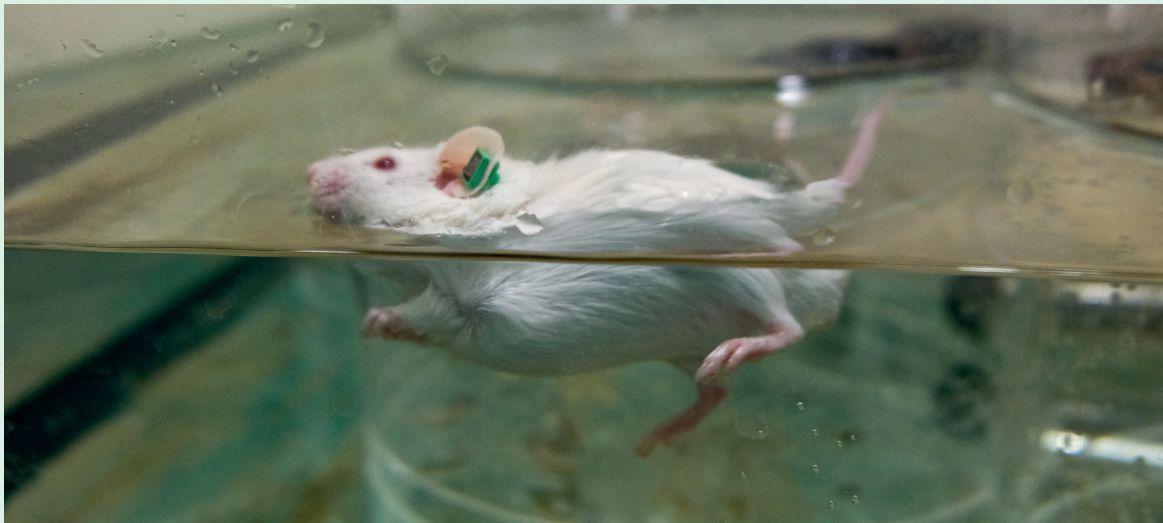


mgr Karol Ciemiński

Rozprawa doktorska

**MOLEKULARNY MECHANIZM
OCHRONNEGO DZIAŁANIA TRENINGU PŁYWACKIEGO
NA MIĘŚNIE SZKIELETOWE W MYSIM MODELU
LUDZKIEJ CHOROBY STWARDNIENIA
ZANIKOWEGO BOCZNEGO**



Promotor:
prof. dr hab. Wiesław Ziółkowski

Promotor pomocniczy:
dr Damian Flis





Akademia Wychowania Fizycznego
im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu

mgr Karol Ciemiński

**Molekularny mechanizm ochronnego działania
treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu
ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego**

Rozprawa doktorska

Promotor:
prof. dr hab. Wiesław Ziółkowski

Promotor pomocniczy:
dr Damian Flis

Poznań 2023

*Dziękuję moim promotorom:
prof. drowi hab. Wiesławowi Ziółkowskiemu i drowi Damianowi Flisowi
za inspirację do badań, nieocenioną pomoc w trakcie przygotowywania
pracy doktorskiej, cierpliwość i motywację do dalszego rozwoju naukowego*

