

**A vázizom glükózfelvételét fokozó farmakológiai vegyületek
vizsgálata *in vitro* és *in vivo***

Ph.D. értekezés

Köhler Zoltán Márton



Témavezető: *Keller-Pintér Anikó, M.D., Ph.D.*

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Biokémiai Intézet

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

SZEGED

2023

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. A disszertáció témájához közvetlen kapcsolódó közlemények listája:

1. **Köhler, Zoltán Márton**, György Trencsényi, László Juhász, Ágnes Zvara, Judit P. Szabo, László Dux, László G. Puskas, László Rovó and Anikó Keller-Pinter (2023). Tilorone increases glucose uptake in vivo and in skeletal muscle cells by enhancing Akt2/AS160 signaling and glucose transporter levels. *Journal of Cellular Physiology* 238(5), 1080–1094. <https://doi.org/10.1002/JCP.30998> [IF: 5,6] Q1
2. Gönczi, Mónika, Andrea Csemer, László Szabó, Mónika Sztretye, János Fodor, Krisztina Pocsai, Kálmán Szenthe, Anikó Keller-Pintér, **Zoltán Márton Köhler**, Péter Nánási, Norbert Szentandrassy, Balázs Pál, and László Csernoch (2022). Astaxanthin Exerts Anabolic Effects via Pleiotropic Modulation of the Excitable Tissue. *International Journal of Molecular Sciences* 23(2):917. <https://doi.org/10.3390/ijms23020917> [IF: 5,6] D1

A tézishez kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 11,2

2. Egyéb publikációk:

1. Sztretye, Mónika, Zoltán Singlár, Nyamkhuu Ganbat, Dána Al-Gaadi, Kitti Szabó, **Zoltán Márton Köhler**, László Dux, Anikó Keller-Pintér, László Csernoch, and Péter Szentesi (2023). Unravelling the Effects of Syndecan-4 Knockdown on Skeletal Muscle Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6933. <https://doi.org/10.3390/ijms24086933> [IF: 5,6] D1
2. **Köhler, Zoltán Márton**, and Szepesi, Ágnes (2023). More Than a Diamine Oxidase Inhibitor: L-Aminoguanidine Modulates Polyamine-Related Abiotic Stress Responses of Plants. *Life* 2023, Vol. 13, Page 747, 13(3), 747. <https://doi.org/10.3390/LIFE13030747> [IF: 3,2] Q2
3. Szepesi, Ágnes, László Bakacsy, Henrietta Kovács, Árpád Szilágyi, and **Zoltán Márton Köhler** (2022). Inhibiting Copper Amine Oxidase Using L-Aminoguanidine Induces Cultivar and Age-Dependent Alterations of Polyamine Catabolism in Tomato Seedlings. *Agriculture (Switzerland)* 12(2):274. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020274> [IF: 3,6] Q2
4. Becskeházi, Eszter, Marietta Margaréta Korsós, Eleonóra Gál, László Tiszlavicz, Zsófia Hoyk, Mária A. Deli, **Zoltán Márton Köhler**, Anikó Keller-Pintér, Attila Horváth, Kata Csekő, Zsuzsanna Helyes, Péter Hegyi, and Viktória Venglovecz (2021). Inhibition of NHE-1 Increases Smoke-Induced Proliferative Activity of Barrett's Esophageal Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10581 22(19):10581. <https://doi.org/10.3390/ijms221910581> [IF: 6,208] D1

A tézishez nem kapcsolódó publikációk kumulatív impakt faktora: 18,608

A teljes kumulatív impakt faktor: 29,808

IF értékek a Journal Citation Reports (JCR) – Clarivate alapján
Kvartilis besorolás a SCImago Journal & Country Rank (SJR) alapján

1. BEVEZETÉS

1.1. Az izom homeosztázis

A vázizom a test tömegének akár a 40%-át is kiteheti, fontos része a légzésnek, a mozgásnak, a testtartásnak és az anyagcserének. Figyelemreméltó önmegújító képességgel rendelkezik a szatellita sejteknek köszönhetően, így biztosítva sérülés után a szervezet szerkezeti és funkcionális helyreállítását. A tápanyagok elérhetősége létfontosságú ehhez a folyamathoz, és mivel a glükóz befolyásolja az aktivált szatellita sejtek, azaz mioblasztok differenciálódását; a hiánya akadályozhatja a vázizomrostok regenerálódását, valamint hozzájárulhat olyan állapotokhoz, mint a szarkopénia. Az életkorból eredő változások is befolyásolják a glükózfelvételt és az anyagcsereutakat, ezzel az izmok egészségét és működését.

1.2. Jelátviteli folyamatok a vázizom glükózfelvételének hátterében

Egészséges szervezetben, az emelkedett vércukorszint normalizálásában a kulcsszerepet a vázizom tölti be a 4-es típusú glükóz transzportere (GLUT4) által. Ez az egyedüli olyan glükóz transzporter a szervezetben, amelyik normál állapotában nem a plazmamembránban található és inzulin függő. Mioblasztokban még mind a GLUT4, mind a GLUT1 fontos, azonban a differenciációt követően, a miotubulusokban már csökkent a GLUT1 jelentősége.

