg a kísérlet során, és a platform folyamatos megvilágítás alatt volt. Az egerek mozgását a platformon egy felső webkamerával (GeniusWideCam F100, Genius, New Taipei City, Tajvan) videofelvételen rögzítettük. A minden egyes állaton elvégzett protokoll három részből állt:

- A habituáció során (1. nap) az egeret a platform közepére helyeztük, és egy zárt tetejű hengerrel (8 cm átmérőjű) lefedtük 1 percre. A henger eltávolítása után az egeret 5 percig hagytuk, hogy megismerkedjen a környezettel, vagy amíg megtalálta és kijutást a menekülési dobozba.
- Az akvizíciós tréning 10 napon keresztül zajlott, naponta kétszer 1 órás időközönként. Az egeret 15 másodpercig letakartuk a hengerrel, majd ennek

eltávolítása után az egér 3 percet kapott, hogy megtalálja a menekülő doboz helyét. Az egerek menekülésre készítéséhez erős fényt és 90 dB fehér háttérzajt használtunk. Ha az egerek nem találták meg időben a menekülési lyukat, a menekülődobozba helyeztük őket, és 1 percig bent tartottuk őket szoktatási célból.

- A vak próbát 3 nappal az akvizíciós tréning után tartottuk. Minden lépés azzal megegyező volt kivéve, hogy a teszt hossza csak 1 perc volt és a menekülődobozt eltávolítottuk.

Videók kiértékelése az AnimalTracker program segítségével

A Barnes Maze kísérletek során az állatok mozgását rögzítő videók elemzéséhez az AnimalTracker [103] programot használtuk, amely az ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) képfeldolgozó program nyílt forráskódú bővítménye. A Morris-féle vízlabirintus modulját a Barnes-labirintushoz igazítottuk, hogy kiszámítsuk az egerek által a kiindulási helytől a céljukig megtett időt és távolságot.

In vitro kísérletek

A kísérleti állatok feláldozásához cervikális diszlokációt alkalmaztunk CO₂ túladagolást követően. Az egerek hátsó lábából kipreparáltuk a *m. flexor digitorum brevis* (FDB), valamint *m. extensor digitorum longus* (EDL) izmokat, illetve molekuláris biológiai vizsgálatainkhoz ezen izmokon kívül még a *m. tibialis anterior* (TA) és *m. glutealis* izmokat is.

A kísérletekben használt oldatok összetétele a 2. táblázat tartalmazza.

Oldat	Összetétel
Kreb's oldat	135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ , 10 mM HEPES, 10 mM glukóz, 10 mM NaHCO ₃ ; pH 7.2
Normál Tyrode oldat	137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 11,8 mM HEPES; 1 g glukóz; pH 7,4
Ca²⁺ mentes Tyrode oldat	Ugyanaz az összetétel mint a normál Tyrode oldatnak, de CaCl ₂ nélkül készül
Patch külső oldat	140 mM TEA-CH ₃ SO ₃ , 1 mM CaCl ₂ , 3,5 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 1 mM 4-AP, 0,5 mM CdCl ₂ , 0,3 mM LaCl ₃ , 0,001 mM TTX (citrát), 0,05 mM BTS. A pH-t TEA-OH-val 7,2-re, az ozmolalitást pedig TEA-metánszulfonáttal 320 mOsm-re állítottuk be.
Patch belső oldat	110 mM N- metilglutamin, 110 mM L-glutaminsav, 10 mM EGTA, 10 mM Tris, 10 mM glukóz, 5 mM Na ₂ ATP, 5 mM PC Tris, 0,5 mM rhod-2, 3,56 mM CaCl ₂ , 7,4 mM MgCl ₂ az 1 mM [Mg ²⁺] és 100 nM [Ca ²⁺] koncentrációk eléréséhez. A pH-t NaOH-val 7,2-re, az ozmolalitást pedig N-metilglükaminnal 320 mOsm-re állítottuk be.
Retinol	törzsoldat:10 mM koncentráció 100% EtOH-ban beoldva.

2. táblázat. A kísérletek során alkalmazott oldatok.

Rövidítések: BTS: N-benzil-p-toluén sulfonamid EtOH: etanol; EGTA: etilén-glikol-bisz(2-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav

Izomerő mérés

A szobahőmérsékleten történő *in vitro* izomerő méréshez az EDL izmokat vízszintesen helyeztük el egy kísérleti kamrában, ahol folyamatosan perfundáltuk karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) buborékoltatott Krebs-oldattal (10 ml/perc). Az izom egyik végét egy kapacitív mechano-elektromos erőmérőhöz (Experimetria, Budapest, Magyarország), míg a másik végét egy rovar tűhöz erősítettük. Az izmokat ezután olyan hosszúságra feszítettük, amelynél a maximális erőt tudja kifejteni. 5 perces várakozási után, az izmokat alulról érintő két platinaelektrodát használtunk 2 ms-os szupramaximális (5 V) impulzusok leadására. Ezeket a

0,5 Hz-es frekvenciájú impulzusokat arra használtuk, hogy legalább 10 egyedi rángást (angol elnevezés szerint twitch-et) váltsunk ki. A tetanusz kialakulásához az egyedi impulzusokat (5 V, 2 ms) 200 Hz-es frekvenciával alkalmaztuk 200 ms-ig. A kialakuló erőt 2 kHz-en digitalizáltuk TL-1 DMA interfész segítségével, és egy online csatlakoztatott számítógépen tároltuk Axotape szoftverrel (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Az erőt végül az adott EDL izom keresztmetszeti területére normalizáltuk.

Egyedi FDB izomrostok izolálása

A kalciumméréseket az egerek FDB izmából származó egyedi vázizomrostokon végeztük. Az FDB izom normál Tyrode-oldatban történő manuális preparálását enzimatikus emésztés követte 0,2% I-es típusú kollagenázt tartalmazó kalcium mentes Tyrode-oldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, katalógusszám: SCR103) 37 °C-on, 50 percig. Az enzimes kezelés után az FDB izmokat normál Tyrode-oldatba helyeztük, és hűtőszekrényben tároltuk 4 °C-on felhasználásig (maximum 36 órán belül). Az izom pipettával történő finom triturálása után egyedi FDB-rostokat kaptunk.

Feszültség clamp mérés és konfokális mikroszkópia

Az FDB rostokon történő kalcium mérésekhez a patch clamp technikát alkalmaztuk. A mérés kezdetekor az izolált FDB rostokat *külső oldat*ba helyeztük (lásd 2. Táblázat), és feszültség-clamp technikával rögzítettünk a nyugalmi potenciáljukat (Axoclamp 200B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA). A citoszolikus kalcium változásainak vizsgálatához különböző depolarizáló feszültségeket alkalmaztunk a pClamp 11.0-n programon keresztül (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), és egyidejűleg konfokális mikroszkóppal (Zeiss 5 Live, Oberkochen, Németország) vonalmenti szkennelés, más néven line-scan felvételeket rögzítettünk a keletkező jelekről. A rostokat patch pipettán keresztül dializáltuk 50 μM rhod-2 és 10 mM EGTA tartalmú *belső oldattal* (lásd 2. Táblázat), majd 15-20 perc inkubálás elteltével alkalmaztunk depolarizáló impulzusokat. A rhod-2 gerjesztését 543 nm-en végeztük, az 550 nm feletti emissziót megfelelő szűrő segítségével vettük fel. Az időfelbontás 0,5 ms soronként, míg a térbeli felbontás 0,24 μm /sor volt. A kísérleteket szobahőmérsékleten végeztük (20-22 °C). A nyugalmi potenciált -80 mV-ra állítottuk, a pipetta ellenállása 2 és 4 $\text{M}\Omega$ között változott.

A line-scan képeket egy saját fejlesztésű programmal elemeztük ki, melyben Royer [104] által leírt modellt vettük figyelembe a következő paraméterekkel: K_d (rhod-2) = 1,58 μM és $k_{\text{ON}} = 0,07 \mu\text{M}^{-1} \text{ms}^{-1}$. A Ca^{2+} -felszabadulás fluxusából (amely a kalciumcsatornákon

keresztül történő rhod-2 áramlást jelenti) levonva a pumpa eltávolítási fluxusát, meghatározható az SR-ből kilépő nettó fluxus. Ennek integrálja meghatározza a depolarizáció által felszabadítható SR kalciumtartalmat, más néven a felszabadított Ca^{2+} mennyiségét.

A Ca^{2+} -felszabadulás fluxusát (R_{rel}) a citoplazmatikus Ca^{2+} szintek változásából számoltuk, majd egy modellel illesztettük. A modell a kalcium intracelluláris térből történő eltávolítási folyamatokat tartalmaz, ahogy azt eredetileg Melzer és munkatársai írták le [105]. A lineáris kapacitív áramokat analóg kompenzációval korrigáltuk. Az aktiválás feszültség (V_m) függésének leírására Boltzmann-függvényt használtunk:

$$\text{Ca}(V) = \text{Ca}_{\text{max}} / (1 + \exp(-(V_m - V_{50})/k)) \quad \text{Eq. (1)}$$

Az Eq.(1) egyenletben a V_{50} a félaktivációs feszültség, ez adja meg nekünk, hogy hány mV-nál érjük el a maximális kalcium tranziensnek felét, ennek a segítségével tudjuk definiálni az ECC mechanizmus minőségét. A Ca_{max} a maximálisan mért kalcium érték, míg az $1/k$ a függvény logaritmikus meredeksége. Az egyes adatpontokat a Ca_{max} értékre normalizáltuk, és a membránpotenciál függvényében ábrázoltuk.

A Ca^{2+} tranzienseket a line-scan felvételekből a következőképpen számoltuk: a kiindulási vagy másnéven alap (háttér) fluoreszcenciát ($F_0[x]$) az első depolarizáló impulzus előtti időtartományban 15-20 vonal átlagolásával számítottuk ki. A depolarizáció impulzus során kialakuló fluoreszcencia jel intenzitását erre a $F_0[x]$ -re normalizálva fejeztük ki ($F[x]/F_0[x]$). Az F/F_0 csúcserkéket ezután a line-scan képeken lévő adatpontok átlagolásával kaptuk, és a maximális depolarizációhoz közeli értékeknél ábrázoltuk. Ha egy sor tetanikus depolarizáló impulzust alkalmaztunk, egyetlen exponenciális függvényt alkalmaztunk a felszabadult kalcium meghatározására az alábbiak szerint:

$$y = y_0 + ae^{-bx} \quad \text{Eq. (2)}$$

Ezzel a képlettel illesztettük a maximális F/F_0 változásának időbeli lefutását, ami így lehetővé tette az SR kalciumtartalom becslését. A fenti egyenletben x az alkalmazott tetanikus impulzusok száma, b az SR kalcium depléciójának időállandója, a az SR-ben maradt kalcium az utolsó depolarizáló impulzust követően míg y_0 a teljes és a fennmaradó SR kalciumtartalom különbsége.

Egyes kísérletekben, az izolált FDB rostokat $10 \mu\text{M}$ retinol-al előkezeltük 3 órán át normál Tyrode oldatban, 4°C -on.

Mitokondriális kalcium felvétel mérés

A mitokondriális kalciumszint változásait az egyedi FDB rostokban Ainsbinder és munkatársai (2015) nyomán rhod-2 AM kalcium érzékeny festéket alkalmazva vizsgáltuk ismétlődő elektromos ingerlést követően [106]. A rhodamin-alapú indikátorok kationosak, ami specifikusan a mitokondriumokba történő potenciál vezérelt festékfelvételt eredményez és ez által lehetőségünk nyílik az aktivitásfüggő mitokondriális kalciumfelvétel követésére. Az FDB rostokat 5 μM rhod-2-AM-mel inkubáltuk 15 percig szobahőmérsékleten, majd normál Tyrode oldattal mostunk. A rostokat elektromosan stimuláltuk (S88 Stimulator, Grass Technologies, Warwick, RI, USA) egy pár platinaelektrodán keresztül, amelyeket az egészségesnek ítélt, ép struktúrájú rost közelében helyeztünk el. A rostokon 5 egymást követő tetanuszos ingerléssorozatot (500 ms időtartamú, 100 Hz) alkalmaztunk szupramaximális aktiváló feszültség mellett. x-y képeket (512 512 pixel, 0,5 ms/pixel) készítettük nyugalomban, az 1. és 5. tetanusz után. A mitokondriumokból származó rhod-2 fluoreszcencia értékek (F_{mito}) kiszámítását a következőképpen végeztük: a rost hossz tengelyével párhuzamos hosszanti oldalú téglalapot jelöltünk ki, amely terület felett Zeiss Zen Blue (Zeiss, Oberkochen, Németország) programmal kiszámítottuk az átlagos fluoreszcens értéket. Az F_{mito} normalizált mitokondriális kalciumfelvételt az így kapott hullám alakú görbék csúcserkéi (I-csík fluoreszcencia, mitokondriumot reprezentálva, $F_{\text{I-csík}}$) és a mélypontok (A-csík, fluoreszcencia, alapvonal, $F_{\text{A-csík}}$) ismeretében számítottuk ki az alábbi egyenlet segítségével:

$$F_{\text{mito}} = (F_{\text{I-csík}} - F_{\text{A-csík}}) / F_{\text{A-csík}} \quad \text{Eq. (3)}$$

Molekuláris Biológia

RNS preparálás, Reverz Transzkripció (RT) és Kvantitatív Polimeráz Lánc Reakció (Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR))

A teljes RNS-frakciót TRI-reagenssel (MRC, Cincinnati, OH, USA, katalógusszám: TR118) izoláltuk CTRL, AX és krill olajjal táplált egerekből származó homogenizált TA vázizom mintákból. Az izolált RNS-t nukleázmentes vízben újra szuszpendáltuk és -80°C -on tároltuk a kísérletek megkezdése előtt. Az RNS koncentrációját és minőségét spektrofotométerrel határoztuk meg 260 nm hullámhosszon (NanoDrop ND1000; Promega Biosciences, Madison, WI, USA). Az izolált RNS-t DNázissal és RNáz inhibitorral kezeltük (Ambion, Austin, TX, USA). Az Omniscript RT kittel (Qiagen, Germantown, MD, USA; katalógusszám: 205113) az izolált összes RNS-ből 1000 ng-ot reverz transzkripcióval komplementer DNS-é (cDNS) alakítottuk. A cDNS-szintézist random hexamerek

felhasználásával végeztük 25 µl reakciótérfogatban. A kvantitatív RT-PCR-hez Taqman Gene Expression Assays-t használtunk a Taqman™ Gene Expression Master Mix-szel (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Az amplifikációt Light Cycler 480 Master műszerrel (Roche, Basel, Svájc) végeztük (kat. sz. lemezekhez, Roche: 04729692001; kat. sz. zárófóliákhoz, Roche: 04729757001). A Taqman génexpressziós vizsgálatokhoz a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, USA) vásárolt és a 4. Táblázatban összefoglalt Taqman próbákat használtunk. Az amplifikációs program 10 perc volt 95 °C-on, majd 50 ciklusonként 15 másodpercig 95 °C-on és 1 perc 60 °C-on. A transzkriptumok relatív expressziós értékeit összehasonlító Ct módszerrel számítottuk ki, és AP3D1-et (Mm00475961_m1) használtuk normalizáláshoz. Minden qPCR reakciót triplikátumban végeztünk. A Cp értékeket a Light Cycler 480 SW 1.5.0 szoftverrel (Roche) határoztuk meg, a relatív másolatszámokat pedig a DCp módszerrel számítottuk ki. Végül a vizsgált (MCU, Mfn2, CB1, Drp1) és normalizációs gén (AP3D1) esetében a mért értékek arányai adták a relatív expressziós szinteket.

Vizsgált gén	Termék szám (Thermo Fisher Scientific)
MCU	(Mm01168773_m1)
Mfn2	(Mm00500120_m1)
CB1	(Mm01212171_s1)
Dnm1	(Mm03_42)
AP3D1	(Mm00475961_m1)

3. Táblázat. PCR során használt Taqman próbák.

Western Blot

Western blot kísérletekhez a teljes sejtizátumot a *m. glutealis*-ból mechanikus erő kivonásos módszerrel izoláltuk. A szövetmintákból sejtizátumokat készítettünk úgy, hogy a sejteken rozsdamentes acél golyókkal nyíróerőt alkalmaztunk. A fehérjetartalmat módosított BCA fehérje vizsgálattal (Pierce, Rockford, IL, USA) mértük. A mintákat ezután nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézisnek vetettük alá; 10%-os géleket sávonként egyenlő (40 µg) mennyiségű fehérjével töltöttünk fel. A mintákat ezután nitrocellulóz membránra vittük át (Bio-Rad). A fehérjekötő nitrocellulóz membránokat 5%-os tej-PBS oldattal blokkoltuk. A fehérjéket nyúl-anti-MICU1 primer antitestekkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, PA5-77364, poliklonális, 1:500), nyúl anti-Mitofusin-2-vel

(Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA 9482 és 8570, 1:500) és egér anti-Drp1-el (Santa Cruz, Dallas, TX, USA, sc-271583, monoklonális, 1:500) jelöltük 5% tejpport tartalmazó PBS-be hígítva. Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált, kecskéből származó anti-nyúl IgG Fc antitesteket (Bio-Rad; 1:1000 5% tejpport-t tartalmazó PBS-ben) használtuk, és az immunreaktív sávokat SuperSignal® West Pico vagy Femto Chemiluminescent Substrate fokozott kemilumineszcenciás kittel (Pierce, Rockford, IL, USA) tettük láthatóvá KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, Kodak, Tokió, Japán) segítségével. Az egyenlő fehérjefelvitel meghatározásához a membránokat újra megvizsgáltuk egér anti- α -actinin antitesttel (1:1000 hígítás 5% tejpport-t tartalmazó PBS-ben, Santa Cruz, Dallas, TX, USA, sc-166524), és a fent leírtak szerint láthatóvá tettük.

Fehérje	Gazdaszervezet	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás
MICU1	nyúl	Thermo Fisher Scientific	PA5-77364	1:500
Mitofusin-2	nyúl	Cell Signalling Technology	9482	1:500
Drp-1	egér	Santa Cruz	sc-271583	1:500
α -actinin	egér	Santa Cruz	sc-166524	1:1000

4. Táblázat. Western Blot során használt antitestek.

Statisztikai elemzés

Ebben a munkában az összesített adatokat az $\text{átlag} \pm \text{standard hibaként}$ (standard error of the mean, SEM) adtuk meg. Az *in vivo* grip teszt mérésekhez páros t-próbát alkalmaztunk, hogy összehasonlítsuk az adatokat a táplálékkiegészítőkkel való etetés előtt és után az egyes csoportok esetében. Az *in vitro* erőmérésnél az átlagot és a SEM-et az ugyanabból az állatból származó izmok értékeinek átlagaként számoltuk ki, míg a minták száma az adott csoporton belüli állatok száma volt. A CTRL, AX és krill olaj adatok összehasonlítására egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) és páronkénti Bonferroni-féle többszörös összehasonlítási módszert is alkalmaztunk. Minden más esetben a statisztikai szignifikancia értékelését a Prism statisztikai programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük.

Eredmények

Az AX és krill olaj táplálékkiegészítés megnöveli az *in vivo* izomerőt

Feltételeztük, hogy az AX erősen befolyásolhatja a sejtanyagcserét, ezért kezdetben megvizsgáltuk az AX etetés testsúlyra gyakorolt krónikus hatását. A kísérlet 1. és 28. napján megmértük a standard rágcsálótáppal (CTRL csoport), valamint az AX-al kiegészített táppal etetett egerek testtömegét. Fiatal felnőtt egerek esetén az átlagos testtömeg-növekedés szignifikánsan kisebb volt az AX egerekben, mint CTRL állatokban (5. táblázat). Ez a különbség nem a csökkent táplálékfelvételnek volt köszönhető, mivel az átlagos tápbevitel azonos volt a két csoportot nézve ($0,21 \pm 0,01$ (CTRL) és $0,22 \pm 0,02$ (AX) g/nap/testtömeg-gramm). Az átlagos testsúlyok a két csoport esetén az alábbiak voltak: $27,7 \pm 1,0$ g (1. nap) és $28,8 \pm 0,8$ g (28. nap) a CTRL csoportban, míg az AX csoport esetén: $28,1 \pm 0,7$ g (1. nap) és $28,2 \pm 0,7$ g (28. nap).

