

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Al-Gaadi Dána

Témavezető:

Dr. Szentesi Péter



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola

DEBRECEN

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések	3
I. Irodalmi áttekintés	5
I.1. A vázizom.....	5
I.1.1 A vázizom felépítése és működése.....	5
I.1.2 A vázizom típusai.....	6
I.1.3. A vázizom növekedésének szabályozása.....	7
I.2. Az izomrostok felépítése	7
I.3. Ankyrin.....	10
I.4. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat (ECC).....	11
I.5. A kalcium felszabadulási események vizsgálata.....	13
I.6. <i>Cmpt</i> állatmodell	13
I.7. Az öregedés hatása a vázizmokra.....	14
I.8. Az oxidatív stressz és antioxidánsok hatása vázizmokban	15
I.9. A szelén mint antioxidáns.....	15
II. Célkitűzések.....	16
III. Anyagok és módszerek.....	17
III.1. Állatmodell	17
III.2. A szelén diéta leírása	17
III.3. <i>Cmpt</i> egér modell	17
III.4. <i>sAnk1</i> KO egér modell	18
III.5. <i>In vivo</i> kísérletek.....	18
III.5.1. Önkéntes futómalom mérések.....	18
III.5.2. Grip teszt	18
III.6. <i>In vitro</i> kísérletek.....	18
III.6.1. Izomerő mérés.....	18
III.6.2. Egyedi vázizom rostok izolálása.....	19
III.6.3. Teljes sejtes intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérés.....	20
III.6.4. Elemi kalciumfelszabadulási események (CREs) mérése permeabilizált izomrostokban...	23
III.6.5. Feszültség clamp mérések és Ca^{2+} -tranzien্স analízis	24
III.6.6. ROS mérések.....	25
III.6.7. Western blot analízis	25
III.6.8. Az izmok szeléntartalmának meghatározása	27
III.7. Adatelemzés és statisztika.....	27

IV. Eredmények	29
IV.1. <i>In vivo</i> kísérletek.....	29
IV 2. <i>In vitro</i> kísérletek.....	31
IV.2.1. Erőmérés	31
IV.2.2. Intracelluláris kalciumkoncentráció változások ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) öreg állatokban.....	35
IV.2.3. Az idős izom $[Ca^{2+}]_i$ -t szabályozó fehérjéinek összetétele.....	37
IV.2.4. Megnövekedett ROS-termelés az idős izomban	40
IV.2.5. SAnk1 KO egerekből származó vázizom rostoknak csökken az SR kalciumtartalma	42
IV.2.6. A spontán Ca^{2+} felszabadulási események (CRE) kisebbek sAnk1 KO egerekben	46
V. Diskusszió.....	49
V.1. Az öregedés hatása az izmok teljesítményére	49
V.2. A hosszú távú edzés hatása az izmok teljesítményére.....	49
V.3. A RyR1 expressziója idős korban.....	50
V.4. Az izomtömeg és a kontraktilis erő közötti ellentmondás.....	51
V.5. A szelén hatása az izom teljesítményre	51
V.6. A szelén étrend kiegészítés és a szelenoprotein tartalom öregkorban	53
V.7. Az sAnk1 hiányának hatása a Ca^{2+} homeosztázisra.....	53
V.8. A Ca^{2+} -tárolás csökkenése	54
V.9. A SERCA pumpa aktivitása.....	54
V.10. Kitekintés.....	55
VI. Összefoglalás	56
VII. Summary	57
VIII. Irodalomjegyzék	58
IX. Tárgyszavak	67
X.Függelék	67
XI. Közlemények listája	68
Köszönetnyilvánítás.....	70

Rövidítések

ATP: adenosin trifoszfát

BTS: N-benzyl-p-toluene Sulphonamide

Ca²⁺: kalciumion

$\Delta[Ca^{2+}]_i$: intracelluláris Ca²⁺-koncentráció változása

CICR: kalciumindukált kalciumfelszabadulás (Calcium-Induced Calcium Release)

CMM: Casual mediation model

Cmpt: Compact genotípusú egér

CO₂: szén-dioxid

DHPR: dihidropiridin receptor

ECRE: elemi kalciumfelszabadulási esemény (Elementary Calcium Release Event)

EDL: *m. extensor digitorum longus*

EGTA: ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

FDB: *m. flexor digitorum brevis*

FWHM: térbeli félérték szélesség (full width at half maximum)

HG-AFS: Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry

ic: intracelluláris

j-SR: junkcionális SR

kDa: kilo Dalton

l-SR: longitudinális SR

Ktrl: kontroll csoport

Mstn: miosztatin

mtsai: munkatársai

nTyr: normál HEPES-Tyrode oldat

PBS: Phosphate-buffered saline

PBST: PBS, 0,1% Tween 20-val kiegészítve

PTI: (Photon Technology International)

ROS: reaktív oxigén-gyökök (Reactive Oxygen Species)

RyR: Ryanodin Receptor

sAnk1.5: small ankyrin 1.5

SERCA: sarco- endoplazmaticus reticulum Ca^{2+} – ATP-áz

SDS-PAGE: nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis

SM: Signal Mass

Sol: *m. soleus*

Spark: spontán Ca^{2+} felszabadulási esemény

SR: szarkoplazmatikus retikulum

TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak)

TTX: tetrodotoxin

I. Irodalmi áttekintés

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 (Suzman és mtsai., 2015; Szentesi és mtsai., 2019). 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.

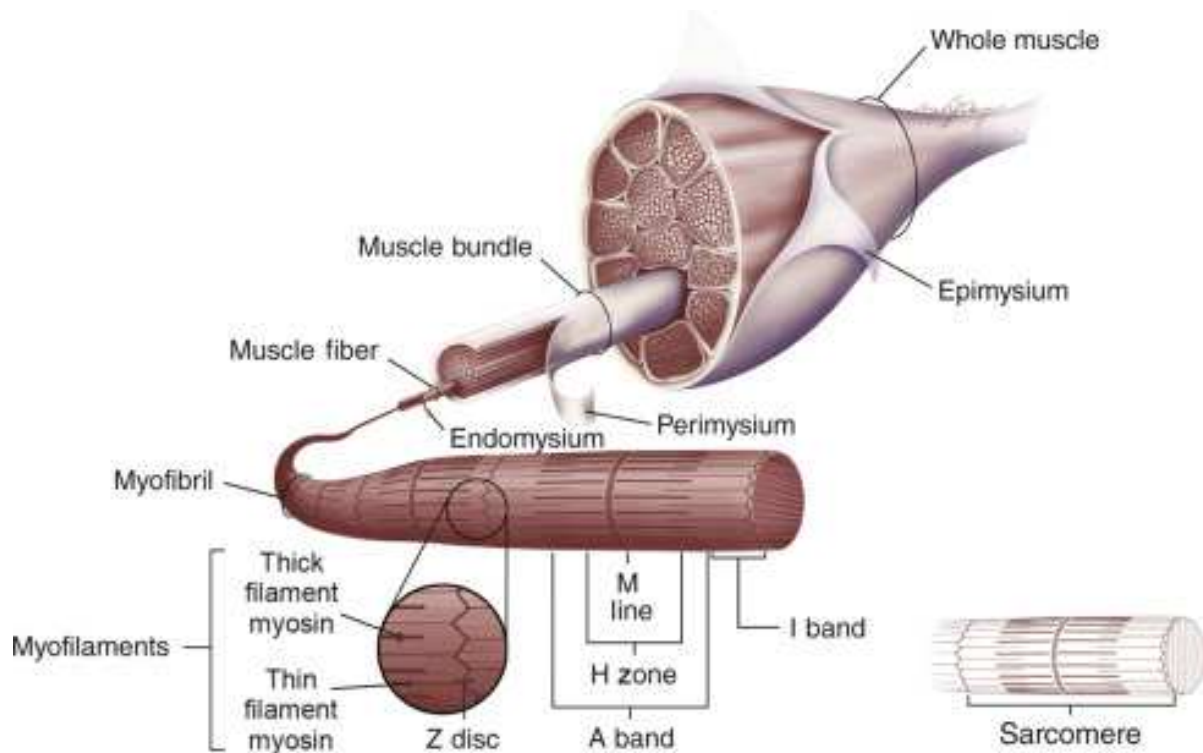
I.1. A vázizom

A vázizom a felnőtt ember teljes testsúlyának körülbelül 40%-a, ez a legmozgékonyabb és legdinamikusabb szövetünk. A kémiai energiát (ATP, glikogén, glükóz) mechanikai munkává alakítja át, ezzel többek között a testrészek mozgatását, a test helyzetének stabilizálását, a testtartást, valamint a belső szervek alak- és méretváltozásait teszi lehetővé. A vázizom felépítését a kötegekben elrendezett izomsejtek (izomrostok) és a kötőszövet jól meghatározott kölcsönös elrendezése jellemzi.

I.1.1 A vázizom felépítése és működése

A vázizom felépítési egysége a több-magvú harántcsíkolt izomrost. Az egyedfejlődés során először egyedi izomsejtek, azaz mioblastok jelennek meg, melyek több-magvú izomcsövekké (miotubulusokká), végül óriássejteké, azaz izomrostokká egyesülnek. Utóbbi átmérője 10-100 μm , hossza pedig 30-40 cm is lehet.

Minden egyes izomrostot, illetve az ezekből álló izomrostkötegeket (fasciculusokat) vékony kötőszövetes réteg borít be és választ el a szomszédjától. Ennek fontos szerepe van az erőátvitelben, az izom eredési vagy tapadási helyéhez való rögzítésben, illetve az izomrostok tápanyagellátásában. Három típusa van, az egyik az egyedi izomrostokat körülvevő burok, az endomysium, ami finom rácsrostokból épül fel. Itt helyezkednek el a legkisebb átmérőjű erek és idegrostok. A második típus már vastagabb, ez a perimysium, ami a fasciculusokat borítja be. Az utolsó a tömött rostos kötőszövetből álló típus, az epimysium. Ez található legkijjebb, amit az izmot ellátó fő erek és idegek fúrnak át. (1. ábra)



1.ábra A vázizom felépítése (Forrás: Marley Dobyns, Animal Science Department, Iowa State University)

I.1.2 A vázizom típusai

A vázizomnak három típusa van, melyeket a rostok összehúzóási gyorsasága, miozin-ATPáz aktivitásának sebessége és metabolikus profilja alapján különböztetjük meg. Az utóbbi az oxidatív foszforilációval és glikolízissel történő ATP-termelés kapacitását adja meg. A miozin-ATPáz aktivitás sebessége azt mutatja meg, hogy a rost milyen gyorsasággal bontja az ATP molekulákat a kontrakciós ciklus során. Azok az izomrostok, melyekre az oxidatív metabolizmus jellemző, nagy mennyiségű mioglobint (egyetlen hemoglobin alegységhez hasonló felépítésű oxigénkötő fehérje) és mitokondriumot tartalmaznak.

I. lassú oxidatív: kis átmérőjű, magas mioglobin és mitokondrium tartalmú rostok. Lassú, nem fáradékony motoros egységeket alkotnak, amik kisebb erőt képesek kifejteni. Miozin-ATPáz aktivitásuk alacsony. Pl. az ember hosszú hátizmaiban és a maratoni futók izmaiban nagy arányban vannak jelen.

IIA. gyors oxidatív/ glikolitikus: közepes átmérőjűek, nagyszámú mitokondriumot és sok mioglobint tartalmaznak. Nagymennyiségű glikogén is található bennük, képesek anaerob glikolízisre. Gyors, nem fáradékony motoros egységeket alkotnak, amelyek nagy izomfeszülést generálnak. Pl. a középtávfutók izmaiban nagy arányban vannak jelen.

IIB. gyors glikolitikus: nagy átmérőjűek, kisszámú mitokondrium és alacsony mioglobin tartalmúak. Glikogént tárolnak. Gyors, fáradásra hajlamos motoros

egységeket alkotnak, nagy erő kifejtésre képesek. Miozin-ATPáz aktivitásuk gyors. Ezzel homológ szerkezetű rosttípus a IIX., mely emberben található. (Scott és mtsai., 2001)PI. emberben a külső szemmozgató izmokban és a rövidtávú futók izmaiban nagy arányban vannak jelen.

I.1.3. A vázizom növekedésének szabályozása

Az izmok 3 féle módon tudnak növekedni: a rostok száma, hossza vagy keresztmetszete nő meg. Mivel a vázizom rostok nem képesek az osztódásra, ezért a legtöbbjük a mioblasztok egyesüléséből születik. A felnőttkori több-magvú vázizomrostok már születés előtt kifejlődnek az izmokban. A kialakuló vázizom rost izom magokat termelhet vagy veszthet. Ezért születés után hatalmas izomtömeg növekedés valósul meg az izomrost nagyobbodása következményeként. A hossz megnyúlása attól függ, hogy a meglévő többmagvú rostok egyesülnek-e több mioblasztal, ami növeli az egyes sejtekben lévő magok számát. A terület növekedésekor mind a rostok megnyúlnak, mind a kontraktilis miofibrillumok mérete és száma megnő, amit az egyes izomrostok magjai támogatnak. Ilyen történik például a súlyemelő izmai esetén.

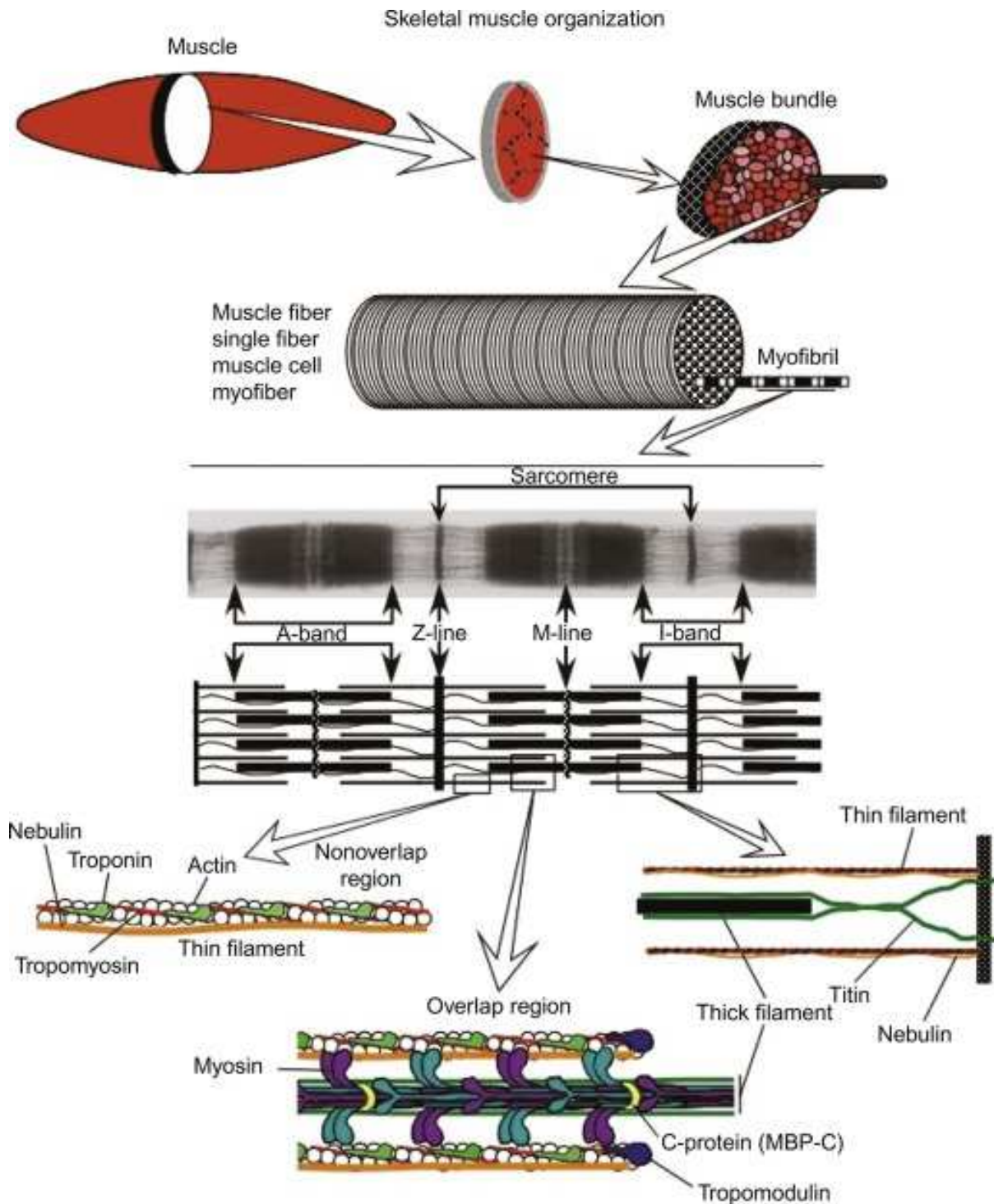
Egy extracelluláris jelzőfehérje, a miosztatin (Mstn) szabályozza az izomsejtek számát és méretét. Funkciója, hogy negatívan szabályozza az izomnövekedést. A miosztatin a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β) fehérjék szupercsaládjához tartozik és a vázizom sejtek választják ki. Fiatal korban a vázizom növekedés alatt nagy mennyiségben van jelen, de kis mennyiségű fehérje található a felnőtt ember keringésében is (megnövekszik AIDS-es betegeknél, izomvesztés esetén). (Alberts B, 2002.) Korábban kimutatták, hogy Mstn-hiányos állatokban túlnyomó részt IIB típusú rostok vannak jelen (Amthor és mtsai., 2007). Ez a gyors, glikolitikus izomtípus lehet a felelős a gyors fáradékonyságért. Ezen egereknek az izomzatuk hatalmas, legalább 2-3-szor nagyobb, mint a kontroll egereké. Az izomsejtek száma és mérete is növekedett (Hamrick és mtsai., 2006; McPherron & Lee, 2002). Ugyanazon gén mutációja megfigyelhető az úgynevezett „kettős izomzatú” szarvasmarhafajtákban is (Grobet L. 1997; McPherron & Lee, 1997; Mosher és mtsai., 2007).

I.2. Az izomrostok felépítése

Az izomrostokon belül miofibrillumok találhatóak, amik az izomrost hossz tengelyével párhuzamosan helyezkednek el. Vastag (miozin, 485 kDa) és vékony (aktin, 42 kDa) filamentumokból állnak, ezek felelősek az összehúzódásért. Az izomrostok citoplazmáját (szarkoplazma) ezek a kontraktilis elemek töltik ki, melyek lehetővé teszik az izomsejt mechanikai munkavégzését. A miofilamentum kötegeket a simafelszínű endoplazmatikus retikulum (szarkoplazmatikus retikulum, SR) veszi körbe.

Az izomrostok harántcsíkzata a hossz tengelyük mentén szabályosan váltakozó sötétebb, vastag és vékony filamentumokat egyaránt tartalmazó (anizotrop, A-csík), és a világosabb, csak vékony filamentumokat tartalmazó (izotróp, I-csík) szakaszok váltakozásából ered. A H-csík az A-csík közepén található, melynek közepén az M-zóna helyezkedik el. A Z-lemezek az I-csíkok közepén vannak, ez vázként szolgál, amihez a vékony filamentumok kapcsolódnak.

Szarkomérnek nevezzük a két Z-lemez közötti részt; ez a harántcsíkolt izomrost funkcionális kontrakciós egysége. Ennek átlagos hossza egy emlős vázizomban 2-3 μm , mely a 4 μm -t is elérheti maximális nyújtáskor és 1 μm -es lehet maximális összehúzódáskor (2. ábra).



2. ábra Az izomrostok felépítése és a csúszófilamentum modell. (Forrás: American Meat Science Association jóvoltából, Darl Ray rajza alapján.)

Az összehúzódást leíró csúszófilamentum-mechanizmus során az I-csík vékony filamentumai becsúsznak az A-csík vastag filamentumai közé, így a szarkomér megrövidül. Ennek molekuláris alapja, hogy kereszthidak képződnek, ami során a miozin feji régiója hozzákötődik az aktin filamentumhoz és konformációváltozás következtében begömbül, majd az aktin filamentumot elcsúsztatja. A relaxáció során leválik az aktinról és visszatér eredeti konformációjába. Mindkét folyamathoz energia szükséges, melyet a miozin ATP bontásából nyer (Cooke, 1997; K. E. Davies & Nowak, 2006; Fonyó, 2011).

Három további óriásfehérje vesz részt a szarkomér megfelelő szerveződésében: ezek a titin (~3800 kDa), az obszkurin (850 kDa) és a nebulin (800 kDa). A titin, az elasztikus filamentum alkotója az M-zónához és a Z-lemezhez is kötődik az N- és a C-terminális régióival. Az M-zónában a titin kölcsönhatásba lép az obszkurinnal és a miomezinnel, így biztosítja az M-zóna stabilitását. A Z-lemezen az obszkurinhoz és az α -aktininhez kötődik. A nebulin a Z-lemezhez kötődik, az aktin filamentumok teljes hosszán végignyúlik és a vékony filamentumok elhelyezkedését segíti. Az obszkurin egy szarkomerikus fehérje, mely főként az M-zónában található meg és kisebb mértékben van jelen a Z-lemezben is. Az obszkurin egy izom-specifikus fehérjével lép kapcsolatba, ami az SR-ben található, a small Ankyrin 1.5 (sAnk1.5)-tel. Ez a kapcsolat felelős az SR megfelelő elhelyezkedéséért a miofibrillumok körül. Obszkurin-hiányos egereken végzett friss tanulmányok kimutatták, hogy az obszkurin felelős a teljes M-zóna stabilitásáért (Kontogianni-Konstantopoulos és mtsai., 2006; D. Randazzo és mtsai., 2017; Davide Randazzo és mtsai., 2017; D. Rossi és mtsai., 2017).

A disztrofin a szarkolemma és a miofilamentumok legkülső rétege között elhelyezkedő fehérje. Ez egy olyan fehérjekomplex része vázizomban, amely az izomrostokat erősíti, és a sérüléstől megvédi, míg az izom összehúzódik és relaxál. A disztrofin horgonyként viselkedik, ami összeköti a citoskeletont az extracelluláris mátrixszal. Emberben a disztrofin kódoló gén mutációja köthető a Duchenne- és a Becker-féle izomdisztrófiához. Ez főként férfiakban előforduló súlyos izombetegség, amely folyamatos izomvesztéssel és atrófiával társul.

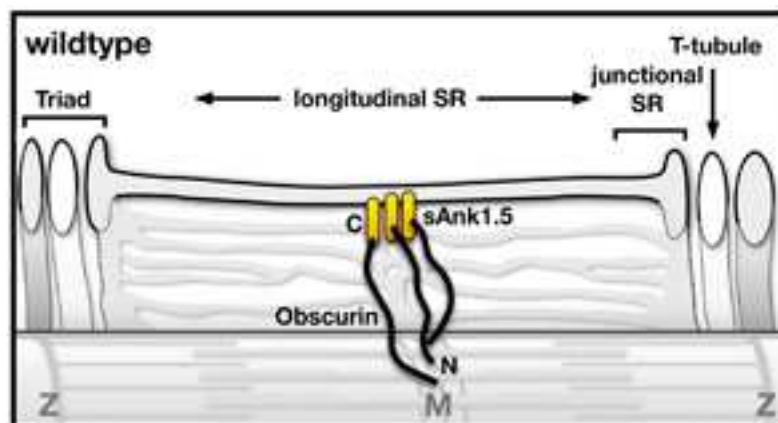
A vékony filamentumban található az aktin, amelyhez regulátor fehérjék csatlakoznak, a tropomiozin és a troponin. Az aktinnak több formája van, az egyik egy szabad monomer, azaz G-aktin (globuláris), a másik a filamentum része, az F-aktin (filamentózus). Az utóbbi kialakulásához a G-aktin polimerizálódik. Ennek szerkezete hasonló egy kettős, csavart gyöngysorhoz. Ehhez az F-aktinhoz kötődik a tropomiozin az összehúzódás során. Ez két azonos, 34 kDa molekulásúlyú alegységből alakult ki. Ezek az I-filamentumokban vannak jelen, ahol az aktinból álló kettős hélix között helyezkednek el. A tropomiozin 7 aktin-monomerhez és egy troponinhez kötődik. Az aktin, a tropomiozin és a troponin fehérjekomplex szükséges az aktomiozin szabályzásához. Az összehúzódás során az aktin felületén lévő tropomiozinok elmozdulnak, amit a troponin-C-hez kötődő Ca^{2+} vált ki. Nyugalomban a tropomiozin elfoglalja a miozinejek kötődési helyét az aktinon, majd miután a tropomiozin-troponin konformáció változáson megy át, már nem lesz akadálya az akto-miozin kapcsolat létrejöttének, vagyis a

kereszthidak kialakulásának. A troponin komplex három polipeptid alegységből áll. Az egyik a troponin-C, mely 17,8 kDa molekulatömegű és nagy affinitással és specificitással köti meg a Ca^{2+} -ionokat, és ezután konformációváltozáson megy át. A második alegység a troponin-I, mely 24 kDa molekulatömegű, ez gátolja az aktomiozin ATPáz-aktivitását. A C alegységgel speciális kölcsönhatásban van, mivel ha ez Ca^{2+} -t köt, komplexet képez vele, és ekkor az ATPáz-aktivitás gátlása megszűnik. A troponin-T a harmadik alegység, amely 37 kDa molekulatömegű. Ez az aktinhoz és a tropomiozinhoz is kötődik. A troponin komplex a miofibrillum azon fehérjekomponense, amely megkötve az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} -ot elindítja az izom megrövidülését.