A GLUT4 membránba való transzlokációját elindíthatja az inzulin bekötődése az inzulin receptorba. A receptor ezután aktiválja foszfoinozítid 3-kinázt (PI3K) az inzulin receptor szubsztrát 1 (IRS1) foszforilációján keresztül. A PI3K egyfelől képes a Ras-hoz kapcsolódó C3 botulinum toxin szubsztrát 1 (Rac1)/p21-aktivált kináz 1 (PAK1)/cofilin útvonalon szabályozni az aktin átrendeződést, ezzel biztosítani az utat. Másfelől a PI3K képes aktiválni mozgató elemeket a foszfoinozitol-függő fehérje kináz-1 (PDK1)/Akt/Akt szubsztrát 160 kDa (AS160; TBC1D4) útvonalon keresztül. Foszforiláció hiányában azonban az AS160 képes a GLUT4 mozgatásához nélkülözhetetlen Rab molekulákat inaktív állapotban tartani, ezzel a GLUT4-et intracellulárisan tartani.

A GLUT4 transzlokáció megindítására van egy alternatív, inzulin független útvonal is az AMP-aktivált fehérje kináz (AMPK) lévén, ami szintén képes szabályozni az AS160-at. Az AMPK, mint egy energiaszenzor képes érzékelni az AMP/ATP arányt és aktiválódik a magas AMP szintre. A sirtuin 1-gyel (Sirt1) közösen képes az AMPK szabályozni a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor- γ koaktivátor-1 α -t (PGC-1 α), ami kulcsfontosságú transzkripció

faktor számos biológiai folyamatban, mint például a mitokondrium biogeneze vagy a glükóz/zsír/sav metabolizmusa. A peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor- γ (PPAR γ), ami közvetlenül felelős a GLUT4 transzkripciójáért, szintén a PGC-1 α irányítása alatt áll. Egymással ellentétes hatással, de az AMPK és az Akt is az emlős rapamycin célponton (mTOR) keresztül képes számos anyagcsere-útvonalat befolyásolni, mint például a glükóz/zsír/aminosavak metabolizmusát, és ezáltal hatást gyakorolni az összetettebb folyamatokra, például a sejtnövekedésre vagy a túlélésre.

1.3. A GLUT4 transzlokáció károsodása és a diabetes mellitus

A vázizom glükóz felvételének limitáló eleme a GLUT4, ugyanakkor az inzulin rezisztencia fő hibája a károsodott GLUT4 transzlokáció és a csökkent GLUT4 mennyiség. Az inzulinrezisztencia és a nem megfelelő inzulinszekréció áll a 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM) hátterében, amelyet nem inzulinfüggő diabetes mellitusnak (DM) is neveznek és a DM-os betegek 90%-át teszi ki. A cukorbetegségekre jellemző krónikus hiperglikémiás állapot több szövetben is képes oxidatív stresszt kiváltani, ami hosszú távon különféle szövődményekhez vezet. Tipikusan ilyenek a stroke, a szív- és érrendszeri betegségek, a perifériás neuropátia, a retinopátia és a diabéteszes nephropathia. Ezenkívül a diabetes mellitus kezelésének előrehaladtával új szövődményeket azonosítottak, mint például a rák, fertőzések, funkcionális és kognitív károsodások, májbetegségek és érzelmi zavarok. A helyzet súlyossága ellenére a betegség megelőzése és gyógyítása még nem ért el áttörést, hiszen a diagnosztizált betegek száma évről évre csak nő, jelenleg már eléri az 536,6 milliót és a jelenlegi tendencia alapján 2030-ra 634 millióan lesznek. A helyzetet tovább rontja, hogy a cukorbeteg fele feltehetően nincs is diagnosztizálva. Mindezek ellenére kevés terápiás lehetőség van, ami a glükóz felvételt a jelátvitel szintjén tudná javítani. Egyedül a Metformin van ma is használatban, ami a mitokondriális funkciók szabályozásával aktiválja az AMPK-t és fokozza a glükóz felvételét.

1.4. Csont morfogénikus fehérjék (BMP-k) és a glükóz felvétel szabályozása

Csont morfogénikus fehérjék (BMP-k) a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) fehérjék szupercsaládjába tartoznak, eredeti leírásuk szerint a csont és porc kialakulásában van szerepük, de számos más biológiai folyamatban is fontosak, mint például az adipogenezis, elhízás és diabetes. A BMP-k szekretált fehérjék és hatásukat a sejtekre a heterodimer receptorukon keresztül, több Smad-molekula foszforilációs aktiválásával fejtik ki.