Paraméterek	<i>In vivo</i> adatok	
	CTRL	AX
Állatok száma	9	7
Testsúly változás (g)	$1,1 \pm 1,8$	$0,1 \pm 1,4^{**}$
Normalizált erő változása (mN/g)	$0,16 \pm 0,39$	$0,560 \pm 0,12^*$

5. táblázat. A testsúly és a fogóerő változása a speciális AX tartalmú táplálékkiegészítés 4 hetes alkalmazását követően fiatal-felnőtt egerek esetén. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest.

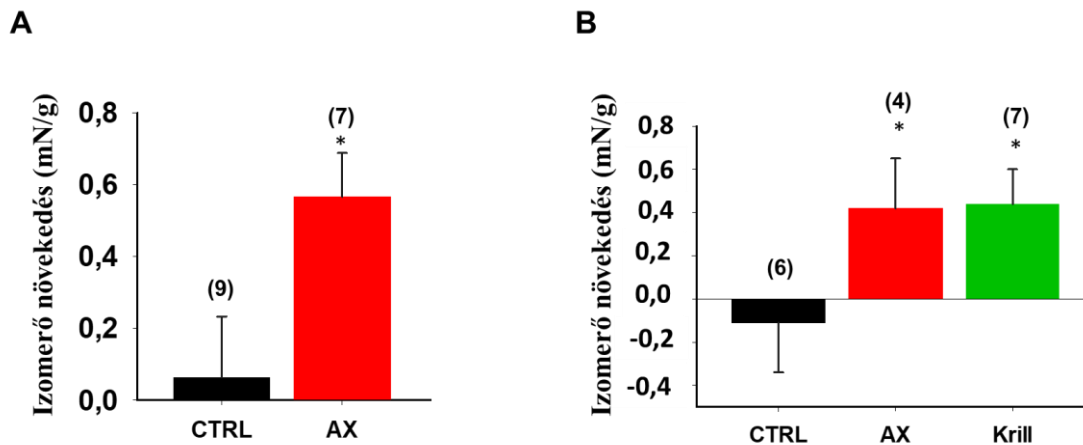
A fiatal felnőtt állatok *in vivo* izomtelijsítményének meghatározására grip, vagy más néven fogóerő tesztet alkalmaztunk az AX táplálék-kiegészítéssel történő etetési időszak elején és végén is. Ennek megfelelően 4 hét után az AX-al etetett egerek átlagosan nagyobb erő kifejtésre voltak képesek (5. táblázat, 12. ábra, A panel).

Hasonló eredményeket kaptunk az öregedő egerek AX-al és krill olajjal való etetése során. Míg az AX etetés nagyobb mértékű fogyást eredményezett a speciális diétán eltöltött negyedik hét végére, a krill olajjal kiegészített tápot fogyasztó állatcsoport hasonló testsúlyváltozási tendenciákat mutatott, mint a CTRL csoport (6. táblázat). A testtömeg

változása itt sem a csökkent táplálékfelvételnek és nem is a csökkent izomtömegnek volt tulajdonítható (az átlagos tápfogyasztás: $0,21 \pm 0,01$, $0,22 \pm 0,02$ és $0,21 \pm 0,03$ g/nap/ testtömeg-gramm a CTRL, az AX és a Krill csoport esetében). Idősödő egerek esetén is azt tapasztaltuk, hogy a CTRL csoporthoz képest az AX és a krill olaj is jelentősen megnövelte a testtömegre normalizált markolóerőt négy hét elteltével (6. táblázat, 12. ábra B panel).

Paraméterek	<i>In vivo</i> adatok		
	CTRL	AX	Krill
Állatok száma	6	4	7
Testsúly változás(g)	$-1,04 \pm 0,66$	$-3,98 \pm 0,31^{***}$	$-0,73 \pm 0,34$
Normalizált erő változása (mN/g)	$-0,11 \pm 0,23$	$0,42 \pm 0,23^*$	$0,44 \pm 0,16^*$

6. Táblázat. Az öregedő egerek testsúly és *in vivo* izom teljesítményének változásai AX és krill olaj 4 hetes táplálékkiegészítés következtében. * $p < 0,05$ és *** $p < 0,001$ a kontrollhoz képest.



12. ábra. A testsúlyra normalizált maximális izomerő növekedése az AX és krill olaj etetést követően fiatal (A) és öregedő (B) egerek esetén. A zárójelben lévő számok a csoportonként vizsgált állatok számát jelölik. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.

Az AX és krill olaj táplálékkiegészítés megnöveli az *in vitro* izomerőt

Annak megállapítására, hogy az AX diéta megváltoztathatja-e közvetlenül az izomfunkciót, *in vitro* izomerőt vizsgáltunk fiatal felnőtt egereken. Az EDL izmok normalizált egyszeri rángásának átlagos amplitúdójában nem volt különbség az AX-al etetett és a CTRL csoport között (7. táblázat, 13. ábra A panel). Ez némileg előrelátható volt, mivel az EDL izmok keresztmetszete nem különbözött a csoportok között ($1,30 \pm 0,07 \text{ mm}^2$ a CTRL és $1,27 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ az AX esetében). Ezzel ellentétben, az AX etetés jelentősen megnövelte a tetanusz alatt kifejtett erőt (7. táblázat, 13. ábra B panel). EDL izmok esetén, mindkét csoportban a csúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak, TTP) és a fél relaxációs idő (half relaxation time, HRT) esetén nem találtunk szignifikáns különbséget (7. táblázat).

Amikor öregedő egerek esetén vizsgáltuk az AX és krill olaj táplálékkiegészítés hatásait, azt találtuk, hogy jelentősen megnövekedett a normalizált egyszeri rángások (twitch) és a tetanuszok amplitúdója a kezelt állatokban (8 táblázat, 13. ábra C, D panel). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy idősödő egerekben az AX-al történő táplálékkiegészítés hatékonyabbnak bizonyult a krill olajjal szemben, mivel az izomerő markánsabb növekedését okozta egyedi rángások és tetanusz esetén egyaránt.

Paraméterek	Twitch		Tetanusz	
	CTRL	AX	CTRL	AX
Izmok száma	9	9	9	9
Erő (mN/mm^2)	$1,69 \pm 0,13$	$1,76 \pm 0,08$	$7,13 \pm 0,49$	$8,67 \pm 0,53^*$
TTP (ms)	$32,5 \pm 1,4$	$33,1 \pm 1,1$	$173,9 \pm 5,3$	$169,4 \pm 4,3$
HRT (ms)	$29,2 \pm 1,0$	$28,8 \pm 1,0$	$75,1 \pm 6,6$	$81,0 \pm 3,5$

Rövidítések: TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő; HRT: félrelaxációs idő

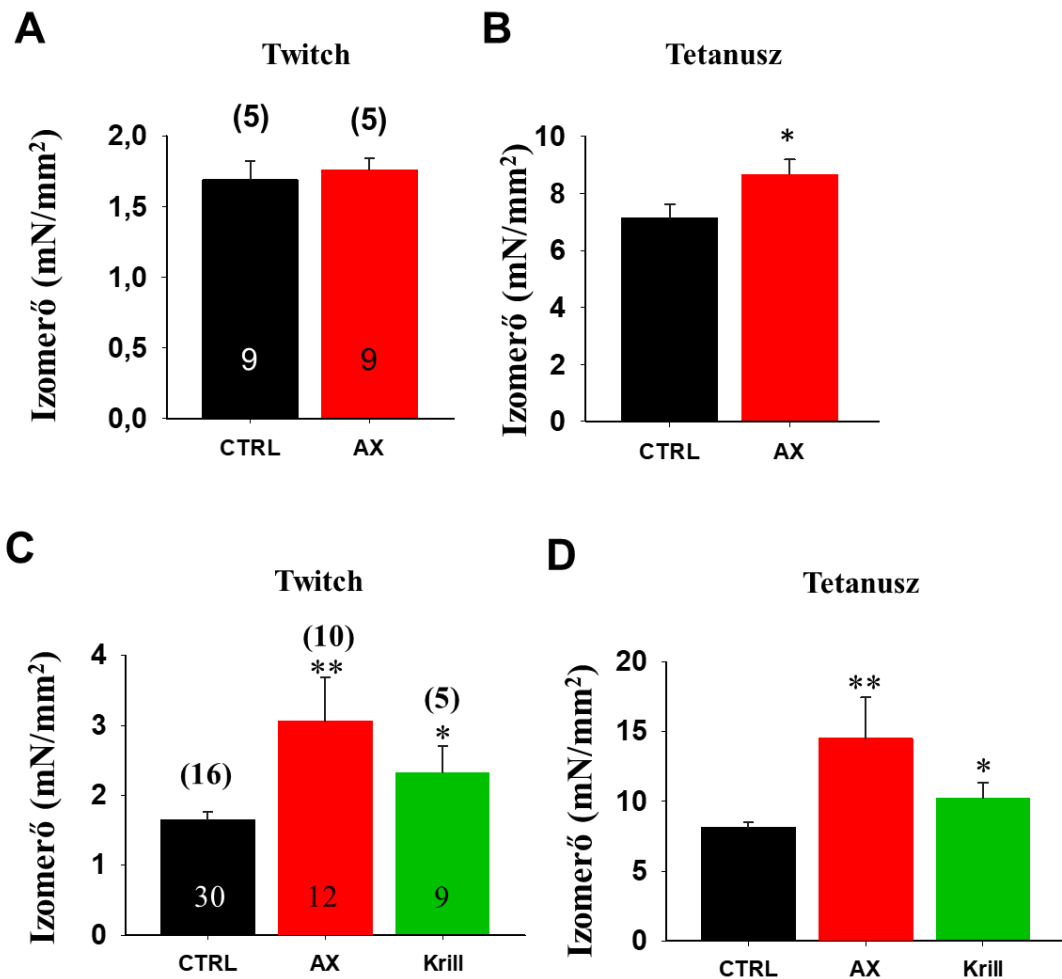
7. táblázat. *Fiatal felnőtt egerek esetén az in vitro erőmérés paraméterei 5 darab kontroll és 5 darab AX diétán tartott egérből származó EDL izom esetén. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest.*

Paraméterek	Twitch		
	CTRL	AX	Krill
Izmok száma	30	12	9
Erő (mN/mm ²)	1,65 ± 0,12	3,06 ± 0,63**	2,33 ± 0,38
TTP (ms)	30,1 ± 0,3	31,0 ± 1,3	34,3 ± 1,7***
HRT (ms)	26,0 ± 0,6	26,0 ± 1,3	28,1 ± 1,4

Paraméterek	Tetanusz		
	CTRL	AX	Krill
Izmok száma	30	12	9
Erő (mN/mm ²)	8,13 ± 0,40	14,52 ± 2,94**	10,24 ± 1,11*
TTP (ms)	173,7 ± 4,4	177,8 ± 7,8	190,1 ± 5,8
HRT (ms)	80,2 ± 4,6	76,7 ± 8,3	65,7 ± 7,2

Rövidítések: TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő; HRT: félrelaxációs idő

8. táblázat. Idősödő egerekben az *in vitro* izomösszehúzóds paramétereinek változása EDL izmokban az AX és krill olaj diétát követően. * $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$ a kontrollhoz képest.



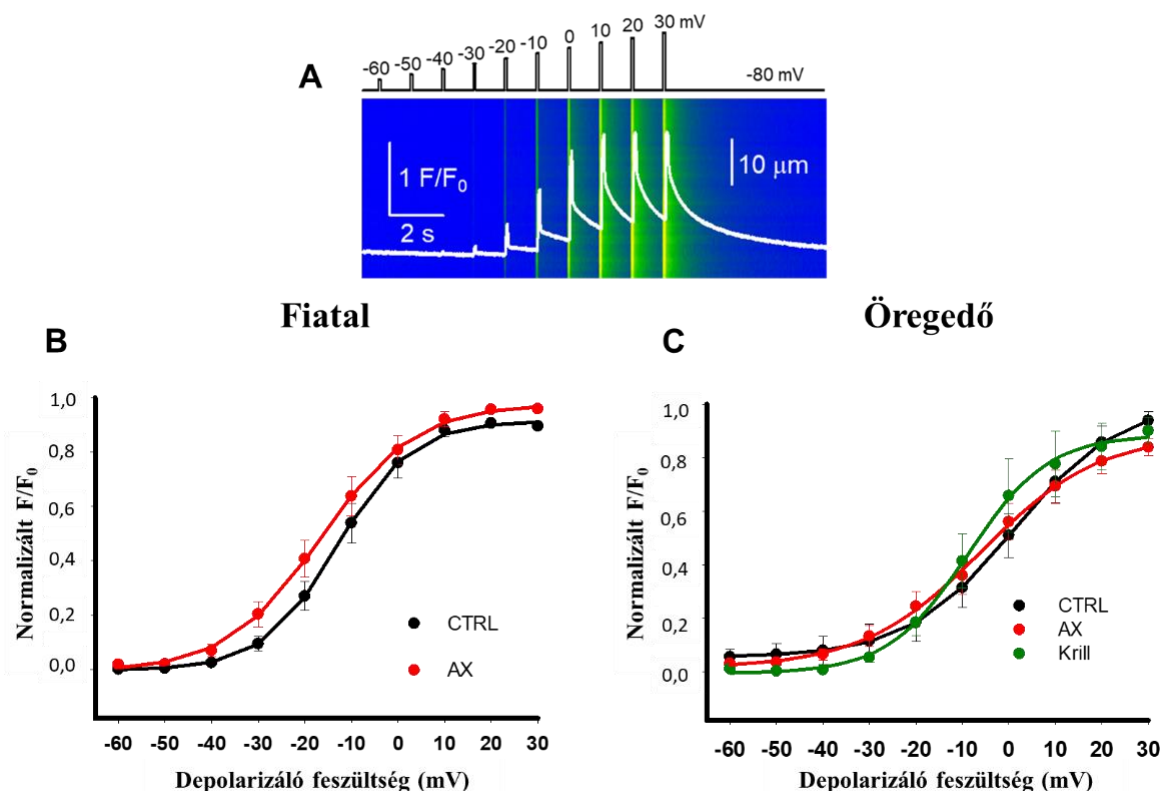
13. ábra. Nagyobb izomerő generálás EDL izmokban az AX és krill olaj táplálékkiegészítést követően *fiatal* (A,B) és *idősödő* (C,D) egerek esetén. A zárójelben lévő számok a felhasznált állatok számát jelölik. Az oszlopokban lévő számok a vizsgált izmok számát jelzik. * és ** a kontrollhoz képest számolt szignifikáns különbséget jelöli * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ értéken.

Ugyanakkor, az AX kezelés hatására sem a twitch, sem a tetanusz esetén nem észleltünk szignifikáns különbséget az olyan paraméterekben, mint a TTP vagy a HRT (8. táblázat). Ezzel szemben, azt találtuk, hogy a krill olaj adagolás az egyedi rángások esetén szignifikánsan megnövelte a TTP értékét a kontrollhoz képest.

A kalciumtranziensek feszültségfüggése változatlan marad a karotinoid táplálékkiegészítés után

Az AX, valamint a krill olaj tartalmú diéta a DHPR és RyR1 közötti mechanikai kapcsolat, vagyis az ECC mechanizmus egyik kulcsfontosságú lépésére gyakorolt hatásainak felmérésére kalciumtranzienseket vizsgáltunk teljes sejtes feszültség-clamp technikát alkalmazva. Enzimatikusan izolált FDB rostokon 100 ms hosszúságú depolarizációkat alkalmaztunk -80 mV tartófeszültségről indulva -60 és +30 mV között, 10 mV-onként növelve a depolarizáló impulzusokat. A két impulzus közötti késleltetés 1100 ms volt. Ezzel párhuzamosan a kalciumtranzienseket Zeiss Live konfokális mikroszkópon mértük. A 14. ábra A paneljén az adott protokoll mellett rögzített reprezentatív line-scan (x-t) kép látható. A fehér színű görbe az átlagos nyugalmi $F_0(x)$ értékekre normalizált fluoreszcencia intenzitást mutatja, amelyet a kép 50 sorának átlagolásával kaptunk. A 14. ábra B panelje a fiatal felnőtt egércsoport átlagos normalizált fluoreszcencia értékeinek feszültségfüggését hasonlítja össze 12 darab CTRL (fekete) és 17 darab AX (piros) FDB rost esetén.

Az *Anyagok és Módszerek* fejezetben bevezetett Eq.(1) képletet alkalmazva Boltzmann függvényt illesztettünk az adott mérés során rögzített maximális fluoreszcencia értékekre. Sem a fél-aktivációs feszültségben (V_{50}), sem az illesztett görbék meredekségeiben ($1/k$) nem találtunk eltérést a CTRL és AX rostok adatainak összehasonlítása során (9A táblázat). Kísérleteink alapján elmondható, hogy a kalciumfelszabadulás feszültségfüggése nem változott a két csoportban, vagyis az AX kezelés vélhetően nincs hatással a kalciumfelszabadulás aktiválására, tehát a DHPR és RyR1 közötti mechanikai kölcsönhatásra.



14. ábra. A táplálékkiegészítők adagolása nem változtatta meg az FDB rostokon mért kalciumtranziensek feszültségfüggését fiatal felnőtt egerek esetén, míg öregedő egerekben enyhén balra tolta azt. **(A)** A rhod-2 fluoreszcenciát bemutató $F_0(x)$ alapértékre normalizált reprezentatív konfokális line-scan felvétel egy kontroll sejtben, amelyet egymást követő depolarizáló feszültségeknek tettünk ki (a képen látható protokollt követve) egészsejtes feszültség-clamp technikát alkalmazva. **(B, C)** A kalcium tranziensek feszültségfüggésének Boltzmann illesztései fiatal, valamint öregedő egerekből származó egyedi FDB rostokon.

Amikor megvizsgáltuk az idősödő egerek esetén a táplálékkiegészítés hatásait a kalciumtranziensek feszültségfüggésére azt találtuk, hogy a krill olaj tartalmú diéta enyhén balra, vagyis negatívabb feszültségértékek irányába tolta a V_{50} értéket. Az illesztések paramétereit a 9. táblázat B része foglalja össze, míg a 14. ábra C paneljén a fluoreszcencia átlagértékekre történt legjobb illesztések láthatók 6 darab FDB rost esetén (zöld).

A fluoreszcencia intenzitás csúcsertékéből számolt kalcium tranziensek maximuma (+10 mV-os depolarizáció esetén) statisztikailag nem különbözött a fiatal egerek két csoportja között ($3,46 \pm 0,22$ a CTRL és $3,68 \pm 0,35$ az AX csoport esetében, 15. ábra). Mivel a depolarizáló impulzus időtartama mindig állandó volt (100 ms), az F/F_0 tranziensek alatti

területet az impulzus elejétől a végéig számoltuk ki, és nem találtunk statisztikailag eltérő értékeket ($172,1 \pm 17,9$ ms a CTRL esetében, illetve $176,4 \pm 19,2$ ms az AX esetében; $p > 0,8$). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AX egerekben megfigyelt nagyobb tetanikus erő vélhetően nem a fokozott kalciumfelszabadulás következménye.