I.3. Ankyrin

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 (V. Bennett & Chen, 2001). A harántcsíkolt izmokban mindhárom ankyrin gén az izom-specifikus izoformákat kódolja (V. Bennett & Healy, 2009; Cunha, S.R.; Mohler, 2011; Davide Randazzo és mtsai., 2013; Tee & Peppelenbosch, 2010). A legtöbb szervben található ankyrin izoformának nagy a molekulatömege (220–130 kDa), viszont az Ank1 génben található belső promotor 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 (Gallagher & Forget, 1998; Kordeli és mtsai., 1998; Tuvia és mtsai., 1999; D. Zhou és mtsai., 1997). Ezen kisebb izom-specifikus izoformák közül az sAnk1.5 expresszálódik a legszélesebb körben, míg a többi izoforma alacsonyabb szinten található meg (Armani és mtsai., 2006). Az sAnk1.5 citoplazmatikus vége egy olyan specifikus szekvenciát tartalmaz, amely közvetlen kötődést tesz lehetővé az obszkurinnal (Bagnato és mtsai., 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos és mtsai., 2003). Az utóbbi egy olyan szarkomerikus fehérje, amely az M-sáv stabilitásának fenntartásához szükséges a vázizomban (Kontrogianni-Konstantopoulos és mtsai., 2006; D. Randazzo és mtsai., 2017; Davide Randazzo és mtsai., 2017; D. Rossi és mtsai., 2017). Az sAnk1.5 és az obszkurin közötti kölcsönhatás elengedhetetlen ahhoz, hogy az SR-t a miofibrillumok közvetlen közelében tartsák (Barone és mtsai., 2015). Erre bizonyíték, hogy az sAnk1 izoformák kiütése patkány *flexor digitorum brevis* (FDB) izomból származó primer sejt kultúrákban anasztomózist eredményezett az SR longitudinális tubulusaiban, míg a junkcionális SR-t csak alig befolyásolta (Ackermann és mtsai., 2011). Az sAnk1 hiányos (KO) egerekben pedig azt találták, hogy az sAnk1 hiánya jelentősen csökkentette az SR térfogatát. Viszont az SR kalciumcsatornájának és pumpájának expressziós szintjei és lokalizációi nem különböztek az sAnk1 KO egerekből származó gyors és lassú izmok rostjai esetén a kontroll egerekhez képest (Giacomello és mtsai., 2015). 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 (Lange és mtsai., 2009). 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 fehérjét tartalmazó tubuláris aggregátumok keletkeztek. Mindezeket a szerkezeti változásokat az sAnk1 KO izmok elektrofiziológiai tulajdonságainak és erejének romlása kísérte (Giacomello és mtsai., 2015). Ezek az eredmények összhangban állnak egy korábbi kutatással, amely szerint a sAnk1-hiányos tenyésztett izomrostok csökkentett Ca^{2+} felszabadulást mutatnak az SR-ből (Ackermann és mtsai., 2011).

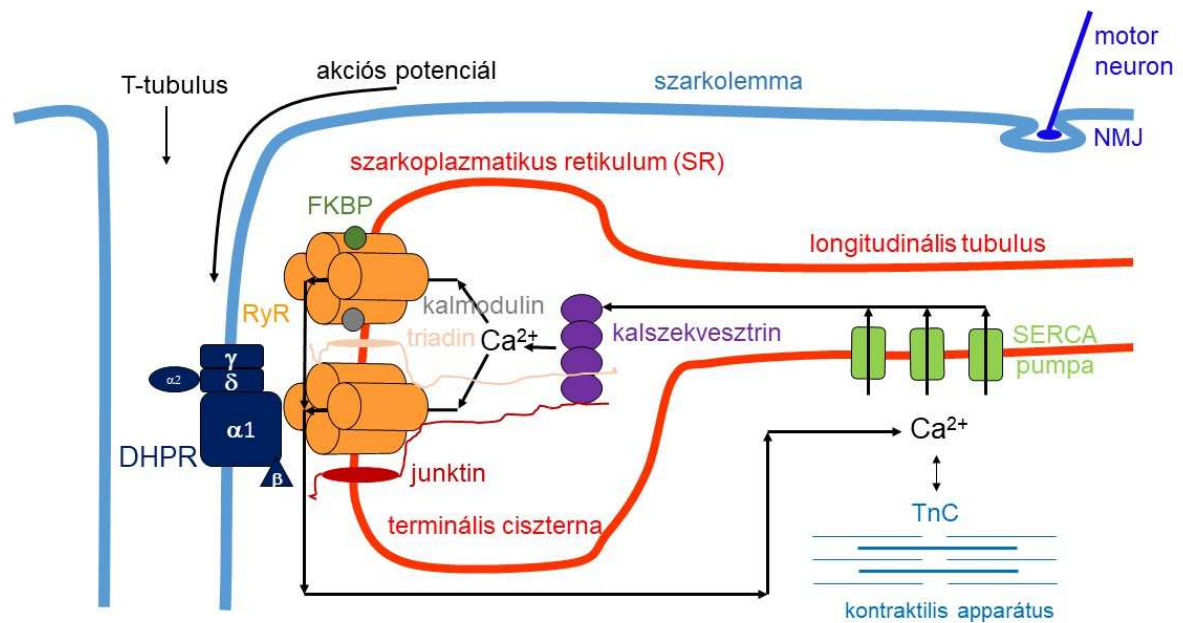


3. ábra Az sAnk1.5 elhelyezkedése (Lange és mtsai., 2009)

I.4. Az excitációs-kontrakciós kapcsolat (ECC)

Az SR fő funkciója a kalciumionok (Ca^{2+}) intracelluláris raktározása. Az SR-nek két különböző része van: a longitudinális (l-SR) és a junkcionális (j-SR). Az utóbbiak olyan hálózatot hoznak létre, amelyek csőszerűen körülveszik a miofibrillumokat. Az SR másik része a miofibrillumokkal párhuzamosan elhelyezkedő hosszanti (longitudinális) tubulus. A disztális végükön az l-SR tubulusok egyesülnek egy nagyobb struktúrába, melynek egymás felé néző kiszélesedett végeit terminális ciszternának nevezik. A j-SR az A-csík és I-csík között helyezkedik el. Minden A-I csík határánál két terminális ciszterna található a T-tubulus két oldalán, ami a szarkolemma betüremkedése a szarkoplazmába. Ezt a hármas struktúrát nevezzük triádnak. (Fonyó, 2011; Franzini-Armstrong, 2009; Sorrentino, 2011). A triádokon megy végbe az excitációs-kontrakciós kapcsolat (ECC), amit elektromechanikai csatolásnak is neveznek. Ennek során a motoneuronról érkező akciós potenciál a szarkolemmán végigterjedve bejut a T-tubulusokba. Az itt található dihidropiridin-receptorok (DHPR) a vázizom feszültségérzékelő L-típusú Ca^{2+} -csatornái és a depolarizáció hatására aktiválódnak. A DHPR mint kalciumcsatorna vázizomban nem működik, de konformációváltozásával megnyitja a vele fizikai kapcsolatban álló rianodin-receptorokat (RyR), amelyek a j-SR terminális ciszternájában található Ca^{2+} -csatornák. A folyamat eredményeképpen felszabadul az SR-ben tárolt Ca^{2+} (Franzini-Armstrong & Protasi, 1997; Schneider, 1994), majd a rostokban lévő megemelkedett citoszolikus Ca^{2+} -tartalom hatására a tropomiozin elcsúszik a vékony filamentum mellett, és ez vezet az izomrost összehúzódásához (Kontogianni-Konstantopoulos és mtsai., 2006) (4. ábra).

A kontrakció után az izom relaxációjához fontos, hogy a citoszolikus Ca^{2+} -koncentráció lecsökkenjen a nyugalmi szintre. Ennek megtörténteért főleg az SR Ca^{2+} -pumpája a felelős, ami az ATP hidrolízise során keletkezett energiát használja, és aktív módon pumpálja vissza a Ca^{2+} -ot a citoplazmából az SR-be. Ezt a pumpát Szarko/Endoplazmatikus Retikulum Ca^{2+} -ATPáz-nak (SERCA) nevezik, amely az I-SR membránjában található. Minden egyes ATP hidrolizálása során két Ca^{2+} -ot pumpál vissza az SR-be (Fonyó 1999, Endo 2006, Röhlich 2006). Ez a pumpa a P-típusú ionpumpák közé tartozik, a Ca^{2+} -kat elektrokémiai gradiensükkel szemben transzportálja.



4. ábra Az excitációs-kontrakciós kapcsolat

A RyR-nek három izoformája van emlőssőkben, vázizomban jellemzően a RyR1, szívizomban a RyR2 míg az agyban a RyR3 található meg. Bizonyos szövetek minden izoformát tartalmaznak. Számos sejtes összetevő (pl. ATP, HCl, Ca^{2+} és Mg^{2+}), specifikus fehérjék (foszfatázok és kinázok) és endogén oxidatív anyagok szabályozzák a RyR funkciókat (Szentesi és mtsai., 2019). Ez a Ca^{2+} -csatorna négy azonos alegységből épül fel, azaz homotetramer. A legfontosabb endogén aktivátora a Ca^{2+} . Ha a Ca^{2+} kötődik a csatorna intracelluláris oldalán található aktivációs kötőhelyéhez, akkor a csatorna megnyílik, és így a Ca^{2+} -k ki tudnak lépni a kalciumraktárakból (Ca^{2+} -indukált Ca^{2+} -kiáramlás, azaz CICR). További endogén aktiváló molekula az intracelluláris ATP és a reaktív oxigén gyökök. Exogén aktiváló molekula például a koffein, ami a csatorna Ca^{2+} iránti affinitását fokozza, így megnő az egy akciós potenciál alatt az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} mennyisége (Fonyó, 2011). A fiziológiásan jelenlévő sejt citoplazmájában jelenlévő magnéziumionok gátolják a csatorna működését, így nyugalomban

ezek zárva tartanak. A RyR-on egy alacsony affinitású kalciumkötőhely is található. Ha ide Ca^{2+} -k kötődnek, akkor a csatorna bezáródik, azaz inaktívulódik. Ez nyugalomban kötőhely üres, viszont aktiváció során az alacsony kalciumkoncentráció megnő, így az alacsony affinitású kötőhelyre bekötődhetnek a Ca^{2+} -k.

Emberben az egyik fontos kation a Ca^{2+} , amelynek ionizált formája a vérben 1,2 mmol/l. (Pozzan és mtsai., 1994). Intracelluláris koncentrációja átlagosan 100 nM, amit aktív folyamatokkal tartanak fent a sejtek. Extracelluláris koncentrációja kb. 1,2 mM. Ezeknek a mennyiségeknek köszönhetően jó másodlagos hírvivő, mivel kis mennyiségű ion energiaigényes mozgatása nagy intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) változásokat eredményez. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változása fontos szereppel bír többek között a sejtmozgásban, sejtosztódásban, differenciálódásban, kontrakcióban, ingerület-átvitelben (Berridge, 1993; Vermassen és mtsai., 2004; Yoshida, 1997). Vázizomban az SR-ben raktározódik a kalszekvesztrin fehérjéhez kötődve. A kalszekvesztrin (CSQ) az SR lumenében található, a Ca^{2+} -k megkötésére alkalmas fehérje. Egy CSQ 40 darab Ca^{2+} megkötésére alkalmas.

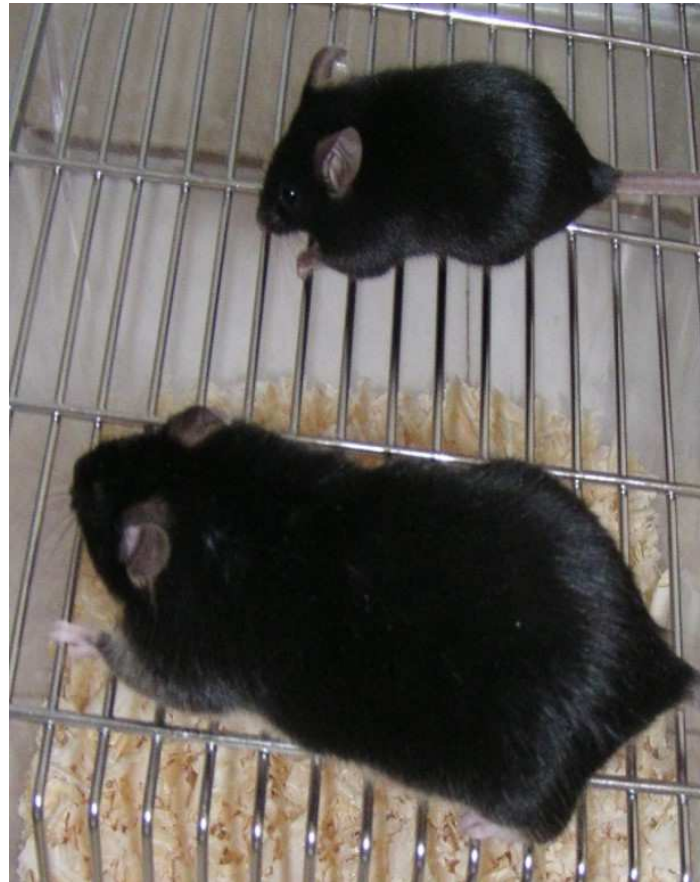
I.5. A kalcium felszabadulási események vizsgálata

Vázizomban az izom összehúzódásakor az egész sejtre kiterjedő, tranziens $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedés történik, amely elemi eseményekből, „spark”-okból áll össze. A spark-ok egy vagy több RyR egyidejű megnyílása által létrejövő SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulási események. (Ríos és mtsai., 1999; Shirokova és mtsai., 1996, 1998; J. Zhou és mtsai., 2003) Felfedezésüket a konfokális mikroszkópia tette lehetővé, amihez olyan fluoreszcens kalciumindikátor használata elengedhetetlen, aminek alacsony a háttér fluoreszcenciája. Először szívizomsejteken (Cannell & Soeller, 1997; H. Cheng és mtsai., 1996), majd később vázizmokon (Baylor, 2005; Tsugorka és mtsai., 1995) is leírták Ca^{2+} -spark-okat. Ez a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció 10-20 ms-ig tartó átmeneti megemelkedése, amely kis térrészben lokalizált (2-3 μm). Az elemi kalciumfelszabadulási események másik típusa az „ember”. Erről feltételezik, hogy csak egy RyR megnyílásának a következménye, térbeli kiterjedése hasonló a spark-éhoz, viszont az amplitúdója jelentősen kisebb és időben is hosszabb (Csernoch és mtsai., 2008; Kirsch és mtsai., 2001; Klein & Schneider, 2006).

I.6. Cmpt állatmodell

A csökkent miosztatin expresszálo egerek esetén az Mstn génben egy 12 bp deléciót találtak, ezért kapták a MstnCmpt-dl1Abc (Szabó és mtsai., 1998) nevet. Ennek köszönhetően a miosztatin expresszió módosul, így hipermuszkuláris fenotípus jelenik meg (Varga és mtsai., 2003). (5. ábra) Később kimutatták, hogy a megnövekedett izomtömeg nem jár megnövekedett izomerővel, sőt ezek az egerek gyengébbek voltak a kontroll állatokhoz képest (Amthor és mtsai., 2007). A Cmpt állatok állóképessége is rosszabb a kontrollokhoz képest (Bodnár és mtsai., 2014), amit az EC kapcsolatban létrejövő módosulások okozhatnak. Ezen állatoknak nagyobb a hajlamuk a metabolikus acidózisra. A kardio-respiratorikus rendszerük nem képes maradéktalanul kiszolgálni a megnövekedett izomtömeg oxigénigényét. A Cmpt

állatokban eltolódik az izom anyagcseréje a glikolízis felé, az izomrostok típusának aránya megváltozik, több lesz a gyors izom bennük.



5. ábra Azonos korú Cmt egér (alul) és kontroll egér (felül)

I.7. Az öregedés hatása a vázizmokra

Az izomtömeg folyamatosan csökken az életkorral. Ez a folyamat felgyorsul hetven éves kor után (Mitchell et al., 2012), azonban ezekben a mechanizmusokban részt vevő biológiai folyamatok még nem teljesen tisztázottak (Mitchell és mtsai., 2012). Az izmok regenerációs képessége és ereje szintén csökken az életkorral. Egy fontos résztvevő lehet ezekben a folyamatokban a lelassult alapanyagcsere-sebesség, amely hozzájárul az izomtömeg csökkenéséhez. Ezek a jelenségek csökkent fizikai aktivitáshoz, táplálékhiányhoz, krónikus gyulladásához vezethetnek (Aniansson és mtsai., 1986). 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 (Bodnár és mtsai., 2014). Másrészt az általános vélemény, hogy a folyamatosan végzett mérsékelt testmozgás jó formában tartja az izmokat. A megnövekvő izomaktivitás

komplex igényeinek kielégítéséhez növekszik a kapilláris-sűrűség és az enzimaktivitás az izomanyagcsere 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.

I.8. Az oxidatív stressz és antioxidánsok hatása vázizmokban

Az öregedés során a vázizom funkcióvesztése például az oxidatív stressz következménye is lehet, ami a reaktív oxigén vagy nitrogén gyökök (ROS/RNS) akkumulálódásának az eredménye. Fiziológias körülmények közt az oxidatív egyensúlyt a ROS/RNS termelés, illetve ezek 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 sejtfunkciókra nézve (Bodnár és mtsai., 2016). A vázizom rengeteg oxigént használ, így nagy mennyiségű ROS/RNS képes termelődni, amelyek egyik legfontosabb forrása a mitokondrium, ami öregedés során csökkent kapacitással működik (Anderson és mtsai., 2006). Az öregedő izmokban a megnövekedett oxidatív stressz az EC-kapcsolat és a Ca^{2+} -homeosztázis megváltozásához vezethet.

I.9. A szelén mint antioxidáns

Az izomgyengeség vagy az öregedés során fokozott mag- és mitokondriális DNS-károsodás (Hamilton és mtsai., 2001) léphet fel, amely az izomrostok számának csökkenéséhez vezet, és ezáltal a vázizom-funkciók károsodása következhet be. A szelén antioxidáns tulajdonsággal rendelkező nyomelem, és fontos szerepet játszik több izomfunkcióban (Rederstorff és mtsai., 2006). Teheneknél a szelénhiány fehér izombetegséget okoz (a csontváz és a szívizom gyengesége és degenerációja (Löfstedt, 1997)). Embereken hasonló miopátiát írtak le (Ishihara, H., 1999). A súlyos szelénhiányhoz elégtelen vázizomfunkciók kapcsolódnak (Chariot & Bignani, 2003). A fiatal egerekkel kapcsolatos korábbi munkánkban kimutattuk, hogy a szelénrel kiegészített étrend növeli a Ca^{2+} felszabadulását a szarkoplazmatikus retikulumból, 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 (Bodnár és mtsai., 2016). A szelenoproteinek olyan kémiai reakciókban vesznek részt, mint az oxidatív reduktív reakciók, az instabil oxigén tartalmú molekuláktól (ROS) 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 kalciumhomeosztázisban is. (Castets és mtsai., 2012) Az izom szelenoprotein N tartalmának csökkenését kimutatták a kor előrehaladtával (Novoselov és mtsai., 2010).

II. Célkitűzések

Munkánkban a célunk az volt, hogy kiderítsük, az öregedés során fellépő izomerő csökkenés, illetve az ECC-t befolyásoló fokozott oxidatív stressz 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 öregkorra?
- Ezek hogyan befolyásolják az ECC-ban résztvevő fehérjék működését és az izom Ca^{2+} -homeosztázisát?
- A szelenoprotein N szintje hogyan változik a szelén étrend-kiegészítés hatására idős egerekben?

Továbbá szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a vázizom egyik fontos fehérjének hiánya miként befolyásolja az ECC-t:

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

III. Anyagok és módszerek

III.1. Állatmodell

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 órás világos és 12 órás 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, melyek a többi nem edzett csoporthoz hasonló körülmények között voltak tartva, viszont megnövelt szelén tartalmú étrendet kaptak.

III.2. A szelén diéta leírása

Elemi nano méretű szelént (NanoSe) kevertünk normál rágcsálótápra és ezzel etettük 2 hónapon át a 20–22 hónapos, nem edzett kontroll egereket. A szelént 5 ppm (részecske / millió) koncentrációban alkalmaztuk. Így 1 kg rágcsálótáp 5 mg Se tartalmazott, ami körülbelül 40 µg / testtömeg kg / nap Se felvételt eredményezett a kísérleti állatokban. A nano méretű elemi szelén előállítását korábban már leírtuk (Eszenyi és mtsai., 2011).

III.3. *Cmpt* egér modell

A Compact, azaz a *MstnCmpt-dl1Abc* egerek Dr. Müller Géza laboratóriumából származtak (Varga és mtsai., 2003). Ezek az állatok - mivel miosztatin-hiányosak, ami az izomnövekedés negatív szabályozója - megnövekedett izomtömegűek (5. ábra). A *Cmpt* mutáció fenntartása céljából heterozigóta egereket vad típusú C57BL6 (*Mstn* +/+; kontroll; 5. ábra felső) és *Cmpt* egerek (5. ábra alsó) pároztatásával nyertünk. A genotípus meghatározására farok csúcsból származó mintát használtunk.

III.4. sAnk1 KO egér modell

A sAnk1 KO egerek a Jackson Laboratóriumból (Bar Harbor, ME, USA) származtak. Az egér kolóniát heterozigóta egerek keresztezésével tartotta fenn olasz kollaborációs partnerünk, és az utódok genotípusát polimeráz láncreakcióval határozták meg. Mi tőlük kaptunk fiatal vegyes nemű állatokat és saját állatházunkban tartottuk őket a kontroll egerekhez hasonló körülmények között a felhasználásukig. A kísérleteket sAnk1 KO és vad típusú alomtárs egerekkel végeztük, amely állatok súlya 20–30 g között mozgott.

III.5. *In vivo* kísérletek

III.5.1. Önkéntes futómalom mérések

Az edzett kontroll csoportba tartozó egereket olyan ketrecbe helyeztük, amiben egér futómalom (Campden Instruments Ltd., Loughborough, UK) 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 futási sebességet, a 24 óra alatt megtett távolságot és a futással töltött idő hosszát. Majd a 4. és 14. napok közötti adatokat átlagoltuk és így kaptuk meg az egyes állatok futási teljesítményét. Végül az egy kísérleti csoportba tartozó egerek adatainak átlagolásával számítottuk ki a kísérleti csoportok értékét.

III.5.2. 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 frekvenciával 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.

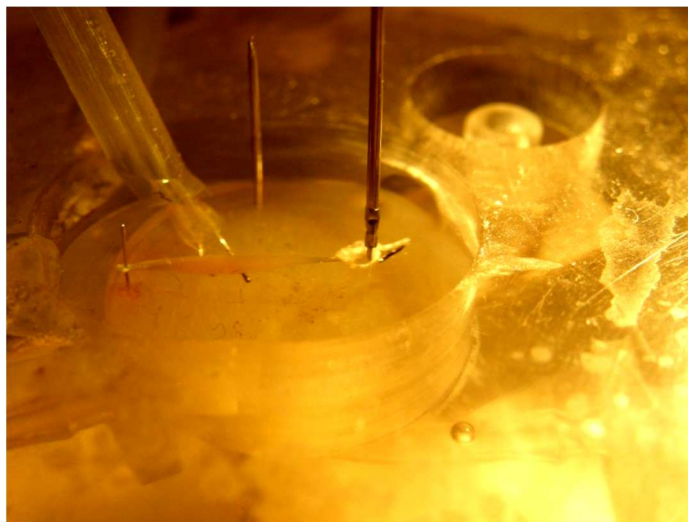
III.6. *In vitro* kísérletek

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*-ből (FDB), *m. extensor digitorum longus*-ból (EDL), *m. soleus*-ból (SOL) és *m. quadriceps femoris*-ből származó izmokat használtuk fel.

