

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Singlár Zoltán

Témavezető: Dr. Sztretye Mónika



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

A karotinoid táplálékkiegészítők hatásai az izomteljesítményre és a kalcium-homeosztázisra

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

Írta: Singlár Zoltán, okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Sztretye Mónika

Az értekezés bírálói:

Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Enyedi Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Papp Zoltán, MTA doktora
tagok: Dr. Kiss Andrea, PhD
Dr. Enyedi Balázs, PhD
Dr. Dr. Tóth Melinda, PhD
Dr. Sarang Zsolt, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati Intézet
"A" épület
2024. november 29, 12 óra

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; ezek a simaizom, a szívizom és a vázizom. Míg a simaizmok nem rendelkeznek szabályosan elhelyezkedő szarkomerákkal, a szív- és vázizom sejtek jól szervezett harántcsíktolt struktúrát tartalmaznak, amely fénymikroszkóppal jól megfigyelhető.

A vázizom speciális membrán rendszerei

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. 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. A T-tubulusok az A és I vonalak mentén helyezkednek el a vázizomban. 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.

A vázizom elektro-mechanikai kapcsolata

Az izomösszehúzódást és relaxációt a citoplazma Ca^{2+} szintjének gyors változása szabályozza. Egy fiziológiásan működő vázizomszövetben az összehúzódás az elektro-mechanikai kapcsolattal (Excitation Contraction

Coupling, ECC) jön létre, melynek során az akciós potenciál (elektromos jel) Ca^{2+} -felszabadulást (mechanikai válasz) eredményez. Ennek a jelátalakításnak a helyszínei a fentebb említett triádok, ahol az ECC során mechanikai kölcsönhatások alakulnak ki a feszültségfüggő L-típusú Ca^{2+} -csatornának (CaV1.1) vagy másnéven dihidropiridin-receptorok (DHPR), és az I-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 kalciumcsatornának megnyílásához vezet. A Ca^{2+} ezt követő gyors és masszív felszabadulása a mioplazmába indítja el az izomösszehúzódást. A myoplazmatikus 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, előkészítve az izmot az ECC következő ciklusára.

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 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 F1/F₀ ATPáz ATP-szintetizáló aktivitását.

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).

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 fúziójában, míg az optic atrophy 1 (OPA1) a belső mitokondriális membrán 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. 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

A patológiai állapotok mellett, az öregedés is egy olyan tényező, amely hatással van a mitokondriumok működésére. Az öregedés és korrall járó betegségek kialakításában a mitokondriumot tekintik a legfőbb mediátornak, ugyanis a sejtorganelum nem megfelelő működése hozzájárul több humán betegség kialakulásához.

Reaktív oxigén gyökök

Az "Öregedés Szabadgyök-elméletét" a múlt század 50-es éveiben Hartman fogalmazta meg, 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.

Az intracelluláris ROS leggyakoribb formái közé tartoznak a szuperoxid anion (O_2^-), a hidroxil gyök ($\bullet OH$), a hidrogén peroxid (H_2O_2) és a lipid hidroperoxidok (LOOH). A ROS molekulák legnagyobb hányada a vázizomban termelődik kontrakció közben, de nyugalmi állapotban is. A legfőbb ROS molekula a O_2^- forma, ami sok sejtalkotóban termelődik a sejt működése során, beleértve a peroxiszómákat, az endoplazmatikus retikulumot, valamint a mitokondriumokat.

Az emlős sejtekben az ATP fő forrása a mitokondriális elektrontranszport lánc, amely legalább 11 különböző helyen tud O_2^- molekulákat előállítani a belső mitokondriális membrán mindkét oldalán.

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.

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 mozgásképesség romlása jelentkezik, ami rontja az idősök életminőségét. Napjainkban a világ népességének egyre nagyobb hányada időskorú, 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. 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.

Az izomerő csökkenés egy másik magyarázata lehet az SR megváltozott Ca^{2+} kibocsátása is, amit a RyR1 oxidatív stressz általi módosulása válthat ki.

A szarkopénia az öregedéssel együtt járó vázizom mennyiség csökkenését 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 jellemzik. Az izomtömeg csökkenése főként a rostok számának és méretének csökkenése miatt következik be; ugyanakkor az összejt-kimerülés következményeként megjelenő neuromuszkuláris junkciók degenerációja is megfigyelhető, ami miatt bekövetkezik a motoros egységek elvesztése.

