

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A vázizmok elektromechanikai kapcsolatának változása idős korban,
egerekben**

Al-Gaadi Dána

Témavezető: Dr. Szentesi Péter



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2020.

A vázizmok elektromechanikai kapcsolatának változása idős korban, egerekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Al-Gaadi Dána okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szentesi Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Enyedi Péter, MTA doktora
Dr. Vámosi György, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, Élettudományi Központ
2018. június 19. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus
tagok: Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Prof. Dr. Tóth Attila, MTA doktora
Dr. Jeney Viktóra, PhD
Dr. Ivanics Tamás, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2020. december 14. 14:00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a szentesi.peter@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2020. december 12.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Bevezetés

A vázizom a legnagyobb szervünk, ami a testtömeg 40%-át teszi ki. Rendkívül fontos a normális élet folyamán, hiszen a mozgásban, a testtartásban és a szervezet energia metabolismusában fontos szerepet játszik. A vázizom tömege edzéssel növelhető, mozgás hiányában és idős korban azonban csökken. A jobb életkörülmények miatt a születéskor várható élettartam mára már kitolódott, aminek következtében egyre nagyobb az idős populáció. Ennek következtében az időskori szarkopénia (a vázizom tömegének és az erőnek a csökkenése) is népbetegséggé nőtte ki magát. Bármilyen terápia, ami lassítani tudná az öregkori izomsorvadást vagy gyorsítani az izomsérülések utáni regenerációt, jelentős pozitív nemzetgazdasági és társadalmi hatással járna. Ezért széleskörűen vizsgálják a szarkopénia hátterét és kezelésének lehetőségeit.

Az izomtömeg folyamatosan csökken az életkorral. Ez a folyamat felgyorsul 70 éves kor után, azonban ezekben a mechanizmusokban részt vevő biológiai folyamatok még nem teljesen tisztázottak. Az izmok regenerációs képessége és ereje szintén csökken az életkorral. Egy fontos résztvevő lehet ezekben a folyamatokban a lelassult alanyanyagcsere-sebesség, amely hozzájárul az izomtömeg csökkenéséhez. Ezek a jelenségek csökkent fizikai aktivitáshoz, táplálékhiányhoz, krónikus gyulladásokhoz és csökkent hormonkiválasztáshoz vezethetnek. A vázizom lenyűgöző plaszticitással rendelkezik, amely lehetővé teszi, hogy alkalmazkodjon az egész életen át tartó működéshez. Feltételezzük, hogy a fiatal korban szerzett nagyobb izomtömeg ígéretes kiindulási pontot jelenthet az öregedés során a megfelelő izomzat és fizikai teljesítmény fenntartása érdekében. A megnövekedett izomtömeg azonban nem feltétlenül vezet fokozott teljesítményhez. Például, ilyen fenotípusú a miosztatin hiányos egér, mely csökkent *in vivo* fizikai aktivitást mutat. Más részről az általános vélemény, hogy a folyamatosan végzett mérsékelt testmozgás jó formában tartja az izmokat. Az izomképzés hozzájárul a megnövekedett aktivitás komplex igényeinek kielégítéséhez a megnövekedett kapilláris sűrűség és enzimaktivitás révén, az izom-anyagcsere fokozódása érdekében. Továbbá a kontraktilis fehérjék megnövekedett termelése nagyobb kontraktilis erőt tesz lehetővé. A szarkopénia nagyon bonyolult mechanizmus, amely sokkal több jelenséget foglal magában, mint a fizikai aktivitás csökkenése az életkorral. A táplálkozás hatása és a hormontermelés változásai az élet során erősen hozzájárulnak az

izomtömeg csökkenéséhez. E két tényező hozzájárulásának jellege és mértéke az izom egészséges és funkcionális megőrzéséhez még nem ismert.

Az öregedés során a vázizom funkció vesztese például az oxidatív stressz következménye is lehet, ami a reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök (ROS/RNS) akkumulálódásának az eredménye. A fiziológias körülmények között az oxidatív egyensúlyt a ROS/RNS termelés, illetve ezeknek eltávolítása között az antioxidáns rendszer szabályozza. Ezen reaktív gyökök fiziológias koncentrációjának fontos szerepe van több jelátviteli útvonalban, mind a túl alacsony, mind a túl magas szintjük is káros lehet a sejt funkciókra nézve. A vázizom rengeteg oxigént használ, így nagy mennyiségű ROS/RNS képes termelődni, amelyek egyik legfontosabb forrása a mitokondrium, ami öregedés során csökkent kapacitással működik. Az öregedő izmokban a megnövekedett oxidatív stressz az excitációs kontrakciós-kapcsolat (ECC) és a Ca^{2+} homeosztázis megváltozásához vezethet.

A szelén antioxidáns tulajdonsággal rendelkező nyomelem, és fontos szerepet játszik több izomfunkcióban. Teheneknél a szelénhiány fehér izombetegséget okoz (a csontváz és a szívizom gyengesége és degenerációja). Embereken hasonló miopátiát írtak le. A súlyos szelénhiányhoz elégtelen vázizom-funkciók kapcsolódnak. A fiatal egerekkel kapcsolatos korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a szelénnel kiegészített étrend növeli a kalcium felszabadulását a szarkoplazmatikus retikulumból (SR), és így javítja a vázizom *in vivo* és *in vitro* teljesítményét. Ezeket a hatásokat az izmok megnövekedett szelenoprotein N szintje kísérte, ami fokozott oxidatív stressz-toleranciát eredményezhet hosszú távú összehúzódások során. A szelenoproteinek olyan kémiai reakciókban vesznek részt, mint az oxidatív redukciók, az instabil oxigén tartalmú molekuláktól való védekezésben esszenciális szerepük van. Habár a szelenoprotein N pontos működése nem ismert, de valószínűleg az oxidatív stressztől védi a sejteket. Születés előtt sok szövetben aktív, s részt vesz az izomszövet kialakulásában (miogenezis). Fontos szerepe van a születés utáni normál izomműködésében, és a kalcium homeosztázisban is. Az izom szelenoprotein N-tartalmának csökkenését kimutatták a kor előrehaladtával.