A BMP-k részt vesznek a glükóz felvétel szabályozásában is. A BMP7 növeli a glükózfelvételt mind izom-, mind zsírszövetben a PDK1/PI3K/Akt útvonal és a GLUT4 transzlokáció által. Ezzel összhangban csökken a mennyisége T2DM-os betegek szérumban, míg a BMP2 mennyisége növekszik. Ugyanakkor a BMP2-nek a BMP6-tal inzulin érzékenyítő hatása van, együtt képesek növelni a GLUT4 transzlokáció mértékét és a PPAR γ által a GLUT4 mennyiségét is. A BMP6 egymagában képes csökkenteni a szérumban lipid és glükóz szintet ob/ob egerekben már 6 napos kezelést követően. Hiperglikémiára és a szabad zsírsavak növekedésére fokozódik a BMP4 expressziója, aminek a mennyisége emberekben korrelál az adipociták méretével, az elhízással és az inzulin érzékenységgel. Sajnos azonban a BMP-k komplex hatásai még mindig nem teljesen feltártak és a komplex hatásukat együttesen vizsgáló, átfogó tanulmányok is hiányoznak.

1.5. Tiloron dihidroklorid

Egy, az 1970-es évek óta alkalmazott antivirális szerről, a tiloron dihidrokloridról (2,7-bis[2-(diethylamino)ethoxy]-9-fluorenon dihidroklorid; későbbiekben: tiloron) leírták, hogy tüdő epithelium sejtekben növeli a BMP2 és BMP7 transzkripcióját. Valamint, hogy a tiloron képes fokozni a Smad1/5/8 foszforilációját a BMP-ken keresztül, ezzel gátolva az izomtömeg csökkenését és javítva az egerek túlélését cachexiás izommodellben.

A tiloron számos országban kapható antivirális szer és javallott olyan vírusos fertőzésekkel szemben, mint az influenza, akut légúti vírusfertőzés, vírusos hepatitis és vírusos agyvelőgyulladás. Továbbá a tiloron olyan vírusokkal szemben is hatékony, mint a herpes simplex vírus, a Nyugat-Nílus vírus és az Ebola vírus, valamint a humán koronavírusokkal szemben, ideértve a MERS-CoV-ot és SARS-CoV-2-t.

1.6. A reaktív oxigén formák és a glükóz felvétel kapcsolata

A normális anyagcsere során képződő reaktív oxigén- és nitrogénformák (ROS/RNS) egészen addig esszenciálisak, amíg az antioxidánsokkal egyensúlyban vannak. A redox egyensúly felborulása oxidatív stresszhez vezet, ez számos betegség, akár a T2DM okozója is lehet. A ROS-ok, ideértve a szuperoxid anion gyök ($O_2^{\cdot-}$), hidrogén-peroxid (H_2O_2) és hidroxilgyök ($\cdot OH$) képesek megromlítani a biológiai membránokat, a fehérjéket, az enzimeket és a nukleinsavakat, mindezzel a sejtkárosodást és az öregedést elősegíteni. A sejtekben a mitokondrium ATP képzése során keletkezik a legtöbb ROS, de egyes metabolikus faktorok, mint a magas környezeti glükóz is hozzájárulhatnak a mitokondriális diszfunkcióhoz, gyulladáshoz és apoptózishoz. A károsodott mitokondriális funkció lipid felhalmozódáshoz,

inzulinrezisztenciához és csökkent glükózfelvételhez vezet. A ROS okozta szerin foszforiláció az IRS-en gátolja az inzulin indukálta tirozin foszforilációt, ezzel blokkolva magát az inzulin hatást, az Akt és az AS160 eredményezte GLUT4 transzlokációt, valamint a ROS csökkenti a GLUT4 mennyiségét és végeredményben a glükóz felvételét. A peroxinitrit is gátolja az inzulin választ az IRS1 tirozin foszforilációjának csökkentésével és az Akt aktivációjának elnyomásával. A redox egyensúly fenntartása és helyreállítása létfontosságú a káros hatások megelőzéséhez.

1.7. Antioxidáns védelem és az astaxanthin

Az emberi szervezet számos antioxidánsal van felvértezve, amelyek az oxidánsok hatásainak ellensúlyozására szolgálnak. Ezeket két nagy csoportra oszthatjuk: enzimátikus és nem enzimátikus antioxidánsok. Az astaxanthin egy xantofil karotinoid, ami a nem enzimátikus antioxidánsok közé tartozik. Sok, főként tengeri alga képes szintetizálni, és a táplálékláncon keresztül különféle állatokban jelenik meg, így az emberi táplálékokban is megtalálható.

Az astaxanthin a többi karotinoidhoz hasonlóan lipoldékony, így képes a lipid kettős rétegbe beilleszkedni, és a szabad gyököket mind a membránban, mind a membrán felületén eliminálni tudja. Az astaxanthin erélyesebb olyan, nem enzimátikus antioxidánsoknál, mint a C-vitamin, a β -karotin és az α -tokoferol, képes jelentősen csökkenteni a magas glükóz, TNF vagy palmitinsav indukálta ROS szintet. Az astaxanthin képes csökkenteni a vércukor- és HbA1c-szintet, valamint a TG és a koleszterin értékét T2DM betegekben.