III.6.1. Izomerő mérés

Az EDL (gyors) és a SOL (lassú) izmokat csipesz és olló segítségével manuálisan kipreparáltuk. Ezután vízszintesen elhelyeztük egy kísérleti kamrában, amelyet folyamatosan (10 ml / perc) karbogénnel (95% O₂ és 5% CO₂) perfundált Krebs-oldattal (összetevői mM-ban: 135 NaCl, 5

KCl, 2,5 CaCl₂, 1 MgSO₄, 10 Hepes, 10 glukóz, 10 NaHCO₃; pH=7,2; szobahőmérséklet) mostuk a vitalitás megőrzésének céljából. Az izom egyik végét egy kapacitív mechano-elektromos erőmérőhöz rögzítettük (Experimetria, Budapest, Magyarország), a másik vége pedig egy rovartüvel volt kiszúrva. (6. ábra)



6. ábra Az izomerő mérése

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 ugyanilyen 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.

III.6.2. 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 glucose; 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 enzimmentes 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 triturálással nyertünk egyedi vázizomrostokat.

III.6.3. Teljes sejt intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció mérés

Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció változásait Fura-2 AM festék segítségével figyeltük meg. Ez a fluoreszcens festék rációmetrikus, tehát a Ca^{2+} -ot kötött formájának abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca^{2+} -ot nem kötött formájától (380 nm). Az egyedi izomroston a két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon való gerjesztést követően az emittált fluoreszcens fény intenzitások hányadosából kiszámítható a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Grynkiewicz és mtsai., 1985).

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R), \quad (1)$$

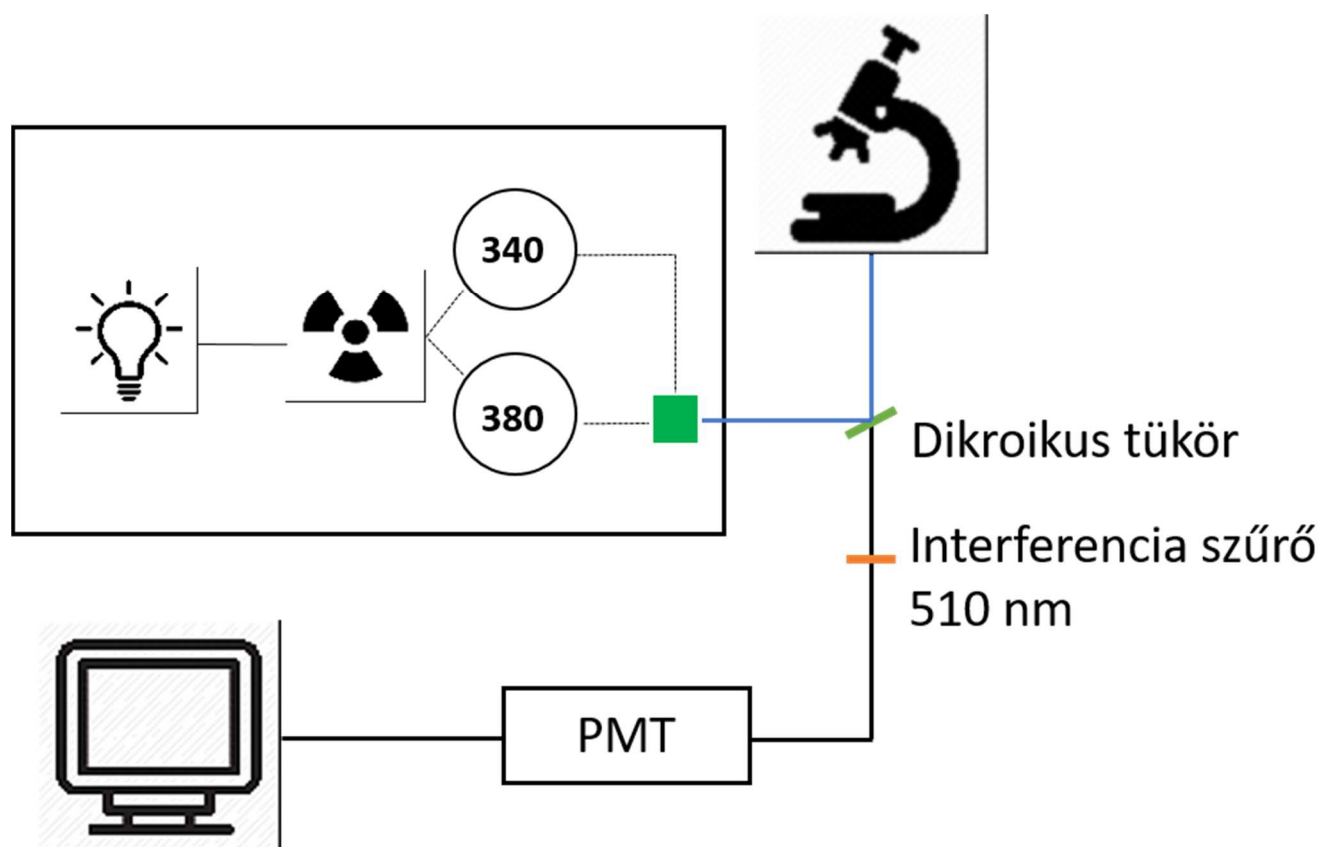
ahol K_d a festék disszociációs állandója, $R_{\max}$ a fluoreszcencia hányados, ha a festék Ca^{2+} -nal telített, $R_{\min}$ a fluoreszcencia hányados, ha a festék egyáltalán nem köt Ca^{2+} -ot, R a mért fluoreszcencia értékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó. Az $R_{\max}$, $R_{\min}$ és β értékeit kalibrációs mérések során határoztuk meg a következő módon. A kalibrációt az intracelluláris oldatnak megfelelő oldatban végeztük különböző kalciumkoncentráció mellett Fura-2 jelenlétében. A nominálisan kalciummentes oldatot EGTA hozzáadásával készítettük el. A kalibráció során a mérő kádat feltöltöttük az adott kalciumkoncentrációjú oldattal és a PTI rendszerrel mindkét (340 és 380 nm) hullámhosszon megvilágítottuk. A mérések után elkészítettük az átlagos hányados (R) értéket a két hullám hosszán mért jelekből (F_{340}/F_{380}). Az $R_{\min}$ értékét a kalcium mentes oldatban mért hányados adja meg. Az $R_{\max}$ értékét pedig a biztosan szaturált fluoreszcens jelet adó maximális $[\text{Ca}^{2+}]$ -jú oldatban mért jelek hányadosa szolgáltatja. A β értékét pedig a kalciumkoncentrációt megadó ($[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$) egyenletnek a mért R értékekre történt illesztésből határoztuk meg.

A fluoreszcens mérésekhez izolált egyedi FDB rostokat használtunk, amit lamininnal bevont fedőlemezre trituráltunk. 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) csoporttal ellátott festék átjut a sejtmembránon, a Fura-2-ről a sejten belüli intracelluláris észterázok lehasítják az acetoxi-metilésztert, s így kapjuk meg a funkcióképes 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. (7. ábra)

Az intracelluláris kalcium koncentrációt minden esetben a mért fluoreszcencia-intenzitások hányadosából számítottuk *in vivo* kalibrálás alkalmazásával (1. egyenlet). 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.



7. ábra PTI mérőrendszer felépítése. Megvilágító egysége egy 75 W-os XENON izzó, amely a látható hullámhossz tartományban világít és folytonos a spektruma. A készülék két darab egymástól függetlenül állítható monokromátorral rendelkezik (340 és 380 nm). Az emittált fény szűrőjének (510 nm) sávszélessége 20 nm.

A kalciumfelszabadulás tanulmányozásához a Ca^{2+} -tranzienseket depolarizáló oldattal váltottuk ki, ami 120 mM NaCl helyett ugyanennyi KCl-et 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 (P), a troponin C-hez (TN), a parvalbumin (parv) 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 mioplazmatikus térbe kijutó és onnan eltávolításra kerülő Ca^{2+} mennyiségének változását az alábbi differenciál egyenletrendszer írja le, amelyet Brum és mtsai. (1988) dolgoztak ki. Ebben

szerepel a Ca^{2+} különböző kötőhelyekre történő kötődése és onnan leválása. A troponin esetében ezt a

$$\frac{d[\text{CaTN}]}{dt} = k_{on, \text{CaTN}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{TN}] - k_{off, \text{CaTN}} \cdot [\text{CaTN}] \quad (2)$$

egyenlet írja le, ahol $[\text{TN}]$ a teljes troponin, míg $[\text{CaTN}]$ a kalciumot kötött troponin koncentrációja.

Ezen kötőhelyek közül néhány a Ca^{2+} mellett Mg^{2+} -t is köt. Ilyen a parvalbumin (PARV), amelyre ezért két egyenlet is vonatkozik.

$$\frac{d[\text{CaPARV}]}{dt} = k_{on, \text{CaPARV}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{PARV}] - k_{off, \text{CaPARV}} \cdot [\text{CaPARV}] \quad (3)$$

és

$$\frac{d[\text{MgPARV}]}{dt} = k_{on, \text{MgPARV}} \cdot [\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{PARV}] - k_{off, \text{MgPARV}} \cdot [\text{MgPARV}] \quad (4)$$

ahol $[\text{PARV}]$ teljes parvalbumin, míg $[\text{CaPARV}]$ a kalciumot és $[\text{MgPARV}]$ a magnéziumot kötött parvalbumin koncentrációja.

Az SR Ca^{2+} -pumpájára a következő két egyenlet vonatkozik:

$$\left(\frac{d[\text{Ca}]}{dt} \right)_p = -V_{max} \cdot \left(\frac{[\text{CaP}]}{P_T} \right)^2 \quad (5)$$

ahol $[\text{P}]_T$ a pumpa teljes koncentrációja, míg $[\text{CaP}]$ a kalciumot kötött pumpa koncentrációja és a négyzetre emelésben van figyelembe véve, hogy a pumpa két db Ca^{2+} -ot köt. A pumpa Ca^{2+} -kötését pedig a következő egyenlet írja le:

$$[\text{CaP}] = \frac{[\text{P}]_T \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{[\text{Ca}^{2+}] + K_P} \quad (6)$$

ahol K_P a pumpa Ca^{2+} iránti disszociációs konstansát jelöli. Végezetül a Ca^{2+} -érzékeny festék is kötőhelyként van figyelembe véve:

$$\frac{d[\text{CaD}]}{dt} = k_{on, \text{CaD}} \cdot [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{D}] - k_{off, \text{CaD}} \cdot [\text{CaD}] \quad (7)$$

ahol $[\text{D}]$ a teljes festék, míg $[\text{CaD}]$ a kalciumot kötött festék koncentrációja.

A teljes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást leíró differenciálegyenlet a fenti egyenletek összege:

$$\frac{d[\text{Ca}]}{dt} = -\frac{d[\text{CaTN}]}{dt} - \frac{d[\text{CaPARV}]}{dt} - V_{max} \cdot \left(\frac{[\text{CaP}]}{P_T} \right)^2 - \frac{d[\text{CaP}]}{dt} - \frac{d[\text{CaD}]}{dt} + L \quad (8)$$

ahol L az egyetlen pozitív tag és az SR-ből nyugalomban kicsurgó $[\text{Ca}^{2+}]$ -ot jelenti. Ez konstans, független az időtől és egyenlő a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -vel.

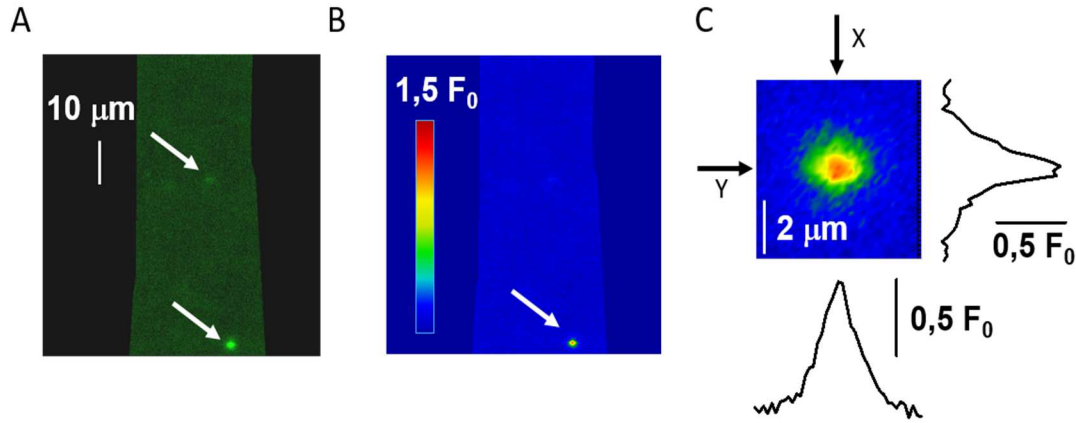
A modell összes többi paraméterét állandó értéken tartottuk $[\text{PARV}] = 690 \mu\text{M}$, $k_{on, \text{CaPARV}} = 160 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_{off, \text{CaPARV}} = 1,5 \text{s}^{-1}$, $k_{on, \text{MgPARV}} = 0,4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_{off, \text{MgPARV}} = 8 \text{s}^{-1}$, $[\text{TN}] = 250 \mu\text{M}$, $k_{on, \text{CaTN}}$

$= 20 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_{\text{off, CaTN}} = 150 \text{s}^{-1}$, $[P] = 200 \mu\text{M}$, $k_p = 0,5 \mu\text{M}$. A K_p a pumpa fehérje Ca^{2+} iránti disszociációs konstansát jelöli. A Ca^{2+} felszabadulás sebességét (fluxus) a Ca^{2+} -tranzienst időbeli deriváltjaként számítottuk ki. A hosszú depolarizáció alatt (5 s) felszabadult Ca^{2+} mennyisége pedig jó becslése az SR kalciumtartalmának (Ursu és mtsai., 2005).

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 hatására az SR-ből nagy mennyiségű Ca^{2+} szabadult fel a RyR-eken keresztül. Az összes lokálisan adagolt oldat 50 μM N-benzil-p-toluene Sulphonamide-t (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. A SR Ca^{2+} -tartalmát a kalciumtranziensekből a Ca^{2+} -felszabadulást és -visszavételt leíró modellből számoltuk ki. Ez elfogadott módszer az Ca^{2+} -tartalmának becslésére.

III.6.4. 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 kalciumindikátor festék bejutását is segítettük a rost belsejébe (Szentesi és mtsai., 2004). A felszíni membrán permeabilizálódását mikroszkóp alatt a fluo-3 fluoreszcencia intenzitása növekedése révén 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-immersiós objektívvel (NA = 1,3) rögzítettük egy ultragyors 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.



8. ábra XY szkennelés, és egy spark. A. Egy fluo-3 kalciumérzékeny festékkel töltött izomrost képe. A nyíllal jelölt világosabb területeken találhatóak a spark-ok. B. Az A panel háttér fluoreszcenciára normalizált (F/F_0) képe. A képeket úgy állítottuk elő, hogy normalizáltuk a kiindulási fluoreszcenciára (F_0) a háttér levonása után (a rostok kívül meghatározva). A melegebb színek nagyobb $[Ca^{2+}]$ -nek felelnek meg. C. A B panelen nyíllal jelölt spark kinagyított képe, a rostok hosszanti tengelyével párhuzamos (X) vagy arra merőleges (Y) térbeli profiljával együtt. A térbeli profilok a nyilakkal jelölt helyeken 5 pixel széles sávok átlagolásával készültek.

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 frekvenciaspektrumát kiszámítottuk gyors Fourier-transzformáció (FFT) alkalmazásával. Ezután a szarkomereknek 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 (8. ábra). Végül a *spark*-ok következő paramétereit számítottuk ki: az amplitúdót és két térbeli szélességet a maximum felénél (FWHM), a Z-vonalakra merőlegesen (FWHM-x) és azokkal párhuzamosan (FWHM-y). A CRE során felszabadult Ca^{2+} mennyiségének becsléséhez kiszámítottuk a jel sűrűséget (Signal Mass, SM).

$$\text{Signal Mass} = A * 1,206 * \text{FWHM} - x * \text{FWHM} - y * \text{FWHM} - z \quad (9)$$

ahol A a *spark*-ok amplitúdója (Hollingworth és mtsai., 2001). A z irányú (azaz az optikai tengely irányú) FWHM becslésére a két FWHM (x és y irányú) átlagát használtuk.

III.6.5. 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 kalciumindikátort 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 membránpotenciált -80 mV-on tartottuk. A pipetta ellenállása 1-2 MΩ tartományban változott. Analóg kompenzációt alkalmaztuk a lineáris kapacitív áramok korrigálására. A Ca²⁺-tranzienseket egy modell alkalmazásával analizáltuk, amely kiszámítja a kalciumfelszabadulás fluxusát. A modell figyelembe veszi a [Ca²⁺]_i(t) változásait egyetlen térfogategységben, beleértve a kalciumeltávolítási folyamatokat, mint például a SERCA pumpa maximális transzportsebessége (V_{max}, illesztett paraméter). A kísérleteket kalciumpuffer (10 mM EGTA) jelenlétében végeztük, így az endogén puffereket szinte elhanyagolhatónak tekintettük a kalciumeltávolítási folyamatban. A Ca²⁺-felszabadulás aktiválódásának feszültségfüggését a Boltzmann függvény írja le:

$$[Ca^{2+}]_i(V_m) = [Ca^{2+}]_{i,max} / (1 + \exp(-(V_m - V_{50})/k)) \quad (10)$$

ahol V₅₀ az 50%-os aktivációhoz tartozó feszültség, k a függvény meredekség logaritmusának reciproka, és V_m az adott depolarizációs feszültség. A vonalmenti szkennelés képeket egy általunk készített program segítségével elemeztük a következő paraméterek felhasználásával: K_{d rhod-2} = 18 μM és k_{ON} = 0,7×10⁸ M⁻¹s⁻¹. A Ca²⁺-felszabadulás fluxusból (a kalciumcsatornákon keresztülmenő fluxusból) kivonva a pumpa eltávolító fluxusát, az SR-ből kilépő nettó fluxus meghatározható. A nettó fluxus integrálja megadja a depolarizációval felszabadítható SR kalciumtartalmat, vagy más néven a felszabadult Ca²⁺ mennyiségét (Δ[Ca²⁺]_{i,összes}). (Brum és mtsai., 1988)

III.6.6. 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 dihidroetidium feldúsul a sejtmagokban és tökéletesen megadja azok elhelyezkedését. Így minden rostos egy olyan azonos nagyságú területen végeztük a számolást, ahol nem volt sejtmag. Ez a terület számos szarkomért lefedett és így lehetett biztosítani, hogy nagyjából azonos mennyiségű mitokondriumból származó fluoreszcens jelet vegyünk figyelembe az analízis során. 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.

III.6.7. Western blot analízis

A hátsó végtagból származó *musculus quadriceps femoris* szövetmintáit lízispufferben homogenizáltuk (20 mM Tris-HCl, 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 Tris-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 gélelektroforézissel (SDS-PAGE) 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 tejporral, a membránokat egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a megfelelő primer antitestekkel. (1. táblázat)

Miután háromszor 10 percig mostuk PBST-vel (PBS, 0,1% Tween 20-szal 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 tejport 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.

Fehérje neve	Forgalmazó	Kat. szám	Gazda szervezet	Hígítás	Epitóp
DHPR	Thermo Scientific	MA3-921	egér	1:500	nyúl dihidropiridin receptor
RyR1	I. Marty	Ajándék I. Marty-tól	nyúl	1:5000	disznó rianodin receptor
RyR1	Thermo Scientific	MA2-925	egér	1:1000	csirke pektoriális izom eredetű rianodin receptor
SERCA1	Thermo Scientific	MA3-912	egér	1:1000	nyúl vázizom eredetű ATPáz aminosav 506-C-terminus
Aktin	Santa Cruz	sc-1616	nyúl	1:500	humán eredetű aktin C-terminusa
Sepn	Santa Cruz	sc-98960	nyúl	1:500	humán eredetű SEPN1 belső régiójából származó 293-452 aminosav
α -aktinin	Santa Cruz	sc-166524	egér	1:500	humán eredetű α -aktinin C-terminusában 872-891 aminosavak

1. táblázat Western blot-hoz használt antitestek

III.6.8. Az izmok szeléntartalmának meghatározása

Az EDL izom teljes szeléntartalmának becslését korábban részletesen ismertettük (Ungvári és mtsai., 2014). Röviden, az EDL izom teljes szeléntartalmának becsléséhez Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry-t (HG-AFS) használtunk. A mintákon nedves emésztést végeztünk úgy, hogy 5 ml 65% HNO₃-t adtunk 1 g mintához, 60 °C-on 60 percig, majd 120 °C-on 240 percig emésztettük, ezután 3 ml 30% -os H₂O₂-t adtunk hozzá. 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.

III.7. Adatelemzés és statisztika

Az összesített adatokat átlag $\pm$ átlag hibájaként (SEM) fejeztük ki. Az átlagot és a SEM-et 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 tetanusos erő közötti kapcsolatot az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció mediátorként változtatja-e.

IV. Eredmények

IV.1. *In vivo* kísérletek

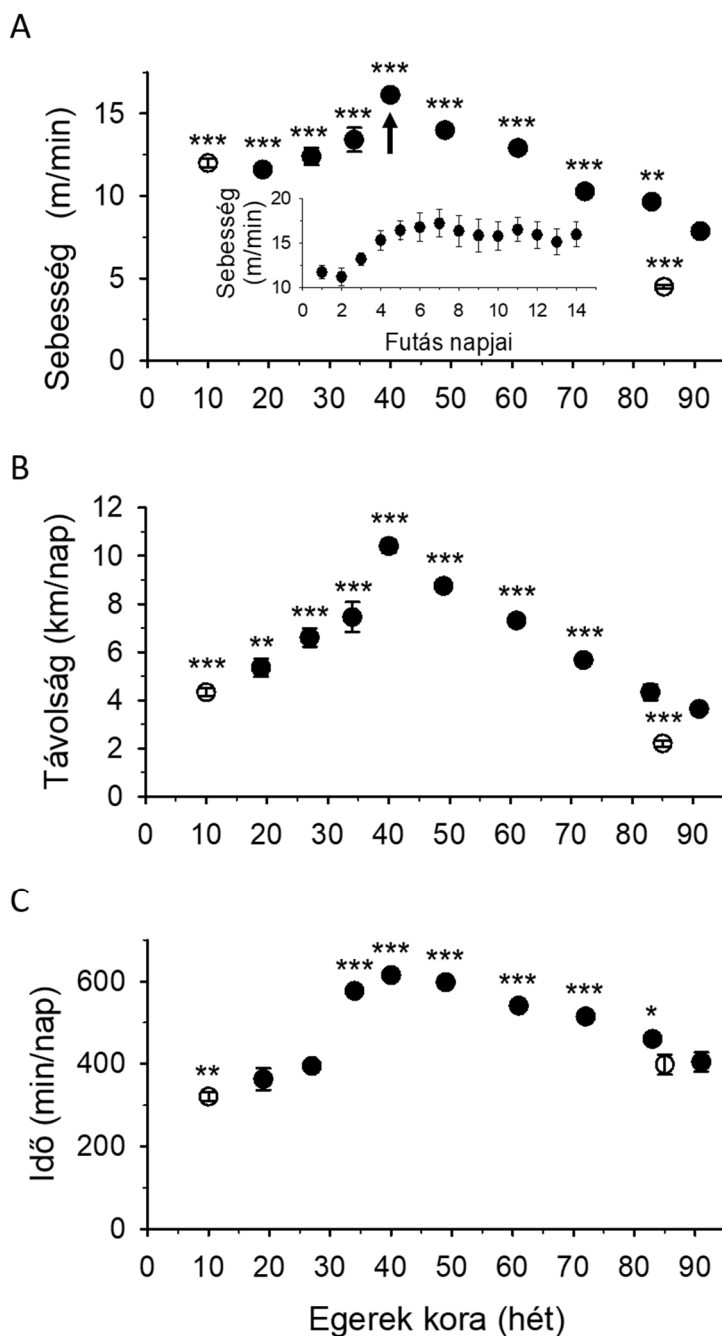
Az állatok *in vivo* izomtéljesítményének ellenőrzésére grip tesztet használtunk. A kontroll állatok testtömegre normalizált fogási ereje csökkent az életkorral, mivel a testsúlyuk nőtt, viszont a fiatal állatokhoz hasonló maximális erőt produkáltak (2. táblázat). A Compact mutációt (*Cmpt*) hordozó, 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 (2. táblázat). A szelénkezelés nem változtatta meg a maximális fogási erőt időskorban, de a testtömegre normalizált kapaszkodási erő szignifikánsan magasabb lett, mint a kontroll egereké (2. táblázat).