Az ankyrin a protein-adapterek családjába tartozik, részt vesz a speciális membrándomének szervezésében. Mindhárom ankyrin gén (Ank1, Ank2 és Ank3) több splicing eseményen keresztül nagyszámú ankyrin izoformát kódol, amelyek közös általános szerkezettel rendelkeznek. A harántcsíkolt izmokban mindhárom ankyrin gén az izom-specifikus izoformákat kódolja. A legtöbb

szervben található ankyrin izoformának nagy a molekulatömege (220–130 kDa), viszont az Ank1 génben található belső promoter a kis izom-specifikus izoformákat expresszálja, amelyek 20–25 kDa-osak, és együttesen sAnk1-nek nevezzük őket (sAnk1.5, sAnk1.6, sAnk1.7 és sAnk1.9). Ezekben az sAnk1 izoformákban hiányzik a legtöbb kanonikus ankyrin domén, viszont az NH₂-végükön egyedülálló hidrofób domént tartalmaznak, amely az SR-hez köti őket. Ezen kisebb izomizoformák közül az sAnk1.5 expresszálódik a legszélesebb körben, míg a többi izoforma alacsonyabb szinten található meg. Az sAnk1.5 citoplazmatikus vége egy olyan specifikus szekvenciát tartalmaz, amely közvetlen kötődést tesz lehetővé az obszkurinnal. Ez egy olyan szarkomerikus fehérje, amely az M-sáv stabilitásának fenntartásához szükséges a vázizomban. Az sAnk1.5 és az obszkurin közötti kölcsönhatás elengedhetetlen ahhoz, hogy az SR-t a miofibrillumok közvetlen közelében tartsák. Erre bizonyíték, hogy az sAnk1 izoformák kiütése patkány *flexor digitorum brevis* (FDB) izomból származó primer sejtkultúrákban anasztomózist eredményezett az SR longitudinális tubulusaiban, míg a junkcionális SR-t csak alig befolyásolta. Az sAnk1 hiányos (KO) egerekben pedig azt találták, hogy az sAnk1 hiánya jelentősen csökkentette az SR mennyiségét. Viszont az SR kalcium csatornájának és pumpájának expressziós szintjei és a lokalizációi nem különböztek az sAnk1 KO egerekből származó gyors és lassú izmok rostjai esetén a kontroll egerekhez képest. Az obszkurin KO egerek vázizomrostjainak szinte azonos változásait figyelték meg az SR morfológiájában, megerősítve az sAnk1 és az obszkurin közötti kölcsönhatás jelentőségét az SR szerkezetének megőrzésében. További vizsgálatokban azt találták, hogy az életkor növekedésével az sAnk1 KO egerekből származó rostokban szerkezeti károsodások és nagy területű kontraktúrák alakultak ki, illetve az SR fehérjéket tartalmazó tubuláris aggregátumok keletkeztek. Mindezeket a szerkezeti változásokat az sAnk1 KO izmok elektrofiziológiai tulajdonságainak és erejének romlása kísérte. Ezek az eredmények összhangban állnak egy korábbi kutatással, amely szerint a sAnk1 hiányos tenyésztett izomrostok csökkentett Ca²⁺ felszabadulást mutatnak az SR-ből.

Célkitűzés

Az öregedés során jelentkező izomtömeg csökkenés, ami lehet a már a népbetegséggé vált szarkopénia következménye, az izomerő jelentős elvesztésével és a megnövekedett fáradással jár. Ez lehet annak is a következménye, hogy a korral előrehaladva nő a reaktív oxigén gyökök termelése is, ami tovább roncsolja a sejteket. Továbbá a ROS jelenléte befolyásolja az ECC-ban résztvevő fehérjéket is, ami a vázizom normál működésében kulcsfontosságú Ca^{2+} -homeosztázishoz csökkent működéséhez vezet. Célunk az volt, hogy kiderítsük ez a folyamat miként lassítható. A megválaszolandó kérdéseink a következők voltak:

- vajon az antioxidáns szelén étrend-kiegészítés megfordítja-e az öregedés során fellépő izomfunkció csökkenést?
- Az egész életen át tartó edzés miként befolyásolja az izomfunkciók megőrzését öreg korra?
- Ezek hogyan befolyásolják az ECC-ban résztvevő fehérjék működését és az izom kalciumhomeosztázisát?
- A szelenoprotein N szintje hogyan változik a szelén étrend-kiegészítés hatására idős egerekben?

A vázizomban jelenlévő sAnk1 fehérjék fontos szerepet játszanak az SR miofibrillum közelében tartásában, amelynek normális működése elengedhetetlen a Ca^{2+} -homeosztázisban. Mivel még nem ismert, hogy ennek a fehérjének a hiánya befolyásolja-e a vázizomrostok Ca^{2+} homeosztázisát a fiatal és öreg sAnk1 KO egerek esetén, ezért a következő kérdéseink voltak:

- sAnk1 KO egerek esetén a fehérjének a hiánya befolyásolja-e a vázizomrostok intracelluláris Ca^{2+} homeosztázisát?
- az öregedés hogyan befolyásolja ezeket a változásokat?

Anyagok és módszerek

Állatmodellek

Állatkísérleteinket az Európai Unió irányelveinek (86/609/EEC) megfelelően végeztük. A kísérleti protokollt a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével (31/2012/DE MÁB) hajtottuk végre. A vegyes nemű állatokat fémrács fedelű műanyag ketrecekben helyeztük el. Az egereket normál rágcsáló táppal etettük, a vízhez *ad libitum* hozzáférésük volt. Az állatok helyiségének megvilágítása automatikusan 12 óra világos és 12 óra sötét ciklusok váltakozásával volt megoldva, a hőmérsékletet pedig 22–25° C tartományban tartottuk. Kísérleteinket vegyes nemű C57 BL/6, *Cmpt* illetve *sANK1 KO* egereken végeztük.

Az öregedés hatásait vizsgáló kísérletsorozatban 5 féle állatcsoporton végeztünk méréseket. Az első csoportban, amelyet edzett kontrollnak neveztünk el, C57 BL/6 egerek voltak, amelyeket normál étrenden tartottunk és edzésképpen futómalommal felszerelt ketrecbe helyeztük, amit 14 napon keresztül önkéntesen használhattak 2 havonta, 2 hónapos koruktól, az életük végéig. A második és harmadik, azaz a nem edzett fiatal (4 hónapos) és nem edzett idős (20-22 hónapos) kontroll csoportban szintén C57 BL/6 egerek voltak. Ők is normál étrendet kaptak, viszont a ketrecükben nem volt futómalom. A negyedik, azaz a nem edzett *Cmpt* csoportban, 20-22 hónapos *Cmpt* egerek, szintén normál étrenden és normál ketrecben, tehát futómalom nélkül voltak tartva. Az ötödik, nem edzett szelénrel etetett csoportban 20-22 hónapos C57 BL/6 egerek voltak, akik a többi nem edzett csoporthoz hasonló körülmények között voltak tartva, viszont megnövelt szelén tartalmú étrendet kaptak.

In vivo kísérletek:

Önkéntes futómalom :

Az edzett kontroll csoportba tartozó egereket olyan ketrecbe helyeztük, amiben egér futómalom volt. A malmokat összekapcsoltuk egy számítógéppel, majd az adatokat 20 perces időközönként, folyamatosan 14 napig rögzítettük. Minden egyes egérre kiszámítottuk a napi átlagos és maximális sebességet, a megtett távolságot és a futással töltött idő hosszát.

Grip- teszt:

A mellső láb fogási tesztjét úgy végeztük, hogy amikor az állatok megbízhatóan megfogták erőmérőhöz kapcsolt fém keretet, akkor a farkuknál fogva óvatosan elhúztuk őket az erőmérőtől. Az egereket párhuzamosan tartottuk az erőmérőhöz kapcsolt kerettel. A maximális erőt akkor regisztráltuk, mielőtt az állat elengedte a keretet. A jeleket 2 kHz-es frekvencián digitalizáltuk, és egy online csatlakoztatott számítógépen tároltuk. A tesztet egerenként 10–15 alkalommal megismételtük majd az adatokat átlagoltuk, hogy egyetlen adatpontot kapjunk állatonként. Az edzett csoportok méréseit mindig a 14 napos futási periódus előtt végeztük. Az összes többi csoport esetében a grip tesztet az állatok feláldozásának napján végeztük.