*Dziękuję mojej żonie i rodzicom
za ogromne wsparcie, zrozumienie i motywację*

Niniejszą pracę dedykuję moim bliskim

SPIS TREŚCI

DANE O KANDYDACIE	5
WYKAZ SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	10
1. WSTĘP	11
1.1. Stwardnienie zanikowe boczne – istota choroby, etiologia, modele badawcze.....	11
1.2. Postępowanie lecznicze w stwardnieniu zanikowym bocznym; rola treningu	12
1.3. Trening pływacki a stwardnienie zanikowe boczne.....	12
1.4. Szlak sygnałowy Akt.....	13
1.5. Zmiany metaboliczne towarzyszące stwardnieniu zanikowemu bocznemu.....	14
2. CELE I HIPOTEZY	17
3. CYKL PUBLIKACJI	18
4. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	19
4.1. Materiały i metody badawcze wykorzystane w publikacjach 1 i 2	19
4.1.1. Trening pływacki	19
4.1.2. Pobranie krwi	20
4.1.3. Homogenizacja tkanek i przygotowanie lizatów do pomiaru metodami western blotting, separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oraz analizy proteomicznej	20
4.1.4. Western blotting	20
4.1.5. Analiza proteomiczna	21
4.2. Metody badawcze wykorzystane w publikacji 1	21
4.2.1. Pomiar masy ciała i masy mięśnia pierszczelowego przedniego (TA)	21
4.2.2. Pomiar aktywności kinazy kreatynowej (CK)	22
4.2.3. Metoda separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej	22
4.3. Metody badawcze wykorzystane w publikacji 2	22
4.3.1. Pomiar mleczanu we krwi	22
4.3.2. Pomiar mleczanu w mięśniu pierszczelowym przednim (TA)	22
4.3.3. Homogenizacja tkanek i przygotowanie lizatów do pomiaru ilościowego dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NAD ⁺ , NADH) i mleczanu	22
4.3.4. Pomiar ilości dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych	23
4.3.5. Homogenizacja i przygotowanie tkanek do pomiaru aktywności enzymów	23
4.3.6. Pomiar aktywności enzymów	23
4.3.7. Pomiar dehydrogenazy jabłczanowej (MDH)	23
4.3.8. Pomiar dehydrogenazy mleczanowej (LDH)	23
4.4. Analiza statystyczna	24

5. WYNIKI	25
5.1. Publikacja 1	25
5.2. Publikacja 2	25
6. DYSKUSJA	28
7. WNIOSKI	33
8. PIŚMIENNICTWO	34
ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA	40
ZAŁĄCZNIK 2. PUBLIKACJE	50

DANE O KANDYDACIE

Data uzyskania tytułu magistra: 14.07.2015 r.

Nazwa jednostki organizacyjnej, w której nadany został tytuł: Wydział Wychowania Fizycznego Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego w Gdańsku.

Kandydat w 2015 r. podjął studia doktoranckie w Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku, gdzie 27 czerwca 2018 r. otworzył przewód doktorski pt. *Wpływ treningu pływackiego na szlak sygnałowy IGF-1/Akt w modelu zwierzęcym stwardnienia zanikowego bocznego*. 17 lutego 2020 r. złożył rezygnację ze studiów doktoranckich potwierdzoną decyzją o skreśleniu z listy uczestników studiów doktoranckich 27 lutego 2020 r. Przewód doktorski na wniosek kandydata został umorzony decyzją Rady Naukowej AWFis w Gdańsku 29 września 2022 r. W marcu 2020 r. rozpoczął studia doktoranckie w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

WYKAZ SKRÓTÓW

Akt – kinaza Akt, kinaza białkowa B

ALDOA – aldolaza A

ALS (ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) – stwardnienie zanikowe boczne

ATP – adenozyntrifosforan

B0QZL1 – enolaza 1

cASPAT – cytoplazmatyczna aminotransferaza asparaginianowa

C57BL/6J – myszy typu dzikiego, bez modyfikacji genetycznej

CK (ang. *creatine kinase*) – kinaza kreatynowa

cMDH (ang. *cytoplasmic malate dehydrogenase*) – izoenzym cytoplazmatycznej dehydrogenazy jabłczanowej

DTT – ditiotreitol

E9Q509 – kinaza pirogronianowa

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy, in. kwas wersenowy

ENOA – α -enolaza

ENOB – β -enolaza

FALS (ang. *familial ALS*) – odmiana dziedziczna stwardnienia zanikowego bocznego

FoxO – białka należące do rodziny *forkhead box O*

FOXO3a (ang. *forkhead box O3*) – jedna z czterech części białka należącego do rodziny *forkhead box O*

G6PI – glukozy-6-fosforan

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

HXK1 – heksokinaza 1

HXK2 – heksokinaza 2

IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor 1*) – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IRS (ang. *insulin receptor substrate*) – substrat receptora insuliny