	Fiatal (3 hónapos)		Öreg (20-22 hónapos)		
	Kontroll (8)	Kontroll (6)	<i>Cmpt</i> (7)	Szelénnel etett (6)	Kontroll edzett (8)
Testsúly (g)	19,7±1,1 ***	31,2±1,2	52,8±1,8 ***	28,6±1,0	26,9±0,8**
Maximális erő (mN)	98,0±2,0	99,5±3,2	138,4±5,1 ***	104,0±2,9	112,1±3,1 **
Testsúlyra normalizált (mN/g)	5,02±0,13 ***	3,22±0,12	2,61±0,09 ***	3,63±0,10 **	4,17±0,12 ***

2. táblázat Testsúly és kapaszkodási erő. A zárójelben szereplő számok az állatok számát jelölik. *, ** és *** a szignifikáns különbséget jelölik az öreg kontrollhoz képest, $p<0,05$, $p<0,01$ és $p<0,001$.

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 (2. táblázat). 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 (lásd a 9. ábra A paneljének betét grafikonján). Az összes többi mért paraméter (napi maximális sebesség,

futási idő és távolság) hasonló tendenciát követett (ezeket az adatok nem mutatom be) a futás két hetében.



9. ábra Az önkéntes futás átlagos napi sebessége, távolsága és időtartalma. 8 kontroll egér, 2 havonta 2 héten át végzett önkéntes futásának követése. A: átlagos napi sebesség; B: átlagos napi távolság; C: átlagos napi futással töltött idő. Az üres körök a 10. héten az egerek első futási eredményét mutatják. Az üres körök a 85. héten egy olyan öreg egerekből álló csoport eredményeit mutatják, amelyek előtte egyszer sem futottak. A *, ** és *** szignifikáns eltérést mutat 90. héten kapott átlagoktól $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$ szinten. Az A panel betét grafikonja a nyíllal jelölt pont számolásához használt 14 napos mérési eredményt mutatja.

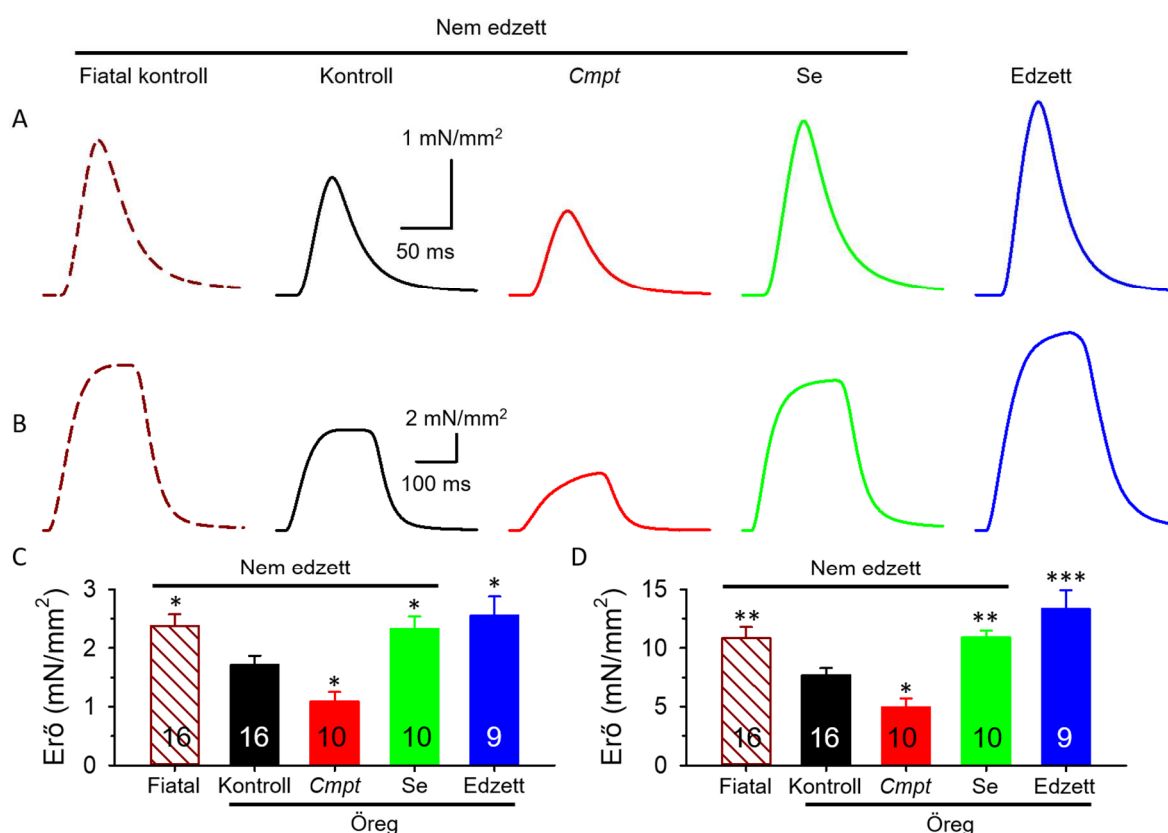
Az önkéntes futás minden paramétere csökkenést mutatott a 40. hetes életkor után a kontroll egerekben (9. ábra). Ezenkívül elvégeztük az önkéntes futó malom kísérletet olyan 21 hónapos állatokon is, amelyek korábban még nem futottak életükben (nem edzett csoport). Az átlagos

sebesség (9A. ábra) és a napi távolság (9B. ábra) 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 (9C ábra). 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.

IV 2. *In vitro* kísérletek

IV.2.1. Erőmérés

Ahogy vártuk, a korral csökken az *in vitro* izomerő a kontroll állatokban (10. ábra).



10. ábra Izometrikus erő az EDL izomban. Egyedi rövid összehúzódás (twitch) (A,C) és tetanusz (B,D) méréseket végeztünk 4 hónapos, nem edzett kontroll (barna, szaggatott vonal); 20 hónapos nem edzett kontroll (fekete); Cmpt (piros); szelénrel etetett (zöld); és edzett kontroll (kék) egerekből származó EDL izmokon, szobahőmérsékleten (24 °C). Az erőt az izom keresztmetszeti felületére normalizáltuk. Az oszlopokban lévő számok mutatják a vizsgált izmok számát. *, **, *** jelzi a szignifikáns különbséget az öreg kontrollhoz képest, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. A vizsgált állatok számát a 3. táblázatban adtuk meg.

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 (10. ábra A, C), a *Cmpt*, a szelénnel etetett, az edzett és a kontroll állatok között. (3. táblázat).

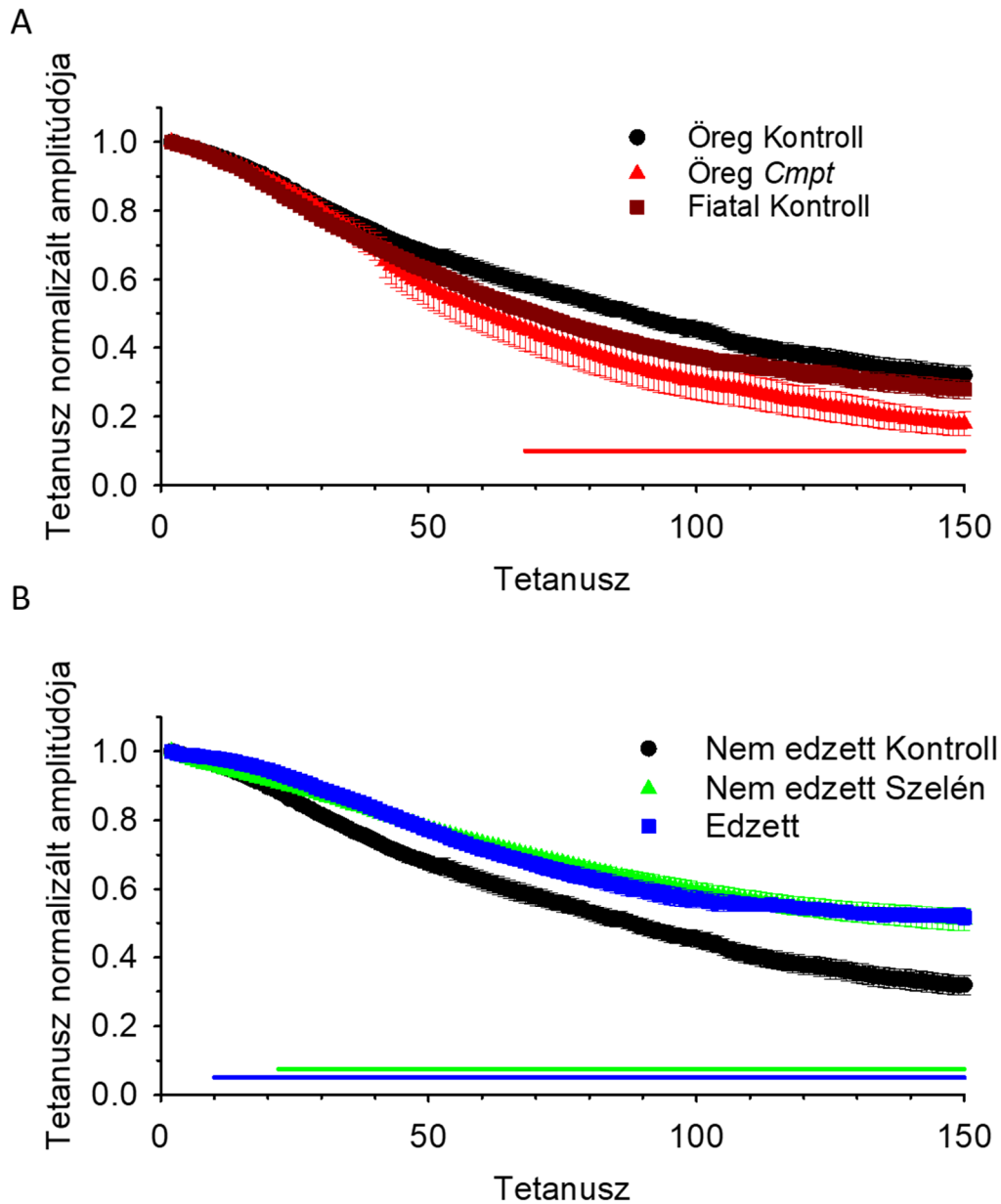
Erő paraméterei		Fiatal kontroll n=11	Öreg kontroll, nem edzett n=9	Öreg <i>Cmpt</i> , nem edzett n=7	Öreg szelénnel etetett, nem edzett n=5	Öreg kontroll, edzett n=5
Maximális erő (mN/mm ²)	Tw [§]	2,38±0,20*	1,71±0,16	1,09±0,16*	2,33±0,21*	2,01±0,22
	Te [§]	10,83±0,97**	7,68±0,61	4,95±0,77*	10,89±0,60*	10,92±0,88
TTP [§] (ms)	Tw	34,6±1,1	32,4±0,7	30,4±1,4	32,7±0,6	2,55±0,33***
	Te	173,2±4,2	168,8±6,9	164,7±7,0	189,3±3,3*	188,2±2,5**
HRT [§] (ms)	Tw	29,0±1,0	30,9±1,3	28,0±1,2	29,9±1,4	27,5±1,7*
	Te	72,8±5,0	75,3±7,4	74,6±5,2	64,2±1,8	62,9±2,5
Időtartam (ms)	Tw	216,5±32,6	185,3±22,8	136,4±6,9	179,2±24,1	132,4±12,2*
	Te	336,1±4,7	329,7±7,3	322,1±8,6	361,3±9,4*	350,2±7,9
Tw/Te		0,20±0,01	0,22±0,03	0,27±0,10	0,21±0,01	0,22±0,01
Fáradás [#] (%)	50.	31,6±2,0	32,5±2,0	40,1±5,5	22,3±1,1***	22,8±1,6***
	tetanusz	60,4±3,2	54,7±2,4	67,7±4,9*	40,2±2,5***	43,1±2,6
	alatt	150.	67,6±3,7	68,0±2,8	80,0±3,5*	49,1±3,3***
CSA (mm ²)		1,03±0,06*	1,22±0,08	1,90±0,21*	0,91±0,05*	0,80±0,08
Izmok száma		16	16	10	10	9

3. táblázat Az EDL izmon végzett twitch és tetanusz mérések átlagolt paraméterei. Az állatcsoportoknál szereplő értékek a vizsgált állatok számát mutatják. *, **, *** a szignifikáns különbséget jelöli az öreg nem edzett kontroll csoporthoz viszonyítva; p<0,05, p<0,01; p<0,001. Az 50., a 100. és a 150. tetanuszt az első tetanuszra normalizáltuk. A fáradást úgy számoltuk, hogy $100 \cdot (1 - (\text{normalizált tetanusz amplitúdója}))$. TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak), HRT: fél relaxációs idő (half relaxation time), Tw: Twitch, Te: Tetanusz, CSA: az izom keresztmetszeti felülete

Erő paraméterei		Fiatal kontroll n=11	Öreg kontroll, nem edzett n=9	Öreg Cmpt, nem edzett n=7	Öreg szelénnel etetett, nem edzett n=5	Öreg kontroll, edzett n=5
Maximális erő (mN/mm ²)	Tw [§]	2,06±0,26	2,03±0,36	1,83±0,41	2,07±0,29	2,01±0,22
	Te [§]	11,36±1,46	10,21±1,62	11,07±1,33	10,06±1,31	10,92±0,88
TTP [§] (ms)	Tw	70,5±4,3	64,7±3,5	68,2±4,2	81,1±2,5**	97,7±6,2***
	Te	505.9±2.8**	516.0±2.2	520,0±7,8	521,3±1,7	526,6±2,6**
HRT [§] (ms)	Tw	67,1±5,8	63,3±3,5	65,4±5,8	73,4±3,9	86.1±4.4*
	Te	91,5±2,3***	126,2±6,7	109,5±5,6	149,7±3,1*	119,4±6,0
Időtartam (ms)	Tw	311,1±22,2	286,9±18,2	273,1±18,8	306,7±15,9	364,8±25,3*
	Te	701,6±7,9***	820,9±25,5	796,6±34,4	862,6±13,9	780,8±13,6
Tw/Te		0,20±0,03	0,22±0,04	0,15±0,02	0,21±0,02	0,20±0,04
Fáradás [#] (%) tetanusz alatt	50.	33,5±4,2*	22,8±0,7	34,9±3,9**	20,9±2,3	29,7±1,0***
	100.	54,6±4,5*	40,7±1,8	60,1±4,0***	36,6±3,9	44,6±2,2
	150.	63,3±4,6*	48,8±2,7	72,3±3,7***	48,5±4,2	50,9±2,6
CSA (mm ²)		1,01±0,07	1,07±0,13	1,05±0,14	1,02±0,09	0,93±0,07
Izmok száma		14	15	11	10	9

4. táblázat A soleus izmon végzett twitch és tetanusz mérések átlagolt paraméterei. Az állatcsoportoknál szereplő értékek a vizsgált állatok számát mutatják. *, **, *** a szignifikáns különbséget jelöli az öreg nem edzett kontroll csoporthoz viszonyítva; p<0,05, p<0,01; p<0,001. Az 50., a 100. és a 150. tetanuszt az első tetanuszra normalizáltuk. A fáradást úgy számoltuk, hogy $100 \cdot (1 - (\text{normalizált tetanusz amplitúdója}))$. TTP: csúcs eléréséhez szükséges idő (time to peak), HRT: fél relaxációs idő (half relaxation time), Tw: Twitch, Te: Tetanusz, CSA: az izom keresztmetszeti felülete

Míg a szelénnel 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 (10. ábra B, D). Érdekes módon ezek a különbségek nem voltak megfigyelhetőek a soleus izomban. (4. táblázat). Nem volt különbség az egyedi rángás/tetanusz arányban az állatcsoportok között (3. és 4. táblázat). Ez a paraméter a neuromuszkuláris junkció normális működéséről árulkodik.

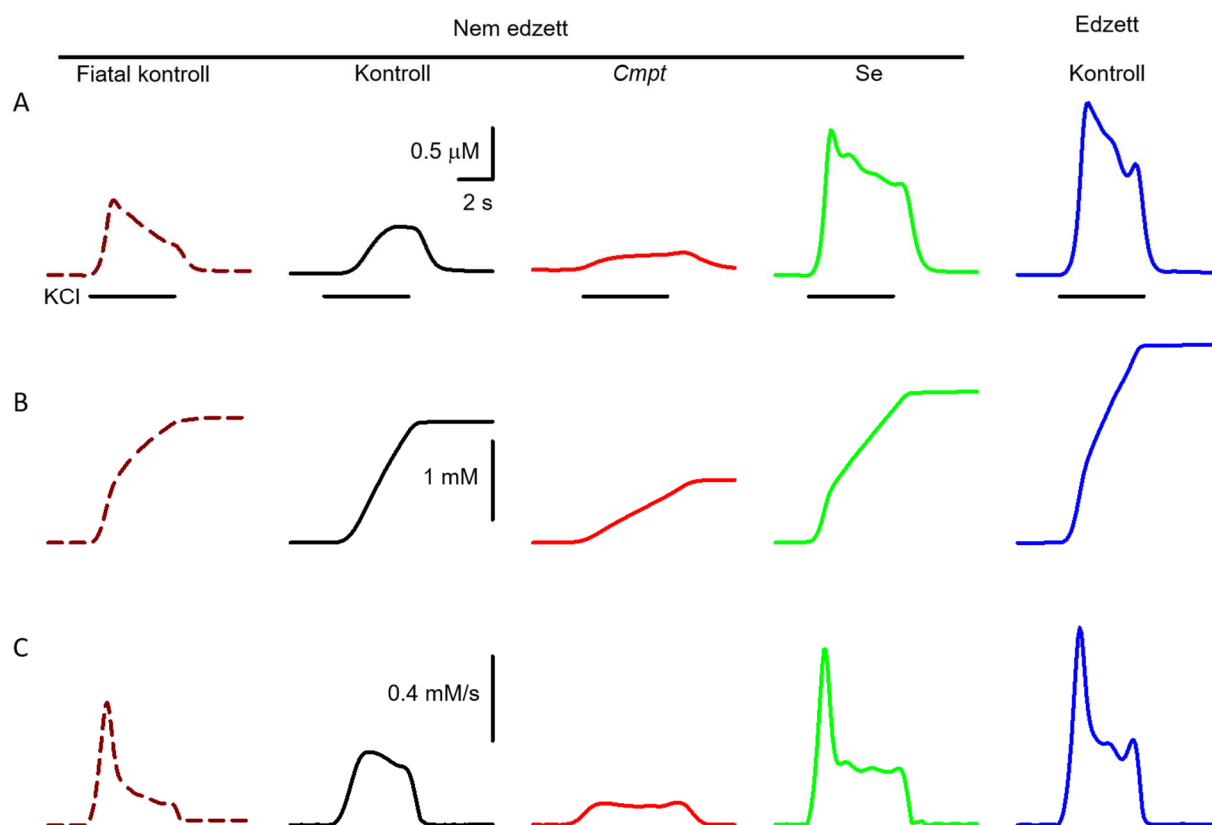


11. ábra Fáradás mérése. Az EDL izmok fáradását 0,5 Hz frekvenciával ismételt 150 darab tetanussal váltottuk ki, az egymást követő tetanuszok amplitúdóit az első kiváltott tetanuszra normalizáltuk. A: Fiatal és öreg egereknél a fáradás hasonló volt, de az öreg Cmpt egerekben szignifikánsan nagyobb, mint a többiben. B: Az edzett és szelénnel etetett egerek kevésbé fáradtak, mint azt tapasztaltunk az öreg egerek esetében. A folyamatos vízszintes vonalak a görbék alatt (piros: nem edzett Cmpt; zöld: nem edzett szelénnel etetett; kék: edzett kontroll) azt az intervallumot mutatják, ahol az adatok szignifikánsan különböznek a nem edzett öreg kontrolltól ($p < 0,05$). A vizsgált izmok darabszáma és a konkrét 50., 100. és 150. fáradás értékek a 3. számú táblázatban találhatóak.

Továbbá a szelén és az edzés csökkentette az izmok fáradását a 150 tetanuszt tartalmazó protokoll alatt EDL izmokban (11B ábra, 3. táblázat), viszont az öreg állatok SOL izmaiban nem (4. táblázat). Ezzel ellentétben az idős Cmpt egerekből származó mind gyors, mind lassú izmok szignifikánsan fáradékonyabbak voltak, mint az idős kontroll egerek azonos típusú izmai (11A ábra, 2. táblázat). Nem találtunk szignifikáns különbségeket a fiatal és az idős kontroll egerek között az EDL izmok fáradékonyságában (11A. ábra, 2. táblázat).

IV.2.2. Intracelluláris kalciumkoncentráció változások ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) öreg állatokban

Megvizsgáltuk az izomhipertrófia, az edzés és a szelénkezelés hatásait a kalciumhomeosztázisra idős egerek egyedi FDB izomrostjaiban. A rostokat a mérésekhez a kalciumérzékeny Fura-2 acetoxi-metil (AM) festékkel töltöttük fel.



12. ábra KCl depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek és az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} mennyisége és sebessége FDB rostokban. A: KCl depolarizáció által kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció változások, B: a felszabadult Ca^{2+} mennyisége, C: a Ca^{2+} -felszabadulás fluxusa 4 hónapos nem edzett (barna, szaggatott vonal), 20 hónapos nem edzett kontroll (fekete), szelénrel etetett (zöld) és edzett kontroll (kék) egerekből származó FDB rostokban. A fekete vízszintes vonalak a kalciumtranziensek alatt a KCl adagolását mutatják.

A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szignifikánsan magasabb volt a *Cmpt* rostokban, mint a kontroll egerekből származóakban (5. táblázat). A szelénkezelés és edzés jelentősen csökkentette a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ szintet a fiatal állatok szintjére (5. táblázat) 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 12A ábra reprezentatív Ca^{2+} -tranzienseket mutat, amelyeket ilyen depolarizációkkal idéztünk elő normál (1,8 mM) extracelluláris kalciumkoncentráció jelenlétében. A szelén etetés és az edzés növelte a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját, míg *Cmpt* állatokban ez kisebb volt, mint a kontroll egerekben. Az 5. táblázatban szereplő összesített adatok megerősítik, hogy a szelén étrend-kiegészítés 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 Ca^{2+} -felszabadulás mértéke. A szelén majdnem megduplázta, és az edzés csaknem megháromszorozta a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját. Ezzel ellentétben a depolarizációval kiváltott Ca^{2+} -tranziensek a *Cmpt* állatokban lényegesen kisebbek voltak, mint a kontroll rostokban (12A ábra, 5. táblázat).

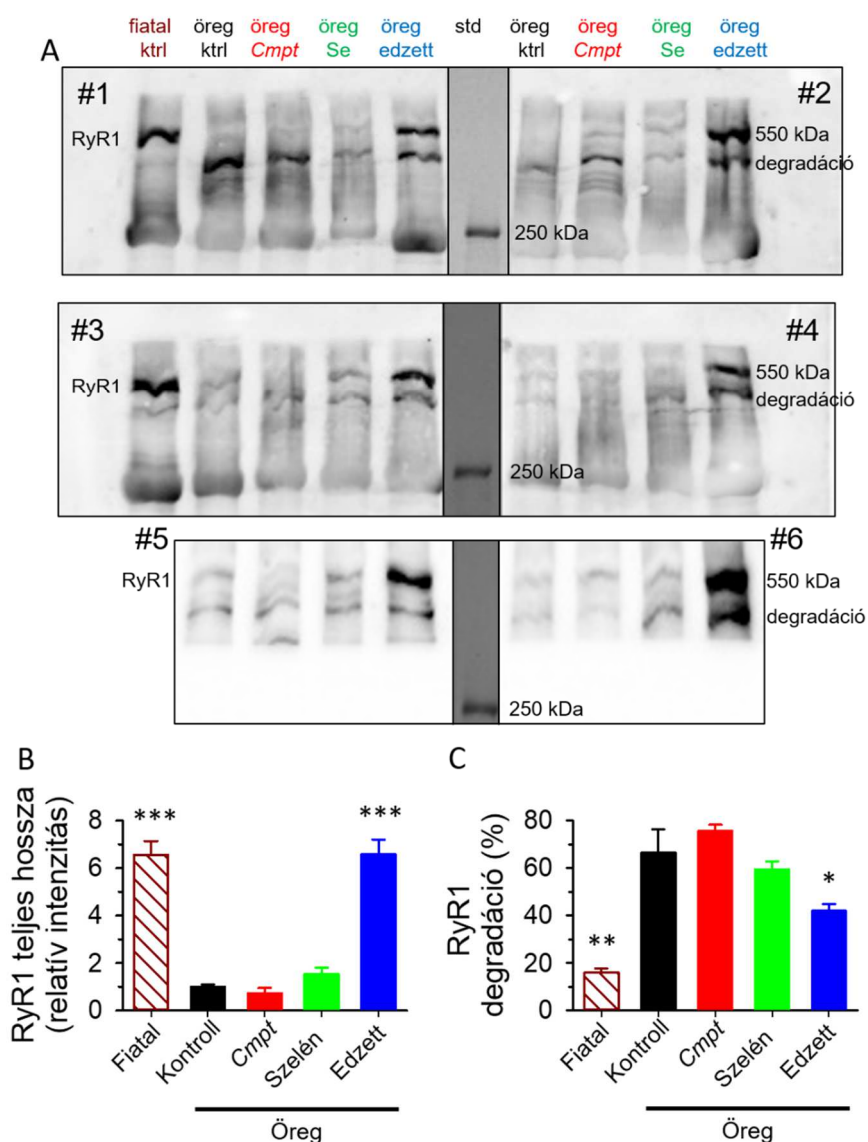
	Fiatal		Öreg		
	Kontroll (6)	Kontroll (4)	<i>Cmpt</i> (6)	Szelénnel etetett (6)	Kontroll, edzett (3)
Nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	71,5±0,8***	78,1±1,6	88,3±4,9*	68,1±2,1***	70,0±1,5*
$\Delta[Ca^{2+}]_i$ (μ M)	643,7±63,6	566,3±62,4	163,4±24,1***	1080,3±193,5**	1702,1±230,2***
Ca^{2+} fluxus (μ M/s)	644,7±41,7**	481,2±34,0	186,8±31,3***	691,9±100,8*	1116,5±66,3***
Felszabadult Ca^{2+} mennyisége (μ M)	1332,2±92,7	1326,6±112,5	426,7±81,0***	1355,6±202,7	1716,5±159,5**
Rostok száma	39	25	11	14	8

5. táblázat A kalcium tranziensek és az SR-ből felszabaduló Ca^{2+} mennyiség átlagos paraméterei FDB izomrostokban. A zárójelben lévő számok az állatcsoportok neve mellett a vizsgált állatok számát jelölik. *, **, *** mutatja a szignifikáns különbséget, $p < 0,05$, $0,01$ és $0,001$, az idős kontroll csoporthoz viszonyítva.