In vitro kísérletek:

Az állatokat elaltattuk majd feláldoztuk a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának jóváhagyott protokollja szerint (31/2012 / DE MÁB), (22/2011/ DE MÁB, 2012). Pentobarbitális altatás (27 mg / kg) és *cervicalis dislocatio* után az *m. flexor digitorum brevis* (FDB), *m. extensor digitorum longus* (EDL), *m. soleus* (SOL) és *m. quadriceps femoris* származó izmokat használtuk fel.

Izomerő mérés:

Az EDL (gyors) és a SOL (lassú) izmokat csipesz és ollós segítségével manuálisan kipreparáltuk. Ezután vízszintesen elhelyeztük egy kísérleti kamrában, amelyet folyamatosan (10 ml / perc) karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) perfundált Krebs-oldattal (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 10 mM Hepes, 10 mM glukóz, 10 mM NaHCO₃; pH=7,2; szobahőmérséklet) mostunk a vitalitás megőrzésének céljából. Az izom egyik végét egy kapacitív mechano-elektromos erőmérőhöz rögzítettük, a másik vége pedig egy rovartüvel volt kiszúrva. Rövid összehúzódások kiváltására két, az izom alatt elhelyezett platina elektródot használtunk a szupramaximális amplitúdójú, 2 ms hosszú impulzusok leadására, 0,5 Hz-en. A tetanusz kiváltására ugyan ilyen egyedi impulzusokat alkalmaztunk 200 Hz frekvencián 200 ms (EDL) illetve 100 Hz frekvencián 500 ms (SOL) hosszan. A fáradást 150 db tetanusz adásával idéztük elő, a tetanuszokat 0,5 Hz frekvencián ismételve. A fáradás számszerűsítése érdekében az egymást követő tetanuszok amplitúdóját normalizáltuk az első tetanuszra. Azokat az izmokat, amelyek láthatóan megsérültek a kézi preparáció során, kizártuk az értékelésből. A mérések végeztével az izmok maximális átmérőjét

fénymikroszkóp alatt határoztuk meg. Ebből számoltuk az izmok keresztmetszeti felületét (CSA) kör keresztmetszetet feltételezve. Az erő adatokat erre a keresztmetszeti felületre normalizáltuk átlagolás előtt.

Egyedi vázizom rostok izolálása:

A kalcium koncentráció méréseinket egyedi FDB vázizom rostokon végeztük. Az izom manuális kipreparálásakor kalciummentes Tyrode oldatot használtunk, ami a következőket tartalmazta mM-ban: 137 NaCl, 5,4 KCl, 0,5 MgCl₂, 5 ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 11,8 HEPES; 1 gL⁻¹ glükóz; pH=7,4. Az egyedi vázizomrostok izolálásához, enzimatikusan emésztettük az FDB-t. Ehhez 0,2% I-es típusú kollagenázt (Sigma, St Louis, MO, USA) adtunk a preparáló oldathoz, majd az izmot ebben tartottuk 37 °C-on 35-65 percig. Ezután az emésztést enzim mentes normál Tyrode oldattal (1,8 mM CaCl₂) állítottuk le, és ebben tároltuk az izmokat felhasználásig 4°C-on. A méréseket megelőzően az FDB izmokból enyhe fokú manuális trituralással nyertünk egyedi vázizomrostokat.

Teljes sejt intracelluláris Ca²⁺ koncentráció mérés:

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció változásait Fura-2 AM festék segítségével figyeltük meg. Ez a fluoreszcens festék rációmetrikus, tehát a Ca²⁺-ot kötött formájának abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca²⁺-ot nem kötött formájától (380 nm). Az egyedi izomroston a két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon való gerjesztést követően, az emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából kiszámítható a [Ca²⁺]_i.

A fluoreszcens mérésekhez izolált egyedi FDB rostokat használtunk, amit lamininral bevont fedőlemezre trituraltunk. Ezután lecseréltük az oldatot festékes oldatra, ami 1 ml normál Tyrode-ben 5 μM Fura-2 AM-et és 150 nM neostigmint tartalmazott. Az utóbbi az extracelluláris acetilkolin-észteráz enzim gátlása miatt kellett, hogy megakadályozzuk a festék rostokba jutása előtti aktivációját. Ez azért fontos, mert miután az acetoxi-metilészter (AM) formájú festék átjut a sejtmembránon, a Fura-2-ről a sejten belüli intracelluláris észterázok lehasítják az acetoxi-metilésztert, s így kapjuk meg a funkció képes rációmetrikus kalcium indikátort. A festékes oldatban a rostokat 60 percig 37°C-on töltöttük. A rostokat ezután festék mentes Tyrode oldatban szobahőmérsékleten 30 percig tartottuk a mérések előtt.

Kettős hullámhosszúságú monokromátorral felszerelt PTI készülékkel (Deltascan, Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA)

végeztük a váltakozó gerjesztést (340 és 380 nm), míg az emissziót 510 nm-en mértük meg foton-elektronsokszorozó illetve interferenciaszűrők segítségével 10 Hz gyakorisággal rögzítettük egy számítógépen.

Az intracelluláris kalcium koncentrációt minden esetben a mért fluoreszcencia-intenzitások hányadosából számítottuk in vivo kalibrálás alkalmazásával. A mérések kezdetekor az adott fedőlemezen először egy sejtmentes területen felvettük a háttérét. Külső perfúziós rendszer segítségével folyamatosan normál Tyrode oldattal perfundáltuk a rostokat. A kiválasztott rostok kezeléséhez egy lokálisan pozícionált perfúziós kapilláris tűt (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, Berkeley, CA, USA) használtunk. A 0,35 ml/perc átfolyási sebességű tűnek az oldatadagolását egy lokális perfúziós rendszerrel (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific, Berkeley, CA, USA) vezéreltük. A tű mikro-manipulátorral a mérendő rostra történő irányításával értük el, hogy a különböző oldatok szinte azonnal és csak a kiválasztott rostot éri el. A kalcium-felszabadulás tanulmányozásához a Ca^{2+} tranzienseket depolarizáló oldattal váltottuk ki, ami 120 mM NaCl helyett ugyanennyi KCl-t tartalmazott. Ezt a lokális perfúzió segítségével 5 s-ig adagoltuk a kiválasztott sejtre. A mioplazmába felszabadult Ca^{2+} meghatározására a kalcium kötődését az intracelluláris kötőhelyekhez és eltávolítását az intracelluláris térből következőképpen modelleztük: a Ca^{2+} intracellulárisan kötődhet a SERCA pumpához, a troponin C-hez, a parvalbuminhoz és a festékhez; míg az eltávolítása a Ca^{2+} pumpa aktivitásával volt figyelembe véve. A kalcium pumpa maximális szállítási sebességét a Ca^{2+} tranziens stimulációt követő leszálló fázisából a legmegfelelőbb paraméterek illesztésével határoztuk meg. A modell összes többi paraméterét állandó értéken tartottuk. A Ca^{2+} felszabadulás sebességét (fluxus) a Ca^{2+} tranziens időbeli deriváltjaként számítottuk ki. A hosszú depolarizáció alatt (5 s) felszabadult Ca^{2+} mennyisége pedig jó becslése az SR kalciumtartalmának.