A Ca^{2+} homeosztázis szabályozásának zavara és a fokozott oxidatív stressz és ROS termelődés olyan mechanizmusok, amelyek hozzájárulnak az izomerő korfüggő csökkenéséhez.

Oxidánsok és antioxidánsok

A sejtorganellek vagy citoplazmatikus enzimek által termelt $O_2^{\cdot-}$ gyorsan átalakul H_2O_2 -vé, és ezt a folyamatot a szuperoxid diszmutáz (SOD) izoformák katalizálják. A H_2O_2 számít az elsődleges redox szignalizációs molekulának a biológiai jelenségek redox szabályozásában.

Antioxidánsok

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

Az A-vitamin (retinol) szintén részt vesz a redox-folyamatokban, és potenciális antioxidánsnak tekinthető a testmozgás okozta oxidatív stresszben. Azonban egyes vizsgálatokban hatása nem volt előnyös, mivel a vázizomzatban növelte az oxidatív stresszt, ami szövetkárosodáshoz vezetett.

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. Az antioxidánsok másik hatásmechanizmusa a szervezet antioxidatív géneinek az aktiválása, az LDL koleszterin oxidációjának a megakadályozása, és így antiapoptotikus védelmet biztosítanak az agynak, a szívnek és a májnak

Mivel az antioxidánsok képesek a ROS túlermelés visszaszorítására, így feltételezés szerint az öregedés folyamatát is képesek lehetnek lelassítani.

A karotinoidok és hatásmechanizmusuk

A karotinoidok az A-vitamin prekursorai, amik természetes pigmentjei a gyümölcsöknek és zöldségeknek. Nagyszámú konjugált kötéseinek köszönhetően biztosítják a sárga, narancs vagy vörös színt a természetben.

Kémiai szerkezetük szerint két fő csoportba sorolhatjuk őket:

1.) karoténok, más néven karotinoidok, csak hidrogént és szenet tartalmaznak;

2.) xantofillok, amelyek többféle oxigéntartalmú funkciócsoportot 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. Szerepet játszanak bizonyos epitél sejtek differenciációs folyamatában, valamint a látás, növekedés, reprodukció és fertőzés elleni védelemben is fontosak.

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. Szerepet játszanak bizonyos epitél sejtek differenciációs folyamatában, valamint a látás, növekedés, reprodukció és fertőzés elleni védelemben is fontosak.

Geroprotektív karotinoidok: astaxanthin (AX) és krill olaj

A xantofilok csoportjába tartozik az utóbbi időben kiemelt figyelmet élvező astaxanthin (AX), amit először Kuhn és Soerensen izolált homárból. 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 élénkvirőrs, 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 és feldolgozástól függően 0,1 és 1,5 mg/ml között tartalmaz astaxanthint. A krill olaj az AX mellett tartalmaz A- és E-vitamint, ásványi anyagokat, ω -3 telítetlen zsírsavakat (ω -3 polyunsaturated fatty acids, 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.

Az AX hatásai vázízomban

A vázizom fiziológiás működése során mitokondriális vagy azon kívüli forrásokból, mint például NADPH-ből származó nitrogén oxigén gyökök (nitric oxygen species, NOS) és ROS keletkezik. Edzés során a szervezetünk fenntartja a megfelelő oxidatív egyensúlyt, amit egy kifinomult belső antioxidáns rendszerrel ér el. Mindehhez 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, szükség van specifikusabban működő antioxidánsok használatára.

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 sprintfutás után. 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. Több adat is utal arra, hogy az AX képes védeni a mitokondriumokat az oxidatív stressztől a membrán permeabilitásának köszönhetően. Ezért az AX kiemelkedő szerepet játszhat az aktív életmódot folytató emberek és sportolók számára, akiknek fontos a magasabb teljesítmény és gyorsabb felépülés.

Céltűzés

Az izommunka révén termelődő reaktív oxigén gyökök 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 kalciumfelvételtre 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 fogalmaztunk 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 táplálékkiegészítés 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/B16 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 óras sötét és 12 óras világos ciklusban történt.