A tranziensek további vizsgálata bizonyította, hogy az SR-ből felszabaduló kalcium mennyisége az edzés után szignifikánsan nagyobb (12B. ábra, 5. táblázat), 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 szelénrel táplált egerekben nem változott, a Ca^{2+} -tranziens amplitúdója jelentősen megnőtt. Ez az SR-ből történő kalciumfelszabadulás módosított kinetikájára utalhat, amelyet megerősítettünk az SR Ca^{2+} -felszabadulás sebességének (fluxus) kiszámításával. Ez szignifikánsan nagyobbak bizonyult mind a szelénrel táplált, mind az edzett egereknél, míg a *Cmpt* állatokban szignifikánsan alacsonyabb volt, a nem edzett kontroll egerekhez viszonyítva (12C. ábra, 5. táblázat).

IV.2.3. Az idős izom $[Ca^{2+}]_i$ -t szabályozó fehérjéinek összetétele

Megvizsgáltuk az EC-kapcsolat kulcsfontosságú fehérjéinek expressziós mintázatát a vázizmokban. Az 13A. ábra reprezentatív Western blotot mutat az összes állatcsoportból.

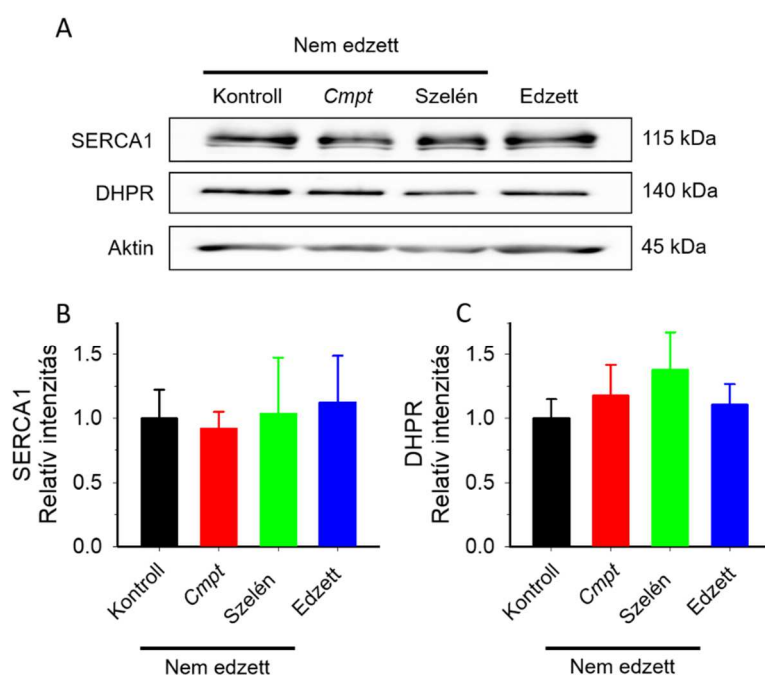


13. ábra A RyR1 expressziójának változása öreg egerek izmaiban. A: 8 darab öreg (mindegyik csoportból 2) és egy fiatal állattól származó specifikus RyR1 antitestekkel festett immunoblotok reprezentatív membránjai. A középső, fekete függőleges vonalak jelzik a határt a standard (std) és a minta sávok között. Az #1 és a #2 blot Thermo Scientific antitesttel volt jelölve, míg a #3 blot I. Marty-tól származó antitesttel, (1. táblázat) amit lumineszcens módon volt detektálva. B: Átlagolt RyR1 (550 kDa sáv) tartalom normalizálva az öreg kontrollra, 4 darab fiatal és 6 darab öreg egérből minden egyes csoportból. C: Összes Western blotból származó degradált RyR1 átlagolt százaléka. *, **, *** mutatja a szignifikáns különbséget a nem edzett öreg kontroll csoporthoz képest, $p < 0,05$, $0,01$ és $0,001$.

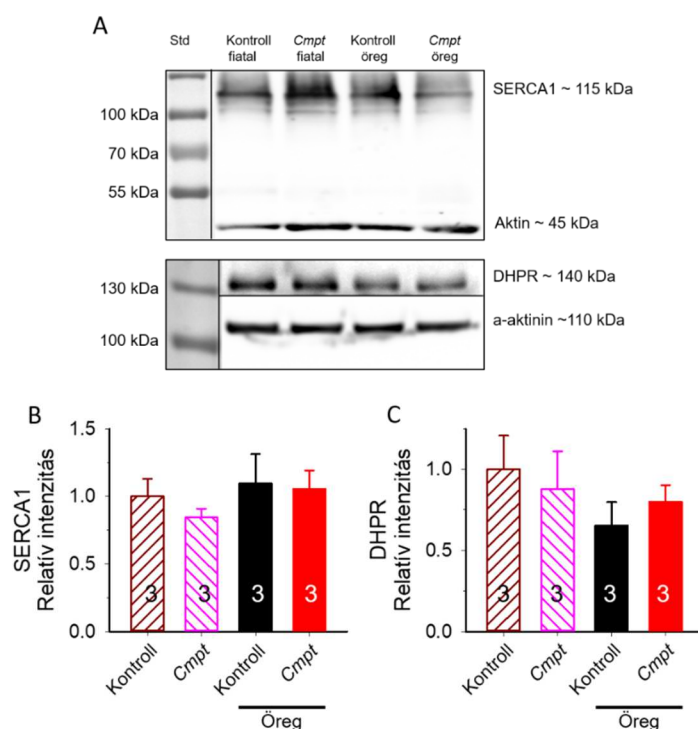
Érdekes módon a RyR1 erős korfüggő csökkenést mutatott minden nem edzett állatcsoportban, de az edzett egerekben nem (13B. ábra). Szembetűnő, hogy az egész életen át tartó futás a teljes hosszúságú RyR1 tartalmat megőrizte a fiatal állatok szintjén (13B. ábra). Másrészt a RyR1 kisebb molekulatömegű bomlástermékének szignifikánsan megnövekedett mennyisége figyelhető meg idős állatokban (13C. ábra). Ezzel szemben az egész életen át tartó

edzés a normál, 550 kDa-os protein szignifikánsan kevesebb bomlását eredményezte (13C. ábra). A RyR1 expressziós mintázatát két különböző antitesttel igazoltuk (1. táblázat, 13. ábra).

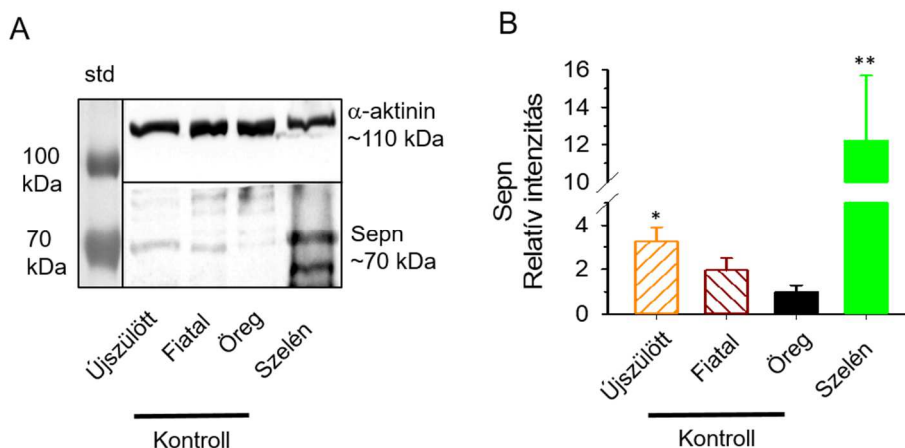
Érdekes módon, a RyR1-el ellentétben nem volt szignifikáns különbség a SERCA és a DHPR normalizált szintjében az idős állatok különböző csoportjai között (14. ábra). Ezenkívül nem találtunk szignifikáns különbséget a DHPR és a SERCA mennyiségében a fiatal és az idős kontroll állatok között sem (15. ábra). 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 (Bodnár és mtsai., 2016), 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 (16. ábra). A szelénnel kiegészített étrend után figyelemre méltó emelkedést figyeltünk meg a szelenoprotein N szintjében (16. ábra). Ezzel párhuzamosan meghatároztuk az idős egerek EDL izmainak átlagos szeléntartalmát, és ez szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a szelénrel 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, $n=4$).



14. ábra SERCA1 és DHPR expressziója öreg izmokban. A: Reprezentatív Western blot képek mutatják a SERCA1 és DHPR expresszióját quadriceps femoris izmokban. Aktint használtunk töltési kontrollként. B: SERCA1 és C: DHPR átlagolt tartalma minden csoportból 4 öreg egér izmaiból, először aktinra, majd utána nem edzett kontrollra normalizálva.



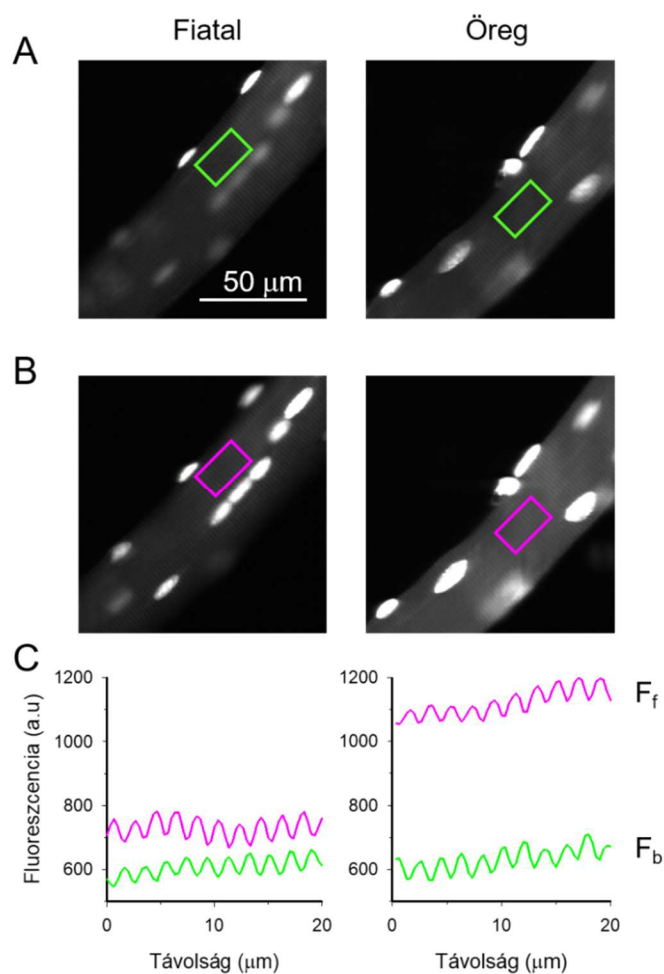
15. ábra SERCA1 és DHPR expressziója fiatal és öreg izmokban. A: Reprezentatív Western blot képek mutatják a SERCA1 és a DHPR expresszióját quadriceps femoris izmokban. α-aktinint és aktint használtunk töltési kontrollként. Az átlagolt SERCA1 (B) és DHPR (C) expressziója fiatal és öreg kontroll egerekből származó izmokon, illetve Cmpt egerek, amit először a töltési kontrollra, majd a fiatal kontrollra normalizáltunk. Az oszlopokban látható számok mutatják a vizsgált állatok számát. A fekete vízszintes illetve függőleges vonalak jelölik a határt a standard (std) és a minta sávok között. A sávok különböző expozíciós idővel készültek.



16. ábra Selenoprotein N kortól függő expressziója C57BL/6 egerekben. A: Reprezentatív immunoblot specifikus Selenoprotein N (Sepn) antitesttel festve; 4 napos (Neonátális), 4 hónapos (fiatal) és 22 hónapos (öreg) kontroll és szelénrel etetett egerekből származó quadriceps femoris esetén. A bal oldali oszlop a standard (std). α-aktinint használtunk töltési kontrollként. B: 3 membrán átlagolt relatív intenzitásai (12 darab egér, 3 minden csoportból). * és ** mutatja a szignifikáns különbséget az öreg kontrollhoz képest, $p < 0,05$ és $p < 0,01$. A fekete vízszintes illetve függőleges vonalak jelölik az határt a standard (std) és a minta sávok között. A sávok különböző expozíciós idővel készültek.

IV.2.4. Megnövekedett ROS-termelés az idős izomban

Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a RyR1-et az oxidatív stressz befolyásolja (Rederstorff és mtsai., 2006), 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 (17. ábra). 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.

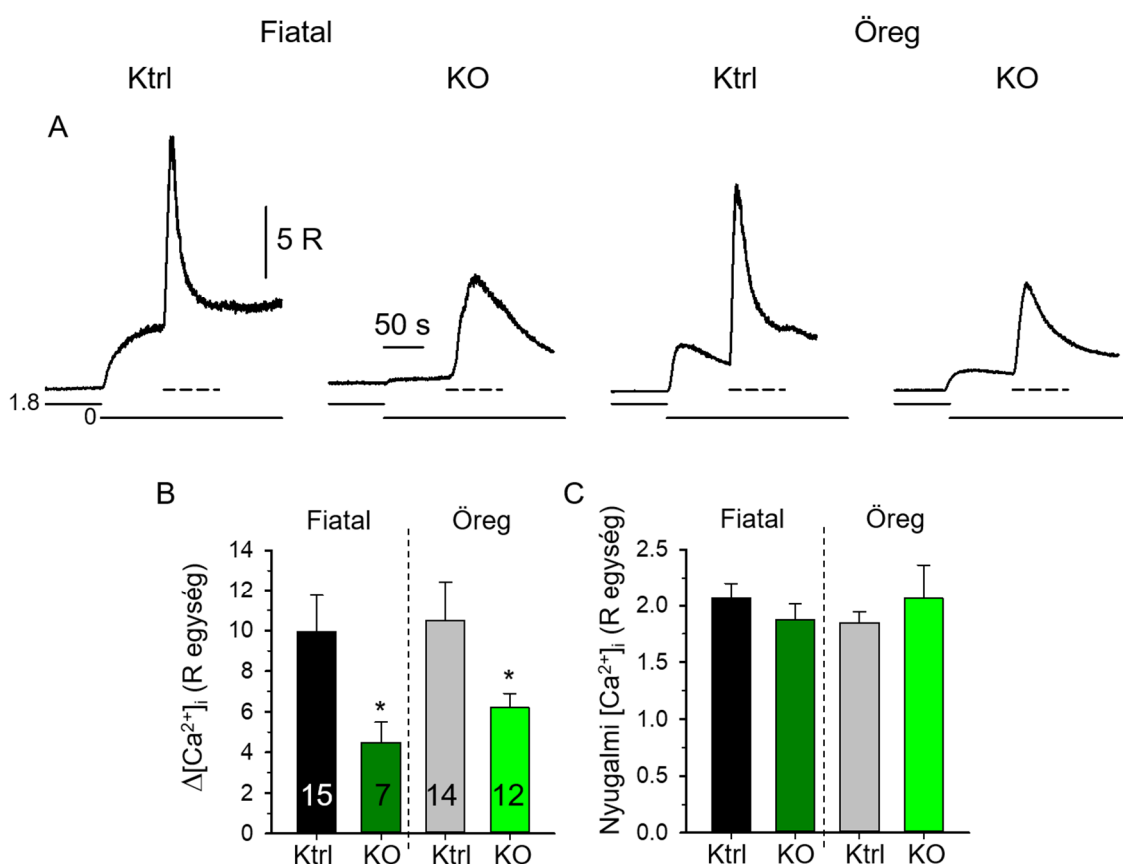


17. ábra ROS mérések. A: 3 mM dihidroetidiummal feltöltött nyugalomban levő FDB rost fluoreszcens intenzitása (532 nm-en gerjesztve és 550 nm fölött mérve). B: Ugyanazon rost képe 150 db 2 ms hosszú négyszögimpulzussal (téringelés) kiváltott tetanusz után. C: A rostok hossztenegelyével párhuzamosan kijelölt téglalapok területéből átlagolt fluoreszcencia értékeket a háttérre normalizáltuk; az A panelen zöld; stimuláció előtti fluoreszcencia (F_b) és a B panelen rózsaszín; stimulációt követő fluoreszcencia (F_f). A fluoreszcencia periodikusán váltakozó növekedése és csökkenése a festék eloszlásának a szarkomért követő mintázatát mutatja.

IV.2.5. SAnk1 KO egerekből származó vázizom rostoknak csökken az SR kalciumtartalma

Munkánk második részében szintén az öregedés hatását vizsgáltuk a vázizmok működésére egy speciális egérmódelben. 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 (Giacomello és mtsai., 2015). Ezért megvizsgáltuk, hogyan változik a vázizmok kalciumhomeosztázisa ebben az egérmódelben a kor előrehaladtával.

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



18. ábra Csökkent amplitúdójú Ca^{2+} -tranziensek sAnk1 KO egerekből származó FDB izmokon. A: reprezentatív, releasing koktéllal kiváltott Ca^{2+} tranziensek, 4 és 10 hónapos kontroll (Ktrl) illetve sAnk1 KO egerek FDB izmaiból izolált rostokon történő mérésekből származnak. B: maximális $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés; R egység: ratio. C: a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Az oldatadagolás protokollja a következő volt: 0-70 s normál (1,8 mM Ca^{2+}) Tyrode, (1,8, folyamatos vonal), 70-300 s Ca^{2+} -mentes Tyrode 5 mM EGTA-val (0, folyamatos vonal), 150-220 s releasing koktél (200 μM 4-chloro-M-cresol és 10 μM ciklopiázonsav) Ca^{2+} -mentes Tyrode oldatban (szaggatott vonal). Az oszlopokban lévő számok az átlagolt rostok számát mutatják. A különböző csoportokban lévő állatok száma 3 és 4 között mozgott. * mutatja a szignifikáns különbséget a kontroll csoporttól, $p < 0,05$.

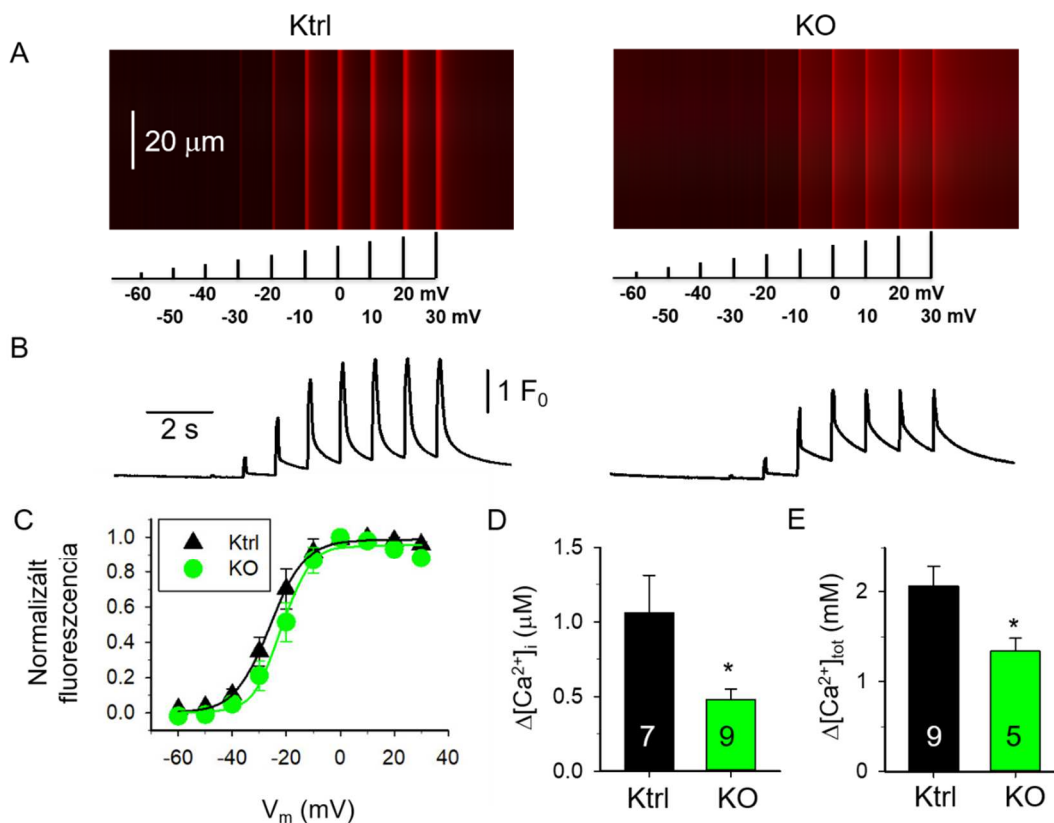
Először megmértük a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ot a kontroll és sAnk1 KO egerekből származó nem ingerelt FDB rostokon. A mérések alapján a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ értékek nem különböztek szignifikánsan sem a 4, sem a 10 hónapos sAnk1 KO egerekből származó FDB rostokban a kontrollhoz viszonyítva (18C. ábra). Kalciummentes extracelluláris oldatban, Ca^{2+} -felszabadulást okozó oldattal (releasing koktél) való kezelés hatására kialakuló reprezentatív Ca^{2+} tranziensek láthatóak a 18A. ábrán. A Ca^{2+} eltávolítása az extracelluláris oldatból

alkalmanként depolarizálhatja a rostokat, aminek következtében enyhe növekedés következhet be a $[Ca^{2+}]_i$ -ban (ez látható a tranziensek előtt). A releasing koktél adagolása a kontroll egerekből származó rostokon nagy Ca^{2+} tranzienseket eredményezett, ami már akkor elkezdett csökkenni a kalcium raktár ürülésének eredményeként, amikor a koktél még jelen volt a roston (18A. ábra). A genetikailag módosított egereken végzett mérésekből azt kaptuk, hogy a Ca^{2+} tranziensek amplitúdójának változásának ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) átlaga szignifikánsan kisebb volt a 4 és 10 hónapos KO egerekből származó rostokban, az azonos korú kontroll egerekhez viszonyítva (18B. ábra). Ez arra utalhat, hogy az SR térfogat, és így a teljes Ca^{2+} -tartalma kisebb az sAnk1 KO egerekben, mint a kontroll egerekben.