Az SR Ca^{2+} -tartalmának közvetlen mérésére egy másik mérési protokollt is alkalmaztunk. Először lokális perfúzió segítségével normál Tyrode oldatot adagoltunk a rostokra, majd ezt kalciummentes Tyrode oldatra cseréltük, amely 5 mM EGTA-t tartalmazott. Az intracelluláris Ca^{2+} -raktárt egy koktél (200 μM 4-klór-M-krezol és 10 μM ciklopiazonsav) felhasználásával ürítettük ki kalciummentes Tyrode-ban. A koktél eredményeként az SR-ből nagy mennyiségű Ca^{2+} szabadult fel a RyR-eken keresztül. Az összes lokálisan adagolt oldat 50 μM BTS-t tartalmazott, hogy csökkentsük a rost mozgását a kalcium felszabadulása során. Nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékét úgy számoltuk, hogy átlagoltuk a

fluoreszcencia hányadosokat normál Tyrode-ban. Az SR Ca^{2+} -tartalmát a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ és a koktél alkalmazása során mért hányados maximuma közötti különbségeként számítottuk ki.

Elemi kalciumfelszabadulási események (CREs) mérése permeabilizált izomrostokban:

Az izolált egyedi FDB izomrostokat szaponinnal permeabilizáltuk, és 0,1 mM fluo-3 festékkel töltöttük fel. A rostokat relaxáló oldatban (összetevői mM-ban: 6 MgCl_2 , 5 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 125 K-glutamát, 10 HEPES, 1 EGTA, 0,13 CaCl_2 , 10 glükóz, 10 Na-foszfo-kreatin, pH=7,2) tartottuk 2-3 percen keresztül 0,002% szaponin jelenlétében. Így a felszíni membrán kilyuggatásával nemcsak az elemi események számát tudtuk fokozni a rostokon, hanem egyúttal a kalcium-indikátor festék bejutását is segítettük a rost belsejébe. A felszíni membrán permeabilizálódását mikroszkóp alatt a fluo-3 fluoreszcencia intenzitása növekedéseként követtük nyomon. Ezt az oldatot ezután mérési oldatra cseréltük (összetevői mM-ban: 6 MgCl_2 , 5 $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 95 K_2SO_4 , 10 HEPES, 1 EGTA, 0,13 CaCl_2 , 10 glükóz, 10 Na-foszfo-kreatin, pH=7,2). A képeket 40x olaj-immersziós objektívvel (NA = 1,3) rögzítettük egy ultra gyors Zeiss 5 LIVE lézeres pásztázó konfokális mikroszkópon (Zeiss, Oberkochen, Németország). A fluo-3 festéket argonion lézerrel 488 nm-en gerjesztettük, majd a rost által kibocsátott fluoreszcens fényt 505 nm hullámhossz felett gyűjtöttük össze. A mérési oldat alkalmazását követő tizenöt perc elteltével minden vizsgált rostról nyolc különböző helyen 120 db 512×512 pixel nagyságú (x, y) képet tartalmazó képsorozatot készítettünk 67 ms/kép sebességgel. Az egyes sorozatok első képén meghatároztuk a háttérét és a rost körvonalát. Ezután az átlagolt háttér-fluoreszcenciát kivontuk minden sorozat összes képének minden pixeléből. A rost Z-vonalainak detektálására az összes kép frekvencia-spektrumát kiszámítottuk gyors Fourier-transzformáció (FFT) alkalmazásával. Ezután a szarkoméreknek megfelelő frekvenciakomponensek inverz FFT-jét használtuk a Z-vonalak eltávolítására a képekről. Stacionárius wavelet módszert alkalmaztunk alacsony küszöbérték szűréssel, hogy kimutassuk az elemi Ca^{2+} felszabadulási eseményeket (CRE vagy spark) a rostokon. Végül a sparkok következő paramétereit számítottuk ki: amplitúdó és két térbeli szélességet a maximum felénél (FWHM), merőlegesen (FWHM-x) és párhuzamosan (FWHM-y) a Z-vonalakkal. A CRE során felszabadult Ca^{2+} mennyiségének becsléséhez kiszámítottuk a jel sűrűséget (Signal Mass, SM).

Feszültség Clamp mérések és Ca^{2+} tranziens analízis:

Az izolált FDB rostokon feszültség clamp körülmények között (Axoclamp 2B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) az előbb bemutatott konfokális mikroszkóppal (Zeiss 5 Live) készítettünk képeket a következő összetételű külső oldatban:(mM-ban) 140 TEA- CH_3SO_3 , 1 CaCl_2 , 3,5 MgCl_2 , 10 HEPES, 1 4-amino-piridin, 0,5 CdCl_2 , 0,3 LaCl_3 , 0,001 TTX és 0,05 BTS, pH=7,2, ozmolalitás 320 mOsm. A pipettát rhod-2 fluoreszcens kalcium indikátort tartalmazó belső oldattal töltöttük fel (ennek összetevői mM-ban: 110 N-metil-glucamin, 110 L-glutaminsav, 10 EGTA, 10 Tris, 10 glükóz, 5 Na ATP, 5 foszfo-kreatin Tris, 0,1 rhod-2, 3,56 CaCl_2 , és 7,4 MgCl_2 , pH=7,2, ozmolalitás 320 mOsm). Az összes kísérletet 20-22°C-on végeztük, és a nyugalmi membrán potenciált -80 mV-on tartottuk. A pipetta ellenállása 1-2 M Ω tartományban változott. Analóg kompenzációt alkalmaztuk a lineáris kapacitív áramok korrigálására. A Ca^{2+} tranzienseket egy modell alkalmazásával analizáltuk, amely kiszámítja a kalcium felszabadulás fluxusát. A modell figyelembe veszi a $[\text{Ca}^{2+}]_{i(t)}$ változásait egyetlen térfogat egységben, beleértve a kalcium eltávolítási folyamatokat, mint például a SERCA pumpa maximális transzport sebessége ($V_{\max}$). A kísérleteket kalcium puffer (10 mM EGTA) jelenlétében végeztük, így az endogén puffereket szinte elhanyagolhatónak tekintettük az kalcium eltávolítási folyamatban. A Ca^{2+} felszabadulás aktiválódásának feszültségfüggését a Boltzmann függvény írja le. A kalcium felszabadulás fluxusból (a kalcium csatornákon keresztülmenő fluxusból) kivonva a pumpa eltávolító fluxusát, az SR-ből kilépő nettó fluxus meghatározható. A nettó fluxus integrálja megadja a depolarizációval felszabadítható SR kalcium tartalmat, vagy más néven a felszabadult Ca^{2+} mennyiségét ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{i \text{ összes}}$).