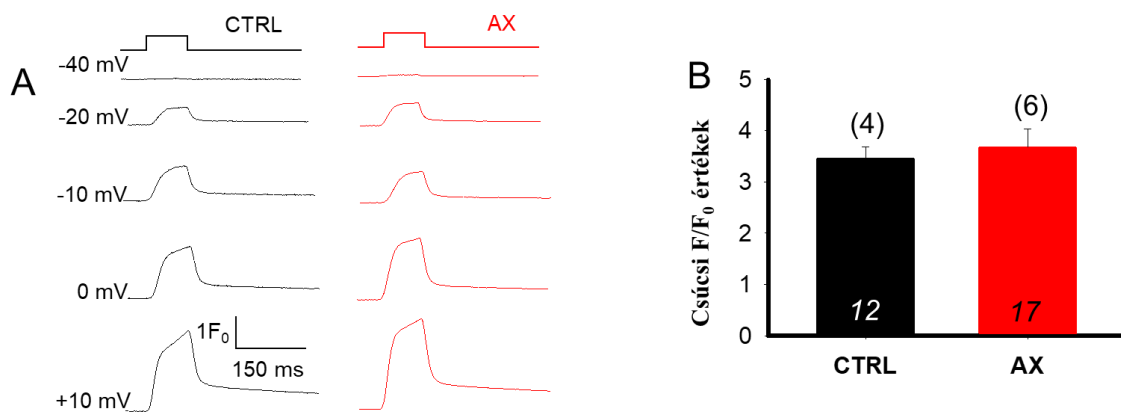
A

Paraméterek	<i>A Boltzmann függvény illesztett paraméterei - fiatal</i>	
	CTRL	AX
Állatok száma	4	6
FDB rostok száma	12	17
V_{50} (mV)	$-13,03 \pm 2,29$	$-16,57 \pm 2,70$
1/k	$7,91 \pm 0,54$	$10,04 \pm 0,79$

B

Paraméterek	<i>A Boltzmann függvény illesztett paraméterei - idősödő</i>		
	CTRL	AX	Krill
Állatok száma	7	5	5
FDB rostok száma	13	10	6
V_{50} (mV)	$1,07 \pm 4,82$	$-5,80 \pm 3,89$	$-8,77 \pm 5,87$
1/k	$11,35 \pm 0,75$	$12,78 \pm 1,47$	$8,65 \pm 1,57$

9. táblázat. A Boltzmann függvények illesztésének paraméterei fiatal (A) és idősödő (B) egerek esetén.



15. ábra. (A) A normalizált fluoreszcencia értékek időbeli profiljai az adott nagyságú 100 ms hosszúságú depolarizáló impulzusoknál fiatal CTRL és AX egerek FDB rostjaiban. (B) A maximális depolarizációs impulzusok közelében (+10 mV) kapott F/F_0 csúcsértékek összesített adatai. Az oszlopokban levő számok a vizsgált sejtek számát, míg a zárójelben lévő számok a vizsgált állatok számát jelölik.

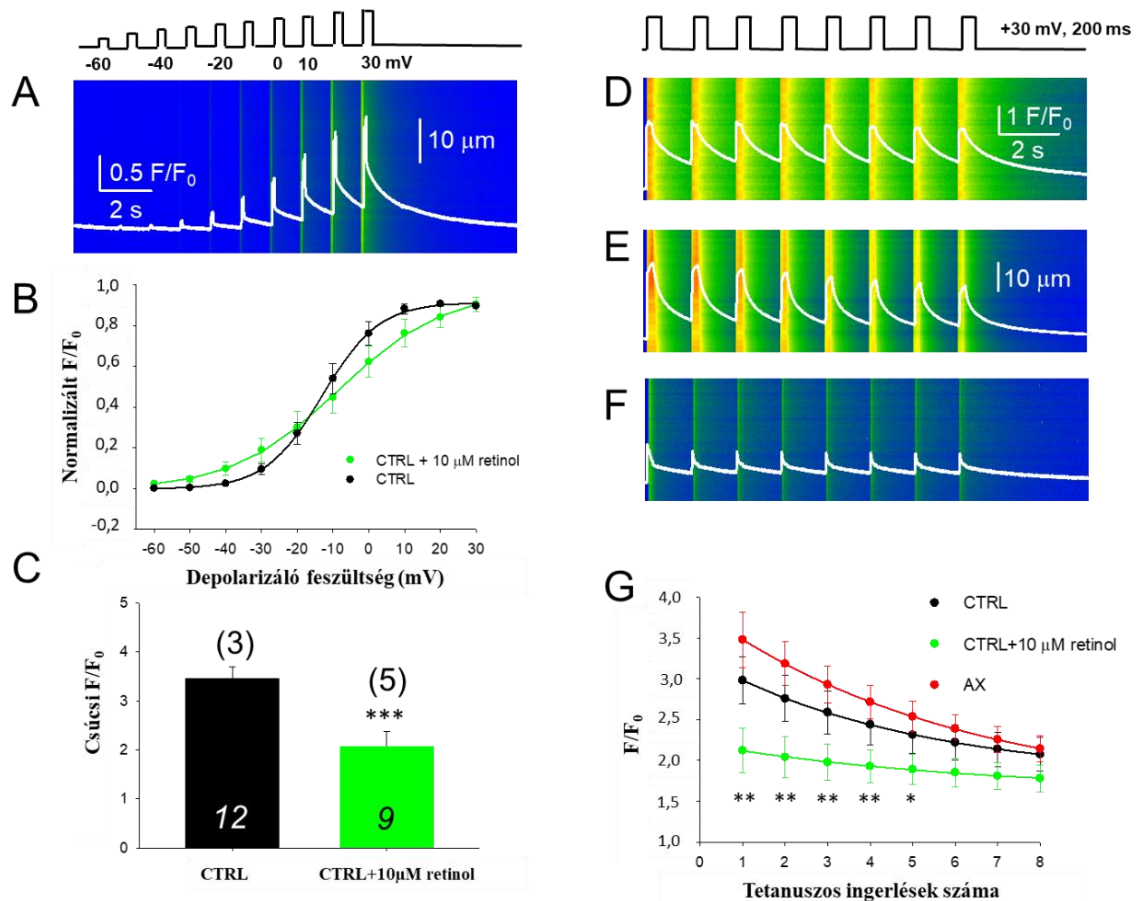
A retinol módosítja a Ca^{2+} felszabadulást vázizomban

A következő kísérletsorozatban 10 μ M retinol akut hatását vizsgáltuk a vázizom elektromechanikai kapcsolat működésére, fiatal egerekben. A retinol szerkezetileg hasonló az AX-hez, de az intracelluláris metabolizmusa eltérő. A 16. ábra A panel-jén bemutatott reprezentatív kísérletben az alkalmazott protokoll látható. Eredményeink azt mutatják, hogy a retinol akut alkalmazása eltolta a kalciumtranziensek fél aktivációs feszültségét és megváltoztatta azok meredekséget (16. ábra B panel). A kapott pontok átlagos értékeire Boltzmann-függvényt illesztettünk az Eq. (1) alapján (10. táblázat). Ez a hatás a raktárból felszabaduló kalcium csúcsértékének jelentős csökkenésével járt együtt a retinollal előkezelt rostok esetében (16. ábra C panel).

Paraméterek	<i>A Boltzmann függvény illesztett paraméterei</i>	
	CTRL	Retinol
Állatok száma	4	6
FDB rostok száma	12	11
V ₅₀ (mV)	-13,03 ± 2,29	-8,52 ± 3,70
1/k	7,91 ± 0,54	14,76 ± 0,68

10. táblázat. A Boltzmann függvények illesztésének paraméterei fiatal kontroll és akut retinol kezeléssel átesett FDB rostokon.

Mivel a Ca²⁺ visszavétele a raktárba a nyugalmi SR kalciumtartalom legfőbb szabályozója, kíváncsiak voltunk, hogy az azonnali – aktiválástól aktiválásig terjedő – Ca²⁺ visszavételt is módosítja-e a két vizsgált hasonló szerkezetű vegyület. A szerek hatásának tesztelésére maximális depolarizációjú tetanusz sorozatot alkalmaztunk a 16. ábra D, E és F paneleken látható protokollt követve CTRL, AX és retinollal kezelt rostokon. A kalcium tranzienseket 1,5 s késleltetéssel, egyenként 200 ms időtartamú, +30 mV-ra történő depolarizáló impulzusok sorozatával váltottuk ki. Ebben a kísérleti elrendezésben a folyamatos és ismételt depolarizációval kiváltott kalciumtranziensek megfeleltethetők a fiziológias izomösszehúzódnás során fellépő tetanuszos rángásokkal.



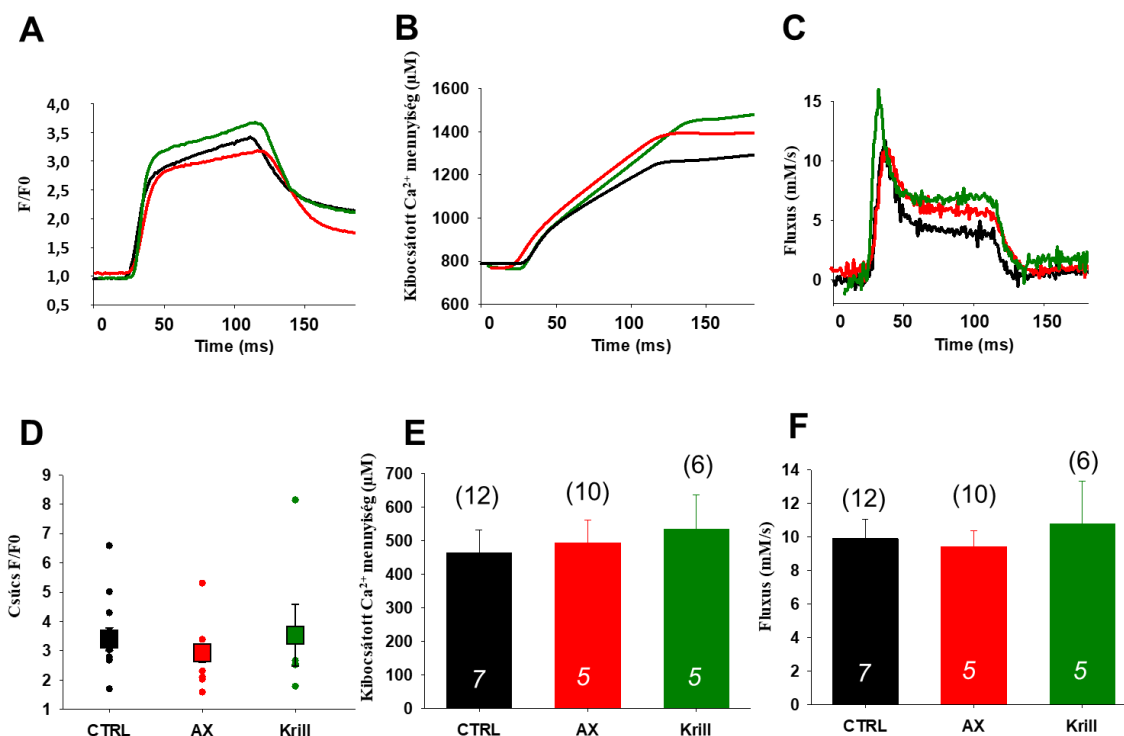
16. ábra. Akut retinol kezelés hatása fiatal egerek FBD rostjainak elektro-mechanikai kapcsolatának működésére. (A) Reprezentatív konfokális line-scan felvétel a feszültség aktivált intracelluláris kalciumtranziensekről egy kontroll FDB rost esetén. A fehér görbe a térben átlagolt $F(t)/F_0$ -t jelzi. (B) A kalciumtranziensek feszültségfüggése. (C) Normalizált fluoreszcencia csúcs a maximális depolarizációhoz közeli (+10 mV) értéknél. *** szignifikáns eltérést ($p < 0,001$) jelöl a CTRL-hoz képest. A dőlt betűs számok a vizsgált sejtek számát, míg a zárójelben lévő számok a vizsgált állatok számát jelölik. (D, E, F) Az FDB rostok kalciumraktárainak ürülésének mértékét bemutató reprezentatív line-scan képek CTRL (D), AX (E) és retinol (F) kezelt sejtekben. (G) A normalizált fluoreszcenciát minden egyes impulzusra ábrázoltuk, és az F/F_0 csökkenés értékeléséhez egy-egy exponenciális függvényt illesztettünk a pontokra. * és ** az AX és a retinol közötti szignifikáns eltérést jelöli az adott depolarizáció esetében (* $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$).

A 16. ábra G panelje szemlélteti a normalizált fluoreszcencia értékek (F/F_0) alakulását az ismétlődő tetanusos stimuláció során CTRL, AX és retinollal kezelt FDB rostokban. A sorozatos ingerlés hatására, folyamatosan csökken az F/F_0 érték, hiszen egyre inkább ürül a raktár kalciumtartalma és egyre kisebbek lesznek a kalciumtranziensek. Meglepve tapasztaltuk, hogy

az AX kezelt rostokban kevésbé volt drámai ez a csökkenés. Ezzel szemben a retinol kezelés szignifikánsan lecsökkentette azt (16. ábra F panel, G panel zöld görbe). Mindhárom esetben, a fluoreszcencia csökkenést egy exponenciális függvényvel illesztettük meg az *Anyagok és Módszerek* fejezetben megadott Eq. (2) képlet alapján; az illesztési paraméterek a következők voltak: $y_0 = 1,77, 1,53$ és $1,61$, $a = 1,46, 2,29$ és $0,59$; $b = 0,19, 0,16$ és $0,15$ a CTRL, AX és retinol esetében. Retinol alkalmazása esetén az illesztett exponenciális görbe jóval a kontroll és AX illesztés alatt marad, ami arra utal, hogy az akut retinol kezelést követően az izomrostok hajlamosabbak a fáradékonyságra, hamarabb kimerülnek.

Változatlan Ca^{2+} tranziensek és Ca^{2+} fluxusok antioxidáns táplálékkiegészítés után

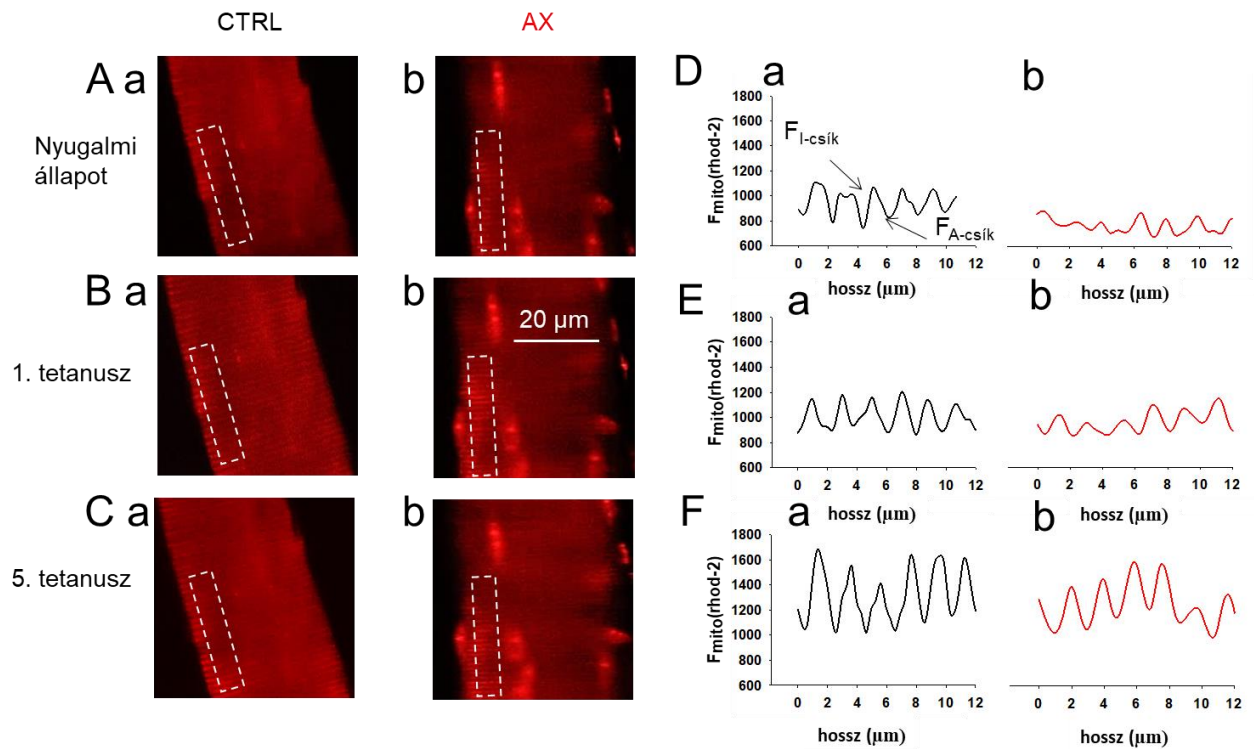
A 17. ábra A paneljén látható a CTRL (fekete), AX (piros) és krill olaj (zöld) öregedő egerekből származó FDB izomrostokban rögzített maximális depolarizációval kiváltott rhod-2 fluoreszcencia változásainak összehasonlítása. A 17. ábra B panel a nettó felszabaduló Ca^{2+} mennyiségét mutatja, míg a C panelen az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásaiból számolt Ca^{2+} fluxus látható. Az átlagos F/F_0 csúcs fluoreszcencia értékekben nem figyeltünk meg szignifikáns változást a vizsgált csoportok között (17. ábra D panel), nevezetesen ezek az értékek: $3,40 \pm 0,39$; $2,93 \pm 0,31$, illetve $3,53 \pm 1,06$ voltak a CTRL, AX és krill olaj esetében. Összességében elmondható, hogy a fluoreszcencia, az abból számolt kalciumkoncentrációk, valamint kalciumfluxus nagyon hasonló időbeliséget mutatnak a CTRL és a táplálékkiegészítővel etetett állatokban, ami arra utal, hogy ezek tekintetében nincs jelentős változás a speciális karotinoid tartalmú étrend alkalmazás követően.



17. ábra. A táplálékkiegészítők Ca²⁺-tranziensekre és Ca²⁺-fluxusokra gyakorolt hatásának összehasonlítása öregedő egerek FDB izomrostjaiban. **(A)** Reprezentatív F/F₀ fluoreszcencia változások 100 ms hosszú depolarizáló impulzusok hatására. **(B)** Az F/F₀ tranziensekből számított nettó felszabaduló Ca²⁺ mennyisége **(C)** Ca²⁺-fluxus görbék a B panel görbéiből számolva. **(D)** A maximális depolarizáló impulzusoknál (100 ms, +30 mV) kapott F/F₀ csúcsértékek összesített adatai. A pontok egyedi sejteknek felelnek meg; a négyzetek az egyes csoportokra számított átlagot (+SEM) jelzik. **(E, F)** Az átlagos kibocsájtott Ca²⁺ mennyisége, valamint a Ca²⁺ fluxus. Az oszlopokban lévő számok a vizsgált állatok számát, míg a zárójelben lévő számok a vizsgált sejtek számát jelölik.