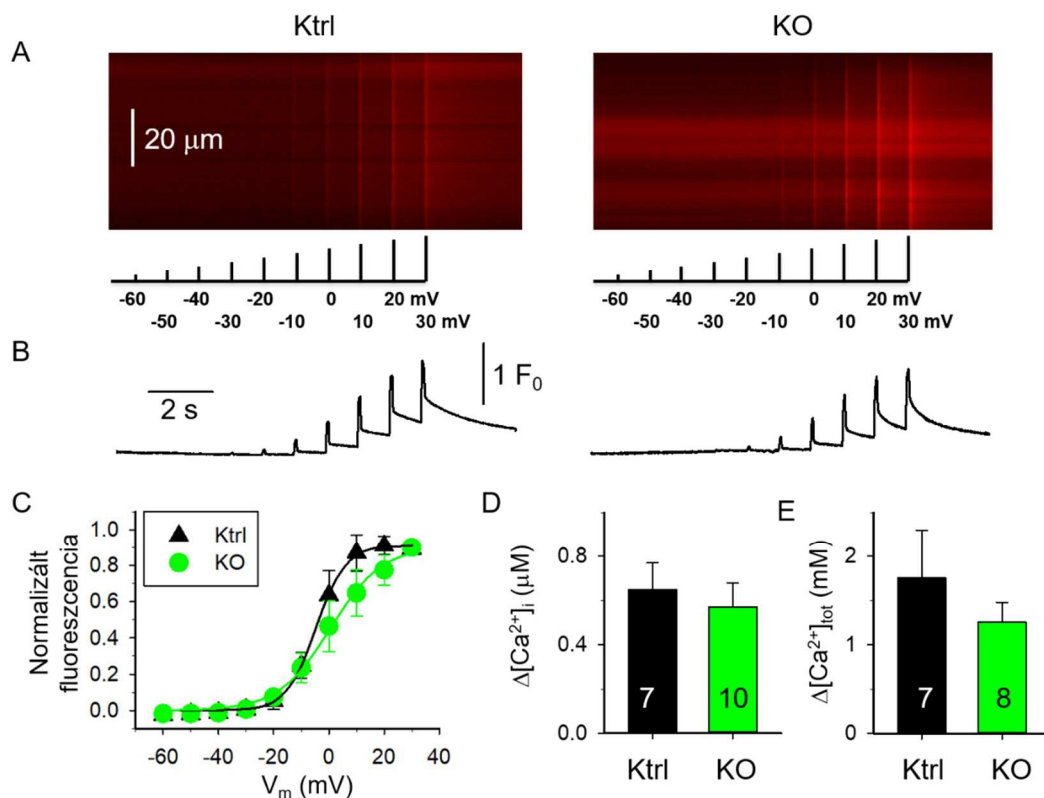
A következőkben $[Ca^{2+}]_i$ változásokat teljes sejttes feszültség clamp technika alkalmazásával vizsgáltuk úgy, hogy fokozatosan növeltük a membrán depolarizációt -60 mV és +30 mV között (19. és 20. ábra). Amint az 19. ábra A, B és D panelja mutatja, a Ca^{2+} tranziensek amplitúdójában lévő átlagos 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 (20. ábra B, D). Amikor kiszámítottuk a teljes felszabadult Ca^{2+} mennyiséget ($\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$) a legnagyobb depolarizációs pulzus (+30 mV) alatt, csak a 4 hónapos egerek esetén találtunk szignifikáns különbséget a sAnk1 KO és kontroll egerek között (19E. ábra), viszont a 10 hónaposak esetében már nem (20E. ábra). A tranziensek feszültség-függését leíró Boltzmann függvény paramétereit csak kismértékben befolyásolta a sAnk1 hiánya a fiatal (19C. ábra) és öreg (20C. ábra) 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 (6. táblázat).

Boltzmann illesztés paraméterei	Kontroll 4 hónapos (4 egér, 9 rost)	KO 4 hónapos (5 egér, 9 rost)	Kontroll 10 hónapos (4 egér, 9 rost)	KO 10 hónapos (4 egér, 9 rost)
$[Ca^{2+}]_{i,max}$	1,91±0,27	1,11±0,19*	1,61±0,34	1,39±0,32
k (mV)	7,25±1,09	5,57±0,85	5,88±0,92	8,67±1,16 [#]
V ₅₀ (mV)	-21,84±4,96	-20,68±2,97	-4,76±4,44 [#]	-3,62±6,17 [#]

6. táblázat Az értékek az egyedi rostok kalciumkoncentráció változásainak Boltzmann függvénnyel (10. egyenlet) történt illesztésének paramétereiből számolt átlagok. * szignifikáns eltérést mutat a kontroll értékektől $p < 0,05$ szinten. # szignifikáns eltérést mutat az azonos genetikai csoportba tartozó fiatal egerek értékeitől $p < 0,05$ szinten.



19. ábra A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ membránpotenciál függő változásai 4 hónapos kontroll és sAnk1 KO egerekben. A: Vonal menti pásztázási képek a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásairól teljes sejt feszültség clamp körülmények között. Az ingerlés 100 ms-ig tartó, folyamatosan növekedő membrán depolarizációkból állt -60 mV és +30 mV között; 10 mV növekedéssel minden 500 ms-ban. Minden sejtet -80 mV-os nyugalmi membránpotenciálra tartottunk és 10 mM EGTA-t tartalmazó külső oldattal mostunk. A baloldalon lévő skála mindkét vonal menti pásztázási képre vonatkozik. B: A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ időbeli változásai az A panelen lévő képekből számolódtak 50 vonal átlagolásával, miután a nyugalmi fluoreszcenciára (F_0) normalizáltunk. C: A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásának feszültség-függése. Az értékeket egyedi rostokból nyertük úgy, hogy Boltzmann-eloszlással illesztettünk és aztán az adott rostból kinyert maximumra normalizáltuk, végül rostokként átlagoltuk. A folytonos vonalak mutatják a Boltzmann-függvény átlagértékeket legjobban megközelítő görbéit, melyek paraméterei: $k=8,95$ és $6,17$ mV, illetve $V_{50}=-21,60$ és $-20,91$ mV, a kontroll ($n=10$) és a KO ($n=9$) állatokban. Átlagolt $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (D) és az átlagolt $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ (E) 4 db kontroll és 5 db KO egérből. A $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ maximumát (D) 100 ms, míg a $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{tot}}$ -ot (E) 1 s hosszú +30 mV-os depolarizációknál mértük. Az oszlopokban szereplő számok a mért rostok számát mutatják. * szignifikáns eltérést mutat a kontrollhoz képest $p<0,05$ szinten.

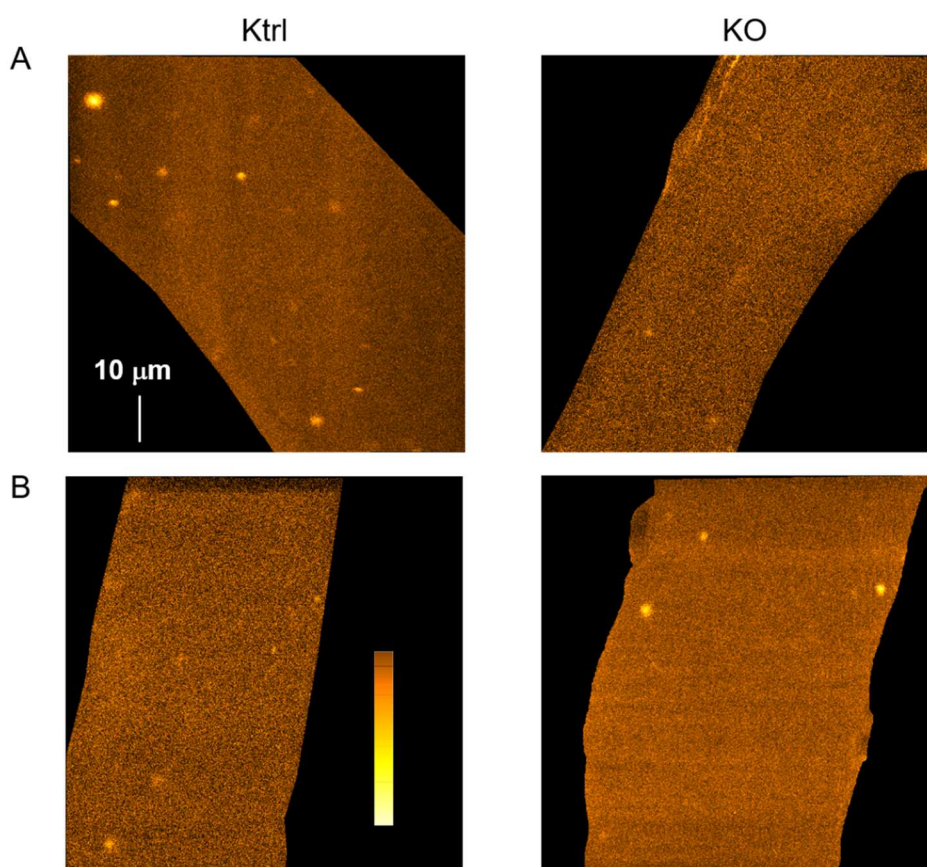


20. ábra A $[Ca^{2+}]_i$ membránpotenciál függő változásai 10 hónapos kontroll és sAnk1 KO egerekben. A: Vonali menti pásztázási képek a $[Ca^{2+}]_i$ változásairól, amiket ugyanazzal a depolarizációs protokollal váltottunk ki, mint az előző ábrán. A baloldalon lévő skála mindkét vonali menti pásztázási képre vonatkozik. B: A $[Ca^{2+}]_i$ időbeli változásai az A panelen lévő képekből számolódtak, ahogy azt az előző ábrán bemutattuk. C: A $[Ca^{2+}]_i$ változásának feszültségfüggése. Az értékeket az előző ábrán leírtak szerint kaptuk meg. A folytonos vonalak mutatják a Boltzmann függvény átlagértékeket legjobban megközelítő görbéit, melyek paraméterei: $k=8,09$ és $14,67$ mV, illetve $V_{50}=-5,94$ és $-7,86$ mV, a kontroll ($n=9$) és a KO ($n=9$) állapotokban. Átlagolt $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (D) és az átlagolt $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ (E) 3 db kontroll és 5 db KO egérből. A $\Delta[Ca^{2+}]_i$ maximumát (D) 100 ms, míg a $\Delta[Ca^{2+}]_{tot}$ -ot (E) 1 s hosszú +30 mV-os depolarizációknál mértük. Az oszlopokban szereplő számok a mért rostok számát mutatják.

Annak kiderítése érdekében, hogy a releasing koktéllal végzett kezelés után megfigyelt, vagy a membrán depolarizáció indukálta csökkent Ca^{2+} tranziensek a SERCA pumpa megváltozott kalciumtranszport eredményeként keletkeztek-e, kiszámoltuk a pumpa maximális Ca^{2+} szállítási sebességét (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 $4,79\pm0,07$ mM s^{-1} , $p=0,54$, $n=9$ mindkét csoportban).

IV.2.6. 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 (Kirsch és mtsai., 2001; Lukács és mtsai., 2008). 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. Az 22. ábrán egy 20 s-os periódust lefedő 120 darab egymást követő XY képből származó összesített képek láthatóak.



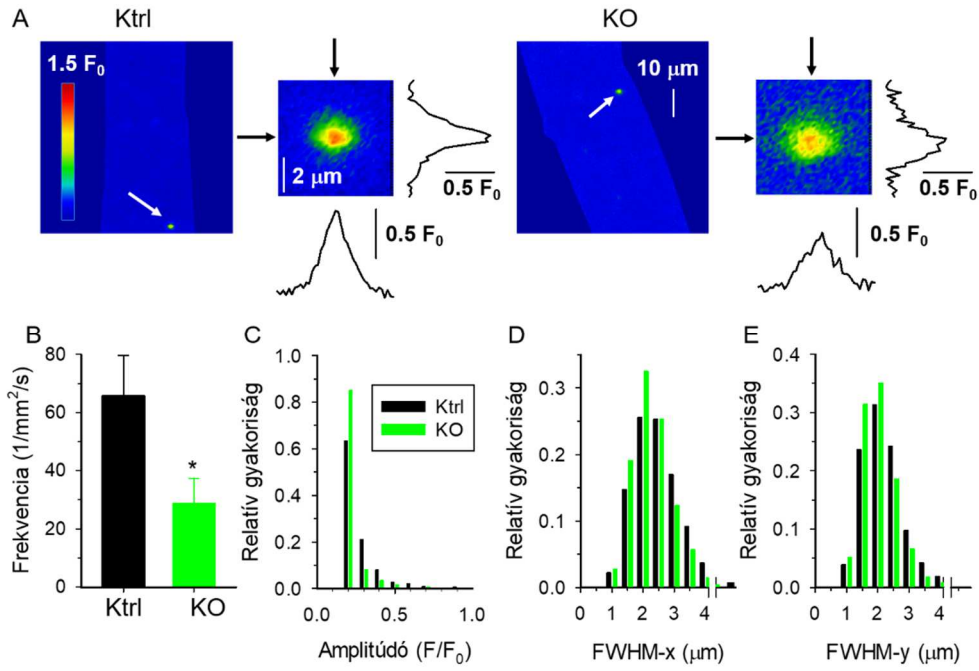
21. ábra Spontán Ca^{2+} felszabadulási események, szaponinnal permeabilizált FDB izomrostokban. Reprezentatív XY kompozit képek 4 (A) és 10 (B) hónapos kontroll (baloldal) és sAnk1 KO (jobboldal) egerek esetében. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat fluo-3-mal feltöltött rostokon figyeltük meg. Az ábrán mindegyik kép 120 db 16 Hz frekvencián rögzített kép összegzéséből készült. A bal felső képen lévő skála mindegyik képre vonatkozik. A színskála a bal alsó képen mindegyik képnél megegyezik. A világosabb színek nagyobb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásnak felelnek meg.

A 4 és 10 hónapos egerek jellemző CRE-jeit nagyított skálán mutatjuk be, a 22A., illetve a 23A. ábrán. A CRE-k gyakoriságának jelentős csökkenését észleltük a 4 hónapos sAnk1 KO egerek rostjaiban, összehasonlítva az azonos korú kontroll egerekkel (22B. ábra, 7. táblázat). A CRE-k gyakorisága csökken a 10 hónapos kontroll egerek rostjaiban is a fiatal kontroll állatokhoz képest (7. táblázat). Öregkorban azonban a KO és a kontroll egerek között nem észleltünk további különbséget a CRE-k frekvenciájában (23B. ábra, 7. táblázat).

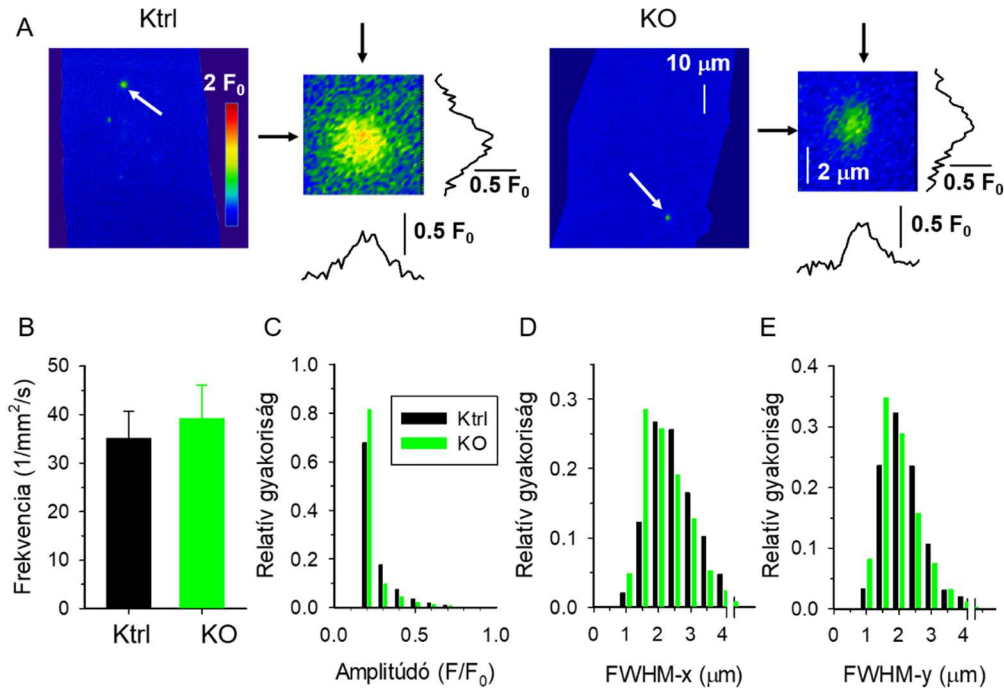
	Kontroll 4 hónapos (3 egér, 43 rost)	KO 4 hónapos (9 egér, 87 rost)	Kontroll 10 hónapos (3 egér, 76 rost)	KO 10 hónapos (4 egér, 105 rost)
Spark-ok száma	1084	1231	1063	1646
Amplitúdó (F/F ₀)	0,216 ± 0,005	0,158 ± 0,003 ***	0,205 ± 0,006	0,171 ± 0,003 ***,##
FWHM-x (μm)	2,239 ± 0,023	2,048 ± 0,020 ***	2,312 ± 0,025 #	1,972 ± 0,020 ***,##
FWHM-y (μm)	1,968 ± 0,020	1,784 ± 0,017 ***	1,991 ± 0,022	1,761 ± 0,017 ***
Signal mass (SM) (μm ³)	3,195 ± 0,130	1,852 ± 0,090 ***	2,909 ± 0,124	1,996 ± 0,088 ***
Frekvencia (mm ⁻² s ⁻¹)	65,8 ± 13,8	28,8 ± 8,6 *	35,0 ± 5,7 #	39,1 ± 6,9

7. táblázat CRE paraméterei kontroll és sAnk1 KO rostokban. * és *** mutatja a szignifikáns különbséget, $p < 0,05$ és $p < 0,001$ szinten a kontrollhoz képest. # és ## mutatja a szignifikáns különbséget a fiatal, genetikailag megegyező egerektől $p < 0,05$ és $p < 0,01$ szinten.

Ezt követően kiszámoltuk az átlagos CRE amplitúdót (F/F₀), és szignifikáns csökkenést találtunk a 4- és 10 hónapos KO egerekben az azonos korú kontrollhoz viszonyítva (7. táblázat). 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 (22C. és 23C. ábra). A CRE-k térbeli kiterjedésének elemzése azt mutatta, hogy az események félérték-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 (7. táblázat). Ez együtt járt a megnövekedett számú kis amplitúdójú CRE-vel a KO egerek rostjaiban (22. ábra D, E és 23. ábra D, E). Ezek a változások egyértelműen tükröződtek a felszabadult Ca²⁺ számított mennyiségében, amelyet a CRE-k alatt a jelsűrűséggel (SM) becsülnek meg (10. egyenlet) (Hollingworth és mtsai., 2001). Amint azt a 7. táblázatban bemutatjuk, 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 Ca²⁺ mennyisége csökken, vagy a Ca²⁺ csatornák nyílása károsodott, esetleg ez egyszerre is megtörténhet.



22. ábra Ca^{2+} felszabadulási események jellemző paraméterei 4 hónapos kontroll és *sAnk1* KO egerekben. A: egyedi normalizált fluoreszcencia (F/F_0) XY képek. A képeket úgy állítottuk elő, hogy egy képet kiválasztottunk egy sorozatból (amint azt a 19. ábra szemlélteti), és normalizáltuk a kiindulási fluoreszcenciára (F_0) a háttér eltávolítása után (a rostok kívül meghatározva). A nagyított részek az eredeti képen megjelölt (fehér nyilak jelölik) Ca^{2+} felszabadulási eseményeket (CRE) mutatják, a rostok hosszanti tengelyével párhuzamos (x) vagy merőleges (y) térbeli profiljaikkal együtt. B-E: A CRE-k összesített adatai. B: frekvencia, C: amplitúdó, és teljes szélesség a maximum felénél (FWHM) x (D) és y (E) irányban kontroll (Ktrl, események száma, $n=1084$) és KO ($n=1231$) rostokon.



23. ábra A Ca^{2+} felszabadulás események jellemzői 10 hónapos kontroll és *sAnk1* KO egerekben. A: egyedi, normalizált fluoreszcencia (F/F_0) XY képek. A képeket az előző ábránál leírt módon készítettük el. B-E: A CRE-k összesített adatai. B: frekvencia, C: amplitúdó, és teljes szélesség a maximum felénél (FWHM) x (D) és y (E) irányban kontroll (Ktrl, események száma, $n=1063$) és KO ($n=1646$) rostokon.

V. Diszkusszió

Munkám során a vázizom öregedés során bekövetkezett változásait vizsgáltam egereken. A bemutatott eredmények egyrészt a szelén étrend kiegészítőként való alkalmazásáról és az egész életen át tartó edzés hatásairól adtak új ismereteket. Másrészt a vázizom egy fontos fehérjéjének hiánya esetén az öregedéssel kialakuló módosult kalciumháztartásról szolgáltatott új adatokat.

V.1. Az öregedés hatása az izmok teljesítményére

Az öregedés során a vázizom erejének és tömegének jelentős csökkenése (szarkopénia) fokozott fáradékonysággal, megromlott regenerációs képességgel és alacsony fizikai teljesítménnyel jár (Distefano & Goodpaster, 2018; Evans & Hurley, 1995; Rolland, 2008). A szarkopénia patofiziológiáját fokozott oxidatív stressz és csökkent hormontermelés jellemzi, és a legfrissebb adatok azt mutatják, hogy a megnövekedett miosztatin szint szintén hozzájárulhat ehhez a folyamathoz (Yarasheski és mtsai., 2002). Mivel vizsgálataink során nem tapasztaltunk pozitív eltérést a csökkent miosztatin expresszióval rendelkező *Cmpt* egerek izomteljesítményében a vad típusú egerekhez képest, így eredményeink arra utalnak, hogy a miosztatin szint változása nem befolyásolhatja jelentősen az idősök izomteljesítményét. Viszont azt találtuk, hogy egerekben a fizikai aktivitás és a testmozgás megakadályozhatja vagy kompenzálhatja az izom öregedését. Továbbá mások arról is beszámoltak, hogy mindezek enyhítik az izomerőhöz, tömeghez és regenerációs képességhez kapcsolódó korral járó betegségeket, és emellett megakadályozzák az izom anyagcsere kóros változásait is (Distefano & Goodpaster, 2018). A csökkent keresztmetszetre normalizált erő (fajlagos feszülés) a fő összetevője az izom feszülés csökkenésének. További tanulmányok azt mutatták, hogy ezt inkább az aktomiozin kereszthidak számának csökkenése okozza, nem pedig az egyetlen kereszthíd által kifejtett erő csökkenése (D'Antona és mtsai., 2003).

Azt is meg kell jegyeznünk, hogy az öregedéssel járó csökkent fizikai teljesítmény részben a szív- és érrendszeri kapacitás gyengülésének is tulajdonítható (Farris és mtsai., 2017). Az öregedő szív fokozott kamrai hipertrófiát mutat és csökken a testmozgás tolerancia a maximális pulzusszám csökkenése miatt. Ez pedig a perifériás izomtömegben csökkent oxigén extrakcióhoz vezet.

V.2. A hosszú távú edzés hatása az izmok teljesítményére

A rutinszerű, enyhe testmozgás pozitív hatásairól számos emberekkel és kísérleti állatokkal végzett vizsgálatban már korábban beszámoltak (Boveris & Navarro, 2008). Kimutatták, hogy a folyamatos edzés kis mértékben növeli a patkányok élettartamát (Holloosy és mtsai., 1985), és egerekben is hasonló hatásokat állapítottak meg mérsékelt testmozgás esetén (Navarro és mtsai., 2004). A rendszeres enyhe testmozgás a teljes testre kifejtett jótékony hatásainak tanulmányozása során megfigyelték, hogy egerekben az öregedéssel járó neurológiai válaszok miként változnak (Boveris & Navarro, 2008). A hosszú távú testmozgás javította az egerek teljesítményét a fizikai tesztekben, ami arra utal, hogy a neuromuszkuláris ingerület átvitel és ította a testmozgás pozitív hatásait a magas vérnyomásra (Kokkinos és mtsai., 2001), a

hiperkoleszterinémiára (Stone, 2006) és a hiperglikémiára (Bhaskarabhatla, K. V. & Birrer, 2005), melyek kóros értékei általában csökkentek fizikai aktivitás hatására. Azonban még továbbra sem tudjuk pontosan, hogy a testmozgás milyen mechanizmusokon keresztül vezet ezekhez a pozitív hatásokhoz.

Az egyik lehetséges válasz, hogy az izmok alkalmazkodnak a folyamatos testmozgáshoz, a mitokondriális funkciók fokozódnak, továbbá a megnövekedett energiaigény kiszolgálásához szükséges légzési lánc új elemei szintetizálódnak (K. J. A. Davies és mtsai., 1981). Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy a ROS-termelés aktiválhatja a jelátviteli útvonalakat, melyek összekapcsolják a vázizmok adaptációját a testmozgással (Paulsen és mtsai., 2014; Ristow és mtsai., 2009). Ezért feltételezhető, hogy az élethosszan tartó edzés előfeltétele lehet az idős izmok ROS toleranciájának. Valójában mi is és mások (Navarro és mtsai., 2004) is kimutatták, hogy a folyamatos edzés jótékony hatással van az idős egerek fizikai teljesítményére. Ezen hatások két lehetséges útvonalt kell mérlegelni, amelyek mindegyike kapcsolatban van az oxidatív stresszel. Az első az, hogy mivel a RyR1 nagyon érzékeny az oxidatív változásokra, a kalciumcsatorna oxidatív stresszhez való alkalmazkodása az egész életen át tartó edzés révén javíthatja a csatorna expressziós szintjét és működését, amint azt a RyR1 általunk talált csökkent degradációja is mutatta az edzett állatokban. A második pedig, hogy habár a RyR1 degradációja nem csökken a szelén étrend kiegészítéssel idős állatok esetén, ennek ellenére a szelén antioxidánsként fokozta az izmok teljesítményét mind fiatal (Bodnár és mtsai., 2016), mind idős állatokban, és ez egy RyR1-független útvonallétezését támasztja alá.