ROS mérések:

Az egyedi FDB rostokat szobahőmérsékleten 20 percig nTyr-ben, 3 nM dihidroetidiummal töltöttük. A nyugalomban levő rostok fluoreszcencia intenzitását 532 nm hullámhosszon történő gerjesztéssel és 550 nm fölötti hullámhosszon detektáltuk. A mérést megismételtük ugyanazon a rostos 100 darab tetanusz után, amit téringerléssel (2 ms hosszúságú négyzetimpulzusokkal 50 Hz gyakorisággal 100 ms időtartamig) váltottunk ki. A háttérre korrigált fluoreszcencia értékeket átlagoltuk egy kiválasztott területen a rostok hossz tengelyével párhuzamosan. A kiszámított görbék a fluoreszcencia periodikus növekedését és csökkenését mutatták, amely a festék eloszlásának a

szarkomér menti mintázatát tükrözi. Feltételeztük, hogy a görbék átlagértékei arányosak a rostok ROS-termelésével.

Western blot analízis:

A hátsó végtagból származó musculus quadriceps femoris szövetmintáit lízispufferben homogenizáltuk (20 mM Tris – Cl, 5 mM EGTA, proteáz-inhibitor koktél (1: 100) a Sigma-tól), és jégen szonikátorral szétbontottuk. A minták fehérjetartalmát módosított bicinchininsav fehérje-tesztel (Pierce, Rockford, IL, USA) mértük, szarvasmarha szérum albumin alkalmazásával. A Western-blot analízishez a teljes izom homogenizátumhoz 1/5 térfogatú ötszörös töménységű elektroforézis mintapuffert (310 mM Trise-HCl pH=6,8, 10% SDS, 50% glycerol, 100 mM dithiothreitol (DTT), 0,01% bróm-fenol-kék) adtunk és ezután 5 percig 80°C-on főztük őket.

10 µg fehérjét elválasztottunk 5% és 7,5% nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) géllel a vizsgált fehérjék immunológiai kimutatására. A fehérjéket elektroforetikusan vittük át a nitrocellulóz membránokra (BioRad, Bécs, Ausztria).

Miután blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5% -os sovány tejjel, a membránokat egy éjszakán át 4° C-on inkubáltuk a megfelelő primer antitestekkel.

Miután háromszor 10 percig mostuk PBST-vel (PBS, 0,1% Tween 20-val kiegészítve), a membránokat a szekunder antitesttel inkubáltuk 1 órán át. Az utóbbi az elsődleges antitestet termelő faj (nyúl vagy egér) ellen termeltetett, tormaperoxidázzal (HRP) konjugált kecske immunoglobulin (Bio-Rad) amit 5% sovány tejporthoz tartalmazó PBS-ben 1:1000 arányban hígítottunk. A jeleket fokozott kemilumineszcencia (ECL) reakcióval detektáltuk (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Az egyes sávok intenzitását és ugyanazon kép háttérét ImageJ programmal (NIH, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg. A háttérre korrigált normalizált értékeket a háztartási gének intenzitása alapján adtuk meg ugyanazon mintákban. Végül ezeket az adatokat a kontrollhoz viszonyítva fejeztük ki.

Az izmok szeléntartalmának meghatározása:

Az EDL izom teljes szeléntartalmának becsléséhez Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry –t (HG-AFS) használtunk. A mintákon nedves emésztést végeztük úgy, hogy 5 ml 65% HNO_3 -t adtunk 1 g mintához, 60°C-on 60 percig, majd 120°C-on 240 percig emésztettük, miután 3 ml 30% -os H_2O_2 -t adtunk hozzá. A kapott mintákat 15 ml-re hígítottuk 3 M sósavval, majd leszűrtük. A hidrid képződéshez HCl -t használtunk a hígításhoz. A méréseket Atomic Fluorescence Spectrometer (Millenium Merlin, P.S. Analytical, Orpington, Anglia) segítségével végeztük, a következő beállításokkal: 15 l / perc argon gáz adagolás, 40 s mérés, 40 s mosási idő, 100-as erősítéssel. A hidridgenerációs reakcióhoz savoldatként 3 M sósavoldatot és redukáló szerként 0,1 M NaOH -ban 1,4 w/V % NaBH_4 -et használtunk.

Adatelemzés és statisztika:

Az összesített adatokat átlag $\pm$ átlag hibájaként (SEM) fejeztük ki. Az átlagot és a SEM-t súlyozott átlagok és súlyozott standard hibák alapján számítottuk ki ugyanazon állatból származó izmok számának megfelelő súlyozásával, míg a minták száma az adott csoportba tartozó állatok száma volt. Az állatcsoportok közötti különbségeket egy-utas illetve két-utas varianciaanalízissel (ANOVA) és páronkénti többszörös összehasonlítási eljárásokkal (Bonferroni többszörös összehasonlító teszt; Student-Newman-Keuls módszer) értékeltük, a Prism statisztikai program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) használatával. A 0,05-nél kisebb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Egyedi mediációs modellt (Casual mediation model; CMM) készítettünk annak megvizsgálására, hogy a szelenoprotein expresszió szintje és a maximális tetanuszos erő közötti kapcsolatot az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mediátorként változtatja-e.

Eredmények

***In vivo* kísérletek:**

Az állatok *in vivo* izomtéljesítményének ellenőrzésére grip tesztet használtunk. A kontroll állatok testtömegre normalizált fogási ereje csökkent az életkorral, mivel a testsúlyuk nőtt, viszont a fiatal állatokhoz hasonló maximális erőt produkáltak. A Compact mutációt (Cmpt) hordozó, idős miosztatin hiányos egerek szignifikánsan nagyobb maximális erőt produkáltak, mint az időskorú kontroll állatok, de a testtömegre történt normalizálás után teljesítményük szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll egereké. A szelénkezelés nem változtatta meg a maximális fogási erőt időskorban, de a testtömegre normalizált kapaszkodási erő szignifikánsan magasabb lett, mint a kontroll egereké. A kontroll állatok egy csoportja (8 egér) 14 napos önkéntes futó malom kísérletekben vett részt (edzett csoport) 9 és 90 hetes koruk között (ez 2 és 22 hónapnak felel meg). Ahogy az várható volt, az egerek egész életen át tartó edzése jelentősen megnövelte a maximális kapaszkodási erőt a nem edzett idős kontroll állatokhoz képest. Az önkéntes futó malom kísérletek eredményei az életkor függvényében változtak. A speciális ketrecben eltöltött 2-3 nap után az átlagos futási sebesség egy adott szinten stabilizálódott. Az összes többi mért paraméter (napi maximális sebesség, futási idő és távolság) hasonló tendenciát követett a futás két hetében. Az önkéntes futás minden paramétere csökkenést mutatott a 40. hetes életkor után a kontroll egerekben. Ezenkívül elvégeztük az önkéntes futó malom kísérletet olyan 21 hónapos állatokon is, akik korábban még nem futottak életükben (nem edzett csoport). Az átlagos sebesség és a napi távolság szignifikánsan alacsonyabb volt a nem edzett kontroll csoportban 85 hetes korban. Érdekes módon a nem edzett idős állatok majdnem ugyanannyi időt töltöttek a futókerékben, mint az idős edzett egerek. Összességében ezek a kísérletek egyértelműen jelezték, hogy az egerek öregedése az izomtéljesítményükre negatív hatással van. E jelenség alapjául szolgáló mechanizmusok tisztázása érdekében a továbbiakban részletesen megvizsgáltuk az *in vitro* erőt és az ECC lépéseit.