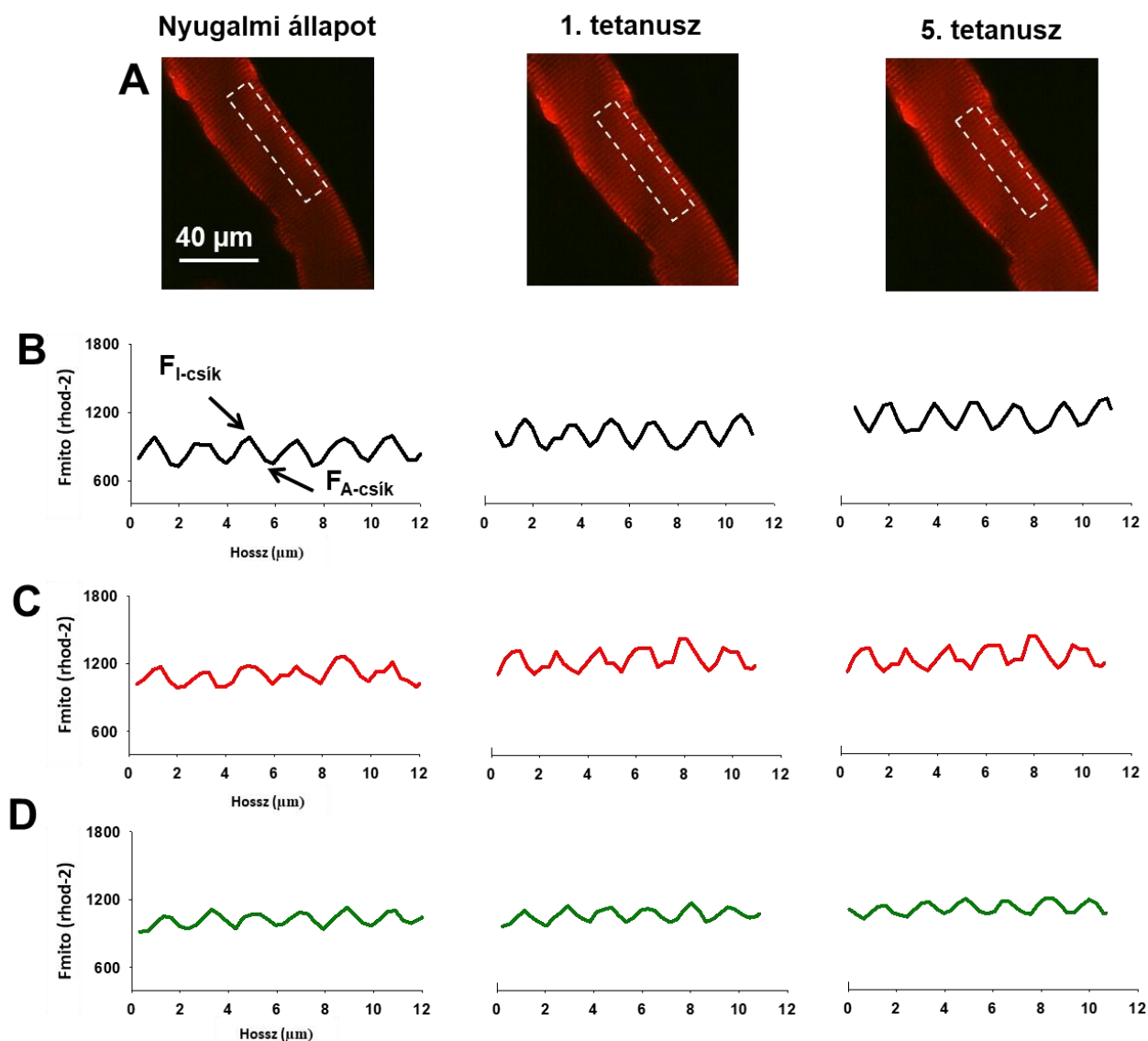
A karotinoid táplálékkiegészítés változó hatásai az aktivitás-függő mitokondriális kalciumfelvételre

A 18. ábrán láthatók egy CTRL és egy AX-al kezelt egérből származó egyedi FDB izomrost konfokális felvételei. Itt a rhod-2 AM fluoreszcenciáját hasonlítjuk össze nyugalmi állapotban (18. ábra A panel), valamint egy (18. ábra B panel) és öt (18. ábra C panel) egymást követő tetanikus depolarizáló impulzust követően. A rost tengelyével párhuzamosan átlagolt fluoreszcencia a tetanuszos stimulációt követően növekszik (18. ábra D, E, F), ám az átlagos fluoreszcencia-növekedés kisebbnek bizonyult az AX-al etetett egércsoport rostjai esetében.



18. ábra. Csökkent aktivitásfüggő kalciumfelvétel az AX-al etetett egerek FDB rostjainak mitokondriumaiban. (A, B, C) Reprezentatív képek a rhod-2 fluoreszcenciájáról FDB rostokban tetanikus stimuláció előtt és után (1. és 5. tetanusz) CTRL (a) és AX (b) egerekben. (D, E, F) Mitokondriális fluoreszcencia-intenzitásprofilok az Aa, Ba, Ca és Ab, Bb, Cb képeken kiemelt négyzet alakú területekből számolva.

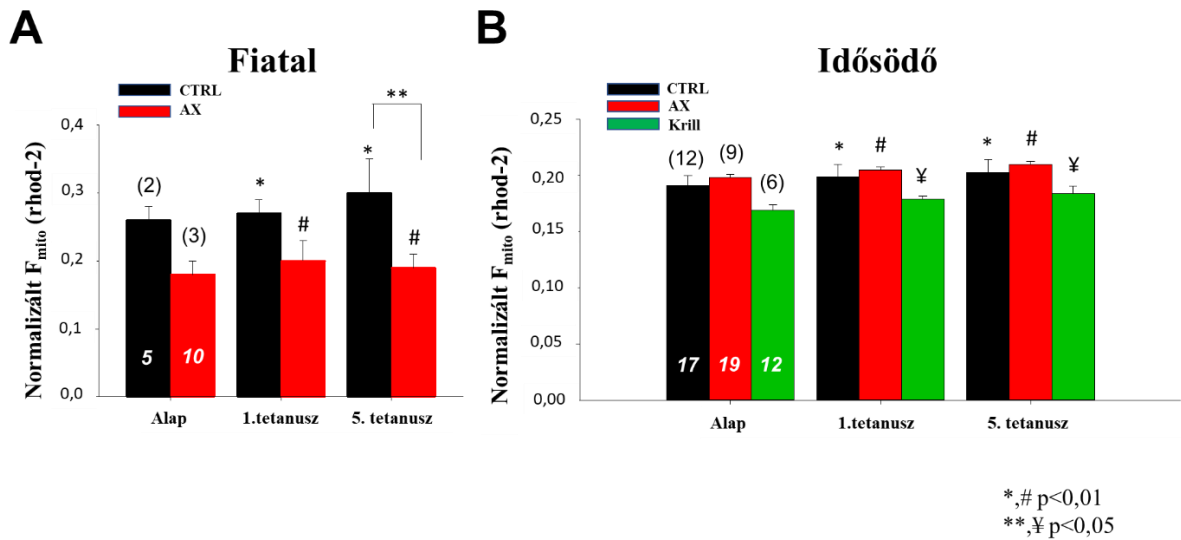
Hasonló méréseket végeztünk az idősödő egereken is. Egy öreg kontroll egérből származó FDB rost reprezentatív konfokális képei láthatóak a 19. ábra A paneljén nyugalomban, illetve 1 vagy 5 ingerlést követően. Az átlagolt fluoreszcenciát itt is egy rosttal párhuzamos területből (a kijelölt fehér téglalap) határoztuk meg (19. ábra B, C és D panelek).



19. ábra. A mitokondriális kalciumfelvétel aktivitás-függő változásai öregedő egerek FDB rostjaiban. (A) A rhod-2 fluoreszcencia ábrázolása egy kontroll FDB rostban, nyugalmi állapotban és tetanuszos stimulációt (1 és 5 tetanusz) követően. (B, C, D) Reprezentatív mitokondriális fluoreszcencia-intenzitásprofilok az A panelen látható téglalap alakú területekből számolva egy kontroll (fekete), AX (piros), és krill olaj (zöld) diétán tartott egérből származó FDB rostok esetén.

A 20. ábra összefoglalva mutatja a fiatal felnőtt csoport (A panel) mellett az öregedő egereken (B panel) rögzített mitokondriális fluoreszcencia értékek (F_{mito}) átlagait. Az F_{mito} kiszámolása az *Anyagok és Módszerek* részben megadott Eq.(3) képlet alapján történt. Jól látható, hogy mindkét állatcsoport esetén az ingerlés hatására fluoreszcencia intenzitásnövekedést tapasztaltunk, ám a fiatal állatok esetén az AX diéta úgy tűnik, hogy

hatásosabb volt, hiszen megvédte a mitokondriumokat a kalcium túltöltődés (overload) ellen. Az idősödő csoportban, a krill olajjal kiegészített diétának volt hasonló hatása.

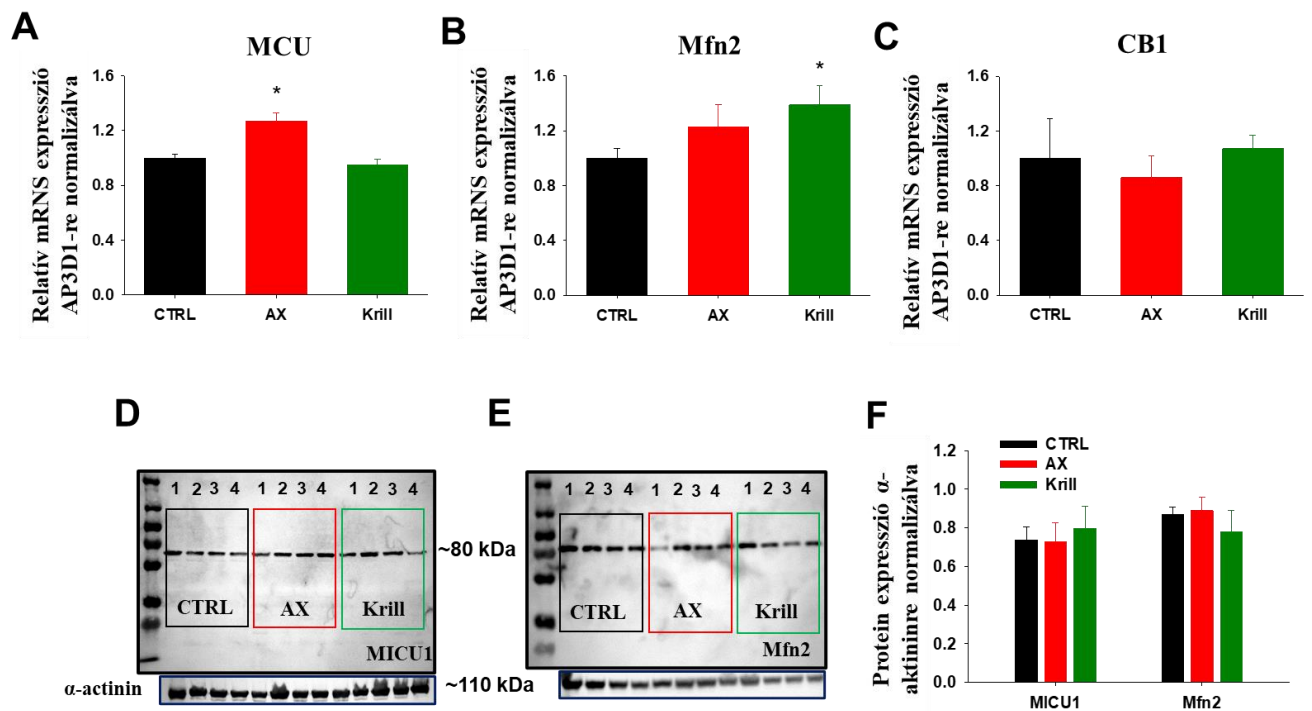


20. ábra: A normalizált átlagos mitokondriális fluoreszcencia (F_{mito}) ábrázolása. (A) CTRL és AX-al etetett fiatal felnőtt egerekből származó FDB rostokban nyugalmi állapotban és a tetanuszos ingerlést követően, valamint idősödő egerek (B) átlagos F_{mito} értékei a speciális diétát követően. *, #, ¥ $p < 0,05$ jelzi az adott csoporton belüli szignifikáns különbséget a tetanuszos ingerlést követően. ** $p < 0,05$ a CTRL és az AX közötti szignifikáns eltérést jelzi az ötödik tetanusznál. Az oszlopokban lévő számok a vizsgált izmok számát, míg a zárójelben lévő számok a vizsgált állatok számát jelölik.

A karotinoid táplálékkiegészítés változó hatásai a mitokondriális dinamikára

A kísérleteink folytatásában arra voltunk kíváncsiak, hogy mi állhat a fokozott *in vivo* és *in vitro* erőgenerálás hátterében az alkalmazott táplálékkiegészítés kapcsán. Ezért arra kerestük a választ, hogy a mitokondriális dinamikában (fúziós és hasadás) és a Ca^{2+} szabályozásban részt vevő egyes fehérjéket befolyásolja-e az AX valamint krill olaj tartalmú speciális étrend. A mitokondriális fúzió jellemzésére az Mfn2-t, a mitokondriális fission vagyis hasadás kapcsán pedig a Drp1-t vizsgáltuk, a mitokondriális kalcium felvétellel kapcsolatban pedig az MCU expressziós szintjét elemeztük. Ezen túl még a CB1 fehérjét is tanulmányoztuk, mivel azt korábban már leírták, hogy az öregedés során megváltozik a fehérje expressziós szintje. A kontroll, AX és krill olajjal etetett idősödő egércsoportok esetén kvantitatív PCR analízist végeztünk az *m. tibialis anterior* (TA) izmokon és az MCU, Mfn2 és CB1 transzkriptum-szintjében szignifikáns különbségeket találtunk a táplálékkiegészítést követően.

Az AX szignifikánsan növelte az MCU mRNS transzkriptum szintjét (21. ábra A panel), míg a krill olaj nem befolyásolta azt. Másrészt az Mfn2 mRNS-szintjét a krill olaj szignifikánsan megváltoztatta a CTRL-hoz képest, AX-kiegészítést követően csak enyhe emelkedést észleltünk az expressziós szinten (21. ábra B panel).

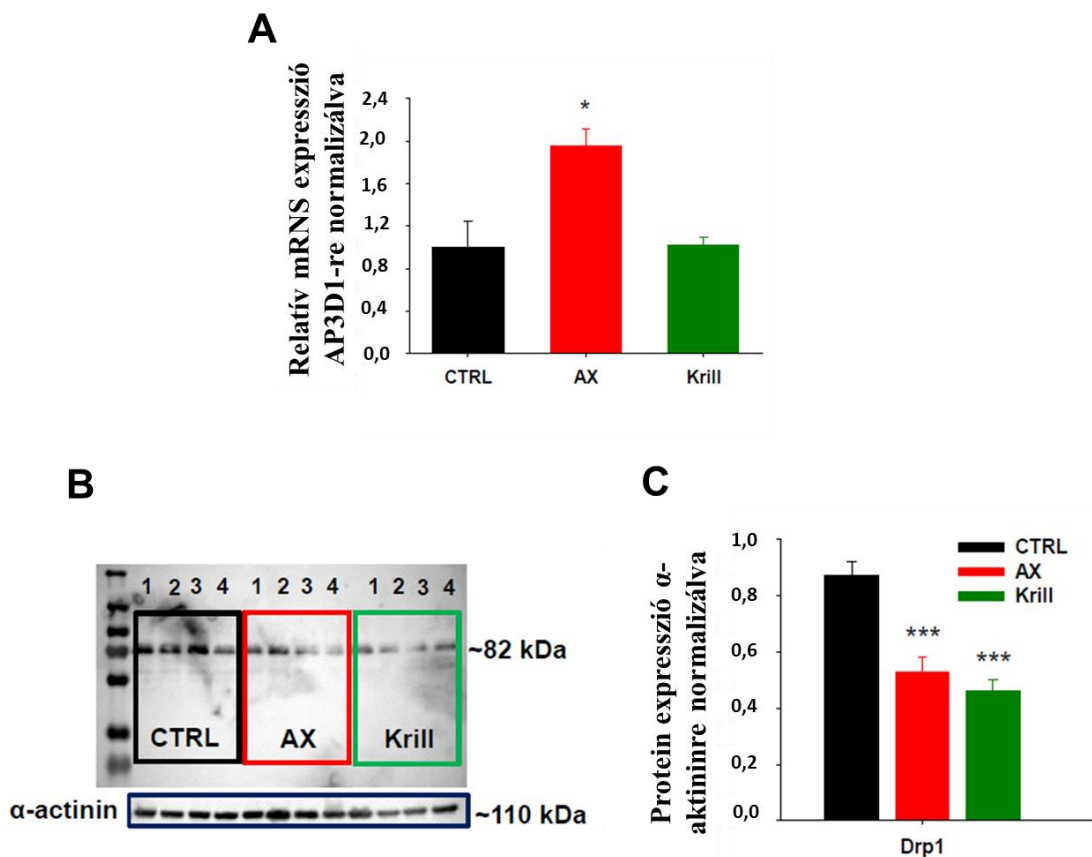


21. ábra. A 4 hetes táplálékkiegészítés változó hatással van a mitokondrium háztartásában részt vevő egyes fehérjékre. (A, B, C) az MCU és az Mfn2 mRNS transzkriptum expressziójában az RT-qPCR analízis szignifikáns különbségeket mutat az AX és krill olaj diétán tartott egerek TA izmaiban. A CB1 mRNS szintje nem változott. Az adatokat négy-négy egérből nyertük csoportonként. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest. (D, E) Reprezentatív Western blot a MICU1 és Mfn2 fehérje vizsgálatára. A számok a vizsgált állatok azonosítószámát jelzik a gélen. (F) A MICU1 és Mfn2 fehérjék átlagos expressziós szintje. Belső kontrollként α -aktinin alkalmaztunk. Az adatok két független kísérletből származnak.

A CB1 transzkriptumok változatlanok maradtak négy hét speciális étrend után (21. ábra C panel). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az öregedő izmokban megnövekedett Mfn2 és MCU transzkriptumok szintjei a fehérjeforgalom változásának következménye lehet. Hogy pontosabb képet kapjunk, szemi-quantitatív Western blot módszerrel megvizsgáltuk a

kapcsolódó fehérjeszinteket, ám nem találtunk szignifikáns változást az étrendkiegészítés után (21. ábra D, E, F panel). Eredményeink alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a négyhetes speciális étrend látszólag nem okoz jelentős változást a vázizmok mitokondriális fúziójában és a kalciumháztartásában.

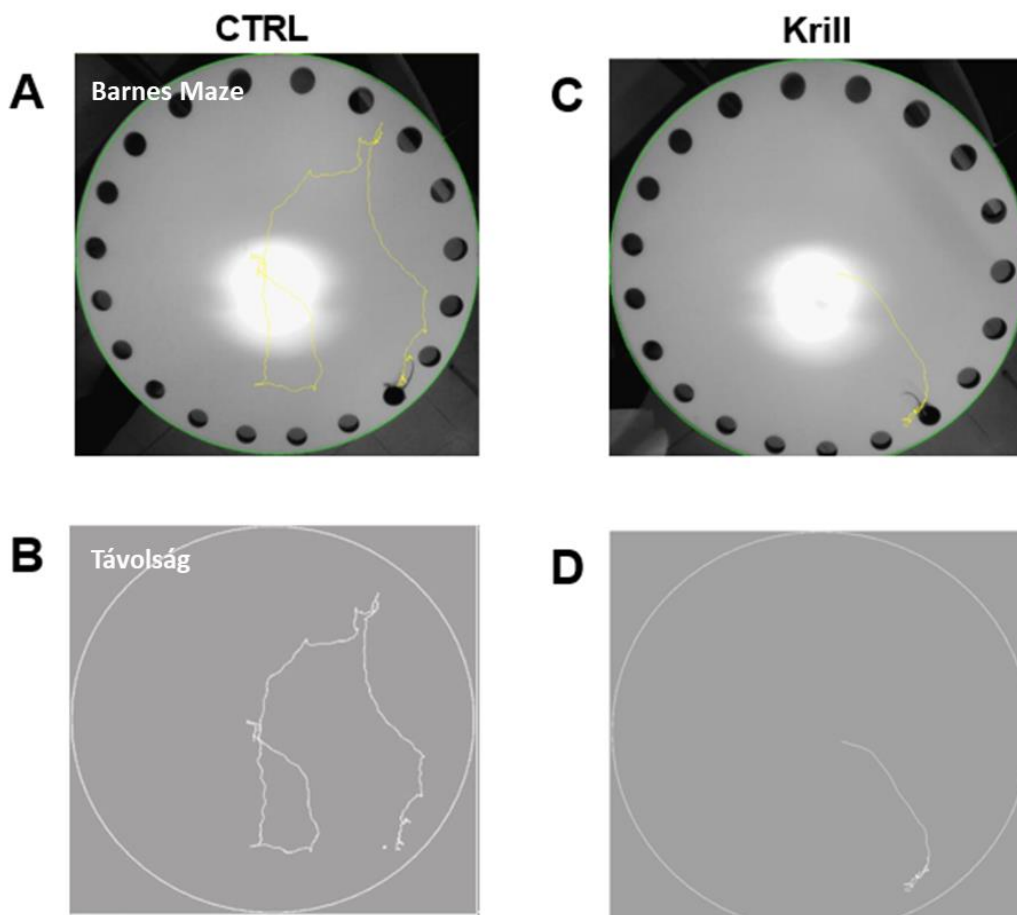
A mitokondriális hasadás egy többlépcsős folyamat, amely főként a citoszolikus GTPáz dinamához kapcsolódó protein 1-től (Drp1) függ. Az AX etetést követően qPCR méréseink szignifikánsan megnövekedett Drp1 transzkriptum-szintet mutattak ki (22. ábra A panel), míg fehérje szinten meglepő módon szignifikáns csökkenést észleltünk a CTRL csoporthoz képest. A krill olajjal etetett csoportban ilyen jellegű változást nem tapasztaltunk mRNS szinten, ám fehérje szinten hasonlóan szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (22. ábra B, C panel).