2. AZ ÉRTEKEZÉS CÉLKITŰZÉSEI

Az egyes BMP-k hatását a glükóz felvételre és a metabolizmusra már korábban is vizsgálták. Ez lehetővé tette számunkra, hogy megértsük, hogy egyes tagjai a BMP családnak befolyásolják a glükózfelvételt a GLUT4 expresszióján és annak transzlokációján keresztül. Továbbá, hogy a szérum BMP szintje összefügg az inzulinérzékenységgel és a T2DM-vel. Azonban a BMP-k kombinált hatásai még ismeretlenek. Bizonyított, hogy a ROS csökkenti a GLUT4 mennyiségét és rontja a GLUT4 transzlokációját, ami hosszú távon inzulinrezisztenciához vezet. Mindazonáltal a ROS antioxidánsokkal való eliminációja okozta változások a GLUT4 transzlokáció szabályozására még hiányosak. Így célul tűztük ki, hogy bővítjük az ismereteinket az alábbi kérdések kapcsán:

- A tiloron valóban képes szimultán több BMP szintjét megnövelni és aktiválni a BMP útvonalat mioblasztokban?
- Hatással van-e a tiloron a GLUT4 transzlokáció szabályozására a mioblasztokban és a miotubulusokban?
- Képes-e fokozni a tiloron kezelés a mioblasztokban a GLUT1 és GLUT4 mennyiségét, valamint a glükóz felvételét?
- Képes-e a tiloron kezelés érzékenyebbé tenni a miotubulusokat az inzulinra?
- Milyen hatással van a tiloron kezelés a mioblasztok mitokondriumainak mennyiségére és működésére?
- Befolyással bír-e a szisztémás tiloron kezelés az egerek szöveti glükóz felvételére?
- Hatással van-e az astaxanthin etetés a glükózfelvételt szabályozó molekulákra az egér vázizmában?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtkultúra, differenciáció és kezelés

A C2C12 egér mioblaszt sejtek 80%-ban magas glükóz tartalmú Dulbecco módosított Eagle médiumot (DEMEM) és 20%-ban főtális borjúsérumot (FBS) tartalmazó médiumban növekedtek, ami 50 µg/ml végkoncentrációjú gentamicinnel volt kiegészítve. A proliferáló sejteket 20 és 35 nM tiloron dihidrokloriddal (2,7-bis[2-(diethylamino)etoxi]-9-fluorenon dihidroklorid) kezeltük 40 órán keresztül.

A differenciációhoz a 80-90%-ban konfluens sejtenyészet médiumát lecseréltük, olyan differenciációs médiumra, amelyben az FBS helyett 2% lószérum volt, majd 5 napig hagytuk, hogy a sejtekből miotubulusok képződjenek. A differenciált miotubulusok 20 nM-os tiloron (2 vagy 5 óra) kezelést kaptak, amit egyes vizsgálatok esetén 10 perces 100 nM-os inzulin kezelés követett.

3.2. Kísérleti állatok

12 hetes, hím C57BL/6J egereken történ a tiloron oltás. A 4 hetes astaxanthin etetés kísérlethez 3 hónapos, hím C57BL/6 egereket alkalmaztunk. Az astaxanthin tartalmú AstaReal A1010 készítményt hozzáadtuk a normál rágcsáló táphoz 4 g/kg arányban. Az állatkísérleteket az Debreceni Egyetem Munkahelyi Állattjóléti Bizottság jóváhagyásával (1/2017/DEBÁB, 3-

1/2019/DEMÁB) végeztük. A laboratóriumi állatok a magyar törvényeknek és az Európai Unió állatjóléti irányelveinek és előírásainak megfelelően voltak tartva és kezelve.

3.3. Kvantitatív real-time (qRT)-PCR

A qRT-PCR-hoz teljes RNS mintát gyűjtöttünk mioblasztokból, majd reverz transzkripciót végeztünk. A SybrGreen reakciókat a qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX keverékkel hajtottuk végre, a gyártó utasításainak megfelelően, az alábbi primerek felhasználásával: [BMP2: NM_007553.3; BMP4: NM_007554.3; BMP7: NM_007557.3; GDF5 (BMP14): NM_008109.3; Smad4: NM_008540.2; Slc2a1 (GLUT1): NM_011400.3; Slc2a4 (GLUT4): NM_001359114.1; HPRT: NM_013556.2; RPL27: NM_011289.3]. Az egyéni küszöbciklus (C_t) értékeket normalizáltuk a *MmHprt* és *MmRpl27* átlagos C_t értékeihez, mint belső kontroll génekhez. A relatív génexpressziós szinteket $2^{-\Delta\Delta C_t}$ értéként mutattuk be.

3.4. Gélelektroforézis és immunblot

A C2C12 sejteket 1mM NaF-al és proteáz inhibitorokkal kiegészített RIPA pufferben lizáltuk. A Biceps femoris és pectoralis izmait mind a kontroll, mind az astaxanthin etetet egérnek proteáz inhibitorokkal kiegészített 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM NaF, és 1 mM Na_3VO_4 tartalmú homogenizáló pufferben homogenizáltuk.