V.3. A RyR1 expressziója idős korban

A károsodott EC-kapcsolat szintén hozzájárulhat az izom erejének a csökkenéséhez, mivel egyre több bizonyíték van az EC szétkapcsolódására az öregedés során: a DHPR feszültségérzékelő funkciója sérül, ami az SR-ből származó Ca^{2+} -felszabadulás csökkenéséhez vezet (Delbono és mtsai., 1995; Payne & Delbono, 2004). Továbbá a RyR1 foszforilációját és redox-függő módosulásait rendellenes Ca^{2+} homeosztázishoz és kontraktilis diszfunkcióhoz is társították hosszú távú izomfáradás esetén (Allen és mtsai., 2008). Az SR-ből való Ca^{2+} -felszabadulás károsodásáról számoltak be életkorfüggő izomgyengeségben (González és mtsai., 2003). Mi csökkent RyR1 tartalmat mutatunk ki öreg izom esetén, amit az egész életen át tartó edzés kompenzált. Érdekes módon a csökkent RyR1-el párhuzamosan megfigyelhető a szétesett kalciumcsatorna fehérje megnövekedett mennyisége az összes öreg állatcsoportban (lásd 13. ábra). A RyR1 ilyen degradációját korábban egy másik kutatócsoport is megfigyelte (Marty és mtsai., 1994). Bár ez a tendencia nem fordult meg teljesen az edzett állatokban, az ép RyR1 közel olyan szinten volt jelen, mint a fiatal egerekben (13. ábra). Így feltételezhető, hogy az izmok folyamatos használata megakadályozza a RyR1 egyébként elkerülhetetlenül fokozódó lebomlását idős korban, ami tehát elősegíti a szükséges számú működőképes kalciumcsatorna jelenlétét az izmokban.

V.4. Az izomtömeg és a kontraktilis erő közötti ellentmondás

Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy a *Cmpt* egerek nagyobb izomtömeggel rendelkeznek, mint a kontroll állatok, és ez az idős korban is így marad. Ez együtt jár a nagyobb maximális *in vivo* erővel is, ha azonban ezt normalizáljuk a testtömegre, akkor a *Cmpt* állatoknál lényegesen alacsonyabb értéket kapunk a vad típusú állatokhoz képest (2. táblázat) annak ellenére, hogy a testtömeg különbség főleg az izomtömeg növekedéséből származik. Hasonló eredményeket kaptak korábban miosztatin-hiányos egerek esetében is (Amthor és mtsai., 2007). Továbbá a fizikai teljesítmény csökkenés és az *in vitro* fáradás kifejezettebb a *Cmpt* egereknél (11. ábra). Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy az izomteljesítmény nemcsak az öregedéssel párhuzamosan romlik, amint azt számos korábbi megfigyelés bemutatta, és a fiatal korban meglévő nagyobb izomtömeg nem szükségszerűen eredményezi az idős egerek jobb teljesítményét. Ez számos publikációval összhangban áll, amelyek azt tárgyalták, hogy az izomtömeg és erő nem feltétlenül korrelál egymással az öregedés során és az izomfáradást az időskor is befolyásolja (Manring és mtsai., 2014). Másrésztől azonban humán tanulmányokban azt is kimutatták, hogy az izomteljesítmény nemcsak az öregedéssel csökken fokozatosan, hanem neurológia tényezők és az elhízás is befolyásolhatja (Moore és mtsai., 2014). Természetesen azt is meg kell jegyezni, hogy a *Cmpt* egerekben a szív- és érrendszer nem képes kielégíteni a megnövekedett anyagcsere-igényt, és fenntartani a normális keringést az érrendszer nagyobb perifériás ellenállása ellen. Ezen túlmenően kimutatták azt is, hogy a miosztatin pro-oxidáns és növeli a ROS-termelést a vázizomban (Sriram és mtsai., 2011), így lehetséges, hogy a *Cmpt* egereknél megnövekedett a bazális antioxidáns enzimszint, és hatékonyabb a felesleges ROS eltávolítása. Mindezek alapján azt mondhatjuk, hogy a miosztatin gátlás és következképpen a *Cmpt* egerek megváltozott fizikai eredményei nem értelmezhetőek egyszerűen.

V.5. A szelén hatása az izom teljesítményre

A szelént széleskörűen használják étrendkiegészítőként, akár önmagában vagy más vitaminokkal együtt. Korábban már bemutattuk, hogy milyen előnyös hatásai vannak az izom teljesítményére fiatal egerekben (Bodnár és mtsai., 2016). Két hét szelénnel történő kezelés után jelentősen nőtt az önkéntes futás maximális sebessége és az izmok *in vitro* fáradástoleranciája fiatal egerekben. Jelen tanulmányunkban hasonló jótékony hatásokat találtunk öreg egereknél az EDL és SOL erejére 8 hétig tartó szelén adagolást követően. A fáradástolerancia szignifikánsan javult EDL esetén (11. ábra) és hasonló tendenciát figyeltünk meg soleusnál is (4. táblázat). Az ismert, hogy az öregedés különösképpen hatással van a IIB típusú rostokra (Larsson, 1983), és az EDL több IIB típusú rostot tartalmaz, mint a SOL, így az volt várható, hogy a szelén étrendkiegészítés vagy az élethosszan tartó edzés az előbbire nagyobb hatással lesz, mint az utóbbira. Mivel ezeket az izomteljesítményre kifejtett előnyös hatásokat nem kísérte atrófia vagy az EC-kapcsolatban résztvevő kulcsfontosságú fehérjék expressziós szintjében történő változások, a szelén az összehúzódnás metabolikus útvonalában játszhat szerepet. Ezt a mediációs analízisünk is alátámasztja (24. ábra), ami szerint a szelén étrendkiegészítés hatását nem az intracelluláris kalciumkoncentráció módosítása útján fejtette ki.

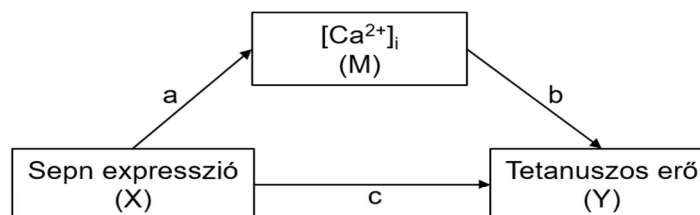
Mediációs analízis

Modell

X: független paraméter

Y: függő paraméter

M: mediátor paraméter



Lépések	Analízis	Paraméterek
1. lépés	Végezzünk egy egyszerű regressziós analízist az X-szel az Y becslésére, hogy teszteljük a „c” útvonalat önmagában, $Y=B_0+B_1 \cdot X+e$	$B_1=199,7$
2. lépés	Végezzünk egy egyszerű regressziós analízist az X-szel az M becslésére, hogy teszteljük az „a” útvonalat önmagában, $M=B_0+B_2 \cdot X+e$	$B_2=1126,7$
3. lépés	Végezzünk egy egyszerű regressziós analízist az M-mel az Y becslésére, hogy teszteljük a „b” útvonalat önmagában, $Y=B_0+B_3 \cdot M+e$	$B_3=0,175$
4. lépés	Végezzünk egy többszörös regressziós analízist az X-szel és az M-mel az Y becslésére, $Y=B_0+B_4 \cdot X+B_5 \cdot M+e$	$B_4=202,6$ $B_5=-0,00256$

24. ábra Módszer: Az egyedi mediációs modellt annak vizsgálatára készítettük, hogy meg tudjuk, vajon a szelenoprotein és a maximális erő közötti kapcsolatot az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció szabályozza-e. Az analízist a szelénrel etetett állatok adatainak meghatározására végeztük el. Jegyzet: Az „e” reprezentálja a mérések hibáját a regressziós egyenlet esetén.

Értékelés: Mivel a B_1 és B_4 paraméterek szinte azonosak és szignifikánsan nagyobbak, mint 0, illetve B_5 nem nagyobb szignifikánsan, mint 0, így az $[Ca^{2+}]_i$ -nak nincs közvetlen és mediációs hatása sem a tetanuszos erőre.

Tudjuk, hogy a reaktív oxigén és nitrogén fajták döntő szerepet játszanak a vázizom plaszticitásában edzés illetve inaktiváció során. Ezek a szarkolemmában, a T-tubulusokban, az SR-ben, a citoszolban és a mitokondriumban termelődhetnek (Sakellariou és mtsai., 2013), de az edzés által termelt szuperoxidok eredete még mindig vitatott. Korábban leírták, hogy a szelénnek pozitív antioxidáns hatása van a csirke vázizmon hősokk-hatást követően (Harsini és mtsai., 2012). A hosszantartó összehúzódások alatt az oxidánsok akkumulálódhatnak az izomban, ami csökkent erő kifejtéshez vezethet. Mi azt találtuk, hogy a tetanuszos ingerlési protokoll során jobban nőtt a ROS termelés az öreg állatok izmaiban a fiatal egerekhez viszonyítva (17. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a vizsgálataink során tapasztalt csökkent erő a nem edzett öreg egereknél részben a megnövekedett oxidatív stressznek köszönhető. Érdekes módon a hatékonyabb fáradás tolerancia kapcsolatban áll a szelén kezeléssel, ami hasonló hatású volt az élethosszig tartó edzéshez. A szelén ezen hatása jól hasznosítható lehet öregkorban, amikor is az izomtömeg lecsökken. Érdekes különbség az élethosszig tartó edzéshez képest, hogy a szelén étrend kiegészítés nem változtatta meg az SR Ca^{2+} tartalmát, viszont növelte az SR-ből történő Ca^{2+} kiáramlás maximális sebességét. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a megnövekedett Sepn szint megakadályozhatja, legalábbis részben, a RyR oxidatív módosulását.

V.6. A szelén étrend kiegészítés és a szelenoprotein tartalom öregkorban

Korábbi kutatások az idős korban adagolt szelén hatásairól arra utalnak, hogy az antioxidáns étrendkiegészítés javíthatja a leucin azon képességét, ami az öreg patkányokban fokozta az izomfehérjék szintézisét (Marzani és mtsai., 2008). Ez a folyamat csökkentheti az oxidatív stressz mértékét. Hasonló eredményeket figyeltek meg akkor is, amikor az egerek magas szeléntartalmú antioxidáns tápkeveréket kaptak (van Dijk és mtsai., 2016). Az állatok általános oxidatív állapota javult, csökkent az izomfáradás és megnőtt a maximális kapaszkodási erejük. Az antioxidáns kiegészítés eredményeként egy megnövekedett mitokondriális funkciót feltételeztek a szerzők. Mi öreg egerekben a szelén jótékony hatásait találtuk az *in vivo* és *in vitro* izom funkciókban, valamint a kalciumhomeosztázisban. Az a tény, hogy a szelénnek hasonló pozitív hatása van a fiatal (Bodnár és mtsai., 2016) és öreg állatok (saját eredmények) izmaira nézve, azt hangsúlyozza, hogy potenciálisan alkalmazható lehet a szarkopénia kezelésében. Számos tanulmány, köztük a miénk is bizonyította (Bodnár és mtsai., 2016), hogy a szelén étrend kiegészítés növelheti a szelenoprotein expresszióját. Azt is leírták, hogy az öregedés során a szelenoprotein expressziója csökken (Novoselov és mtsai., 2010). Mi szintén azt találtuk, hogy a vázizom szelenoprotein tartalma csökken az öreg egerekben, ami visszafordítható volt 2 hónapos szelén étrend kiegészítéssel (16. ábra).

Összességében elmondható, hogy eredményeink egyrészt azt bizonyítják, a mérsékelt edzéssel ellentétben a megnövekedett izomtömeg önmagában nem akadályozza meg az izomerő és a normális RyR1 tartalom csökkenését a korrallal. Másrészt azt találtuk, hogy a szelén étrend kiegészítés során fellépő antioxidáns stratégia megfelelő terápiás eljárás lehet nemcsak izombetegségekkel, hanem az öregedéssel járó betegségek kapcsán is.

V.7. Az sAnk1 hiányának hatása a Ca^{2+} homeosztázisra

A vázizom rostokban az SR specifikus morfológiai adaptációkkal rendelkezik, hogy hatékonyan fenn tudja tartani a Ca^{2+} felszabadulását az izmok összehúzódása számára (Franzini-Armstrong, 2018; Reggiani, 2014; A. E. Rossi & Dirksen, 2006). Az sAnk1 az SR membránon lokalizálódik, és az obszkurin nevű szarkomérben elhelyezkedő óriás fehérjéhez kapcsolódik. Ez a fehérje-fehérje kapcsolat fontos az SR tubulusok pontos elhelyezkedésének kialakulásához, mivel a miofibrillumok körül itt raktározódik a Ca^{2+} , ami közvetlenül szabályozza az izom összehúzódását. Egy korábbi cikkben bemutatták, hogy az sAnk1 hiánya SR térfogat csökkenéshez vezet 4 hónapos egerekben, ami kontraktúrák, tubuláris aggregátumok és a miofibrillum rendellenességek megjelenésével társul az öregedő sAnk1 KO állatokban (D. Rossi és mtsai., 2017). Ezek az elváltozások összeköthetőek a kiegyensúlyozatlan intracelluláris Ca^{2+} -szinttel, ami az életkor során az öreg állatoknál izomkárosodáshoz vezethet.

Mi a fiatal és öreg egerekből származó vázizom rostokon is azt tapasztaltuk, hogy a teljes SR Ca^{2+} -tartalom csökkent sAnk1 KO állatok izmaiban az azonos korú kontroll állatokhoz képest. A feszültség lépcsővel ingerelt rostok Ca^{2+} -tranziensei csökkentek a 4 hónapos, viszont nem a 10 hónapos sAnk1 KO egerekben a korban megegyező vad típusú társaikhoz viszonyítva. Azt

azonban meg kell említenünk, hogy a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója eleve kisebb volt a 10 hónapos kontroll egerekben a 4 hónapos vad típusúakéhoz képest. Ez egybevág a korábban már leírt adatokkal, amik azt mutatják, hogy az öregedés során az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás csökkenést mutat (Jiménez-Moreno és mtsai., 2008). Azonban a 4 hónapos sAnk1 KO egerekben a feszültség lépcső indukálta Ca^{2+} -tranziensek hasonlóak voltak a 10 hónapos sAnk1 KO egerekből izolált rostokon találtakhoz. Ez azért nem meglepő, mert a 4 hónapos sAnk1 KO egerekben a Ca^{2+} -tranziensek amplitúdója eleve csökkent az azonos korú kontroll egerekhez képest. A feszültség lépcső indukált Ca^{2+} -tranzienseket összehasonlítottuk a 10 hónapos állatokban is, ebben az esetben az sAnk1 KO egerek eredményei hasonlóak voltak a kontrollokéhoz. Ezek az eredmények összhangban állnak azzal a megállapítással, hogy az sAnk1 KO egerek SR térfogat csökkenést mutatnak már a fiatal állatokban is, ami így magyarázhatja a Ca^{2+} tranziensek amplitúdójának csökkenését, ami bennük korral már nem nő tovább. Érdekes módon az SR-ből történő Ca^{2+} -felszabadulás feszültségfüggését az sAnk1 hiánya nem befolyásolta, ami arra utal, hogy az sAnk1 KO rostokban megfigyelt megváltozott Ca^{2+} -felszabadulás a csökkent kapacitású Ca^{2+} -tárolást tükrözi. Ez valószínűleg az sAnk1 KO egerekben megfigyelt I-SR térfogat csökkenése miatt van, nem pedig a megváltozott DHPR indukált RyR1 aktiváció okozza.

V.8. A Ca^{2+} -tárolás csökkenése

A vázizomrostok Ca^{2+} -tartalmának csökkenését az sAnk1 KO egerek izmaiban elemi kalciumfelszabadulási események (CRE) mérésével bizonyítottunk. A CRE-k a RyR1 csatornákon keresztüli elemi Ca^{2+} -felszabadulási események nyugalomban, amelyeket a citoszolikus és/vagy lumenális Ca^{2+} aktivál (Heping Cheng & Lederer, 2008). Kísérleti modellünkben (szaponinnal permeabilizált izomrostok) a *spark*-ok kialakulásának legfontosabb hajtóereje a lumenális Ca^{2+} -tartalom, aminek csökkenését egyértelműen mutatta, hogy a KO egerek izomrostjaiban a CRE-k amplitúdója, térbeli eloszlása és gyakorisága csökkent a kontroll izomrostokhoz képest. Ezen kívül a *spark* paramétereiből számított jel-sűrűség értékek, amelyek a felszabadult Ca^{2+} mennyiségének indirekt értékeit reprezentálják (Ríos és mtsai., 1999), szignifikánsan alacsonyabbak voltak az sAnk1 KO rostokban. Ez egy további bizonyíték az sAnk1a hiányos rostok csökkent Ca^{2+} -tartalmára. Az ismert, hogy a RyR-ek lumenális oldalán egy kalciumszenzor van, ami Ca^{2+} kötését követően stimulálja a csatorna nyitását (Burdakov és mtsai., 2005), így elképzelhető, hogy az SR csökkent Ca^{2+} -tartalma felelős lehet a *spark*-ok ritkább előfordulásáért (a RyR-ek ritkább megnyílásáért) az sAnk1a hiányos rostokban.

V.9. A SERCA pumpa aktivitása

A SERCA pumpa aktivitásának indirekt mérése során nem találtunk szignifikáns különbséget a két genotípusú állat között. A 10 hónapos sAnk1 KO egereknél a SERCA pumpa maximális transzportkapacitása ($V_{\max}$) viszont szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll állatokban. Mivel az SR térfogatának csökkenése összehasonlítható mértékű a fiatal és öreg sAnk1 KO egerekben, így a 10 hónapos állatok esetén megfigyelt jelentős SERCA pumpa aktivitás csökkenést nem okozhatja sem az SR morfológiájának változása, sem az sAnk1.5 és a SERCA

és/vagy szarkolipin közötti kapcsolat elvesztése (Desmond és mtsai., 2015, 2017). Inkább az öreg sAnk1 KO egerek vázizmain megfigyelt szerkezeti változások lehetnek ennek a hátterében (Giacomello és mtsai., 2015), viszont nem zárhatunk ki további, még nem azonosított okokat sem. Egy alternatív magyarázat lehet, hogy olyan kompenzációs mechanizmusok, amelyek még működnek a fiatal sAnk1 KO egerekben, már nem eléggé hatékonyak a 10 hónapos állatokban.

Összességében azt mondhatjuk el, hogy az eredményeink alapján az sAnk1.5 hiánya a Ca^{2+} -homeosztázis károsodásához vezet a fiatal sAnk1 KO egerekből származó vázizom rostokban a korban hozzáillő kontroll izomrostokhoz képest. A Ca^{2+} -homeosztázisban megfigyelt különbségek kevésbé szembetűnőek a korral előrehaladva, mivel a Ca^{2+} -felszabadulás hatékonysága az öreg kontroll egerekből származó vázizomrostokban szintén csökken (Jiménez-Moreno és mtsai., 2008). Ebből arra következtethetünk, hogy a fiatal sAnk1 KO egerek Ca^{2+} homeosztázisa már a kezdetektől fogva károsodott, és hasonló szinten működik ahhoz, amit az öreg kontroll egereknél találtunk. Másrészt viszont a korral előrehaladva a KO egerekben szerkezeti változások történnek, mint például megjelennek tubuláris csoportosulások és kontrakturák, amelyek nem találhatók meg a kontroll izomrostokban.

V.10. Kitekintés

A szarkopéniának több oka is lehet, például a rossz táplálkozás is. Nagyobb figyelmet eddig csupán a fehérjebevitel hiányosságára fordítottak. Egy nemrég megjelent áttekintő cikkben leírták, hogy az ásványi anyagok is fontosak lehetnek a szarkopénia megelőzésében és kezelésében, ezeket viszont eddig kevésbé tanulmányozták (van Dronkelaar és mtsai., 2018). Több tanulmányban is azt találták, hogy a szelénbevitelnek pozitív hatása van az izomtömegre (Chen és mtsai., 2014). Illetve az is megfigyelték, hogy a szarkopéniás idősök esetén jóval alacsonyabb a szelénbevitel a nem szarkopéniás idősökhöz képest (ter Borg és mtsai., 2016). A szelenoproteinek révén a szelénről úgy gondolják, hogy jó hatással lehet az izom szintézisre és funkcióra, bár ezeket a mechanizmusok még nem tisztázták.

Másrészt az izomműködés fehérjéinek hiányához is kapcsolhatóak különböző miopátiák: pl. a SEPN1 (Terry & Diamond, 2012), vagy obszkurin (Davide Randazzo és mtsai., 2017). Mivel ezeknek fontos szerepük van a normál izomműködésben, ezért a hiányukat mutató genetikailag módosított állatmodelleken végzett kísérletek irányt mutathatnak különböző miopátiák, öregedéssel járó izomveszteségek terápiás kezelésében, megelőzésében. Továbbá ez lehetőséget teremt a ma már fejlődő génterápiára, mint ahogy azt a Duchenne-féle izomdisztrófia esetén már leírták (Chamberlain és mtsai., 2017).

VI. 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, fáradékonyságot és gyengeséget is okozhat. Hasonló negatív következményei lehetnek izomspecifikus 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 degradációjának 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 (*spark*-ok) elemzése azt mutatta, hogy a *spark*-ok gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb volt a fiatal és idős KO egerek esetén is, a kontrollhoz viszonyítva. Ezenkívül, a *spark*-ok 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.

VII. Summary

Sarcopenia, aging-related loss of muscle mass and muscle strength, is a disease that negatively affects the quality of life of an aging society and severely limits physical performance and daily activity. The absence of the essential trace element selenium may increase the chances of muscle damage, which can also cause muscle pain, fatigue and weakness. Lack of muscle-specific proteins can have similar negative consequences in young and old age.

In our studies, the rate of voluntary running, maximal twitching and tetanus force, and the amount of Ca^{2+} released were shown from the internal stores of muscles decreased, while the production of reactive oxygen radicals increased in elderly mice compared to young animals. These changes were associated with decreased calcium channel RyR1 and Selenoprotein N content and increased RyR1 degradation. Both lifelong exercise and short-term selenium dietary supplementation were able to compensate for the decrease in muscle strength and Ca^{2+} release from SR in elderly mice. However, the increase in muscle mass at a young age was not able to do so, as demonstrated by our experiments in myostatin-deficient mice. Selenium supplementation significantly increased Selenoprotein N levels in old mice and we have shown that its beneficial effect on muscles is mediated through a RyR1 independent pathway.

The calcium content of SR was examined in sAnk1-deficient mice responsible for the normal location of SR, which was significantly decreased in young and old sAnk1 KO animals, whereas additional structural changes appeared only during aging. The absence of sAnk1 also affects intracellular Ca^{2+} homeostasis. While resting cytosolic Ca^{2+} levels did not change in fibers from sAnk1 KO mice, the amplitude of Ca^{2+} transients induced by depolarizing pulses decreased in them without changing their voltage dependence. Furthermore, analysis of spontaneous Ca^{2+} release events (*sparks*) on saponin-permeabilized fibers showed that the frequency of *sparks* was also significantly lower in young and elderly KO mice compared with the control. In addition, the amplitude and spatial extent of the *sparks*, and thus the amount of calcium released, were also significantly lower in KO animals.

In summary, our results suggest that moderate exercise and selenium dietary supplementation have a beneficial effect on calcium release from SR and muscle strength in old age, while increased muscle mass does not improve physical performance during aging. Furthermore, the lack of sAnk1 not only has a negative effect on the structure of SR, but also causes its decreased Ca^{2+} storage capacity, which ultimately results in lower Ca^{2+} release and consequently weaker muscle strength. Our results may show the way for new therapeutic options for sarcopenia and genetic muscle diseases in old age.