K6PF – fosfofruktokinaza

KCl – chlorek potasu

KPi – bufor potasowo-fosforanowy

KPYM1 – izozym kinazy pirogronianowej 1

LA (ang. *lactic acid*) – kwas mlekowy lub sól kwasu mlekowego; mleczan

LDH (ang. *lactate dehydrogenase*) – dehydrogenaza mleczanowa

LDH H (ang. *lactate dehydrogenase heart*) – podjednostka sercowa dehydrogenazy mleczanowej

LDH M (ang. *lactate dehydrogenase muscle*) – podjednostka mięśniowa dehydrogenazy mleczanowej

MAFbx (ang. *muscle atrophy F-box*) – atrogina-1

mASPART – mitochondrialna aminotransferaza asparaginianowa

MCT (ang. *monocarboxylate transporter*) – transporter kwasów monokarboksylowych

MCT1 (ang. *monocarboxylate transporter 1*) – transporter kwasów monokarboksylowych 1

MCT4 (ang. *monocarboxylate transporter 4*) – transporter kwasów monokarboksylowych 4

MDH (ang. *malate dehydrogenase*) – dehydrogenaza jabłczanowa

mMDH (ang. *mitochondrial malate dehydrogenase*) – izoenzym mitochondrialnej dehydrogenazy jabłczanowej

MNLS (ang. *muscle neuronal lactate shuttle*) – mięśniowo-neuronalny transport mleczanu

mTOR – kinaza mTOR, ssaczy cel rapamycyny

MuRF-1 (ang. *muscle ring-finger protein-1*) – ligaza białkowa ubikwityny E3 TRIM63

Na₂EDTA – wersenian disodowy

NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NAD⁺ – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma utleniona

NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana

p70S6K – rybosomalna kinaza białkowa S6 beta-1, kinaza p70S6

p-Akt – fosforylowana kinaza Akt, kinaza białkowa B

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCA (ang. *principal component analysis*) – analiza proteomiczna głównych składowych

p-FOXO3a – fosforylowana forma białka należącego do rodziny *forkhead box O*

PGAM – mutaza fosfoglicerynianowa

PGK1 – kinaza fosfoglicerynianowa 1

PI3K – kinaza PI3K kinazy 3-fosfoinozytydu

p-p70S6K – fosforylowana rybosomalna kinaza białkowa S6beta-1, kinaza p70S6

PTEN – 3-fosfataza fosfatydyloinozytolu-3,4,5-trisfosforanu

PVDF (ang. *polyvinylidene fluoride*) – polifluorek winylidenu

PYR (ang. *pyruvate*) – kwas pirogronowy lub sól kwasu pirogronowego; pirogronian

RPM (ang. *revolutions per minute*) – obroty na minutę

SALS (ang. *sporadic ALS*) – odmiana sporadyczna stwardnienia zanikowego bocznego

SDS – siarczan dodecyłu, sól sodowa

SOD1 – dysmutaza ponadtlenkowa 1

SOD1G93A – myszy wykazujące ekspresję ludzkiego SOD1 z mutacją G93A; mysi model ludzkiej choroby ALS

TA (łac. *tibialis anterior*) – mięsień piszczelowy przedni

TBST – roztwór soli fizjologicznej rozpuszczonej w 10 mM buforze Tris (pH 7,5), zawierający 0,005% Tween 20

TPIS – izomeraza fosfotrioz

Tris-HCl – chlorowodorek Tris(hydroksymetylo)aminometanu

WT (ang. *wild type*) – zwierzęta typu dzikiego

STRESZCZENIE

Cel. Celem pracy była próba określenia molekularnych mechanizmów związanych z ochronnym działaniem treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego (ALS). Sprawdzone, czy progresja choroby i trening pływacki wpływają na dwa procesy potencjalnie związane z atrofią mięśni szkieletowych: przebieg szlaku sygnałowego Akt oraz metabolizm mleczanu.