A sejtlyizátumokat 5 percig, az izom homogenizátumokat 10 percig centrifugáltuk 16,000×g-n, 4 °C-on a sejtes törmelék eliminálására. A minták fehérje koncentrációját BCA fehérje kit segítségével határoztuk meg. Az egységes mennyiségű fehérjét SDS-poliakrilamid gélen választottuk szét, majd Protran membránra blottoltuk át. A sovány tejes blokkolást követően a membránokat egész éjszakán át inkubáltuk primer egér/nyúl antitestekkel. A megfelelő torna-peroxidázzal konjugált anti-IgG másodlagos antitesttel való inkubációt követően a torna-peroxidáz aktivitás mérésére erősített kemilumineszcens metodikát alkalmaztunk. A szignálintenzitást röntgenfilmeken rögzítettük, majd a Quantity One szoftverrel számszerűsítettük.

3.5. Fluoreszcens jelölés és mikroszkópia

A fluoreszcens jelöléshez először a mintákat szobahőn fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel, utána permeabilizáltuk 0,2%-os Triton X100-al, majd 2%-os BSA tartalmú PBS-el blokkoltuk. A GLUT4 láthatóvá tételéhez nyúlból származó anti-GLUT4 primer antitestet alkalmaztunk, majd azt felismerő Alexa Fluor 488-konjugált másodlagos antitestet. A mitokondrium jelöléséhez a sejteket először MitoTracker™ Deep Red FM-el

inkubáltuk normál körülmények között, majd 4%-os paraformaldehiddel szobahőn, 15 percig fixáltuk. A sejtmagokat Hoechst 33258 festettük.

A széles látóterű fluoreszcens képekhez Nikon Eclipse Ni-U fluoreszcens mikroszkópot használtunk 100× objektívvel (Nikon CFI Plan Apo DM Lambda 100× Oil, NA = 1,45). A képeket a saját háttérükre normalizáltuk, majd a jelintenzitást számszerűsítettük és a kontrollhoz viszonyítva ábrázoltuk. A képek kiértékelése és hőtérképekké alakítása ImageJ szoftverrel történt.

A differenciálatlan (mioblaszt) és a differenciált (miotubulus) C2C12 sejtek morfológiájának bemutatásához Leica DMI1 fáziskontraszt mikroszkópot használtunk 10× objektívvel (Leica Hi Plan 10×, NA = 0,28).

3.6. *In vitro* ¹⁸F-fluoro-2-dezoxi-glükóz (¹⁸FDG) felvétel mérése

A mioblasztok radioaktív glükóz analóg ¹⁸FDG felvételének monitorozásához a C2C12 sejteket 24-26 órán át növesztettük. Ezt követően 1 órán át 37 °C-on 10 µCi (0,37 MBq) ¹⁸FDG jelenlétében inkubáltuk a sejteket 1 ml DMEM-ben, ami 1 mM glükózt és 20%-ban FBS-t tartalmazott. Végül a sejteket begyűjtöttük, felfuszpendáltuk és a szuszpenzió radioaktivitását mértük Packard Cobra-II Auto Gamma Counter eszközzel.

A tiloron kezelést 20 és 35 nM koncentrációban alkalmaztuk 40 órán keresztül és a tiloron jelen volt a ¹⁸FDG inkubálás során is. A GLUT1 szerepének meghatározására a glükóz felvételében, a tiloron kezelt sejteket specifikus GLUT1 gátlóval, BAY-876 kezeltük 2 órán keresztül 10 nM-os koncentrációban.

A differenciált miotubulusok ¹⁸FDG felvételének méréséhez először a mioblasztokat 24 órán át növesztettük, míg 90%-os konfluenciát nem mutattak, majd a 20% FBS-t lecseréltük 2% lószérumra és 5 napon át hagytuk a sejteket miotubulusokká differenciálódni. Az 5. napján a differenciációnak 20 nM tiloron kezelést alkalmaztunk a sejt kultúrákon 2 vagy 5 órán keresztül, majd 10 percig 100 nM inzulinnal kezeltük. A ¹⁸FDG felvételt a korábban leírtak szerint mértük.

3.7. A mitokondriális oxigénfogyasztás (O₂ flux) mérése nagy felbontású respirométerrel

A csoportok közötti respirációs különbségek meghatározására a mioblasztokat (3×10^6 sejt) 2 ml MiR05 respirációs médiumban (pH 7,1; oxigén oldhatósági faktor 0,92) vettük fel, majd finoman az oxigráf kamrájába pipettáztuk.

A stabil rutin respirációt követően az intakt sejtek mitokondriális ATP szintézisét blokkoltuk az ATP-szintáz oligomicinnel való gátlásával. Az elektrontranszport rendszer (ETS) maximális kapacitását protonofor fokozatos titrálásával értük el. A komplex I gátlást követően az elektrontranszport rendszertől független légzést (vagy maradék oxigénfogyasztást) határoztuk meg komplex III inhibitor, antimycin A jelenlétében. A DatLab szoftvert használtuk a megjelenítéshez, a respirometriás adatgyűjtéshez és az elemzéshez.

3.8. Az állatok kezelése és *in vivo* képalkotás

C57BL/6J egerek intraperitoneálisan 25 mg / testtömeg kg tiloron injekciót kaptak, ami 3 nappal az első oltást követően meg lett ismételve. Az első oltást megelőzően és a másodikat követően pozitronemissziós tomográfia / komputertomográfia (PET/CT) vizsgálatokat végeztünk.