***In vitro* kísérletek:**

Erő mérés:

Ahogy vártuk, a korral csökken az *in vitro* izomerő a kontroll állatokban. Hogy kiderítsük a hipermuszkuláris fenotípus, az élethosszig tartó edzés, vagy pedig a szelén étrend kiegészítés módosítja-e közvetlenül az izom funkciókat, *in vitro* izomerő mérést végeztünk egy fiatal és négy öreg állatcsoportban. Szignifikáns különbséget találtunk az EDL izmok egyedi összehúzódásainak átlagos amplitúdójában, a Cmpt, a szelénrel etetett, az edzett és a kontroll állatok között. Míg a szelénrel etetés és az egész életen át tartó edzés növelte, addig a Cmpt fenotípus csökkentette a rángások maximális erejét. Hasonló szignifikáns különbséget találtunk a tetanikus erőben is. Érdekes módon ezek a különbségek nem voltak megfigyelhetőek a soleus izomban. Nem volt különbség az egyedi rángás/tetanusz arányban az állatcsoportok között. Ez a paraméter a neuromuszkuláris junkció normális működéséről árulkodik. Továbbá a szelén és az edzés csökkentette az izmok fáradását a 150 tetanuszt tartalmazó protokoll alatt EDL izmokban, viszont az öreg állatok SOL izmaiban nem. Ezzel ellentétben az idős Cmpt egerekből származó mind gyors, mind lassú izmok szignifikánsan fáradékonyabbak voltak, mint az idős kontroll egerek azonos típusú izmai. Nem találtunk szignifikáns különbségeket a fiatal és az idős kontroll egerek között az EDL izmok fáradékonyságában.

Intracelluláris kalcium koncentráció változások ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) öreg állatokban:

Megvizsgáltuk az izomhipertrófia, az edzés és a szelénkezelés hatásait a kalcium-homeosztázisra idős egerek egyedi FDB izomrostjaiban. A rostokat a mérésekhez a kalcium-érzékeny Fura-2 acetoxi-metil (AM) festékkel töltöttünk fel. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szignifikánsan magasabb volt a Cmpt rostokban, mint a kontroll egerekből származóakban. A szelénkezelés és edzés jelentősen csökkentette a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szintet a fiatal állatok szintjére és mindhárom szignifikánsan kisebb volt az öreg egerek izomrostjainak nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentrációjától.

Az SR kalciumtartalmának megállapításához – vagyis az SR-ből felszabadítható kalcium mennyiségének mérésére - 5 másodpercig tartó 120 mM KCl-dal történő depolarizációt alkalmaztunk. A kalcium-tranzienseket ilyen depolarizációkkal idéztünk elő normál (1,8 mM) extracelluláris kalciumkoncentráció jelenlétében. A szelén etetés és az edzés növelte a kalcium-tranziensek amplitúdóját, míg Cmpt állatokban ez kisebb volt, mint a

kontroll egerekben. Az összesített adatok megerősítik, hogy a szelén étrendkiegészítés és az edzés statisztikailag szignifikáns növekedést okozott a $[Ca^{2+}]_i$ változásában a kontroll állatok izomrostjaihoz képest, ami azt mutatja, hogy ilyen körülmények között az SR-ből nagyobb a kalcium felszabadulás mértéke. A szelén majdnem megduplázta, és az edzés csaknem megháromszorozta a kalcium tranziensek amplitúdóját. Ezzel ellentétben a depolarizációval kiváltott kalcium-tranziensek a Cmpt állatokban lényegesen kisebbek voltak, mint a kontroll rostokban.

A tranziensek további vizsgálata bizonyította, hogy az SR-ből felszabaduló kalcium mennyisége az edzés után szignifikánsan nagyobb, és szignifikánsan alacsonyabb a Cmpt állatokban, mint a nem edzett kontroll rostokban, míg ez a szelénkezelés után változatlan volt. Meg kell jegyezni, hogy míg az SR-ből felszabaduló kalcium mennyisége a szelénnel táplált egerekben nem változott, a kalcium tranziens amplitúdója jelentősen megnőtt. Ez az SR kalcium felszabadulásának módosított kinetikájára utalhat, amelyet megerősítettünk az SR Ca^{2+} felszabadulás sebességének (fluxus) kiszámításával. Ez szignifikánsan nagyobbak bizonyult mind a szelénnel táplált, mind az edzett egereknél, míg a Cmpt állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, a nem edzett kontroll egerekhez viszonyítva.

Az idős izom $[Ca^{2+}]_i$ -t szabályozó fehérjéinek összetétele:

Megvizsgáltuk az EC-kapcsolat kulcsfontosságú fehérjéinek expressziós mintázatát a vázizmokban. Érdekes módon a RyR1 erős korfüggő csökkenést mutatott minden nem edzett állatcsoportban, de az edzett egerekben nem. Szembetűnő, hogy az egész életen át tartó futás a teljes hosszúságú RyR1 tartalmat megőrizte a fiatal állatok szintjén. Másrészt a RyR1 kisebb molekulatömegű bomlástermékének szignifikánsan megnövekedett mennyisége figyelhető meg idős állatokban. Ezzel szemben az egész életen át tartó edzés a normál, 550 kDa-os protein szignifikánsan kevesebb bomlását eredményezte. A RyR1 expressziós mintázatát két különböző antitesttel igazoltuk. Érdekes módon, a RyR1-el ellentétben nem volt szignifikáns különbség a SERCA és a DHPR normalizált szintjében az idős állatok különböző csoportjai között. Ezenkívül nem találtunk szignifikáns különbséget a DHPR és a SERCA mennyiségében a fiatal és az idős kontroll állatok között sem. Mivel a szelén etetés hatékonyan ellensúlyozta az izmok teljesítményének életkorhoz kapcsolódó csökkenését (amint azt az előzőekben bemutattuk), és egy korábbi

tanulmányunkban megmutattuk, hogy növeli az izmok szelenoprotein N (Sepn) tartalmát, érdemes volt megvizsgálni, hogy a szelenoprotein N expressziója változik-e az életkorral, és ha igen, vajon a szelén kiegészítése ellensúlyozhatja-e ezt a változást. A 70 kDa-os Sepn expressziója fokozatos csökkenést mutatott az életkorral, a 22 hónapos egereknél 31%-ára csökkent az újszülött állatokban mért értéknek. A szelénnel kiegészített étrend után figyelemre méltó emelkedést figyeltünk meg a szelenoprotein N szintjében. Ezzel párhuzamosan meghatároztuk az idős egerek EDL izmainak átlagos szeléntartalmát, és ez szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a szelénnel táplált egerek izmaiban ($197,1 \pm 6,6$ ng/g, $n=4$, $p<0,05$), mint a kontroll állatokban ($140,5 \pm 1,8$ ng/g, $n=4$).