VIII. Irodalomjegyzék

- Ackermann, M. A., Ziman, A. P., Strong, J., Zhang, Y., Hartford, A. K., Ward, C. W., ... Bloch, R. J. (2011). Integrity of the network sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle requires small ankyrin 1. *Journal of Cell Science*, 124(21), 3619–3630. <https://doi.org/10.1242/jcs.085159>
- Allen, D. G., Lamb, G. D., & Westerblad, H. (2008). Impaired calcium release during fatigue. *Journal of Applied Physiology*, 104(1), 296–305. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00908.2007>
- Amthor, H., Macharia, R., Navarrete, R., Schuelke, M., Brown, S. C., Otto, A., ... Patel, K. (2007). Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1835–1840. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604893104>
- Anderson, A. A., Altafaj, X., Zheng, Z., Wang, Z. M., Delbono, O., Ronjat, M., ... Zorzato, F. (2006). The junctional SR protein JP-45 affects the functional expression of the voltage-dependent Ca²⁺ channel Cav1.1. *Journal of Cell Science*, 119(10), 2145–2155. <https://doi.org/10.1242/jcs.02935>
- Aniansson, A., Hedberg, M., Henning, G. -B, & Grimby, G. (1986). Muscle morphology, enzymatic activity, and muscle strength in elderly men: A follow-up study. *Muscle & Nerve*, 9(7), 585–591. <https://doi.org/10.1002/mus.880090702>
- Armani, A., Galli, S., Giacomello, E., Bagnato, P., Barone, V., Rossi, D., & Sorrentino, V. (2006). Molecular interactions with obscurin are involved in the localization of muscle-specific small ankyrin1 isoforms to subcompartments of the sarcoplasmic reticulum. *Experimental Cell Research*, 312(18), 3546–3558. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.07.027>
- Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D., & Sorrentino, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *Journal of Cell Biology*, 160(2), 245–253. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208109>
- Barone, V., Randazzo, D., Del Re, V., Sorrentino, V., & Rossi, D. (2015). Organization of junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 36(6), 501–515. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9421-5>
- Baylor, S. M. (2005). Calcium sparks in skeletal muscle fibers. *Cell Calcium*, 37(6), 513–530. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.01.002>
- Bennett, V., & Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1), 61–67. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00175-7)
- Bennett, Vann, & Healy, J. (2009). *Membrane Domains Based on Ankyrin and*. 1–17.

- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315–325. <https://doi.org/10.1038/361315a0>
- Bhaskarabhatla, K. V. & Birrer, R. P. (2005). Physical activity and diabetes mellitus. *Comp. Ther*, 31, 291–298. <https://doi.org/10.33029/9704-5700-9-phy-2020-1-352>
- Bodnár, D., Geyer, N., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Hegyi, B., Sztretye, M., ... Szentesi, P. (2014). Hypermuscular mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signalling. *Journal of Physiology*, 592(6), 1353–1365. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261958>
- Bodnár, D., Ruzsnavszky, O., Oláh, T., Dienes, B., Balatoni, I., Ungvári, É., ... Szentesi, P. (n.d.). Dietary selenium augments sarcoplasmic calcium release and mechanical performance in mice. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0134-6>
- Boveris, A., & Navarro, A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.015>
- Brum, G., Fitts, R., Pizarro, G., & Ríos, E. (1988). Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology*, 398(1), 475–505. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017053>
- Burdakov, D., Petersen, O. H., & Verkhratsky, A. (2005). Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium*, 38(3-4 SPEC. ISS.), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.010>
- Cannell, M. B., & Soeller, C. (1997). Numerical analysis of ryanodine receptor activation by L-type channel activity in the cardiac muscle diad. *Biophysical Journal*, 73(1), 112–122. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78052-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78052-4)
- Castets, P., Lescure, A., Guicheney, P., & Allamand, V. (2012). Selenoprotein N in skeletal muscle: From diseases to function. *Journal of Molecular Medicine*, 90(10), 1095–1107. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0896-x>
- Chamberlain, J. R., & Chamberlain, J. S. (2017). Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy*, 25(5), 1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.019>
- Chariot, P., & Bignani, O. (2003). Skeletal muscle disorders associated with selenium deficiency in humans. *Muscle and Nerve*, 27(6), 662–668. <https://doi.org/10.1002/mus.10304>
- Chen, Y. L., Yang, K. C., Chang, H. H., Lee, L. T., Lu, C. W., & Huang, K. C. (2014). Low Serum Selenium Level Is Associated With Low Muscle Mass in the Community-Dwelling Elderly. *Journal of the American Medical Directors Association*, 15(11), 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.06.014>
- Cheng, H., Lederer, M. R., Xiao, R. P., Gómez, A. M., Zhou, Y. Y., Ziman, B., ... Lederer, W. J. (1996). Excitation contraction coupling in heart: New insights from Ca²⁺ sparks. *Cell Calcium*, 20(2), 129–140. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(96\)90102-5](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(96)90102-5)

- Cheng, Heping, & Lederer, W. J. (2008). Calcium sparks. *Physiological Reviews*, 88(4), 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Cooke, R. (1997). Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiological Reviews*, 77(3), 671–697. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.671>
- Csernoch, L., Pouvreau, S., Ronjat, M., & Jacquemond, V. (2008). Voltage-activated elementary calcium release events in isolated mouse skeletal muscle fibers. *Journal of Membrane Biology*, 226(1–3), 43–55. <https://doi.org/10.1007/s00232-008-9138-0>
- Cunha, S.R.; Mohler, P. . (2011). Ankyrin-based Cellular Pathways for Cardiac Ion Channel and Transporter Targeting and Regulation. *Semin Cell Dev Biol.*, 22(2), 166–170. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- D’Antona, G., Pellegrino, M. A., Adami, R., Rossi, R., Naccari Carlizzi, C., Canepari, M., ... Bottinelli, R. (2003). The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*, 552(2), 499–511. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.046276>
- Davies, K. E., & Nowak, K. J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: Old and new players. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), 762–773. <https://doi.org/10.1038/nrm2024>
- Davies, K. J. A., Packer, L., & Brooks, G. A. (1981). Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 209(2), 539–554. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90312-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90312-X)
- Delbono, O., O’Rourke, K. S., & Ettinger, W. H. (1995). Excitation-calcium release uncoupling in aged single human skeletal muscle fibers. *The Journal of Membrane Biology*, 148(3), 211–222. <https://doi.org/10.1007/BF00235039>
- Desmond, P. F., Labuza, A., Muriel, J., Markwardt, M. L., Mancini, A. E., Rizzo, M. A., & Bloch, R. J. (2017). Interactions between small ankyrin 1 and sarcolipin coordinately regulate activity of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1). *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 10961–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.783613>
- Desmond, P. F., Muriel, J., Markwardt, M. L., Rizzo, M. A., & Bloch, R. J. (2015). Identification of small ankyrin 1 as a novel sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1 (SERCA1) regulatory protein in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 290(46), 27854–27867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676585>
- Distefano, G., & Goodpaster, B. H. (2018). Effects of exercise and aging on skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029785>
- Eszenyi, P., Sztrik, A., Babka, B., & Prokisch, J. (2011). Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1(2), 148–152. <https://doi.org/10.7763/ijbbb.2011.v1.27>
- Evans, W. J., & Hurley, B. F. (1995). Age, Gender, and Muscular Strength. *The Journals of*

- Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 50A(Special), 41–44.
https://doi.org/10.1093/gerona/50a.special_issue.41
- Farris, S. D., Moussavi-Harami, F., & Stempien-Otero, A. (2017). Heart failure with preserved ejection fraction and skeletal muscle physiology. *Heart Failure Reviews*, 22(2), 141–148.
<https://doi.org/10.1007/s10741-017-9603-x>
- Fonyó, A. (2011). Az orvosi élettan tankönyve. *Medicina Könyvkiadó*, 708.
- Franzini-Armstrong, C. (2009). Architecture and regulation of the Ca²⁺ delivery system in muscle cells. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 34(3), 323–326.
<https://doi.org/10.1139/H09-017>
- Franzini-Armstrong, C. (2018). The relationship between form and function throughout the history of excitation-contraction coupling. *Journal of General Physiology*, 150, 189–210.
<https://doi.org/10.1085/jgp.20171188901162018c>
- Franzini-Armstrong, C., & Protasi, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: A complex channel capable of multiple interactions. *Physiological Reviews*, 77(3), 699–729. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.699>
- Gallagher, P. G., & Forget, B. G. (1998). An alternate promoter directs expression of a truncated, muscle-specific isoform of the human ankyrin 1 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1339–1348. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1339>
- Giacomello, E., Quarta, M., Paolini, C., Squecco, R., Fusco, P., Toniolo, L., ... Sorrentino, V. (2015). Deletion of small ankyrin 1 (SANK1) isoforms results in structural and functional alterations in aging skeletal muscle fibers. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(2), C123–C138. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00090.2014>
- González, E., Messi, M. L., Zheng, Z., & Delbono, O. (2003). Insulin-like growth factor-1 prevents age-related decrease in specific force and intracellular Ca²⁺ in single intact muscle fibres from transgenic mice. *Journal of Physiology*, 552(3), 833–844.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.048165>
- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., R. J. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17, 71–74.
- Hamilton, M. L., Van Remmen, H., Drake, J. A., Yang, H., Guo, Z. M., Kewitt, K., ... Richardson, A. (2001). Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10469–10474.
<https://doi.org/10.1073/pnas.171202698>
- Hamrick, M. W., Pennington, C., Webb, C. N., & Isales, C. M. (2006). Resistance to body fat gain in “double-muscling” mice fed a high-fat diet. *International Journal of Obesity*, 30(5), 868–870. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803200>
- Harsini, S. G., Habibiyan, M., Moeini, M. M., & Abdolmohammadi, A. R. (2012). Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biological*

- Trace Element Research*, 148(3), 322–330. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9374-0>
- Hollingworth, S., Peet, J., Chandler, W. K., & Baylor, S. M. (2001). Calcium sparks in intact skeletal muscle fibers of the frog. *Journal of General Physiology*, 118(6), 653–678. <https://doi.org/10.1085/jgp.118.6.653>
- Holloszy, J. O., Smith, E. K., Vining, M., & Adams, S. (1985). Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *Journal of Applied Physiology*, 59(3), 826–831. <https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.3.826>
- Ishihara, H., Kanda, F., Matsushita, T., Chihara, K. & Itoh, K. (1999). White muscle disease in humans: myopathy caused by selenium deficiency in anorexia nervosa under long term total parenteral nutrition. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 67, 829–830.
- Jiménez-Moreno, R., Wang, Z. M., Gerring, R. C., & Delbono, O. (2008). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release declines in muscle fibers from aging mice. *Biophysical Journal*, 94(8), 3178–3188. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118786>
- Kirsch, W. G., Uttenweiler, D., & Fink, R. H. A. (2001). Spark- and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 537(2), 379–389. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00379.x>
- Klein, M. G., & Schneider, M. F. (2006). Ca²⁺ sparks in skeletal muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(3), 308–332. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.05.016>
- Kokkinos, P. F., Narayan, P., & Papademetriou, V. (2001). Exercise as hypertension therapy. *Cardiology Clinics*, 19(3), 507–516. [https://doi.org/10.1016/S0733-8651\(05\)70232-0](https://doi.org/10.1016/S0733-8651(05)70232-0)
- Kontogianni-Konstantopoulos, A.; Jones, E.M.; Van Rossum, D.B.; Bloch, R. J. (2003). Obscurin Is a Ligand for Small Ankyrin 1 in Skeletal Muscle □. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 1138–1148. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02>
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D. H., Strong, J. C., Sutter, S., Borisov, A. B., Pumpin, D. W., ... Bloch, R. J. (2006). Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *The FASEB Journal*, 20(12), 2102–2111. <https://doi.org/10.1096/fj.06-5761com>
- Kordeli, E., Ludosky, M. A., Deprette, C., Frappier, T., & Cartaud, J. (1998). Ankyrin(G) is associated with the postsynaptic membrane and the sarcoplasmic reticulum in the skeletal muscle fiber. *Journal of Cell Science*, 111(15), 2197–2207.
- Lange, S., Ouyang, K., Meyer, G., Cui, L., Cheng, H., Lieber, R. L., & Chen, J. (2009). Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 122(15), 2640–2650. <https://doi.org/10.1242/jcs.046193>
- LARSSON, L. (1983). Histochemical characteristics of human skeletal muscle during aging. *Acta Physiologica Scandinavica*, 117(3), 469–471. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1983.tb00024.x>
- Löfstedt, J. (1997). White muscle disease of foals. *The Veterinary Clinics of North America*.

- Equine Practice*, 13(1), 169–185. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30262-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30262-6)
- Lukács, B., Sztrettye, M., Almássy, J., Sárközi, S., Dienes, B., Mabrouk, K., ... Csernoch, L. (2008). Charged surface area of maurocalcine determines its interaction with the skeletal ryanodine receptor. *Biophysical Journal*, 95(7), 3497–3509. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120840>
- Manring, H., Abreu, E., Brotto, L., Weisleder, N., & Brotto, M. (2014). Novel excitation-contraction coupling related genes reveal aspects of muscle weakness beyond atrophy—new hopes for treatment of musculoskeletal diseases. *Frontiers in Physiology*, 5 FEB(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00037>
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., De Jongh, K. S., Lai, Y., Catterall, W. A., & Ronjat, M. (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2270–2274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2270>
- Marzani, B., Ve, A., Astruc, T., Papet, I., Dardevet, D., & Mosoni, L. (2008). Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *J. Nutr. Health Aging*, 138, 2205–2211. <https://doi.org/10.3945/jn.108.094029.2205>
- McPherron, A. C., & Lee, S.-J. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 109(5), 595–601. <https://doi.org/10.1172/JCI200213562>. Introduction
- McPherron, A. C., & Lee, S. J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12457–12461. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>
- Mitchell, W. K., Williams, J., Atherton, P., Larvin, M., Lund, J., & Narici, M. (2012). Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Frontiers in Physiology*, 3 JUL(July), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00260>
- Moore, A. Z., Caturegli, G., Metter, E. J., Makrogiannis, S., Resnick, S. M., Harris, T. B., & Ferrucci, L. (2014). Difference in muscle quality over the adult life span and biological correlates in the baltimore longitudinal study of aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 62(2), 230–236. <https://doi.org/10.1111/jgs.12653>
- Mosher, D. S., Quignon, P., Bustamante, C. D., Sutter, N. B., Mellersh, C. S., Parker, H. G., & Ostrander, E. A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*, 3(5), 779–786. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030079>
- Navarro, A., Gomez, C., López-Cepero, J. M., & Boveris, A. (2004). Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: Survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 286(3 55-3), 505–511.

<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00208.2003>

- Novoselov, S. V., Kim, H. Y., Hua, D., Lee, B. C., Astle, C. M., Harrison, D. E., ... Gladyshev, V. N. (2010). Regulation of selenoproteins and methionine sulfoxide reductases A and B1 by age, calorie restriction, and dietary selenium in mice. *Antioxidants and Redox Signaling*, 12(7), 829–838. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2895>
- Paulsen, G., Cumming, K. T., Holden, G., Hallén, J., Rønnestad, B. R., Sveen, O., ... Raastad, T. (2014). Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: A double-blind, randomised, controlled trial. *Journal of Physiology*, 592(8), 1887–1901. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.267419>
- Payne, A. M., & Delbono, O. (2004). Neurogenesis of Excitation-Contraction Uncoupling in Aging Skeletal Muscle. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 32(1), 36–40. <https://doi.org/10.1097/00003677-200401000-00008>
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*, 74(3), 595–636. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>
- Randazzo, D., Blaauw, B., Paolini, C., Pierantozzi, E., Spinozzi, S., Lange, S., ... Sorrentino, V. (2017). Exercise-induced alterations and loss of sarcomeric M-line organization in the diaphragm muscle of obscurin knockout mice. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(1), C16–C28. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2016>
- Randazzo, Davide, Giacomello, E., Lorenzini, S., Rossi, D., Pierantozzi, E., Blaauw, B., ... Sorrentino, V. (2013). Obscurin is required for ankyrinB-dependent dystrophin localization and sarcolemma integrity. *Journal of Cell Biology*, 200(4), 523–536. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205118>
- Randazzo, Davide, Pierantozzi, E., Rossi, D., & Sorrentino, V. (2017). The potential of obscurin as a therapeutic target in muscle disorders. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(9), 897–910. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1361931>
- Rederstorff, M., Krol, A., & Lescure, A. (2006). Understanding the importance of selenium and selenoproteins in muscle function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(1), 52–59. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5313-y>
- Reggiani, C. (2014). Calcium handling in muscle fibres of mice and men: Evolutionary adaptation in different species to optimize performance and save energy. *Journal of Physiology*, 592(6), 1173–1174. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272344>
- Ríos, E., Stern, M. D., González, A., Pizarro, G., & Shirokova, N. (1999). Calcium release flux underlying Ca²⁺ sparks of frog skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 114(1), 31–48. <https://doi.org/10.1085/jgp.114.1.31>
- Ristow, M., Zarse, K., & Oberbach, A. (2009). *Sports Medicine Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans Exercise promotes longevity and ameliorates type 2 diabetes mellitus and insulin resistance . However , exercise also increases mitochondrial formation of presuma.* (C), 180–182.

- Rolland, Y. et al. (2008). Sarcopenia: its assessment, etiology, pathogenesis, consequences and future perspectives. *J. Nutr. Health Aging*, 12, 433–450. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Rossi, A. E., & Dirksen, R. T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle. *Muscle and Nerve*, 33(6), 715–731. <https://doi.org/10.1002/mus.20512>
- Rossi, D., Palmio, J., Evilä, A., Galli, L., Barone, V., Caldwell, T. A., ... Sorrentino, V. (2017). A novel FLNC frameshift and an OBSCN variant in a family with distal muscular dystrophy. *PLoS ONE*, 12(10), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186642>
- Sakellariou, G. K., Vasilaki, A., Palomero, J., Kayani, A., Zibrik, L., McArdle, A., & Jackson, M. J. (2013). Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(6), 603–621. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4623>
- Schneider, M. F. (1994). *Release in Functioning*.
- Scott, W., Stevens, J., & Binder-Macleod, S. A. (2001). Human skeletal muscle fiber type classifications. *Physical Therapy*, 81(11), 1810–1816. <https://doi.org/10.1093/ptj/81.11.1810>
- Shirokova, N., García, J., Pizarro, G., & Ríos, E. (1996). Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *Journal of General Physiology*, 107(1), 1–18. <https://doi.org/10.1085/jgp.107.1.1>
- Shirokova, N., García, J., & Ríos, E. (1998). Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 512(2), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.377be.x>
- Sorrentino, V. (2011). Sarcoplasmic reticulum: Structural determinants and protein dynamics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(8), 1075–1078. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.004>
- Sriram, S., Subramanian, S., Sathiakumar, D., Venkatesh, R., Salerno, M. S., Mcfarlane, C. D., ... Sharma, M. (2011). Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF-κB. *Aging Cell*, 10(6), 931–948. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00734.x>
- Stone, N. J. (2006). Successful control of dyslipidemia in patients with metabolic syndrome: focus on lifestyle changes. *Clinical Cornerstone*, 8(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(06\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(06)80004-9)
- Suzman, R., Beard, J. R., Boerma, T., & Chatterji, S. (2015). Health in an ageing world - What do we know? *The Lancet*, 385(9967), 484–486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61597-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61597-X)
- Szabó, G., Dallmann, G., Müller, G., Patthy, L., Soller, M., & Varga, L. (1998). A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Genome*, 9(8), 671–672. <https://doi.org/10.1007/s003359900843>

- Szentesi, P., Csernoch, L., Dux, L., & Keller-Pintér, A. (2019). Changes in redox signaling in the skeletal muscle with aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4617801>
- Szentesi, P., Szappanos, H., Szegedi, C., Gönczi, M., Jona, I., Cseri, J., ... Csernoch, L. (2004). Altered Elementary Calcium Release Events and Enhanced Calcium Release by Thymol in Rat Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, 86(3), 1436–1453. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74213-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74213-7)
- Tee, J. M., & Peppelenbosch, M. P. (2010). Anchoring skeletal muscle development and disease: The role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(4), 318–330. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488217>
- ter Borg, S., de Groot, L. C. P. G. M., Mijnders, D. M., de Vries, J. H. M., Verlaan, S., Meijboom, S., ... Schols, J. M. G. A. (2016). Differences in Nutrient Intake and Biochemical Nutrient Status Between Sarcopenic and Nonsarcopenic Older Adults-Results From the Maastricht Sarcopenia Study. *Journal of the American Medical Directors Association*, 17(5), 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2015.12.015>
- Terry, E. N., & Diamond, A. M. (2012). Selenium. *Present Knowledge in Nutrition: Tenth Edition*, (1973), 568–585. <https://doi.org/10.1002/9781119946045.ch37>
- Tsugorka, A., Ríos, E., & Blatter, L. A. (1995). Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science*, 269(5231), 1723–1726. <https://doi.org/10.1126/science.7569901>
- Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M., & Bennett, V. (1999). Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *Journal of Cell Biology*, 147(5), 995–1007. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.995>
- Ungvári, É., Monori, I., Megyeri, A., Csiki, Z., Prokisch, J., Sztrik, A., ... Benko, I. (2014). Protective effects of meat from lambs on selenium nanoparticle supplemented diet in a mouse model of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced immunotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.004>
- Ursu, D., Schuhmeier, R. P., & Melzer, W. (2005). Voltage-controlled Ca²⁺ release and entry flux in isolated adult muscle fibres of the mouse. *Journal of Physiology*, 562(2), 347–365. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.073882>
- van Dijk, M., Dijk, F. J., Bunschoten, A., van Dartel, D. A. M., van Norren, K., Walrand, S., ... Luiking, Y. (2016). Improved muscle function and quality after diet intervention with leucine-enriched whey and antioxidants in antioxidant deficient aged mice. *Oncotarget*, 7(14), 17338–17355. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7800>
- van Dronkelaar, C., van Velzen, A., Abdelrazek, M., van der Steen, A., Weijs, P. J. M., & Tieland, M. (2018). Minerals and Sarcopenia; The Role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on Muscle Mass, Muscle Strength, and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review. *Journal of the American Medical Directors Association*, 19(1), 6-11.e3.

<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2017.05.026>

Varga, L., Müller, G., Szabó, G., Pinke, O., Korom, E., Kovács, B., ... Soller, M. (2003). Mapping modifiers affecting muscularity of the myostatin mutant (Mstn Cmt-dl1Abc) compact mouse. *Genetics*, 165(1), 257–267.

Vermassen, E., Parys, J. B., & Mauger, J. P. (2004). Subcellular distribution of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: Functional relevance and molecular determinants. *Biology of the Cell*, 96(1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.11.004>

Yarasheski, K. E., Bhasin, S., Sinha-Hikim, I., Pak-Loduca, J., & Gonzalez-Cadavid, N. F. (2002). Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 6(5), 343–348.

Yoshida, Y. (1997). *Structure and Function of Inositol*.

Zhou, D., Birkenmeier, C. S., Williams, M. W., Sharp, J. J., Barker, J. E., & Bloch, R. J. (1997). Small, membrane-bound, alternatively spliced forms of ankyrin 1 associated with the sarcoplasmic reticulum of mammalian skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, 136(3), 621–631. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.621>

Zhou, J., Brum, G., González, A., Launikonis, B. S., Stern, M. D., & Ríos, E. (2003). Ca²⁺ sparks and embers of mammalian muscle. Properties of the sources. *Journal of General Physiology*, 122(1), 95–114. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308796>

IX. Tárgyszavak

öregedés, szelén, sAnk1.5, *Cmpt* egér, szarkopénia, kalcium homeosztázis

aging, selenium, sAnk1.5, *Cmpt* mice, sarcopenia, calcium homeostasis

X.Függelék

Az *in vivo* tesztekben (Grip-teszt, önkéntes futómalom) részt vettem és a mérési eredményeket is főleg én analizáltam.

Az *in vitro* izomerő mérésben részt vettem, analízist is én végeztem. Az összes teljes sejtes intracelluláris Ca²⁺ mérést én végeztem és a mérések analízisét is én készítettem el. Feszültség clamp mérésekben és az adatok analízisében is részt vettem. Az elemi kalciumfelszabadulási események mérési eredményinek analízisében vettem részt. A Western blot kísérletekben a minták gyűjtésében és előkészítésében vettem részt. ROS mérésekhez a preparátum előkészítésében és az analízisben vettem részt.

XI. Közlemények listája



**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.



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte lévő elméleti tudásom megszerzésében nyújtottak segítséget.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szentesi Péternek, akinek az útmutatásával a munkámhoz szükséges elméleti és gyakorlati tudást elsajátítottam, és akihez kérdéseimmel bátran fordulhattam.

Köszönöm Dr. Csernoch László professzor úrnak, a DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette munkámat az irányítása alatt álló intézetben, és útmutatásával segített.

Köszönöm Őri Róza asszisztensnőnek, aki a kísérletek elvégzéséhez szükséges kiváló technikai háttérrel biztosította.

Köszönöm az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának a kísérletek során nyújtott segítségüket.

Továbbá szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak a támogatásukat és türelmüket.

Ez a munka a következő pályázatok anyagi támogatásával valósulhatott meg: GINOP-2.3.2-15-2016-00040, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009.