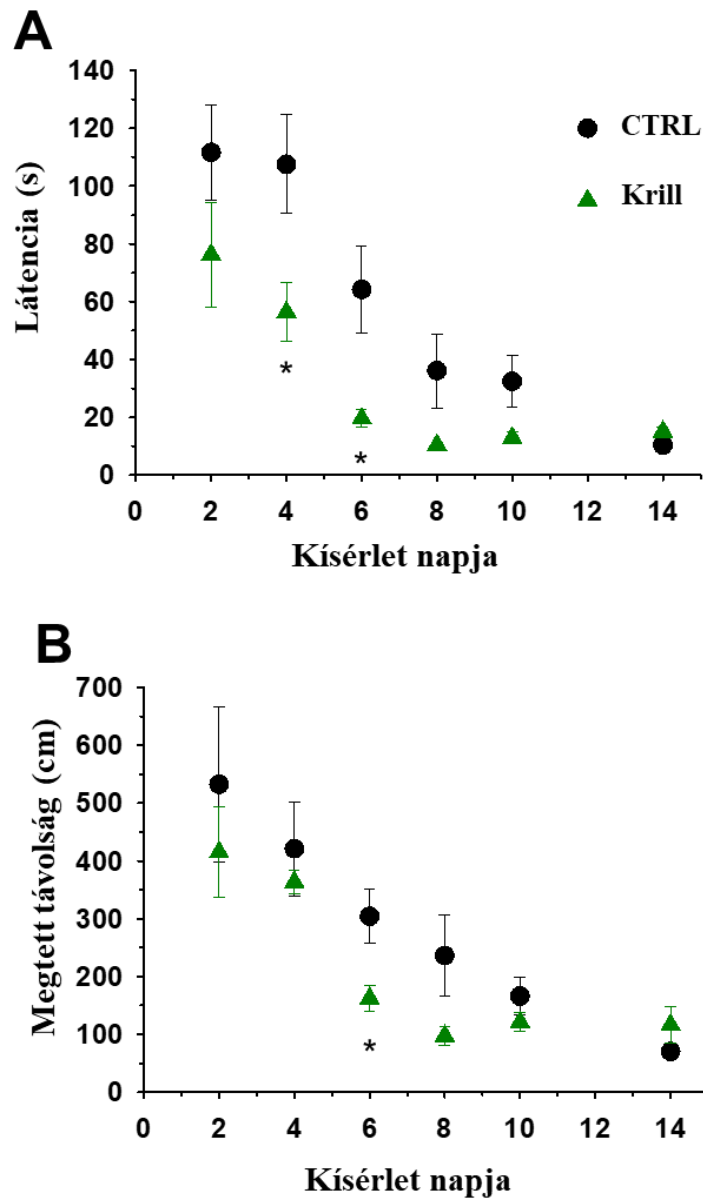
22. ábra. A táplálékkiegészítők adagolásának hatása a mitokondriális Drp1-re. **(A)** RT-qPCR elemzés. Az adatokat csoportonként 4 egérből nyertük. * $p < 0,05$. **(B)** Reprezentatív Western blot a Drp1 fehérje vizsgálatára. *** $p < 0,001$ a kontrollhoz képest. A gélen lévő számok a vizsgált állatok számát jelzik. **(C)** A Drp1 átlagos expressziós szintje. Belső kontrollként α -aktinint használtunk. Az adatok 2 független kísérletből származnak.

A krill olaj és a memória

A krill olajban (de nem az AX-ban) jelenlévő ω -3 PUFA-k tanulási képesség és memóriára való hatásának vizsgálatára a Barnes Maze kísérletet alkalmaztuk kontroll és 4 héten át krill olajjal kiegészített tápot fogyasztó idősödő egereken. Az ismételt kísérletek során megfigyelt különbségek (ha vannak) a menekülési lyukig megtett látenciában (időtartamában) és távolságában (útvonalában) várhatóak, amik a hippocampusz-függő memóriafunkció indikátoraként értelmezhetők. 8-8 kontroll és krill olajjal etetett egeret az akvizíciós időszakban képeztünk ki (részletek az *Anyagok és Módszerek* fejezetben) 10 egymást követő napon, majd háromnapos pihenőidő után vak tesztet végeztünk. Az akvizíciós napokon a céllyukba való belépésig eltelt időt (látencia) és az addig megtett távolságot mértük centiméterben.



23. ábra. A Barnes-Maze teszt 6. napján a céllyuk megtalálásának útvonala 4 hetes krill olaj táplálékkiegészítést követően. A kontroll egér (**A, B**) és a krill olajal etetett egér (**C, D**) által megtett út. A céllyuk megtalálásának ideje (**A, C**) 59,0 mp vs. 15,4 mp, míg a megtett távolság (**B, D**) 260,5 cm vs. 127,1 cm volt a CTRL és a krill olaj diétán tartott egér esetében.



24. ábra. A krill olaj táplálékkiegészítés részben javítja az idősödő egerek tanulását és memóriáját. **(A)** A célyluc helyének megtalálásához szükséges idő. **(B)** A célyluc helyének megtalálásához vezető út hossza. Az adatpontokat kétnaponta átlagoltuk. * $p < 0,05$ szignifikáns különbséget jelöl a kontroll és a krill olaj között.

A kísérlet eredményeként elmondható, hogy a krill olajjal etetett egerek a kísérlet alatt gyorsabban megtanulták a célyluc elhelyezkedését és céltudatosabbak voltak (23. ábra C, D panel), mint a kontroll állatok (23. ábra A B panel), ugyanis szignifikáns különbséget (* $p < 0,05$) találtunk a két állatcsoport között a látenciában (4–6. nap) (24. ábra, A panel) és a megtett távolságban (6. nap) (24. ábra, B panel). A kísérlet végére, vagyis a 14.-ik napra az előbbi két

paraméter átlagértéke mindkét állatcsoportban azonos volt, vagyis a krill olaj hatása csak a kísérlet egy részében volt észlelhető és mérhető.

Eredmények megbeszélése

Az astaxanthin (AX) egy tengeri algákból kinyert karotinoid, melynek fogyasztása, természetes antioxidáns hatásának köszönhetően számos egészségügyi előnnyel jár. Az AX egyedi amfipatikus molekuláris szerkezetének köszönhetően képes magát beékelni a sejtmembránokba és a vérben keringő lipoproteinekbe, így hatékony védelmet tud nyújtani az oxidatív stressz ellen [107]. A vázizomzat kontraktilis aktivitása során (de nyugalomban is) ROS-t termel. Az izomtevékenység során bekövetkező redox egyensúly kibillenés jelentősen hozzájárulhat a kontrakciós erő csökkenéséhez, a fáradékonysághoz és a sérülésekre való nagyobb hajlamhoz. Fiatal és idős korban egyaránt javasolt az antioxidánsok, úgy mint a C-, E- és A-vitamin, továbbá a karotinoidok (melyek az A-vitamin zsírban oldódó prekursorai) fogyasztása. Ezek segíthetnek az oxidatív károsodás mérséklésében, a teljesítmény növelésében, regenerációban, valamint az izomrendszer betegségeinek megelőzésében.

Aoi és munkatársai mutatták ki először egérben az AX felszívódását és a keringés révén a vázizomba és szívizomsejtjeibe való akkumulálódását [108]. Ezen túl, eddig nem voltak ismereteink az AX hatásairól a vázizom elektro-mechanikai kapcsolat folyamataiban, különösen a RyR1-DHPR interakcióra és a kalcium-homeosztázisra nézve.

A doktori disszertációmban bemutatott kutatáshoz az AstaReal A1010 terméket használtuk, amely AX-ban gazdag. A termék gyártói adatlapja szerint 5-5,6% AX-t, valamint kismértékben néhány más antioxidánst, mint például 0,6% d- α -tokoferolt (E-vitamin) és 0,3% aszkorbil-palmitátot is tartalmaz. Bár nem zárható ki, hogy e két utóbbi összetevőnek valamilyen hatása lehet az izomműködésre, úgy gondoljuk, hogy ezek az alacsony koncentrációjuknál fogva nem befolyásolták az AX hatásait jelen tanulmányunkban. Bár az AX tényleges plazmakoncentrációját nem mértük, a korábbi eredmények megerősítették az itt alkalmazott AX készítmény jó abszorpciós tulajdonságait [101]. Fontos kiemelni, hogy a megfigyelt hatások - a tetanuszos erő emelkedése és a mitokondriális kalcium felhalmozódásának csökkenése ismételt stimuláció után - összhangban állnak a korábbi irodalomban található mérésekkel, ahol más antioxidánsokat alkalmaztak az izomműködés fokozására [108].

Táplálékkiegészítők és vázizom teljesítmény

Tanulmányunk alátámasztja azt a tényt, hogy az AX javítja az *in vivo* izomteljesítményt (12. ábra) és az *in vitro* tetanusos izomerőt (13. ábra), anélkül, hogy számottevő hatást gyakorolna a vázizom kalcium-homeosztázisára és az elektro-mechanikai kapcsolatra (14. ábra).

Keveset tudunk viszont a retinol vázizom típusú ECC mechanizmusra kifejtett hatásairól. Az általunk végzett FDB izomrostok akut kezelése 10 μ M retinol-al egyértelműen a feszültségaktivált kalcium tranziensek V_{50} értékében eltolódást eredményezett és jelentősen csökkentette a kalciumtranziesek F/F_0 csúcsát is (16. ábra A–C. panelek). Ezek szerint az izomsejtek valószínűleg nem tudnak elég kalciumot kiadni a citoplazmatikus térbe, így a retinol negatívan befolyásolhatja az izmok Ca^{2+} -homeosztázisait.

Érdeemesnek találtuk további kutatásokat végezni annak érdekében, hogy megértsük, milyen alternatív útvonalak lehetnek felelősek az itt vizsgált karotinoid táplálékkiegészítők által előidézett izomerő növekedéséért. Egy lehetséges magyarázat szerint az AX felgyorsíthatja a lipid felhasználást, ami növeli a metabolikus aktivitást a retinoid jelátvitel és az antioxidáns hatás révén. Ezt az elképzelést megerősítik azon eredményeink, amelyek azt mutatják, hogy az AX tartalmú tápot fogyasztó egerek kisebb mértékben híztak a 4 hetes etetési időszak alatt (6. és 7. táblázat), miközben azonos mennyiségű egértápot fogyasztottak, mint a kontroll csoport egerei (~0,2 g/nap/ttg). Ez összhangban van Ikeuchi és munkatársai munkájával [109], akik azt találták, hogy az AX nem befolyásolja a táplálékfelvételt, de csökkenti a testtömeg-növekedést hízásra hajlamos kísérleti egerekben, valószínűleg az energiafelhasználás növekedése révén. Ruiz és munkatársai, akik először írták le a retinoidsav-anyagcsere szerepét a vázizomban, hasonló eredményekről számoltak be [110].

AX és mitokondriális Ca^{2+} jelátvitel

A vázizom a szervezetünk metabolikusan legaktívabb szövetei közé tartozik, így rendkívül nagy az ATP-igénye, amit a rosttérfogat 10-15%-át kitevő mitokondriumok elégítenek ki. Az izomösszehúzódást követően az intracelluláris raktárból felszabaduló összes Ca^{2+} ion nem hagyja el az izomrostot. A mitokondriumok mintegy 10-18% -ban veszik fel a kalciumot a mitokondriális uniporter (MCU) és más alternatív csatornák segítségével (például a voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)). Megfigyeltük a mitokondriális fluoreszcencia (F_{mito}) tartós növekedését elektromos stimuláció után, ami valószínűleg szerepet játszik az ATP-képződés kalcium általi aktiválásában, ahogy azt Rossi és munkatársai korábban

már felvetették [111]. Mi azt tapasztaltuk, hogy az AX-al etetett egerek csoportjában a mitokondriális kalciumfelvétel csökkent az ismételt tetanikus stimuláció után a CTRL csoporttal összehasonlítva. Eredményeink összhangban állnak azzal a megfigyeléssel, hogy az AX-kiegészítés pozitívan befolyásolja a mitokondriális kalcium-homeosztázist, és csökkenti az aktivitás-függő mitokondriális kalcium egyensúlyának felborulását. Feltételezésünk szerint ez azért lehet, mert az AX képes megkötni és semlegesíteni a képződött ROS-t, és ezzel csökkenti a mitokondriális kalciumfelvételt (20. ábra) megakadályozva ezáltal a mitokondriumok Ca^{2+} -al való túl töltődését [93].

Feltételezésünk szerint, az AX kezelés kis mértékben módosíthatja az MCU kalciumérzékeny szabályozójának (MICU1) expressziós szintjét a vázizomzatban, viszont ez nem gyakorolt szignifikáns hatást a kalcium-homeosztázisra. A kezdeti depolarizációs aktiválás során nem láttunk eltérést a kontroll és AX egércsoportok FDB rostjain mért mitokondriális kalciumszintek között, csak az ötödik tetanikus ingerlés után voltak ezen eltérések detektálhatók.

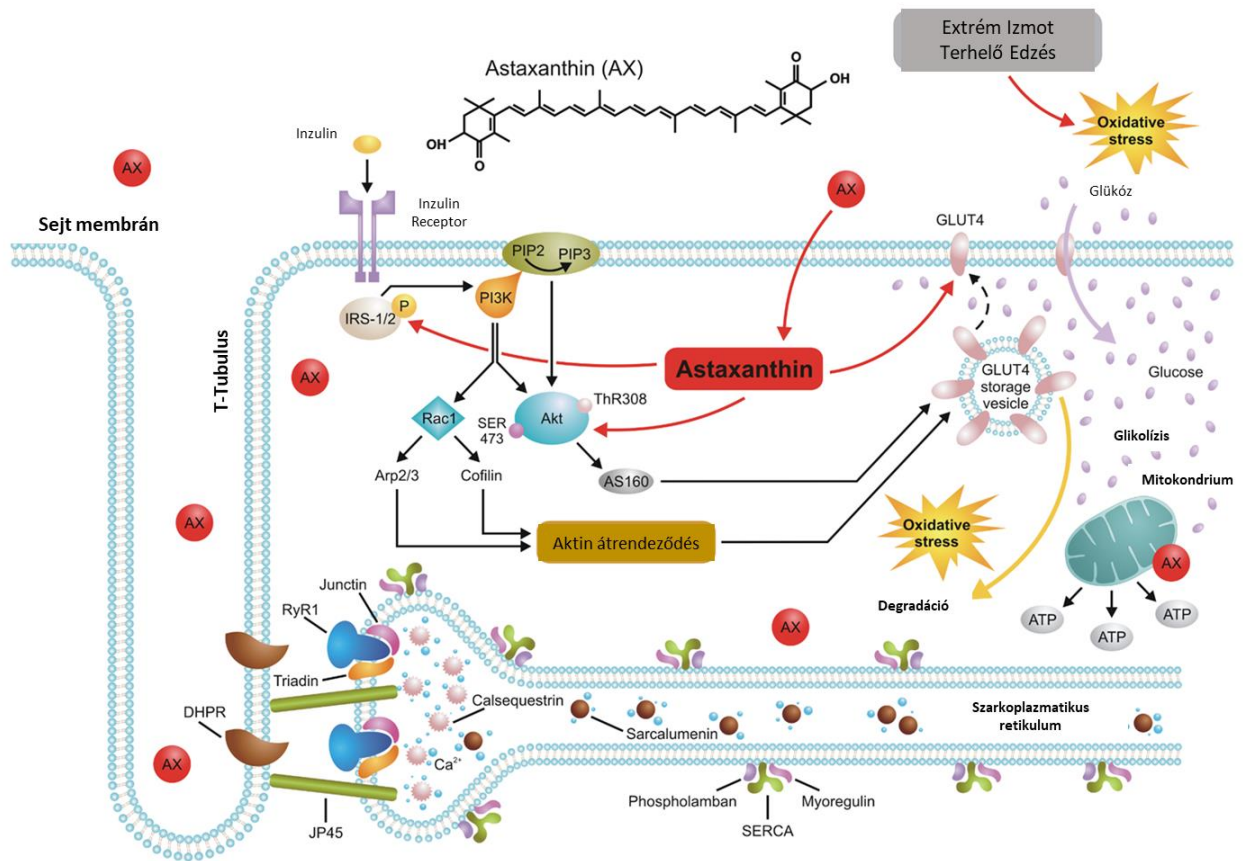
Egy másik lehetőség, hogy az AX befolyásolja a MICU1 kalciumérzékenységet, mivel Reane és munkatársai arról számoltak be, hogy a MICU1 egyik splice-változata módosított kalciumkötő tulajdonságokkal rendelkezik [112]. Bármelyik eset is valósul meg, vélhetően intenzív edzés során a mitokondriális kalcium felvétel lehet az egyik védelmi mechanizmusunk a kalcium túlterhelés, másnéven overload ellen. Másrészről, a vázizomban a MICU1 befolyásolja az ATP-termelést, közvetlenül növelve a kalciumon keresztül az alapvető metabolikus enzimek aktivitását a mitokondriumokban. Mások kimutatták, hogy a MICU1 hiánya nem változtatja meg a nyugalmi izomrostok mitokondriális működését, de csökkenti az oxigénfogyasztás növekedését a kalcium stimuláció során [113]. Elképzelhető, hogy az AX kezelés javítja az ATP közvetlen foszforilációját a MICU1-en keresztül, és elősegíti a vázizomzat energiafelhasználását a zsírsavak oxidációjának irányába tolódva. Ez alacsonyabb testtömegnövekedést eredményez, ahogyan a jelen tanulmányunkban mi is találtuk. Hasonló eredményeket írtak le egy vázizom-specifikus MCU-hiányos egérmodellben, ahol a delécia nem befolyásolta a myofibrillumok intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázisát, de gátolta az akut mitokondriális Ca^{2+} beáramlást és a Ca^{2+} által stimulált mitokondriális légzést, ami az egerek akut fizikai teljesítményének csökkenését eredményezte [113]. Ezenkívül egy friss tanulmány kimutatta, hogy az izomspecifikus MICU1 hiány katabolikus választ váltott ki mind a májban, mind a zsírszövetben, ugyanis a katabolizmusban részt vevő enzimek expressziója megnőtt a

vizsgált mintákban [114]. További feltételezésünk szerint az AX javítja az ADP foszforilációt, így növelve az izomerőt és ennek kompenzálására fog megnőni a zsíryanagcsere.

AX és glükóz metabolizmus

Mivel az AX-t metabolikus változásokkal hozták összefüggésbe (lásd fentebb), azt feltételeztük, hogy hasonlóan a retinsavhoz, az AX is javítja az izomtéljesítményt azáltal, hogy, növeli a glükózfelvételt és/vagy a glikogén raktárokat. Az L6 myotubulusok retinsav kezelése (a retinol karbonsav formájában) fokozta az inzulin által stimulált glükózfelvételt és GLUT4 expressziót [64], csökkentette a testsúlyt és a zsírosodást sovány és elhízott egerekben [65], valamint növelte a zsírsav-oxidációt és az irizin expressziót *in vivo* [115]. Ruiz és munkatársai azt találták, hogy egerekben a retinsav aktiválja az mTORC2-t és az inzulin jelátvitelt. Az SRP35 - kis molekulású retinol-dehidrogenáz fehérje - túlzott expressziója pedig javítja az izomtéljesítményt azáltal, hogy több energiát biztosít a vázizomnak a glükózfelvétel és glikogén raktárak növelésével [110].