Megnövekedett ROS-termelés az idős izomban:

Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a RyR1-et az oxidatív stressz befolyásolja, és ezért feltételeztük, hogy a szelenoproteinek védhetnek a ROS rianodin receptorra kifejtett negatív hatása ellen. A fenti eredmények arra utalnak, hogy az idős állatok izmai fokozottabb oxidatív stressznek lehetnek kitéve, mint a fiatal egerekből származóak. Ennek a hipotézisnek a megerősítésére megvizsgáltuk az izomrostok oxidatív állapotát a ROS-termelés mérésével. E célból a fiatal (4 hónapos) és az idős (22 hónapos) egerek FDB izmaiból izolált rostokat Dihydroethidium-mal töltöttük fel, és a festék fluoreszcenciáját regisztráltuk egy fárasztási protokoll előtt (F_b) és azt követően (F_f). A protokoll 150 darab tetanuszból állt, amit 50 Hz frekvenciával adott 2 ms hosszú négyzet impulzusok váltottak ki. A ROS-termelést a háttérre korrigált fluoreszcenciák (F_f/F_b) arányának kiszámításával számszerűsítettük. Ez az érték szignifikánsan magasabb volt a fárasztásos protokoll után az öregek egerek esetében ($1,54 \pm 0,14$, $n=4$, $p<0,05$), a fiatal izomrostokhoz viszonyítva ($1,11 \pm 0,07$, $n=6$). Ez megerősítette azt a feltevésünket, hogy az öreg izmok fokozott oxidatív stressznek vannak kitéve.

Az sAnk1 KO egerekből származó vázizom rostoknak csökken az SR kalcium tartalma:

Munkánk második részében szintén az öregedés hatását vizsgáltuk a vázizmok működésére egy speciális egérmodellben. Ezekben az állatokban az SR lokalizálásában kulcsfontosságú szerepet játszó sAnk1 fehérje hiányzott. Korábbi vizsgálatokban már kimutatták, hogy az életkor növekedésével az sAnk1 KO egerekből származó izomrostokban súlyos szerkezeti károsodások alakulnak ki. Ezért megvizsgáltuk, hogyan változik a vázizmok kalcium homeosztázisa ebben az egérmodellben a kor előrehaladtával.

Az sAnk1 hiányának hatását a Ca^{2+} homeosztázisra 4 hónapos (fiatal) és 10 hónapos (öreg) egerekből származó egyedi FDB rostokon vizsgáltuk.

Először megmértük a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot a kontroll és sAnk1 KO egerekből származó nem ingerelt FDB rostokon. A mérések alapján a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nem különböztek szignifikánsan sem a 4, sem a 10 hónapos sAnk1 KO egerekből származó FDB rostokban a kontrollhoz viszonyítva. Kalcium mentes extracelluláris oldatban, kalcium felszabadulást okozó oldattal (releasing koktél) való kezelés hatására kialakuló reprezentatív Ca^{2+} tranziensek jönnek létre. A Ca^{2+} eltávolítása az extracelluláris oldatból alkalmanként depolarizálhatja a rostokat, aminek következtében enyhe növekedés következhet be a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban (ez látható a tranziensek előtt). A releasing koktél adagolása a kontroll egerekből származó rostokon nagy Ca^{2+} tranzienseket eredményezett, ami már akkor el kezdett csökkenni a kalcium raktár ürülésének eredményeként, amikor a koktél még jelen volt a rostokon. A genetikailag módosított egereken végzett mérésekből azt kaptuk, hogy a Ca^{2+} tranziensek amplitúdójának átlagos változása ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) szignifikánsan kisebb volt a 4 és 10 hónapos KO egerekből származó rostokban, az azonos korú kontroll egerekhez viszonyítva. Ez arra utalhat, hogy az SR térfogat, és így a teljes Ca^{2+} tartalma kisebb az sAnk1 KO egerekben, mint a kontroll egerekben.

A következőkben $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat teljes sejtes feszültség clamp technika alkalmazásával vizsgáltuk, úgy hogy fokozatosan növeltük a membrán depolarizációt -60 mV és +30 mV között. A Ca^{2+} tranziensek amplitúdójában lévő átlagos változások szignifikánsan kisebbek voltak a 4 hónapos KO egerek esetén a kontrollhoz viszonyítva. Hasonló kísérletek során a 10 hónapos egerek esetén is megfigyeltünk különbséget a sAnk1 KO és kontroll állatoknál, viszont ez nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Amikor kiszámítottuk a teljes felszabadult Ca^{2+} mennyiséget a legnagyobb depolarizációs pulzus (+30 mV) alatt, csak a 4 hónapos egerek esetén találtunk szignifikáns különbséget a sAnk1 KO és kontroll egerek között, viszont a 10 hónaposak esetében már nem. A tranziensek feszültség-függését leíró Boltzmann függvény paramétereit csak kismértékben befolyásolta a sAnk1 hiánya a fiatal és öreg állatoknál, bár az utóbbiaknál a függvény kevésbé volt meredek. Érdekes módon, a Boltzmann görbék középső pontjához tartozó feszültség jobbra tolódott majdnem 20 mV-al, azaz a pozitívabb feszültség felé mind a két öreg (10 hónapos) állatcsoport esetében.

Annak kiderítése érdekében, hogy a releasing koktéllal végzett kezelés után megfigyelt, vagy a membrán depolarizáció indukálta csökkent Ca^{2+} tranziensek a SERCA pumpa megváltozott kalcium transzport eredményeként keletkeztek-e, kiszámoltuk a pumpa maximális Ca^{2+} szállítási sebességet ($V_{\max}$) a kontroll és a sAnk1 KO egerek rostjaiban. Az analízis alapján kiderült, hogy a $V_{\max}$ jelentősen csökkent az öreg állatokban a fiatalokhoz képest mind a kontroll ($p=0,0057$), mind a sAnk1 KO csoportban ($p<0,0001$). Ez arra utal, hogy a Ca^{2+} tranziensek figyelemre méltó, de statisztikailag nem szignifikáns csökkenése az életkorral részben magyarázható az alacsonyabb SERCA pumpa aktivitással. Ugyanakkor a kontroll és az sAnk1 KO izomrostok között 4 hónapos korban megfigyelt Ca^{2+} tranziensek különbsége nem tulajdonítható a SERCA pumpának, mivel ebben a korban nem volt különbség a $V_{\max}$ -ban a két genotípus között ($4,72\pm0,08$ és $4,79\pm0,07 \text{ mM s}^{-1}$, $p=0,54$, $n=9$ mindkét csoportban).