Materiał i metody. U transgenicznych samców myszy (SOD1G93A), począwszy od 70. dnia życia, zastosowano trening pływacki. Trening wykonywany był 5 razy w tygodniu przez 30 minut. Temperatura wody wynosiła 30°C, a maksymalna prędkość przepływu – 5 l/min. Od 105. dnia życia zmniejszono częstotliwość jednostek treningowych do 3 w tygodniu. Dodatkowo czas ćwiczeń i przepływ wody były dostosowane do indywidualnych możliwości zwierząt. Procedura treningowa odbywała się do 115. dnia życia. Po uśmierceniu, zarówno od myszy ALS, jak i myszy grupy kontrolnej (WT), pobrano mięsień piszczelowy przedni (TA), który został zważony i zamrożony. W mięśniu przeprowadzono analizę ilościową wybranych białek szlaku Akt metodą western blotting oraz metodą separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej. Oceniono stopień atrofii mięśni (masa mięśnia TA/masa ciała) oraz uszkodzenie włókien mięśniowych (poziom kinazy kreatynowej we krwi). Wykonano również pomiary związane z metabolizmem mleczanu, określając: stężenie mleczanu we krwi i mięśniu TA, poziom transporterów mleczanu, aktywność dehydrogenazy mleczanowej, aktywność enzymów układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego oraz stężenie dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NAD⁺, NADH). Dodatkowo przeprowadzono analizę proteomiczną wybranych białek szlaku Akt, białek związanych z procesem glikolizy oraz enzymów układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego. Różnice związane z progresją choroby oraz między grupami ALS i WT przeanalizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) lub testu Kruskala–Wallisa. W przypadku wykrycia różnic w modelach testowych poziom istotności określano za pomocą testu *post hoc* Tukeya. Aby zbadać istotność zmian wywołanych treningiem pływackim, zastosowano test t-Studenta lub test U Manna–Whitneya.

Wyniki. Trening pływacki w ALS działa protekcyjnie, powodując utrzymanie masy mięśni szkieletowych. ALS wpływa na nasiloną sygnalizację szlaku Akt w części odpowiadającej za atrofię komórek mięśniowych (FOXO3a/MuRF-1), trening zaś częściowo odwraca te zmiany. ALS indukuje nagromadzenie mleczanu w mięśniach szkieletowych przy jednoczesnym zmniejszeniu jego stężenia we krwi, obniża również stężenie dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w terminalnym stadium choroby. Trening pływacki częściowo kompensuje zmiany stężenia mleczanu we krwi i mięśniach szkieletowych oraz modyfikuje aktywność enzymów LDH i cMDH, jednocześnie nie wpływając na ilość białek transportujących mleczan.

Wnioski. Trening pływacki pozwala na utrzymanie masy ciała i masy mięśniowej zwierząt chorych na ALS. Pełni on funkcję represora białek FOXO3a i MuRF-1 odpowiedzialnych za proces atrofii komórek mięśniowych. Poza tym trening pływacki modyfikuje zaburzony metabolizm mleczanu w mięśniach szkieletowych.

ABSTRACT

Aim. This study aimed to determine the molecular mechanisms involved in the protective effects of swim training on skeletal muscles in a mouse model of human amyotrophic lateral sclerosis. It was verified whether disease progression and swim training affect two processes potentially engaged in skeletal muscle atrophy: the Akt signaling pathway and lactate metabolism.

Materials and methods. Swim training was applied to transgenic male mice (SOD1G93A) starting at 70 days of age. The training was performed 5 times a week for 30 minutes. The water temperature was 30°C, and the maximum flow rate was 5 L/min. Starting from day 105, the frequency of training units was reduced to 3 per week. In addition, the exercise time and water flow were adjusted to the individual capabilities of the animals. The training procedure took place until day 115. After the mice were killed, the tibialis anterior muscle (TA) from ALS and control (WT) mice was harvested, weighed, and frozen. Quantitative analysis of selected Akt pathway proteins in the muscle was performed by Western Blotting and magnetic separation, as well as flow cytometry. The degree of muscle atrophy (TA muscle mass/body weight) and muscle fibers damage (blood creatine kinase activities) were assessed. Measurements related to lactate metabolism were also made by determining: blood and tibialis anterior muscle lactate concentrations, lactate transporter levels, lactate dehydrogenase activity, malate-aspartate transfer system enzyme activity, and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺, NADH) concentrations. In addition, proteomic analysis of selected proteins of the Akt pathway, glycolysis-related proteins, and enzymes of the malate-aspartate transfer system was carried out. Differences related to disease progression and between the ALS and WT groups were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal–Wallis test. The significance level was determined using Tukey's post hoc test when differences were detected in the test models. The Student's t-test or Mann–Whitney U test was used to test the significance of changes induced by swim training.