Az egereket 3%-os Forane-nal altattuk és $10,2 \pm 0,9$ MBq ^{18}F FDG-t fecskendeztünk be 100 μl sóoldatban a tiloron kezelés előtt és a második tiloron kezelés után. 50 perccel a radiotracer injekció beadása után teljes test PET/CT vizsgálatokat végeztünk izoflurán altatásban a preklinikai *nanoScan PET/MRI* 1T készülékkel. A képrekonstrukció és a PET képelemzés után a standardizált felvételi értéket (SUV) a következő képlet alapján számítottuk ki: $\text{SUV} = [\text{ROI aktivitás (MBq/ml)}] / [\text{injektált aktivitás (MBq)} / \text{állattömeg (g)}]$.

3.9. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseket a Student-féle t-próbával vagy egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük, amelyet Dunnett vagy Sidak post-hoc teszt követett. A grafikus ábrázoláshoz és statisztikai elemzésekhez a GraphPad Prism 8.0 szoftvert használtuk. Az adatokat átlagként + a szórások átlaga (SEM) vagy a medián, a 25. és 75. percentilisekkel együtt, dobozdiagramokon ábrázoltuk. A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsan eltérőnek.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A tiloron növeli a BMP jelátvitelt mioblasztokban

Először a tiloron BMP-k transzkripciójára gyakorolt hatását vizsgáltuk C2C12 mioblasztokban, az irodalomban leírt kezelési idő és koncentráció alkalmazásával. A qRT-PCR kimutatta, hogy a BMP2, BMP4, BMP7 és BMP14 mRNS szintje mindkét (20 és 35 nM) tiloron koncentráción emelkedett a mioblasztokban; azonban a BMP14 expresszióját csak a

magasabb koncentráció növelte szignifikánsan. A BMP jelátviteli útvonal aktiválódását a Smad4 mRNS szint emelkedése, valamint a Smad1/5/8 (Ser463/Ser456/Ser467) foszforilációjának növekedése jelezte.

4.2. A tiloron hatása a GLUT4 transzlokációt szabályozó jelátviteli molekulákra

Megvizsgáltuk, hogy a tiloron által kiváltott fokozott BMP transzkripció és aktivált BMP jelátvitel hogyan hat a glükózfelvétel szabályozó elemeire. A tiloron növelte a foszfo-Akt2(Ser474)/Akt2 és foszfo-AMPK(Thr172)/AMPK arányokat, amik szignifikánsak voltak 35 nM tiloron esetében. Az AS160 expresszió mennyiségét mindkét tiloron koncentráció csökkentette, míg a foszfo-AS160(Thr642)/AS160 arányát növelte.

Miotubulusokon teszteltük a tiloron rövid távú hatását, amelyeken először a differenciálódást a dezmin fokozott expressziójával igazoltuk. A miotubulusokban a 20 nM tiloron növelte a foszfo-AS160(Thr642)/AS160 arányt mindkét (2 és 5 óra) kezelési időben.

4.3. A Tiloron fokozza a C2C12 sejtekben GLUT-ok expresszióját és a glükózfelvételt

Vizsgáltuk a GLUT4 intracelluláris expresszióját tiloron kezelt mioblasztokban immunfluoreszcens festéssel és széles látóterű fluoreszcens mikroszkópiával. A sejtek teljes GLUT4 fluoreszcencia intenzitásának számszerűsítése azt mutatta, hogy a tiloron kezelés után megnőtt a GLUT4 tartalom. Ezt követően qRT-PCR-rel vizsgáltuk a Slc2a4 (GLUT4) és a myoblast-specifikus Slc2a1 (GLUT1) mRNS szintet. Azt találták, hogy a különböző koncentrációjú tiloronnal végzett kezelés mind az Slc2a1, mind az Slc2a4 transzkriptum szintjének növekedését eredményezte. A tiloron kezelés hatását Western blot technikával is megvizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy amíg GLUT1 tendenciózusan, addig a GLUT4 mennyisége mindkét koncentrációnál nőtt. Western blot technikával megvizsgáltuk a PPAR γ mennyiségét is, amely a GLUT4 expressziójának kritikus szabályozója, és az általunk alkalmazott mindkét tiloron koncentráció hatására növekedést észleltünk.

Miután a tiloron kezelés hatására a GLUT4 transzlokációt szabályozó elemek fokozott aktivitását és a GLUT4 mennyiségének növekedését mértük, kíváncsiak voltunk arra, hogy a sejtek glükózfelvétele is összhangban van-e mindezzel. A sejtek ¹⁸FDG felvételében 1,5-szörös növekedést tapasztaltunk a 20 nM tiloron kezelés után és további növekedést a magasabb koncentráció hatására. Annak céljából, hogy elkülönítsük a GLUT1- és GLUT4-hez köthető glükózfelvételt, egy specifikus GLUT1 inhibitor, a BAY-876-ot alkalmaztuk, amely jelentősen csökkentette a celluláris ¹⁸FDG felvételt.