Astaxanthin és krill olaj táplálékkiegészítés

A kísérleteink során AstaReal A1010-et (AstaReal Co., Ltd., Nacka, Svédország) használtunk, egy astaxanthin tartalmú természetes biomassa 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.

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 rágcsálótápot kaptak, 25 g/kg végkoncentrációban szintén 4 héten át.

In vivo kísérletek

Testsúlymérés

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 eger 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 olajjal történő táplálékkiegészítés tanulásra és memóriára gyakorolt hatásának értékelésére a Barnes Maze protokollt 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 eger 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 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 célyukig megtett időt és távolságot.

In vitro kísérletek

A kísérleti állatok feláldozásához cervikális diszlokációt alkalmaztunk CO₂ túladagolást követően. Az egerek hátsó lábából kiprobaráltuk 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.

Izomerőmérés

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 platinaelektródát 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 kollagenáz 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 oldatba* 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 $k_{ON} = 0,07 \mu\text{M}^{-1} \text{ms}^{-1}$.

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.

Egyes kísérletekben, az izolált FDB rostokat 10 μ M retinol-al előkezeltük 3 órán át normál Tyrode oldatban, 4 °C-on.

III. 4. 4. Mitokondriális kalciumfelvétel mérés

A mitokondriális kalciumszint változásait az egyedi FDB rostokban Ainbinder 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 μ M 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 csúcsértékei (I-csík fluoreszcencia, mitokondriumot reprezentálva, $F_{I-csík}$) és a mélypontok (A-csík, fluoreszcencia, alapvonal, $F_{A-csík}$) ismeretében számítottuk ki az alábbi egyenlet segítségével:

$$F_{mito} = (F_{I-csík} - F_{A-csík}) / F_{A-csík} \quad \text{Eq. (2)}$$

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.

Western Blot

Western blot kísérletekhez a teljes sejtlizátumot a *m. glutealis*-ból mechanikus erő kivonásos módszerrel izoláltuk. A szövetmintákból sejtlizátumokat 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-dodecyl-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 fehérjekötő 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 torna-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 egyetlen 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.

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 rágsálótáppal (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).

A fiatal felnőtt állatok *in vivo* izomteljesítményének 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.

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.

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. Ez némileg előrelátható volt, mivel az EDL izmok keresztmetszete nem különbözött a csoportok között ($1,30 \pm 0,07$ mm² a CTRL és $1,27 \pm 0,05$ mm² az AX esetében). Ezzel ellentétben, az AX etetés jelentősen megnövelte a tetanusz alatt kifejtett erőt. 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.

Amikor öregedő egerek esetén vizsgáltuk az AX és krill olaj táplálékkiegészítés hatásait, azt találtuk, hogy jelentősen megnövekedett a normalizált egyszeri rángások ($1,65 \pm 0,12$ mN/mm² CTRL esetében, $3,06$

$\pm 0,63$ mN/mm² AX és $2,33 \pm 0,38$ mN/mm² Krill esetében) (twitch) és a tetanusok amplitúdója a kezelt állapotokban ($8,13 \pm 0,40$ mN/mm² CTRL esetében, $14,52 \pm 2,94$ mN/mm² AX és $10,24 \pm 1,11$ mN/mm² Krill esetében). 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. 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.

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.

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 ($V_{50} = 1,07; -5,80; \text{és } -8,77$ mV valamint $1/k = 11,35; 12,78; \text{és } 8,65$ a CTRL, AX és krill olaj csoportoknál).

A fluoreszcencia intenzitás csúcsertékéből számolt kalciumtranziensek 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). 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 retinol módosítja a Ca^{2+} felszabadulást vázizomban

A következő kísérletsorozatban $10 \mu\text{M}$ retinol akut hatását vizsgáltuk a vázizom elektro-mechanikai kapcsolat működésére. A retinol szerkezetileg hasonló az AX-hez, de az intracelluláris metabolizmusa eltérő. Eredményeink azt mutatják, hogy a retinol akut alkalmazása eltolta a kalciumtranziensek fél aktivációs feszültségét és megváltoztatta azok meredekségét ($1/k = 7,91$ és $14,76$ mV, valamint $V_{50} = -13,03$ és $-8,52$ mV a CTRL és retinol csoportoknál). A kapott pontok átlagos értékekre Boltzmann-függvényt illesztettünk. Ez a hatás a raktárból felszabaduló kalcium csúcsertékének jelentős csökkenésével járt együtt a retinol-al előkezelt rostok esetében.