Sematikusan összefoglalva a 25. ábra bemutatja az AX vázizomzatra gyakorolt fő jelátviteli útvonalait, amelyek a glükóz homeosztázishoz és az inzulin jelátviteli útvonalhoz is kapcsolódnak. Ebből a szempontból az AX hatása hasonló a retinolhoz. Azonban az eltérő kémiai szerkezet miatt - a molekula végén két β -ionon gyűrű - térbeli orientációja merőleges a lipid kettősréteg síkjára, ezért a természetes AX megnöveli a hidrofób jelleget a biológiai membránok központi magjában, ellentétben a retinol-al, ami párhuzamosan helyezkedik el a lipid molekulák hidrofób végével. Ezek a tulajdonságok magyarázatot adhatnak a retinol és az AX kalcium jelátvitelre gyakorolt hatásai közötti különbségekre.



25. ábra: Az AX lehetséges hatásmechanizmusa a vázizomzatban. Az AX az inzulinreceptor szubsztrátjára (IRS) hat, aminek következtében aktiválódik a PI3K/Akt útvonal, ami a GLUT4 transzlokációját indukálja a szarkolemmába. Ez növeli az izmok glükózfelvételét, ami végső soron a glikolízis fokozódásához vezet. Az AX természetes lipid kettős rétegek síkjára merőlegesen hidrofób magjának köszönhetően, az AX erőteljes antioxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, és védelmet nyújt a biológiai membránoknak, beleértve a szarkolemmát, a szarkoplazmatikus retikulumot és a mitokondriális membránokat. Ezáltal csökkenti a mitokondriális kalcium túlterhelés okozta oxidatív stresszt, miközben nem befolyásolja az ECC mechanizmus tulajdonságait.

Táplálékkiegészítők és izomteljesítmény idősebb korban

Az izomzatban a kontraktilis tevékenység során oxidatív stressz, avagy reaktív oxigén és nitrogén gyökök keletkeznek, amelyek jelentős hatással lehetnek az izom teljesítményére és egészségére, különösen az idősebb korosztályban. Az antioxidánsok, mint például a C-, E-, A-vitamin, valamint az általunk is vizsgált xantofill astaxanthin bevitelével lehetőség nyílik az izom oxidatív károsodásának csökkentésére és az izomteljesítmény növelésére. A krill olajat demenciában, illetve Alzheimer betegségben szenvedő idősök kezelésére használják, valamint összefüggésbe hozták a testmozgás és az antioxidáns/gyulladáscsökkentő markerek javulásával

[116]. Az egyik lehetséges hatásmechanizmus, hogy a krill olaj aktiválja az mTOR jelátvitelt és az EPA és a DHA kombinációja fokozza az izomfehérje szintézis sebességét azáltal, hogy növeli az mTOR-p70s6k jelátviteli útvonal aktivitását fiatal és középkorú férfiakban és nőkben. A halolaj-kiegészítés, edzés mellett növelheti az erőt és a funkcionális képességeket idősebb felnőtteknél [117]. Fontos megjegyezni, hogy ezek a kutatások korlátozottak, és további vizsgálatokra van szükség a témával kapcsolatban. A metabolikus események és az antioxidáns állapot vizsgálata az izomzatban lehetővé tenné a pontosabb következtetések levonását az AX és a krill olaj hatásmechanizmusával kapcsolatban.

Jelen kutatásban mind a fiatal és az idősödő egércsoportok esetén azt találtuk, hogy a négy hétig tartó AX/krill olaj fogyasztása jelentősen javította az izomerőt *in vivo* és *in vitro*. A testtömeg enyhe csökkenése mellett történtek ezek a változások. Az egyes állatcsoportok táplálékfelvétele gyakorlatilag azonos volt, valamint nem találtunk szignifikáns változást az egércsoportok izomtömegében sem. Ez azt sugallja, hogy a testtömeg-csökkenés nem az izomtömeg veszteséssel magyarázható. Az egyik lehetséges magyarázat a nagyobb izomerő kifejtésre az idősödő egér csoport esetén az lehet, hogy az AX-kiegészítés felgyorsítja a glükózfelvételt és fokozza a lipid felhasználást, ami növeli a vázizomszövet retinsav metabolikus aktivitását. Ezenkívül az AX fogyasztása javíthatja az ATP foszforilációját a MICU1-en keresztül, és az energiafelhasználást több zsírsav-oxidáció felé tolhatja el, ami kisebb testtömeg-gyarapodást eredményezhet.

Táplálékkiegészítők és kalcium-homeosztázis idősödő korban

A táplálékkiegészítés során megnövekedett izomerő lehetséges másik magyarázata lehet a kontraktilis filamentumok kalciumérzékenységének megváltozásán túl (amit jelen munkában nem vizsgáltunk) a RyR1 csatorna aktivitásának változása.

Az öregedéssel morfológiai és ultrastrukturális változások alakulnak ki a vázizmokban. Az SR membránok tubuláris aggregátumai felhalmozódnak, így abnormális SR Ca^{2+} raktározást és Ca^{2+} -felszabadulást okoznak [118]. Továbbá olyan molekuláris változások alakulhatnak ki, amelyek mennyiségi (csökkent expressziós) és funkcionális módosításokat okoznak az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornában [119]. Az öregedő egerekből származó vázizomrostokban a DHPR és a RyR1 funkcionális szétkapcsolása csökkenti a kalciumfelszabadulását az SR-ből [120]. A RyR1-ek rendkívül érzékenyek az oxidatív változásokra, és működésük az öregedő izmokban akadályozott a cisztein-maradékaik

oxidációja és nitrozilációja miatt. Ez Ca^{2+} szivárgást eredményez az SR-ből és izomgyengeséget okoz [121].

Ezekből az eredményekből kiindulva arra az elhatározásra jutottunk, hogy megvizsgáljuk az öregedő egerekben a DHPR és a RyR1 közötti kapcsolat lehetséges módosulásait a teljes sejtes patch-clamp technika és a konfokális képalkotás kombinálásával. A négyhetes, antioxidáns étrendet alkalmazását követően nem tapasztaltunk szignifikáns változást sem a depolarizáló impulzusok által kiváltott kalcium jelekben, sem a kalcium tranziensek csúcserkéiben, a Ca^{2+} felszabadulás fluxusában, és a felszabaduló kalcium mennyiségében (15 és 17. ábra).

Táplálékkiegészítők és mitokondriális funkció

A vázizomkutatás legfrissebb állaspontja szerint, a mitokondriumok fontos szerepet játszanak az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szabályozásában az elektro-mechanikai kapcsolat és a kontraktilis aktivitás során. Az már ismert, hogy az idős szervezetekben nagyobb fokú az oxidatív stressz és ez csökkent mitokondriális Ca^{2+} felvételhez vezet [122]. Míg fiatal felnőtt egerekben az AX-kiegészítés kedvezően csökkentette az aktivitásfüggő mitokondriális kalcium felvételt, öregedő egereknél nem észleltünk hasonló hatásokat (20. ábra). Ez azt jelentheti, hogy mind az AX, mind a krill olaj antioxidáns hatása miatt csökkenhet az FDB izmokban a ROS termelés. Adataink nem mutatnak drámai változást a kalciumtranziensek és a kibocsátási fluxus paramétereinek tekintetében, ezért más folyamatok játszhatnak közre. Egy lehetséges magyarázat lehet az étrendkiegészítés időtartama. Elképzelhető, hogy a négyhetes speciális diéta elegendő volt a fiatal felnőtt egerek számára, hogy a szer kifejtsen kedvező hatását. Az idősödő egereknél -ahol az oxidatív stressz és a ROS termelés kiemelkedőbb- alkalmazott, hasonló időtartamú etetés valószínűleg nem volt elégséges. Arra a következtetésre jutottunk, hogy az AX fogyasztását egy hónapnál tovább lenne érdemes fenntartani idős szervezeteknél, ám ezt egy jövőbeli tanulmányban lehetne tovább vizsgálni.

Több rendellenességet írtak le az öreg egerek vázizmából izolált mitokondriumokban, mint például megnövelt ROS termelést, csökkent elektrontranszport mechanizmust az I-es és V-ös komplexekben, valamint a mitokondriális DNS-ben bekövetkező sérülések [123]. A kannabinoid receptor 1 (CB1) jelenléte a harántcsíkolt izom mitokondriumában és a mitokondriális oxidatív aktivitás szabályozásában jól ismert [20,21]. Megállapítást nyert, hogy az mtCB1 receptorok aktiválódása szerepet játszhat az izomszövet oxidatív aktivitásának szabályozásában a harántcsíkolt izomban. Ainbinder és munkatársai [106] leírták, hogy az

Mfn2 fehérje expressziója fokozatosan csökken a vázizmokban, és ez nem a csökkent génextpresszió vagy az Mfn2 mRNS translációja miatt következik be. Hasonlóképpen, Filadi és munkatársai [124] azt találták, hogy az Mfn2-t nem tartalmazó sejtek csökkent MCU expressziót mutatnak, ami magyarázat lehet a mitokondriális Ca^{2+} jelek csökkenésére. Ezek az eredmények arra ösztönöztek minket, hogy megvizsgáljuk az AX és krill olaj kezelés hatását a mitokondriális dinamikára és a kulcsfontosságú fehérjék expressziós szintjére, amelyek szerepet játszanak a vázizom kalcium-homeosztázisában. Ennek érdekében először qRT-PCR reakció segítségével megvizsgáltuk az Mfn2, MCU, Drp1 és CB1 relatív mRNS-transzkriptumszintjét. Az AX-al etetett csoportban az MCU és DRP1 mRNS szintű expressziójának szignifikáns növekedését tapasztaltuk, míg a Krill csoportba tartozó egerek Mfn2 mRNS expressziója növekedett meg szignifikánsan. (21. ábra, A–C panelek). Fontos megjegyezni, hogy a kapcsolódó fehérjeszintek mennyiségi meghatározásakor (21. ábra F panel) nem voltak kimutathatók az RNS szintű különbségek, a MICU1 és Mfn2 fehérje expressziója nem mutatott különbséget a csoportok között. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a Western blot módszerrel kimutatott változatlan Mfn2 és MICU1 fehérjeszintek (21. ábra D-F panelek) magyarázatot nyújthatnak a patch clamp és az ismétlődő stimuláció által kiváltott mitokondriális Ca^{2+} felvételi kísérletek során megfigyelt kalciumtranziensek és Ca^{2+} jelek változatlan paramétereire. Érdekes volt az a megfigyelés, hogy bár mRNS szinten a Drp1 expresszió szignifikánsan növekedett, fehérje szinten mind az AX, mind a Krill csoportban szignifikánsan csökkent a kifejeződése (22. ábra B-C panelek).

Krill olaj és a tanulási képesség

A krill olaj nagy mennyiségben tartalmaz ω -3 zsírsavakat és foszfolipideket (ami biztosítja a jobb és könnyebb felszívódást a szervezetben), valamint kisebb mennyiségben vitaminokat, ásványi anyagokat, AX-t és flavonoidokat. A krill olaj kiváló forrása az esszenciális tápanyag kolinnak és a különféle aminosavaknak, ideértve az esszenciális aminosavakat is. A krill olajban lévő magas AX tartalom segít megelőzni az oxidációt, stabilizálja a terméket és meghosszabbítja az eltarthatóságát.

Az életkor meghatározó tényező a tanulóképesség szempontjából, amit a térbeli memória teljesítményének fokozatos csökkenése jellemez, és jelentős hatással van a tanulási folyamatokban részt vevő agyi struktúrák morfológiájára. Az AX-t potenciális neuroprotektív vegyületként tartják számon, amely képes lehet megőrizni az agy egészségét. [125]. Az AX-kiegészítés agyra gyakorolt hatásait ebben a tanulmányban nem értékeltük közvetlenül, mi csak a krill olaj hatását vizsgáltuk a Barnes–Maze protokollon keresztül. Grimming és munkatársai

[126] megvizsgálták az AX hatását a kognitív funkciókra és az idegi plaszticitásra fiatal és idős egerekben. A szerzők arra jutottak, hogy az AX egy hónapos alkalmazása javította a kognitív teljesítményt és növelte a hosszú távú potenciózást idősebb egereknél. Ez összhangban van a mi megfigyelésünkkel, miszerint a négyhetes krill olaj táplálékkiegészítés pozitív hatást gyakorolt az idősödő egerek térbeli tanulására és memóriájára. Adataink egyértelműen azt mutatják, hogy az idősödő egerekben javult a kognitív képesség a kísérlet során, mivel az egerek gyorsabban megtanulták a kijárat helyét az útvesztőben (24. ábra).

A halolaj és a krill olaj jelentős mennyiségű PUFA-t (EPA és DHA) tartalmaznak, különböző szerkezeti formákban kötve. A halolajban az EPA és a DHA trigliceridekként található, ezért kevésbé bioaktívak, mint a krill olajban, ahol főleg foszfolipidek formájában található (2:1 arányban). Így biológiailag könnyebben hozzáférhetőek, különösen az agy számára, amely akár 60%-ban áll lipidekből (ennek nagy része PUFA, túlnyomórészt DHA) [127]. Ellentmondásos információk állnak rendelkezésre a halolaj-kiegészítés egerekre gyakorolt hatásairól. Magalhães és munkatársai [128] arra a következtetésre jutottak, hogy a halolaj-kiegészítés nem hosszabbítja meg a normál egészséges egerek élettartamát. Hasonló következtetésre jutottak más kutatócsoportok is, akik azt találták, hogy az izolált ω -3 zsírsavakban gazdag olajok fogyasztása nem növeli meg az eredetileg egészséges egyének élettartamát vagy egészségét, hanem inkább növeli az oxidatív stresszt, csökkenti a sejtműködést és szervi diszfunkciót okoz [129,130]. Másrésztől azt találták, hogy a krill olaj jótékony hatással bír a tanulási képességre [131], antidepresszáns hatást fejt ki patkányokban anélkül, hogy nyugtató hatást mutatna [132], és növeli az EPA és DHA mennyiségét a Zucker patkányok agyában. [133]. Ezek az eredmények a mi eredményeinkkel együtt arra utalnak, hogy a krill olaj lipid-összetétele és AX tartalma meghatározó szerepet játszik idősödő egerekben a kognitív funkciók javításában. Azonban további vizsgálatokra van szükség annak feltárására, hogy az AX önmagában bármilyen közvetlen hatással lenne a központi idegrendszerre.

Konklúzió

Eredményeink abba az irányba mutatnak, hogy az AX, egy általánosan elismert és egyre szélesebb körben használt biztonságos étrendkiegészítő nemcsak antioxidánsként szolgál, hanem megváltoztatja a mitokondriális kalciumjelátvitelt anélkül, hogy befolyásolná a vázizom elektro-mechanikai kapcsolatot, fokozhatja a glükóz anyagcserét, és ez által hozzájárulhat a kontraktilis funkció javításához. Ez új kezelési irányokat nyit meg az anyagcsere-betegségben szenvedő betegek előtt, de további vizsgálatokra van szükség a lehetséges mögöttes mechanizmusok megértéséhez mind sejtszinten, mind szervi szinten.

Az öregedés a vázizom funkció és erő csökkenésével jár együtt. Az élettartam növekedésével fontossá vált az idős lakosság egészségének és fizikai állapotának megőrzése, valamint az agyi funkciók és az általános jólét fenntartása. Ennek eredményeként az egészséges öregedés eléréséhez a vázizomrostok jelátvitelében bekövetkező változások feltárása, valamint a kalciumszabályozás lépéseinek megfejtése tekinthető az egyik fontos feladatunknak. Mivel az öregedés egyik fő jellemzője a vázizomtömeg, az erő és a mozgás progresszív csökkenése, ebben a tanulmányban két lehetséges úgynevezett geroprotektív antioxidáns anyag: az astaxanthin és a krill olaj hatását vizsgáltuk a vázizom teljesítmény és az intracelluláris kalcium-homeosztázis fenntartásában. Kiemelt figyelmet szenteltünk az ECC mechanizmusra és a mitokondriális kalciumszabályozásra. Jelenlegi eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a táplálékkiegészítőknek kedvező hatása van a vázizom teljesítményére anélkül, hogy jelentősen megváltoztatnák az elektro-mechanikai kapcsolatot és a mitokondriális kalciumjelátvitelt. Úgy véljük, hogy a krill olajban található foszfolipid formában lévő PUFA tartalom okozza a kognitív funkciók javulását idősödő egerekben. Sajnos jelen munkában a vérben keringő, illetve az izmok vagy agyban lévő AX koncentráció közvetlen mérése nem történt meg. Vélhetően az AX közvetlen hatásainak vizsgálata a központi idegrendszer neuronjaira, segítenék megérteni az öregedés elleni védő hatásait.

Összefoglalva jelen kutatásról elmondható, hogy az erős antioxidáns és geroprotektív hatású étrendkiegészítők úgy, mint az általunk is vizsgált AX, valamint krill olaj, más beavatkozásokkal együtt, mint például rendszeres testmozgás, speciális táplálkozás, jó hatékonyságot nyújthatnak az agy és a vázizom egészségének és teljesítményének fenntartásában és esetenként megszüntethetik/visszafordíthatják vagy legalább szinten tarthatják az öregedés során tapasztalt negatív hatásokat.

Összefoglalás

Az öregedés és a gyengülés az izomerő csökkenésével jár, amit az izomrostok mennyiségének csökkenése és minőségének romlása jellemez. Az öregedésben vezető szerepet játszanak a reaktív oxigénradikálok, a terminális oxidáció melléktermékeinek keletkezése. Negatív hatásukat antioxidáns-kiegészítéssel lehet mérsékelni.

Az astaxantin (AX), egy tengeri algából izolált karotinoid, amely erős természetes antioxidáns hatásokkal bír és véd az oxidatív stresszel szemben. Az AX és a forrásául szolgáló krill olaj számos egészségfejlesztő, geroprotektív, gyulladáscsökkentő, fáradás-csökkentő hatással rendelkező táplálékkiegészítők. A retinol és származékai a lipid- és energia-anyagcserét befolyásolják. Mindaddig az AX, a krill olaj és a retinol hatásai a vázizomzat excitációs-kontrakciós kapcsolására (ECC) kevésbé volt ismert.

Ebben a munkában az AX és krill olaj funkcionális hatásait vizsgáltuk fiatal és öregedő egerekben. *In vivo* és *in vitro* vázizomfunkciót, valamint az intracelluláris és mitokondriális kalcium-homeosztázis aspektusait, továbbá idősebb egereknél a krill olajat illetően a tanulási képességet és a térbeli memóriát vizsgáltuk.

Munkánk első részében fiatal (4-6 hónapos) C57Bl6 egereket két csoportra osztottunk: a kontroll csoport normál ételt kapott, míg a másik 4 héten keresztül AX-t fogyasztott. *In vivo* és *in vitro* izomerőt és intracelluláris kalcium-homeosztázist vizsgáltunk. Néhány kísérletben akut retinol kezelést alkalmaztunk. Munkánk másik részében ugyanezt az étkezési protokollt alkalmaztuk idősebb egereken, viszont itt egy harmadik csoportot is kialakítottunk, amely krill olajjal kiegészített ételt fogyasztott.