4.4. A tiloron növeli a ^{18}FDG felvételt és az inzulin érzékenységet miotubulusokban

Miotubulusokon először az Akt2(Ser474) foszforilációjának növekedésével igazoltuk az inzulin hatását, majd vizsgáltuk a tiloron inzulin érzékenyítő hatását, amely vizsgálatkor azt kaptuk, hogy a megelőző tiloron kezelés tovább fokozta a pAkt2(Ser474)/Akt2 arányt inzulin adást követően.

Miotubulusokon is tanulmányoztuk a ^{18}FDG felvételét, és a tiloron kezelés után (5 óra) a miotubulusok ^{18}FDG felvételének növekedését figyeltük meg. Ezt követően az inzulin növelte a ^{18}FDG felvételét a kontroll és a tiloronnal kezelt (2 vagy 5 óra) csoportban. És a tiloron alkalmazása (5 óra) tovább tudta fokozni a miotubulusok inzulin által közvetített ^{18}FDG -felvételét.

4.5. A tiloron hatása a mioblasztok mitokondriális funkcióira

Nagy felbontású respirometriával vizsgáltuk a megnövekedett glükózfelvétel hatását a mitokondriális légzési láncra és közvetve az oxidatív ATP termelésére. A kontroll csoporthoz képest a 20 vagy 35 nM tiloronnal végzett kezelés az intakt mioblasztokban a rutin légzés jelentős csökkenését eredményezte. Ezenkívül a tiloron az ATP-kapcsolt légzést is csökkentette.

A funkcionális változások miatt megvizsgáltuk a mitokondriumok biogenezisét szabályozó PGC-1 α összmenyiségét, amelynek fehérjeszintjében nem találtunk változást. Ezért a sejtek mitokondriumait MitoTrackerTM Deep Red FM-mel jelöltük, és egyenként megvizsgáltuk a mioblasztok teljes mitokondriális tartalmát, ahol szintén nem találtunk különbséget a tiloron kezelést követően.

4.6. A tiloron kezelés növeli a ^{18}FDG felvételét *in vivo*

Az *in vitro* vázizom mioblasztokban és miotubulusokban megfigyelt megnövekedett glükózfelvétel alapján PET/CT képalkotás segítségével vizsgáltuk a szisztémás tiloron hatását az *in vivo* ^{18}FDG felvételre. A ^{18}FDG -PET képek kvantitatív analízisével a vázizomzat, a zsírszövet és a máj átlagos SUV-értékének szignifikáns növekedését figyeltük meg a tiloron kezelést követően, ami a radioaktív jelölő fokozott felvételére utal ezekben a szövetekben.

4.7. Az astaxanthin etetés befolyásolja a vázizom metabolizmusát szabályozó molekulákat

A vázizmok méretükből adódóan az egész szervezet anyagcseréjének jelentős részéért felelősek. Ezért célunk volt annak vizsgálata, hogy egy erős antioxidáns, az astaxanthin étrendi alkalmazása hatással van-e a vázizom anyagcserét szabályozó fehérjékre. Az astaxanthin hatását olyan hosszú távú, az erőtermelésben részt vevő reprezentatív izmokban vizsgáltuk, mint például az egerek hátsó végtagjainak (biceps femoris) vagy mellső végtagjainak (musculus pectoralis) izmai.

Mindkét vizsgált izomban az mTOR(Ser2448) foszforilációja nőtt az astaxanthin etetés hatására. Ugyanakkor a teljes mTOR mennyisége is növekedést mutatott, így a foszfo-mTOR(Ser2448)/mTOR arány nem változott az astaxanthin kezelést követően. Bár az Akt2 és a foszfo-Akt2(Ser474)/Akt2 arány nem változott szignifikánsan a vizsgált mintákban, a foszfo-AS160(Thr642)/AS160 arány mind a biceps femoris, mind a pectoralis mintákban nőtt. A PGC-1 α expressziója csak enyhe növekedést mutatott a biceps femoris és a pectoralis izommintákban az astaxanthin kezelést követően.

5. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KONKLÚZIÓK

A vázizomsejtekben, legyenek azok mioblasztok, miotubulusok vagy vázizomszövetek, a glükózfelvétel egy összetett mechanizmus, amelyben a GLUT4 transzlokáció szabályozása központi szerepet játszik. Amennyiben az indítójelek érzékelése és a jelátviteli út sérül, a GLUT4 transzlokációja elmarad és nem történik meg a glükóz felvétele. Ennek eredményeként tartósan magas vércukorszint alakul ki, amely súlyos szövődmények sokaságát okozhatja az egész szervezetben. Ennek elkerülése érdekében fontos a GLUT4 transzlokáció szabályozási mechanizmusainak mélyebb megértése és új jelátviteli folyamatok felfedezése.

Az értekezés új eredményei a következőkben foglalhatók össze:

- A tiloron kezelés növelte a BMP2, BMP4, BMP7 és a BMP14 expresszióját, továbbá aktiválta a BMP jelátvitelt C2C12 sejtekben.
- A GLUT4 transzlokációt szabályozó elemek aktivációja, mint foszfo-Akt2(Ser474)/Akt2 és a foszfo-AS160(Thr642)/AS160 arányok, növekedtek a tiloron kezelés hatására mioblasztokban, ezzel elősegítve a GLUT4 transzlokációt.