A következő kísérletsorozatban $10 \mu\text{M}$ retinol akut hatását vizsgáltuk a vázizom elektro-mechanikai 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 meredekségét ($1/k = 7,91$ és $14,76$ mV, valamint $V_{50} = -13,03$ és $-8,52$ mV a CTRL és retinol csoportoknál). A kapott pontok átlagos értékeire Boltzmann-függvényt illesztettünk az Eq. (1) alapján. Ez a hatás a raktárból felszabaduló kalcium csúcsertékének jelentős csökkenésével járt együtt a retinollal előkezelt rostok esetében.

Mivel a Ca^{2+} visszavétele a raktárba a nyugalmi SR kalciumtartalom legfőbb szabályozója, kíváncsiak voltunk, hogy az azonnali – aktiválástól aktiválásig terjedő – Ca^{2+} visszavétel is módosítja-e a két vizsgált hasonló szerkezetű vegyület. A szerek hatásának tesztelésére maximális depolarizációjú tetanusz sorozatot alkalmaztunk 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 fiziológiás izomösszehúzódás során fellépő tetanuszos rángásokkal.

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. Mindhárom esetben, a fluoreszcencia csökkenést egy exponenciális függvénnyel illesztettük meg. 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

Az átlagos F/F_0 csúcs fluoreszcencia értékekben nem figyeltünk meg szignifikáns változást a vizsgált csoportok között, 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.

A karotinoid táplálékkiegészítés változó hatásai az aktivitás-függő mitokondriális kalciumfelvétellel

A rost tengelyével párhuzamosan átlagolt fluoreszcencia a tetanuszos stimulációt követően növekszik, ám az átlagos fluoreszcencia-növekedés kisebbnek bizonyult az AX-al etetett egércsoport rostjai esetében.

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.

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 háttérében 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, 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.

A CB1 transzkriptumok változatlanok maradtak négy hét speciális étrend után. 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-kvantitatív Western blot módszerrel megvizsgáltuk a kapcsolódó fehérjeszinteket, ám nem találtunk szignifikáns változást az étrendkiegészítés után. 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 dinaminhoz kapcsolódó protein 1-től (Drp1) függ. Az AX etetést követően qPCR méréseink szignifikánsan megnövekedett Drp1 transzkriptum-szintet mutattak ki, 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.

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 idősebb egereken. Az ismételt kísérletek során megfigyelt különbségek (ha vannak) a menekülési lyukig megtett látenciában (időtartamában) és távolságában (útvonalában) várhatóak, amik a hippokampusz-függő memóriafunkció indikátoraként értelmezhetők. 8-8 kontroll és krill olajjal etetett egeret az akvizíciós időszakban képeztünk ki 10 egymást követő napon, majd háromnapos pihenőidő után vak tesztet végeztünk. Az akvizíciós napokon a célylyukba való belépésig eltelt időt (látencia) és az addig megtett távolságot mértük centiméterben.

A kísérlet eredményeként elmondható, hogy a krill olajjal etetett egerek a kísérlet alatt gyorsabban megtanulták a célylyuk elhelyezkedését és céltudatosabbak voltak, mint a kontroll állatok, ugyanis szignifikáns különbséget (* $p < 0,05$) találtunk a két állatcsoport között a látenciában (4–6. nap) és a megtett távolságban (6. nap). 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

Táplálékkiegészítők és vázizom teljesítmény

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

Keveset tudunk viszont a retinol vázizom típusú ECC mechanizmusra kifejtett hatásairól. Az általunk végzett FDB izomrostok akut kezelése 10 μM retinol-al egyértelműen a feszültségaktivált kalcium tranziensek V_{50} értékében eltolódást eredményezett és jelentősen csökkentette a kalciumtranziesek F/F_0 csúcsát is.

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, miközben azonos mennyiségű egértápot fogyasztottak, mint a kontroll csoport egerei (~0,2 g/nap/ttg). Ez összhangban van Ikeuchi és munkatársai munkájával, 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.