Az *in vivo* és *in vitro* erőmérések során azt találtuk, hogy a táplálékkiegészítés jelentősen javította az izomerőt mindkét korcsoport esetén. Amikor a kalcium tranziensek feszültségfüggését vizsgáltuk egyedi *m. flexor digitorum brevis* enzimátikusan izolált rostokban patch clamp technikát alkalmazva, nem találtunk szignifikáns változásokat a táplálékkiegészítést követően egyik korcsoportban sem. Fiatal felnőtt egerek esetén a retinol csökkentette a kalcium tranziensek csúcserőjét. Az aktivitás-függő mitokondriális kalciumfelvétel kisebb volt az AX csoportban fiatal egyedek esetén, míg idősebb egereknél nem találtunk ilyen különbséget. Megmutattuk továbbá, hogy a krill olaj táplálékkiegészítés hatására javult a térbeli memória és a tanulási képesség az öregedő egerekben.

Összességében adataink az antioxidáns táplálékkiegészítők geroprotektorként való alkalmazása mellett szólnak, mivel a tanulási képességet és a fizikai teljesítményt javítják.

Summary

Ageing and frailty are associated with a loss of muscle strength, which is a direct consequence of a reduction in the quantity and quality of muscle fibres. The generation of reactive oxygen radicals, by-products of terminal oxidation, plays a leading role in ageing. Their negative effects can be reduced by antioxidant supplementation.

Astaxanthin (AX), a marine carotenoid, is a powerful natural antioxidant that protects against oxidative stress. AX and its main source (krill oil) are dietary supplements with numerous health-promoting, geroprotective, anti-inflammatory, and anti-fatigue effects. Retinol and its derivatives affect lipid and energy metabolism. To date, the effects of AX, krill oil and retinol on excitation-contraction coupling (ECC) of skeletal muscles are poorly understood.

In this work, we investigated the functional effects of AX and krill oil in young and aging mice. We investigated *in vivo* and *in vitro* skeletal muscle function, aspects of intracellular and mitochondrial calcium homeostasis, cognition and spatial memory in aging mice supplemented with krill oil.

In the first part of our work, we divided young (4-6 months old) C57Bl6 mice into two groups: the control group consumed normal mouse chow, while the other consumed AX for 4 weeks. *In vivo* and *in vitro* force generation and intracellular calcium homeostasis were investigated. In some experiments, acute retinol treatment was used. In the second part of our work, we used the same feeding protocol in aging mice, where we established a third group that consumed krill oil supplemented diet.

In vivo and *in vitro* force measurements revealed that antioxidant supplementation significantly improved muscle strength in both age groups. When we investigated the voltage dependence of calcium transients in individual *m. flexor digitorum brevis* enzymatically isolated fibers using patch clamp technique, we found no significant changes following antioxidant supplementation in either age group. In young adult mice, retinol reduced peak calcium transients. The activity-dependent mitochondrial calcium uptake was lower in the AX group in young individuals, whereas no such difference was found in aging mice. We also showed that krill oil supplementation improved spatial memory and learning ability in aging mice.

Overall, our data support the general use of antioxidant supplements as geroprotectors because they improve learning ability and physical performance.

Irodalmi jegyzék

1. L., R. Du spectre produit par les muscles striés. *Arch. Physiol* **1874**.
2. Knoll P. Über protoplasmaarme und protoplasmareiche Musculatur. *Denkschr Kais Akad Wiss Wien Math Naturwiss* **1891**, 633–700.
3. Krüger Tetanus und Tonus der quergestreiften Skelettmuskeln der Wirbeltiere und des Menschen. In *Leipzig: Geest und Portig*; Leipzig: Geest und Portig, 1952.
4. Pette D Staron R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* **2000**, 500–509.
5. Engel, W.K. The essentially of histo- and cytochemical studies muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology* **1998**, *51*, 655, doi:10.1212/wnl.51.3.655.
6. Bárány, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* **1967**, *50*, doi:10.1085/jgp.50.6.197.
7. Soukup, T.; Zachařová, G.; Smerdu, V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem.* **2002**, *104*, 399–405, doi:10.1078/0065-1281-00660.
8. Tarpey, M.D.; Amorese, A.J.; Balestrieri, N.P.; Ryan, T.E.; Schmidt, C.A.; McClung, J.M.; Spangenburg, E.E. Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skelet. Muscle* **2018**, *8*, 14, doi:10.1186/s13395-018-0160-3.
9. Gregorio, C.C.; Antin, P.B. To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* **2000**, *10*, 355–362, doi:10.1016/S0962-8924(00)01793-1.
10. Franzini-Armstrong, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.* **1999**, *13*, doi:10.1096/fasebj.13.9002.s266.
11. MacLennan, D.H.; Brandl, C.J.; Korczak, B.; Green, N.M. Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* **1985**, *316*, 696–700, doi:10.1038/316696a0.
12. Ogata, T.; Yamasaki, Y. Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of

- mitochondria and sarcoplasmic reticulum arrangement in human red, white, and intermediate muscle fibers. *Anat. Rec.* **1997**, *248*, 214–223, doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199706)248:2<214::AID-AR8>3.0.CO;2-S.
13. Rossi, A.E.; Boncompagni, S.; Dirksen, R.T. Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondrial Symbiosis: Bidirectional Signaling in Skeletal Muscle. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **2009**, *37*.
 14. Favaro, G.; Romanello, V.; Varanita, T.; Andrea Desbats, M.; Morbidoni, V.; Tezze, C.; Albiero, M.; Canato, M.; Gherardi, G.; De Stefani, D.; et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2576, doi:10.1038/s41467-019-10226-9.
 15. Lewis-Smith, D.; Kamer, K.J.; Griffin, H.; Childs, A.M.; Pysden, K.; Titov, D.; Duff, J.; Pyle, A.; Taylor, R.W.; Yu-Wai-Man, P.; et al. Homozygous deletion in MICU1 presenting with fatigue and lethargy in childhood. *Neurol. Genet.* **2016**, *2*, 1–6, doi:10.1212/NXG.0000000000000059.
 16. Musa, S.; Eyaid, W.; Kamer, K.; Ali, R.; Al-Mureikhi, M.; Shahbeck, N.; Al Mesaifri, F.; Makhseed, N.; Mohamed, Z.; AlShehhi, W.A.; et al. A Middle Eastern Founder Mutation Expands the Genotypic and Phenotypic Spectrum of Mitochondrial MICU1 Deficiency: A Report of 13 Patients BT - JIMD Reports, Volume 43. In; Morava, E., Baumgartner, M., Patterson, M., Rahman, S., Zschocke, J., Peters, V., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2019; pp. 79–83 ISBN 978-3-662-58614-3.
 17. Romanello, V.; Sandri, M. The connection between the dynamic remodeling of the mitochondrial network and the regulation of muscle mass. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 1305–1328, doi:10.1007/s00018-020-03662-0.
 18. Filadi, R.; Theurey, P.; Pizzo, P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium* **2017**, *62*, 1–15, doi:10.1016/j.ceca.2017.01.003.
 19. Sebastián, D.; Sorianello, E.; Segalés, J.; Irazoki, A.; Ruiz-Bonilla, V.; Sala, D.; Planet, E.; Berenguer-Llergo, A.; Muñoz, J.P.; Sánchez-Feutrie, M.; et al. Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J.* **2016**, *35*, 1677–1693, doi:10.15252/embj.201593084.
 20. Arrabal, S.; Lucena, M.A.; Canduela, M.J.; Ramos-Uriarte, A.; Rivera, P.; Serrano, A.; Pavón, F.J.; Decara, J.; Vargas, A.; Baixeras, E.; et al. Pharmacological blockade of

- cannabinoid CB1 receptors in diet-induced obesity regulates mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase in muscle. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0145244.
21. Mendizabal-Zubiaga, J.; Melser, S.; Bénard, G.; Ramos, A.; Reguero, L.; Arrabal, S.; Elezgarai, I.; Gerrikagoitia, I.; Suarez, J.; De Fonseca, F.R.; et al. Cannabinoid CB1 receptors are localized in striated muscle mitochondria and regulate mitochondrial respiration. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 1–10, doi:10.3389/fphys.2016.00476.
 22. He, Q.; Harris, N.; Ren, J.; Han, X. Mitochondria-targeted antioxidant prevents cardiac dysfunction induced by tafazzin gene knockdown in cardiac myocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/654198.
 23. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **1956**, *11*, 298–300.
 24. Brewer, G.J. Epigenetic oxidative redox shift (EORS) theory of aging unifies the free radical and insulin signaling theories. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 173–179, doi:10.1016/j.exger.2009.11.007.
 25. Zimniak, P. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1087–1105, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.039.
 26. Rattan, S.I.S. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1230–1238, doi:10.1080/10715760600911303.
 27. Chakrabarty, R.P.; Chandel, N.S. Mitochondria as Signaling Organelles Control Mammalian Stem Cell Fate. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 394–408, doi:10.1016/j.stem.2021.02.011.
 28. Henríquez-Olguín, C.; Boronat, S.; Cabello-Verrugio, C.; Jaimovich, E.; Hidalgo, E.; Jensen, T.E. The Emerging Roles of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 2 in Skeletal Muscle Redox Signaling and Metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *31*, 1371–1410, doi:10.1089/ars.2018.7678.
 29. Dickinson, B.C.; Chang, C.J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 504–511, doi:10.1038/nchembio.607.
 30. Powers, S.K.; Jackson, M.J. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms

- and impact on muscle force production. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 1243–1276, doi:10.1152/physrev.00031.2007.
31. Shadel, G.S.; Horvath, T.L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* **2015**, *163*, 560–569, doi:10.1016/j.cell.2015.10.001.
 32. Brand, M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45*, 466–472, doi:https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003.
 33. Henriquez-Olguin, C.; Meneses-Valdes, R.; Jensen, T.E. Compartmentalized muscle redox signals controlling exercise metabolism – Current state, future challenges. *Redox Biol.* **2020**, *35*, 101473, doi:https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101473.
 34. Austad, S.N.; Allison, D.B.; Antoine, L.H.; Ballinger, S.W.; Bamman, M.M.; Biga, P.; Darley-Usmar, V.M.; Fisher, G.; Gohlke, J.M.; Halade, G. V.; et al. Aging and energetics’ “Top 40” future research opportunities 2010-2013. *F1000Research* **2014**, *3*, 1–19, doi:10.12688/f1000research.5212.1.
 35. Park, D.C.; Yeo, S.G. Aging. *Korean J. Audiol.* **2013**, *17*, 39–44, doi:10.7874/kja.2013.17.2.39.
 36. HARMAN, D. The Biologic Clock: The Mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* **1972**, *20*, 145–147, doi:10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x.
 37. Weisleder, N.; Brotto, M.; Komazaki, S.; Pan, Z.; Zhao, X.; Nosek, T.; Parness, J.; Takeshima, H.; Ma, J. Muscle aging is associated with compromised Ca²⁺ spark signaling and segregated intracellular Ca²⁺ release. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 639–645, doi:10.1083/jcb.200604166.
 38. Pietrangelo, L.; D’Incecco, A.; Ainbinder, A.; Michelucci, A.; Kern, H.; Dirksen, R.T.; Boncompagni, S.; Protasi, F. Age-dependent uncoupling of mitochondria from Ca²⁺ release units in skeletal muscle. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35358–35371, doi:10.18632/oncotarget.6139.
 39. Boncompagni, S.; D’Amelio, L.; Fulle, S.; Fanò, G.; Protasi, F. Progressive disorganization of the excitation-contraction coupling apparatus in aging human skeletal muscle as revealed by electron microscopy: A possible role in the decline of muscle performance. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2006**, *61*, 995–1008, doi:10.1093/gerona/61.10.995.

40. Pietrangelo, L.; Michelucci, A.; Ambrogini, P.; Sartini, S.; Guarnier, F.A.; Fusella, A.; Zamparo, I.; Mammucari, C.; Protasi, F.; Boncompagni, S. Muscle activity prevents the uncoupling of mitochondria from Ca²⁺ Release Units induced by ageing and disuse. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *663*, 22–33, doi:<https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.12.017>.
41. Yarotsky, V.; Protasi, F.; Dirksen, R.T. Accelerated Activation of SOCE Current in Myotubes from Two Mouse Models of Anesthetic- and Heat-Induced Sudden Death. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–12, doi:[10.1371/journal.pone.0077633](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077633).
42. Roubenoff, R.; Hughes, V.A. Sarcopenia: Current Concepts. *Journals Gerontol. Ser. A* **2000**, *55*, M716–M724, doi:[10.1093/gerona/55.12.M716](https://doi.org/10.1093/gerona/55.12.M716).
43. Frontera, W.R.; Suh, D.; Krivickas, L.S.; Hughes, V.A.; Goldstein, R.; Roubenoff, R. Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2000**, *279*, C611–C618, doi:[10.1152/ajpcell.2000.279.3.C611](https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.C611).
44. Liu, W.; Klose, A.; Forman, S.; Paris, N.D.; Wei-LaPierre, L.; Cortés-Lopéz, M.; Tan, A.; Flaherty, M.; Miura, P.; Dirksen, R.T.; et al. Loss of adult skeletal muscle stem cells drives age-related neuromuscular junction degeneration. *Elife* **2017**, *6*, e26464, doi:[10.7554/eLife.26464](https://doi.org/10.7554/eLife.26464).
45. Delbono, O.; O'Rourke, K.S.; Ettinger, W.H. Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers. *J. Membr. Biol.* **1995**, *148*, 211–222, doi:[10.1007/BF00235039](https://doi.org/10.1007/BF00235039).
46. Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 363–383, doi:[10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3).
47. Tan, D.Q.; Suda, T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *29*, 149–168, doi:[10.1089/ars.2017.7273](https://doi.org/10.1089/ars.2017.7273).
48. Zhang, L.; Wang, X.; Cueto, R.; Effi, C.; Zhang, Y.; Tan, H.; Qin, X.; Ji, Y.; Yang, X.; Wang, H. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* **2019**, *26*, 101284, doi:<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.
49. Sies, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–

- 6, doi:10.3390/antiox9090852.
50. Wu, D.; Cederbaum, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Heal.* **2003**, 277–284.
 51. Diaz de Barboza, G.; Guizzardi, S.; Moine, L.; Tolosa de Talamoni, N. Oxidative stress, antioxidants and intestinal calcium absorption. *World J. Gastroenterol.* **2017**, 23, 2841–2853, doi:10.3748/wjg.v23.i16.2841.
 52. Bagi, Z.; Csekó, C.; Tóth, E.; Koller, A. Oxidative stress-induced dysregulation of arteriolar wall shear stress and blood pressure in hyperhomocysteinemia is prevented by chronic vitamin C treatment. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2003**, 285, 2277–2283, doi:10.1152/ajpheart.00448.2003.
 53. Fusco, D.; Colloca, G.; Lo Monaco, M.R.; Cesari, M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin. Interv. Aging* **2007**, 2, 377–387, doi:10.2147/cia.S12159918.
 54. Finaud, J.; Lac, G.; Filaire, E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sport. Med* **2006**, 36, 327–358.
 55. Petiz, L.L.; Girardi, C.S.; Bortolin, R.C.; Kunzler, A.; Gasparotto, J.; Rabelo, T.K.; Matté, C.; Moreira, J.C.F.; Gelain, D.P. Vitamin A oral supplementation induces oxidative stress and suppresses IL-10 and HSP70 in skeletal muscle of trained rats. *Nutrients* **2017**, 9, doi:10.3390/nu9040353.
 56. Berger, M.M. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* **2005**, 24, 172–183, doi:10.1016/j.clnu.2004.10.003.
 57. Beppu, M.; Watanabe, T.; Yokota, A.; Ohmori, S.; Kikugawa, K. Water-soluble antioxidants inhibit macrophage recognition of oxidized erythrocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, 24, 575–578, doi:10.1248/bpb.24.575.
 58. Rodriguez-Amaya, D.B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids-A review. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, 23, 726–740, doi:10.1016/j.jfca.2010.03.008.
 59. Adrienne Bendich and James Allen Olson Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* **1989**, 3, 1927–1932.

60. Rhee, E.J.; Plutzky, J. Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab. J.* **2012**, *36*, 167–180, doi:10.4093/dmj.2012.36.3.167.
61. Mangelsdorf, D.J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R.A.; Yang Zhou, J.; Ong, E.S.; Oro, A.E.; Kakizuka, A.; Evans, R.M. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* **1992**, *6*, 329–344, doi:10.1101/gad.6.3.329.
62. Liu, Q.; Linney, E. The mouse retinoid-X receptor-gamma gene: Genomic organization and evidence for functional isoforms. *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7*, 651–658, doi:10.1210/mend.7.5.8391126.
63. Yun, M.L.; Jung, O.L.; Jung, J.H.; Ji, H.K.; Park, S.H.; Ji, M.P.; Kim, E.K.; Suh, P.G.; Hyeon, S.K. Retinoic acid leads to cytoskeletal rearrangement through AMPK-Rac1 and stimulates glucose uptake through AMPK-p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33969–33974, doi:10.1074/jbc.M804469200.
64. Sleeman, M.W.; Zhou, H.; Rogers, S.; Ng, K.W.; Best, J.D. Retinoic acid stimulates glucose transporter expression in L6 muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1995**, *108*, 161–167, doi:10.1016/0303-7207(95)03473-K.
65. Bonet, M.L.; Ribot, J.; Palou, A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821*, 177–189, doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.001.
66. Amengual, J.; Ribot, J.; Bonet, M.L.; Palou, A. Retinoic acid treatment increases lipid oxidation capacity in skeletal muscle of mice. *Obesity* **2008**, *16*, 585–591, doi:10.1038/oby.2007.104.
67. R. Kuhn; N. A. Soerensen Über die Farbstoffe des Hummers (*Astacus gammarus* L). *Angew. Chemie* **1938**, *51*, 465–466.
68. Nicol, S.; Endo, Y. Krill fisheries: Development, management and ecosystem implications. *Aquat. Living Resour.* **1999**, *12*, 105–120, doi:https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)80020-5.
69. Ali-Nehari, A.; Kim, S.B.; Lee, Y.B.; Lee, H. youn; Chun, B.S. Characterization of oil including astaxanthin extracted from krill (*Euphausia superba*) using supercritical carbon dioxide and organic solvent as comparative method. *Korean J. Chem. Eng.* **2012**, *29*, 329–336, doi:10.1007/s11814-011-0186-2.

70. Grantham, G.J. *The Southern Ocean: The Utilization of Krill*; Rome, Italy, 1977; ISBN 9780823644100.
71. Ramprasath, V.R.; Eyal, I.; Zchut, S.; Jones, P.J.H. Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 178, doi:10.1186/1476-511X-12-178.
72. Cicero, A.F.G.; Reggi, A.; Parini, A.; Borghi, C. State of the art paper
Application of polyunsaturated fatty acids in internal medicine: beyond the established cardiovascular effects. *Arch. Med. Sci.* **2012**, *8*, 784–793, doi:10.5114/aoms.2012.31613.
73. Lee, B.; Sur, B.-J.; Han, J.-J.; Shim, I.; Her, S.; Lee, H.-J.; Hahm, D.-H. Krill phosphatidylserine improves learning and memory in Morris water maze in aged rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **2010**, *34*, 1085–1093, doi:https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.031.
74. Barros, M.P.; Poppe, S.C.; Bondan, E.F. Neuroprotective Properties of the Marine Carotenoid Astaxanthin and Omega-3 Fatty Acids, and Perspectives for the Natural Combination of Both in Krill Oil. *Nutrients* 2014, *6*, 1293–1317.
75. G. Hussein, U. Sankawa, H. Goto, K. Matsumoto, A.; Watanabe, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 443–449.
76. Miyawaki, H.; Takahashi, J.; Tsukahara, H.; Takehara, I. Effects of astaxanthin on human blood rheology. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2008**, *43*, 69–74, doi:10.3164/jcbrn.2008048.
77. Saito, M.; Yoshida, K.; Saito, W.; Fujiya, A.; Ohgami, K.; Kitaichi, N.; Tsukahara, H.; Ishida, S.; Ohno, S. Astaxanthin increases choroidal blood flow velocity. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2012**, *250*, 239–245, doi:10.1007/s00417-011-1843-1.
78. Rao, A.R.; Sindhuja, H.N.; Dharmesh, S.M.; Sankar, K.U.; Sarada, R.; Ravishankar, G.A. Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga haematococcus pluvialis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3842–3851, doi:10.1021/jf304609j.