A spontán Ca^{2+} felszabadulási események (CRE) kisebbek sAnk1 KO egerekben:

A spontán Ca^{2+} felszabadulási események mérése a szaponinnal permeabilizált izomrostokban lehetőséget nyújt a RyR1 funkcionális tulajdonságainak natív környezetben történő tanulmányozására, függetlenül a DHPR kontrolljától. Ezzel a módszerrel teszteltük, hogy a sAnk1 hiánya befolyásolja-e a spontán Ca^{2+} felszabadulást az SR-ből. A spontán CRE méréseket konfokális mikroszkópon kétdimenziós (XY) képalkotással végeztük 4 és 10 hónapos kontroll és sAnk1 KO egerekből származó fluo-3-mal feltöltött FDB izomrostokon.

A CRE-k gyakoriságának jelentős csökkenését észleltük a 4 hónapos sAnk1 KO egerek rostjaiban, összehasonlítva az azonos korú kontroll egerekkel. A CRE-k gyakorisága csökken a 10 hónapos kontroll egerek rostjaiban is a fiatal kontroll állatokhoz képest. Öregkorban azonban a KO és a kontroll egerek között nem észleltünk további különbséget a CRE-k frekvenciájában.

Ezt követően kiszámoltuk az átlagos CRE amplitúdót (F/F_0), és szignifikáns csökkenést találtunk a 4- és 10 hónapos KO egerekben az azonos korú kontrollhoz viszonyítva. A CRE-k amplitúdóinak eloszlását elemezve azt mutattuk ki, hogy a kisebb amplitúdójú CRE-k nagyobb frekvenciával voltak jelen a KO állatokban az azonos korú kontrollhoz viszonyítva. A CRE-k térbeli kiterjedésének elemzése azt mutatta, hogy az események maximumának

felénél mért szélessége (FWHM) mind a Z-vonalakkal párhuzamosan (FWHM-X), mind arra merőlegesen (FWHM-Y) jelentősen csökkent a 4- és a 10 hónapos KO egerekben is. Ez együtt járt a megnövekedett számú kis amplitúdójú CRE-vel a KO egerek rostjaiban. Ezek a változások egyértelműen tükröződtek a felszabadult Ca^{2+} számított mennyiségében, amelyet a CRE-k alatt a jelsűrűséggel (SM) becsülnek meg. Az sAnk1 hiányát az SM jelentős csökkenése kísérte, az egerek korától függetlenül. Ezek az adatok azt jelzik, hogy az SR-ben az azonnali felszabaduláshoz rendelkezésre álló Ca^{2+} mennyisége csökken, vagy a Ca^{2+} csatornák nyílása károsodott, esetleg ez egyszerre is megtörténhet.

Összefoglalás

A szarkopénia, az öregedéssel járó izomtömeg- és izomerővesztés, ami az előregedő társadalom életminőségét negatívan befolyásoló, fizikai teljesítményt és napi aktivitást erősen korlátozó betegsége. Az izmokat érintő elváltozások esélye nőhet az esszenciális nyomelem szelén hiányában, ami izomfájdalmat, fáradást és gyengeséget is okozhat. Hasonló negatív következményei lehetnek izom specifikus fehérjék hiányának is már fiatal és öregkorban is.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az önkéntes futás mértéke, a maximális rángás és tetanuszos erő, valamint az izmok belső raktáraiból felszabadult Ca^{2+} mennyisége csökkent, míg a reaktív oxigén gyökök termelése, megnőtt az idős egerek esetén, a fiatal állatokhoz képest. Ezek a változások a kalciumcsatorna RyR1 és a Selenoprotein N tartalom csökkenésével és a RyR1 bomlásának növekedésével jártak együtt. Mind az egész életen át tartó edzés, mind a rövid távú szelén étrend kiegészítés képes volt kompenzálni az izomerő és az SR-ből történő Ca^{2+} felszabadulás csökkenését idős egerekben. Viszont a fiatal korban megjelenő izomtömeg növekedés erre nem volt képes, amit miosztatin hiányos egereken végzett kísérleteink bizonyítottak. A szelén étrend-kiegészítés szignifikánsan növelte a Selenoprotein N szintjét az öreg egerekben és megmutattuk, hogy izmokra kifejtett jótékony hatása RyR1 független útvonalon keresztül valósul meg.

Megvizsgáltuk az SR normális elhelyezkedéséért felelős sAnk1 hiányos egerekben az SR kalcium tartalmát, ami jelentősen lecsökkent a fiatal és idős sAnk1 KO állatokban, míg a járulékos strukturális módosulások csak az öregedés során jelentek meg. Bebizonyítottuk, hogy az sAnk1 hiánya az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázist is befolyásolja. Míg a nyugalmi citoszolikus Ca^{2+} szint nem változott a sAnk1 KO egerekből származó rostokban, a depolarizáló pulzusokkal kiváltott Ca^{2+} tranziensek amplitúdója lecsökkent bennük a feszültségfüggésük megváltozása nélkül. Továbbá a szaponinnal permeabilizált rostokon végzett spontán Ca^{2+} felszabadulási események (sparkok) elemzése azt mutatta, hogy a sparkok gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt a fiatal és idős KO egerek esetén is, a kontrollhoz viszonyítva. Ezenkívül, a sparkok amplitúdója és térbeli kiterjedése, és így a felszabaduló kalcium mennyisége is szignifikánsan kisebb volt a KO állatokban.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy eredményeink alapján a mérsékelt edzésnek és a szelén étrend kiegészítésnek jótékony hatása van az SR-ből

történő kalcium felszabadulásra és az izomerőre öreg korban, míg a megnövekedett izomtömeg nem javítja a fizikai teljesítményt az öregedés során. Továbbá a sAnk1 hiánya nem csak az SR struktúrájára van negatív hatással, hanem annak csökkent Ca^{2+} raktározási kapacitását is okozza, ami végül kisebb Ca^{2+} felszabadulást és következményesen gyengébb izomerőt eredményez. Eredményeink az időskori szarkopénia és genetikai eredetű izombetegségek új terápiás lehetőségei előtt nyithatnak utat.



**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/221/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Al-Gaadi, Dana
Neptun kód: EB7LHF
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10058622

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Fodor, J., **Al-Gaadi, D.**, Czirják, T., Oláh, T., Dienes, B., Csernoch, L., Szentesi, P.: Improved Calcium Homeostasis and Force by Selenium Treatment and Training in Aged Mouse Skeletal Muscle.
Sci. Rep. 10, 1707, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-58500-x>
IF: 3.998 (2019)
2. Pierantozzi, E., Szentesi, P., **Al-Gaadi, D.**, Oláh, T., Dienes, B., Sztretye, M., Rossi, D., Sorrentino, V., Csernoch, L.: Calcium Homeostasis Is Modified in Skeletal Muscle Fibers of Small Ankyrin1 Knockout Mice.
Int. J. Mol. Sci. 20 (13), 3361, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20133361>
IF: 4.556





További közlemények

3. Sztretye, M., Geyer, N., Vincze, J., **Al-Gaadi, D.**, Oláh, T., Szentesi, P., Kis, G., Antal, M.,
Balatoni, I., Csernoch, L., Dienes, B.: SOCE Is Important for Maintaining Sarcoplasmic
Calcium Content and Release in Skeletal Muscle Fibers.
Biophys. J. 113, 2496-2507, 2017.
IF: 3.495

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,049

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,554**

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

Debrecen, 2020.07.03.