- Megfigyeltük, hogy a tiloron hatására megnőtt a PPAR γ mennyisége, valamint a GLUT1 és GLUT4 szintje is a mioblasztokban.
- A tiloron kezelést követően a miotubulusokban megnőtt a foszfo-AS160(Thr642)/AS160 arány. Ezenkívül a foszfo-Akt2(Ser474)/Akt2 arány inzulin stimulációt követően tovább emelkedett a tiloron kezelt mintákban.
- A tiloron kezelést követően a ^{18}FDG glükózanalóg felvétele mind a mioblasztokban, mind a miotubulusokban megnőtt. Valamint miotubulusokban a tiloron kezelés tovább fokozta az inzulin által kiváltott ^{18}FDG felvételt.
- A szignifikánsan megnövekedett glükózfelvétel nem eredményezett fokozott ATP termelést a mitokondriális légzés által; mind a bazális, mind az ATP-kapcsolt légzés csökkent a tiloron kezelést követően a mioblasztokban, hozzájárulva az AMPK indukciójához, növelve a foszfo-AMPK(Thr172)/AMPK arányát.
- Az *in vivo* C57BL/6J egér kísérletekben a tiloron szisztémás adása megnövekedett ^{18}FDG felvételt eredményezett a vázizomzatban, a májban és a zsírszövetben.
- Az astaxanthin etetés nem változtatta meg a GLUT4 transzlokáció inzulinfüggő szabályozójának, a phospho-Akt2(Ser474)/Akt2 arányát a C57BL/6 egereknek sem a biceps femoris, sem a pectoralis izmában, míg a foszfo-AS160(Thr642)/AS160) aránya növekedett.
- Az mTOR(Ser2448) foszforilációja nőtt az astaxanthin etetés hatására a C57BL/6 egerek biceps femoris és pectoralis izmában, de a teljes mTOR mennyiség is nőtt, így a foszfo-mTOR(Ser2448)/mTOR arány nem változott.

TÁMOGATÁSOK

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatta [pályázati azonosítók: *GINOP-2.3.2-15-2016-00040 (MYOTeam)*, *EFOP-3.6.2-16-2017-00006*, NKFI FK 134684, és NKFI K 132446]. TKP2021-EGA-28 projekt a Magyar Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatásával valósult meg a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból, a TKP2021-EGA támogatási konstrukció keretében. A munkát a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (BO/00734/19/5) és az UNKP-21-5-SZTE-571 számú Innovációs és Technológiatudományi Minisztérium Új Nemzeti Kiválósági Programja támogatta.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet mindazoknak, akik segítettek a doktori tanulmányaim hosszú és rögös útján.

Először is köszönöm Professzor Dux Lászlónak a Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének és a Biokémiai Intézet volt vezetőjének, valamint Csont Tamás Bálintnak a Biokémiai Intézet jelenlegi vezetőjének a lehetőséget, hogy az Intézetükben végezhettem a kutatásomat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Keller-Pintér Anikónak az ő fáradhatatlan támogatásáért és szakami vezetéséért, amely végig kísérte a PhD-s éveimet.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet Professzor Csernoch Lászlónak, Professzor Pál Baláznak és kutatócsoportjuknak a közös munka lehetőségéért.

Köszönetet szeretnék mondani szerzőtársaimnak, Trencsényi Györgynek és Szabó P. Juditnak a ¹⁸FDG mérésekért, Juhász Lászlónak az Oroboroson végzett vizsgálataiért, Zvara Ágnesnek és G. Puskás Lászlónak a qRT-PCR mérésekért.

Külön köszönet illeti Szabó Kittit, Becsky Dánielt, Rádi Erzsébetet és Makráné Felhő Zitát a jóhangulatú munkakörnyezetért és egymás támogatásáért. Továbbá köszönöm a közös munkát a kutatócsoportunk jelenlegi tagjainak: Tóth Enikőnek, Horváth Barnabásnak, Tanner Norman Noelnek, Szabó Dóra Juliannának, Szalenkó-Tökés Ágnesnek és Tóth Évának, valamint volt tagjainak: Petrilla Annamáriának, Szenci-Kaszás Baláznak és Fazekas Szuzinának.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Biokémiai Intézet minden tagjának. A nagylelkű technikai támogatást és segítséget külön is köszönöm Engi Ildikónak, Bodnár Tündének és Ocsovszki Imrének.

Hálás vagyok a biológia tanáromnak, Szontagh Katalinnak, amiért megszerettette velem ezt a területet. És korábbi témavezetőmnek, Szepesi Ágnesnek a közös ötleteléseinkért, amelyekkel felkeltette érdeklődésemet a tudományos pálya iránt.

Szívből jövő hálámat fejezem ki közeli barátaimnak és tanárainak. Legnagyobb köszönetem és hálám azonban a családomnak szól a megingathatatlan támogatásukért, türelmükért és szeretetükért, amelyet egész életemben nyújtottak.