AX és mitokondriális Ca^{2+} jelátvitel

A mitokondriumok mintegy 10-18% -ban veszik fel a kalciumot a mitokondriális uniporter (MCU) és más alternatív csatornák segítségével. 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. 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, az AX kezelés kis mértékben módosíthatja az MCU kalciumérzékeny szabályozójának (MICU1) expressziós szintjét a vázizomban, 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. Bármelyik eset is valósul meg, vélhetően intenzív edzés során a mitokondriális kalcium felvétel lehet az egyik védelmi mechanizmusunk a kalcium túlterhelés, másnéven overload ellen. Másrésztől, 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. 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 deléció 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. 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. További feltételezésünk szerint az AX javítja az ADP foszforilációt, így növelve az izomerőt és ennek kompenzálására fog megőzni a zsírsavcsere.

AX és glükóz metabolizmus

Mivel az AX-t metabolikus változásokkal hozták összefüggésbe, azt feltételeztük, hogy hasonlóan a retinsavhoz, az AX is javítja az izomteljesítményt azáltal, hogy, növeli a glükózfelvételt és/vagy a glikogén raktárokat. 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 izomteljesítményt a glükózfelvétel és glikogén raktárak növelésével.

Mivel az AX-t metabolikus változásokkal hozták összefüggésbe, azt feltételeztük, hogy hasonlóan a retinsavhoz, az AX is javítja az izomteljesítményt azáltal, hogy növeli a glükózfelvételt és/vagy a glikogén raktárokat. 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 izomteljesítményt azáltal, hogy több energiát biztosít a vázizomnak a glükózfelvétel és glikogén raktárak növelésével.

Táplálékiegészítők és izomteljesítmény idősebb korban

Az antioxidánsok, mint például a C-, E-, A-vitamin, valamint az általunk is vizsgált xanthophyll 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. 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.

Jelen kutatásban mind a fiatal és az idősebb 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 eger 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 energiateljesítést 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. Továbbá olyan molekuláris változások alakulhatnak ki, amelyek mennyiségi (csökkent expressziós) és funkcionális módosításokat okoznak az L-típusú feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornában. Az öregedő egerekből származó vázizomrostokban a DHPR és a RyR1 funkcionális szétkapcsolása csökkenti a kalciumfelszabadulását az SR-ből. 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.

A négyhetes, antioxidáns étrendet alkalmazását követően nem tapasztaltunk szignifikáns változást sem a depolarizáló impulzusok által kiváltott kalcium jelekben, sem a kalcium tranziensek csúcserőitében, a Ca^{2+} felszabadulás fluxusában, és a felszabaduló kalcium mennyiségében

Táplálékkiegészítők és mitokondriális funkció

Míg fiatal felnőtt egerekben az AX-kiegészítés kedvezően csökkentette az aktivitásfüggő mitokondriális kalcium felvételt, öregedő egereknél nem észleltünk hasonló hatásokat. 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 kifejtse kedvező hatását. Az idősödő egereknél -ahol az oxidatív stressz és a ROS termelés kiemelkedőbb- alkalmazott, hasonló időtartamú etetés valószínűleg nem volt elégséges.

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. Ainbinder és munkatársai 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 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. Fontos megjegyezni, hogy a kapcsolódó fehérjeszintek mennyiségi meghatározásakor 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 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.

Krill olaj és a tanulási képesség

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. 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.

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 találhatóak, ezért kevésbé bioaktívak, mint a krill olajban, ahol főleg foszfolipidek formájában találhatóak (2:1 arányban). Így biológiailag könnyebben hozzáférhetőek, különösen az agy számára, amely akár 60%-ban áll lipidekből (ennek nagy része PUFA, túlnyomórészt DHA). Ellentmondásos információk állnak rendelkezésre a halolaj-kiegészítés egerekre gyakorolt hatásairól. Eredményeink 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.

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 oxigényökök, 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. Mindeddig 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 idősödő 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 égerétapot, 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 etetési protokollt alkalmaztuk idősödő egereken, viszont itt egy harmadik csoportot is kialakítottunk, amely krill olajjal kiegészített tápot 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 enzimatikusan 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 csúcsértékét. Az aktivitás-függő mitokondriális kalciumfelvétel kisebb volt az AX csoportban fiatal egyedek esetén, míg idősödő 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.

Publikációs lista



**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 alapján 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., Vakizadeh, 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.**, Gönöcz, 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. Sztrétye, 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 alapján szolgáló közleményekre):
13,987**

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, 2024.05.16.