79. N. S. Mashhadi, M. Zakerkish, J. Mohammadiasl, M.Z.; M. Mohammadshahi, and M.H.H. Astaxanthin improves glucose metabolism and reduces blood pressure in patients with type 2 diabetes mellitus. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2018**, *27*, 341–346.
80. Park, J.S.; Chyun, J.H.; Kim, Y.K.; Line, L.L.; Chew, B.P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr. Metab.* **2010**, *7*, 1–10, doi:10.1186/1743-7075-7-18.
81. Kim, S.H.; Kim, H. Inhibitory effect of astaxanthin on oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction-a mini-review. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10091137.
82. Barros, M.P.; Poppe, S.C.; Bondan, E.F. Neuroprotective properties of the marine carotenoid astaxanthin and omega-3 fatty acids, and perspectives for the natural combination of both in krill oil. *Nutrients* **2014**, *6*, 1293–1317, doi:10.3390/nu6031293.
83. Uchiyama, K.; Naito, Y.; Hasegawa, G.; Nakamura, N.; Takahashi, J.; Yoshikawa, T. Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 290–293, doi:10.1179/135100002125000811.
84. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 447–465, doi:10.3390/md9030447.
85. Gao, S.; Li, R.; Heng, N.; Chen, Y.; Wang, L.; Li, Z.; Guo, Y.; Sheng, X.; Wang, X.; Xing, K.; et al. Effects of dietary supplementation of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on antioxidant capacity, lipid metabolism, and accumulation in the egg yolk of laying hens. *Poult. Sci.* **2020**, *99*, 5874–5882, doi:10.1016/j.psj.2020.08.029.
86. Ristow, M. Unraveling the truth about antioxidants. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 709–711, doi:10.1038/nm.3624.
87. Yoshihara, T.; Sugiura, T.; Shibaguchi, T.; Naito, H. Role of astaxanthin supplementation in prevention of disuse muscle atrophy: a review. *J. Phys. Fit. Sport. Med.* **2019**, *8*, 61–71, doi:10.7600/jpfsm.8.61.
88. Sawaki, K.; Yoshigi, H.; Aoki, K.; Azumane, A.; Kaneko, K.; Yamaguchi, M. Sports performance benefits from taking natural astaxanthin characterized by visual acuity and

- muscle fatigue improvements in humans. *J. Clin. Ther. Med.* **2002**, *18*, 73–88.
89. Wolf, A.M.; Asoh, S.; Hiranuma, H.; Ohsawa, I.; Iio, K.; Satou, A.; Ishikura, M.; Ohta, S. Astaxanthin protects mitochondrial redox state and functional integrity against oxidative stress. *J. Nutr. Biochem.* **2010**, *21*, 381–389, doi:10.1016/j.jnutbio.2009.01.011.
90. Aoi, W.; Naito, Y.; Takanami, Y.; Ishii, T.; Kawai, Y.; Akagiri, S.; Kato, Y.; Osawa, T.; Yoshikawa, T. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory effect of oxidative CPT I modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 892–897, doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.019.
91. Aoi, W.; Naito, Y.; Yoshikawa, T. Potential Role of Oxidative Protein Modification in Energy Metabolism in Exercise. *Subcell. Biochem.* **2014**, *77*, 175–187, doi:10.1007/978-94-007-7920-4_15.
92. Liu, P.H.; Aoi, W.; Takami, M.; Terajima, H.; Tanimura, Y.; Naito, Y.; Itoh, Y.; Yoshikawa, T. The astaxanthin-induced improvement in lipid metabolism during exercise is mediated by a PGC-1 α increase in skeletal muscle. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2014**, *54*, 86–89, doi:10.3164/jcbtn.13-110.
93. Polotow, T.G.; Vardaris, C. V.; Mihaliuc, A.R.; Gonçalves, M.S.; Pereira, B.; Ganini, D.; Barros, M.P. Astaxanthin supplementation delays physical exhaustion and prevents redox imbalances in plasma and soleus muscles of wistar rats. *Nutrients* **2014**, *6*, 5819–5838, doi:10.3390/nu6125819.
94. Res, P.T.; Cermak, N.M.; Stinkens, R.; Tollakson, T.J.; Haenen, G.R.; Bast, A.; Van Loon, L.J.C. Astaxanthin supplementation does not augment fat use or improve endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2013**, *45*, 1158–1165, doi:10.1249/MSS.0b013e31827fddc4.
95. Cesari, M.; Pahor, M.; Bartali, B.; Cherubini, A.; Penninx, B.W.J.H.; Williams, G.R.; Atkinson, H.; Martin, A.; Guralnik, J.M.; Ferrucci, L. Antioxidants and physical performance in elderly persons: The Invecchiare in Chianti (InCHIANTI) study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 289–294, doi:10.1093/ajcn/79.2.289.
96. Georges, J.; Sharp, M.H.; Lowery, R.P.; Wilson, J.M.; Purpura, M.; Hornberger, T.A.; Harding, F.; Johnson, J.H.; Peele, D.M.; Jäger, R. The Effects of Krill Oil on mTOR Signaling and Resistance Exercise: A Pilot Study. *J. Nutr. Metab.* **2018**, *2018*,

doi:10.1155/2018/7625981.

97. Liu, S.Z.; Ali, A.S.; Campbell, M.D.; Kilroy, K.; Shankland, E.G.; Roshanravan, B.; Marcinek, D.J.; Conley, K.E. Building strength, endurance, and mobility using an astaxanthin formulation with functional training in elderly. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 826–833, doi:10.1002/jcsm.12318.
98. Yu, T.; Dohl, J.; Chen, Y.; Gasier, H.G.; Deuster, P.A. Astaxanthin but not quercetin preserves mitochondrial integrity and function, ameliorates oxidative stress, and reduces heat-induced skeletal muscle injury. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 13292–13302, doi:10.1002/jcp.28006.
99. Bloomer, R.J.; Fry, A.; Schilling, B.; Chiu, L.; Hori, N.; Weiss, L. Astaxanthin supplementation does not attenuate muscle injury following eccentric exercise in resistance-trained men. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2005**, *15*, 401–412, doi:10.1123/ijsnem.15.4.401.
100. Klinkenberg, L.J.J.; Res, P.T.; Haenen, G.R.; Bast, A.; Van Loon, L.J.C.; Van Diejen-Visser, M.P.; Meex, S.J.R. Effect of antioxidant supplementation on exercise-induced cardiac troponin release in cyclists: A randomized trial. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0079280.
101. Aoi, W.; Maoka, T.; Abe, R.; Fujishita, M.; Tominaga, K. Comparison of the effect of none-sterified and esterified astaxanthins on endurance performance in mice. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2018**, *62*, 161–166, doi:10.3164/jcfn.17-89.
102. Pitts, M. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio-Protocol* **2018**, *8*, 2018, doi:10.21769/bioprotoc.2744.
103. Gulyás, M.; Bencsik, N.; Pusztai, S.; Liliom, H.; Schlett, K. AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *Neuroinformatics* **2016**, *14*, 479–481, doi:10.1007/s12021-016-9303-z.
104. Royer, L.; Pouvreau, S.; Ríos, E. Evolution and modulation of intracellular calcium release during long-lasting, depleting depolarization in mouse muscle. *J. Physiol.* **2008**, *586*, 4609–4629, doi:10.1113/jphysiol.2008.157990.
105. Melzer, W.; Rios, E.; Schneider, M.F. Time course of calcium release and removal in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* **1984**, *45*, 637–641, doi:10.1016/S0006-

3495(84)84203-4.

106. Ainbinder, A.; Boncompagni, S.; Protasi, F.; Dirksen, R.T. Role of Mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. *Cell Calcium* **2015**, *57*, 14–24, doi:10.1016/j.ceca.2014.11.002.
107. Fassett, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. *Molecules* **2012**, *17*, 2030–2048, doi:10.3390/molecules17022030.
108. Mao, G.; Kraus, G.A.; Kim, I.; Spurlock, M.E.; Bailey, T.B.; Beitz, D.C. Effect of a mitochondria-targeted vitamin e derivative on mitochondrial alteration and systemic oxidative stress in mice. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 87–95, doi:10.1017/S0007114510005830.
109. Ikeuchi, M.; Koyama, T.; Takahashi, J.; Yazawa, K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 893–899, doi:10.1271/bbb.60521.
110. Ruiz, A.; Dror, E.; Handschin, C.; Furrer, R.; Perez-Schindler, J.; Bachmann, C.; Treves, S.; Zorzato, F. Over-expression of a retinol dehydrogenase (SRP35/DHRS7C) in skeletal muscle activates mTORC2, enhances glucose metabolism and muscle performance. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–14, doi:10.1038/s41598-017-18844-3.
111. Rossi, A.E.; Boncompagni, S.; Wei, L.; Protasi, F.; Dirksen, R.T. Differential impact of mitochondrial positioning on mitochondrial Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} spark suppression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2011**, *301*, 1128–1139, doi:10.1152/ajpcell.00194.2011.
112. Vecellio Reane, D.; Vallese, F.; Checchetto, V.; Acquasaliente, L.; Butera, G.; De Filippis, V.; Szabò, I.; Zanotti, G.; Rizzuto, R.; Raffaello, A. A MICU1 Splice Variant Confers High Sensitivity to the Mitochondrial Ca^{2+} Uptake Machinery of Skeletal Muscle. *Mol. Cell* **2016**, *64*, 760–773, doi:10.1016/j.molcel.2016.10.001.
113. Kwong, J.Q.; Huo, J.; Bround, M.J.; Boyer, J.G.; Schwanekamp, J.A.; Ghazal, N.; Maxwell, J.T.; Jang, Y.C.; Khuchua, Z.; Shi, K.; et al. The mitochondrial calcium uniporter underlies metabolic fuel preference in skeletal muscle. *JCI insight* **2018**, *3*, doi:10.1172/jci.insight.121689.
114. Gherardi, G.; Nogara, L.; Ciciliot, S.; Fadini, G.P.; Blaauw, B.; Braghetta, P.; Bonaldo,

- P.; De Stefani, D.; Rizzuto, R.; Mammucari, C. Loss of mitochondrial calcium uniporter rewires skeletal muscle metabolism and substrate preference. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 362–381, doi:10.1038/s41418-018-0191-7.
115. Amengual, J.; García-Carrizo, F.J.; Arreguín, A.; Mušinović, H.; Granados, N.; Palou, A.; Bonet, M.L.; Ribot, J. Retinoic Acid Increases Fatty Acid Oxidation and Irisin Expression in Skeletal Muscle Cells and Impacts Irisin in Vivo. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *46*, 187–202, doi:10.1159/000488422.
116. Colletti, A.; Cravotto, G.; Citi, V.; Martelli, A.; Testai, L.; Cicero, A.F.G. Advances in technologies for highly active omega-3 fatty acids from krill oil: Clinical applications. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 1–30, doi:10.3390/md19060306.
117. Rodacki, C.L.N.; Rodacki, A.L.F.; Pereira, G.; Naliwaiko, K.; Coelho, I.; Pequito, D.; Fernandes, L.C. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 428–436, doi:10.3945/ajcn.111.021915.
118. Russ, D.W.; Grandy, J.S.; Toma, K.; Ward, C.W. Ageing, but not yet senescent, rats exhibit reduced muscle quality and sarcoplasmic reticulum function. *Acta Physiol.* **2011**, *201*, 391–403, doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02191.x.
119. Payne, A.M.; Zheng, Z.; González, E.; Wang, Z.M.; Messi, M.L.; Delbono, O. External Ca²⁺-dependent excitation-contraction coupling in a population of ageing mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol.* **2004**, *560*, 137–155, doi:10.1113/jphysiol.2004.067322.
120. Renganathan, M.; Messi, M.L.; Delbono, O. Dihydropyridine receptor-ryanodine receptor uncoupling in aged skeletal muscle. *J. Membr. Biol.* **1997**, *157*, 247–253, doi:10.1007/s002329900233.
121. Andersson, D.C.; Betzenhauser, M.J.; Reiken, S.; Meli, A.C.; Umanskaya, A.; Xie, W.; Shiomi, T.; Zalk, R.; Lacampagne, A.; Marks, A.R. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 196–207, doi:10.1016/j.cmet.2011.05.014.
122. Zampieri, S.; Pietrangelo, L.; Loeffler, S.; Fruhmann, H.; Vogelauer, M.; Burggraf, S.; Pond, A.; Grim-Stieger, M.; Cvecka, J.; Sedliak, M.; et al. Lifelong physical exercise delays age-associated skeletal muscle decline. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2015**, *70*, 163–173, doi:10.1093/gerona/glu006.

123. Mansouri, A.; Muller, F.L.; Liu, Y.; Ng, R.; Faulkner, J.; Hamilton, M.; Richardson, A.; Huang, T.T.; Epstein, C.J.; Van Remmen, H. Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127*, 298–306, doi:10.1016/j.mad.2005.11.004.
124. Filadi, R.; Greotti, E.; Turacchio, G.; Luini, A.; Pozzan, T.; Pizzo, P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E2174–E2181, doi:10.1073/pnas.1504880112.
125. Galasso, C.; Orefice, I.; Pellone, P.; Cirino, P.; Miele, R.; Ianora, A.; Brunet, C.; Sansone, C. On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 1–16, doi:10.3390/md16080247.
126. Grimmig, B.; Hudson, C.; Moss, L.; Peters, M.; Subbarayan, M.; Weeber, E.J.; Bickford, P.C. Astaxanthin supplementation modulates cognitive function and synaptic plasticity in young and aged mice. *GeroScience* **2019**, *41*, 77–87, doi:10.1007/s11357-019-00051-9.
127. O'Brien, J.S.; Sampson, E.L. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* **1965**, *6*, 545–551, doi:10.1016/s0022-2275(20)39620-6.
128. de Magalhães, J.P.; Müller, M.; Rainger, J.E.; Steegenga, W. Fish oil supplements, longevity and aging. *Aging (Albany, NY)*. **2016**, *8*, 1578–1582, doi:10.18632/aging.101021.
129. Spindler, S.R.; Mote, P.L.; Flegal, J.M. Dietary supplementation with Lovaza and krill oil shortens the life span of long-lived F1 mice. *Age (Omaha)*. **2014**, *36*, 1345–1352, doi:10.1007/s11357-014-9659-7.
130. Tsuduki, T.; Honma, T.; Nakagawa, K.; Ikeda, I.; Miyazawa, T. Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice. *Nutrition* **2011**, *27*, 334–337, doi:10.1016/j.nut.2010.05.017.
131. Gamoh, S.; Michio Hashimoto, M.; Yanagimoto, K.; Katakura, M.; Md Abdul, H.; Shido, O. Krill-derived Phospholipids Rich in n-3 Fatty Acid Improve Spatial Memory in Adult Rats. *J. Agric. Sci.* **2011**, *3*, 3–12, doi:10.5539/jas.v3n4p3.
132. Wibrand, K.; Berge, K.; Messaoudi, M.; Duffaud, A.; Panja, D.; Bramham, C.R.; Burri,

- L. Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. *Lipids Health Dis.* **2013**, *12*, 1–13, doi:10.1186/1476-511X-12-6.
133. Di Marzo, V.; Griinari, M.; Carta, G.; Murru, E.; Ligresti, A.; Cordeddu, L.; Giordano, E.; Bisogno, T.; Collu, M.; Batetta, B.; et al. Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but not N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *Int. Dairy J.* **2010**, *20*, 231–235, doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.015.

Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/274/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

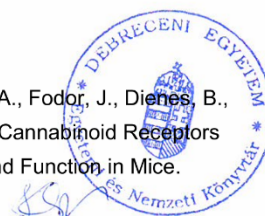
Jelölt: Singlár Zoltán
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10071494

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Singlár, Z.**, Szentesi, P., Fodor, J., Angyal, Á., Csernoch, L., Sztretye, M.: Assessing the Potential of Nutraceuticals as Geroprotectors on Muscle Performance and Cognition in Aging Mice. *Antioxidants*. 10 (9), 1415, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10091415>
IF: 7.675
2. Sztretye, M., **Singlár, Z.**, Szabó, L., Angyal, Á., Balogh, N., Vakilzadeh, F., Szentesi, P., Dienes, B., Csernoch, L.: Improved Tetanic Force and Mitochondrial Calcium Homeostasis by Astaxanthin Treatment in Mouse Skeletal Muscle. *Antioxidants*. 9 (2), 98, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox9020098>
IF: 6.312

További közlemények

3. Sztretye, M., **Singlár, Z.**, Ganbat, N., Al-Gaadi, D., Szabó, K., Köhler, Z. M., Dux, L., Keller-Pintér, A., Csernoch, L., Szentesi, P.: Unravelling the Effects of Syndecan-4 Knockdown on Skeletal Muscle Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (8), 6933, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24086933>
IF: 5.6 (2022)
4. **Singlár, Z.**, Ganbat, N., Szentesi, P., Osgonsandag, N., Szabó, L., Telek, A., Fodor, J., Dienes, B., Gönczi, M., Csernoch, L., Sztretye, M.: Genetic Manipulation of CB1 Cannabinoid Receptors Reveals a Role in Maintaining Proper Skeletal Muscle Morphology and Function in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (24), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232415653>
IF: 5.6





5. Sztretye, M., **Singlár, Z.**, Balogh, N., Kis, G., Szentesi, P., Angyal, Á., Balatoni, I., Csernoch, L., Dienes, B.: The Role of Orai1 in Regulating Sarcoplasmic Calcium Release, Mitochondrial Morphology and Function in Myostatin Deficient Skeletal Muscle.
Front. Physiol. 11, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.601090>
IF: 4.566

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 29,753

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,987**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.05.16.



Tárgyszavak-Key Words

Magyarul:

Vázizom, astaxanthin, antioxidáns, szarkopénia, oxidatív stressz, intracelluláris kalcium, elektro-mechanikai kapcsolat, izomerő

Angolul:

Skeletal muscle, astaxanthin, antioxidants, sarcopenia, oxidative stress, intracellular calcium, electro-mechanical coupling, muscle force

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Sztretye Mónikának, aki a PhD képzésem során alapvetően meghatározta és formálta tudományos utamat. Támogatása nélkül nem tudtam volna elvégezni a munkámat, és mind szakmai, mind emberi téren példaként áll előttem.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Csernoch László Professzor Úrnak, aki lehetővé tette számomra, hogy az Élettani Intézetben végezzem kutatásaimat, és mindig segített abban, hogy tudományos kérdéseimet kritikusan vizsgáljam.

Köszönöm munkatársaimnak, az Élettani Intézet Intracelluláris Kalciumhomeosztázis Munkacsoport minden tagjának, akik állandó gyakorlati tanácsaikkal és segítségükkel hozzájárultak tudásom elméleti és gyakorlati fejlesztéséhez. Köszönet illeti a jelenlegi és volt PhD hallgatókat is, akik barátságos környezetükkel nagyban segítették a munkámat.

Végül, szeretném megköszönni Édesanyámnak, Édesapámnak, valamint közeli hozzátartozóimnak és barátaimnak a folyamatos támogatást, amik nélkül nem jutottam volna el oda, ahol most vagyok.

A kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja (NKFIH-1150-6/2019) finanszírozta, a Debreceni Egyetem Terápiás alapú tematikus programjának keretében. Továbbá, a kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal NKFIH PD-128370 kutatási pályázata támogatta.

További támogatóink a TKP2020-IKA-04 számú projekt, a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatása, a 2020-4.1.1- TKP2020 támogatási program keretében. Továbbá a munka a GINOP-2.3.4- 15-2016-00002 számú projekt, valamint az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 számú, az EU és az Európai Szociális Alap által társfinanszírozott projekt támogatásával valósult meg.

PhD képzésem során az „Új Nemzeti Kiválóság Program” című, ÚNKP-21-3-II-DE-291 számú pályázat, valamint a Mecentura MEC_21_ 141135 pályázat támogatta a kutatásomat.