Results. Swim training protects ALS, resulting in maintained skeletal muscle mass. ALS partially affects the increased Akt signaling pathway, which is responsible for muscle cell atrophy (FOXO3a/MuRF-1), while training partially reverses these changes. ALS induces the accumulation of lactate in skeletal muscles while decreasing its concentration in the blood and lowering the concentration of nicotinamide adenine dinucleotides in the terminal stage of the disease. Swimming training partially compensates for changes in lactate concentration in blood and skeletal muscle and modifies enzyme activity: LDH and cMDH, at the same time, do not affect the amount of lactate transport proteins.

Conclusions. Swim training affects the maintenance of body weight and muscle mass in animals with ALS. It acts as a repressor of FOXO3a and MuRF-1 proteins responsible for the muscle cell atrophy process. In addition, swim training modifies impaired lactate metabolism in skeletal muscle.

1. WSTĘP

1.1. Stwardnienie zanikowe boczne – istota choroby, etiologia, modele badawcze

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS), znane również jako choroba Lou Gehriga, stanowi jedną z najbardziej wyniszczających chorób neurodegeneracyjnych i najczęściej występującą spośród chorób neuronów motorycznych (Nichols i in. 2013). ALS jest chorobą wieloczynnikową o złożonym podłożu, a występujące zmiany dotyczą wielu układów i narządów. Podczas progresji choroby górne neurony ruchowe (neurony motoryczne w korze mózgowej) i dolne neurony ruchowe (neurony motoryczne w rdzeniu kręgowym) ulegają degeneracji i obumierają (Nichols i in. 2013). Na skutek obniżonej aktywności neuronów ruchowych dochodzi do progresywnej atrofii mięśni szkieletowych. Zmiany towarzyszące ALS objawiają się utratą napięcia mięśniowego, występowaniem niedowładów, postępującymi procesami zaniku mięśni oraz wzmożonym napięciem mięśniowym (Rowland 1998). Procesy atrofii dotyczą całego układu mięśniowego. Powoduje to, że chorzy na ALS tracą siły i nie są zdolni do poruszania kończynami. W terminalnym stadium choroby dochodzi do zaniku mięśni oddechowych, przez co chorzy nie są w stanie samodzielnie oddychać (Rowland 1998; Nichols i in. 2013). Rola mięśni szkieletowych w ALS nie została w pełni poznana. Do tej pory wykazano, że nadekspresja zmutowanego białka dysmutazy nadadtlenkowej 1 (SOD1G93A) zapoczątkowuje śmierć neuronów ruchowych i nasila proces atrofii mięśni szkieletowych. Ponadto degradacja neuronów motorycznych została powiązana ze stresem oksydacyjnym wywołanym rozpadem mitochondriów mięśniowych (Dobrowolny i in. 2008; Dupuis i in. 2009; Wong i Martin 2010). Udowodniono, że poziom stresu oksydacyjnego jest wyższy u zwierząt z ALS niż u zwierząt zdrowych (Halon i in. 2010; Flis i in. 2018; Halon-Gołabek i in. 2018).

W Europie ALS dotyka około 2,6 na 100 000 osób (Hardiman i in. 2017), a w Stanach Zjednoczonych 3,9 na 100 000 osób (Mehta i in. 2016). Większość przypadków choroby (90–95%) ma charakter sporadyczny (SALS), a pozostałe zachorowania (5–10%) są dziedziczne (FALS) (Kiernan i in. 2011). Średni wiek zachorowania na ALS to 58–63 lata w przypadku SALS i 47–52 lata w przypadku FALS (Logroscino i in. 2009). Mediana przeżycia po postawieniu diagnozy wynosi 3–5 lat, a około 10% pacjentów przeżywa 10 lat i więcej (Wijesekera i Leigh 2009). Do tej pory poznano ponad 40 genów, których zmutowane formy związane są z pojawieniem się objawów ALS (Mejzini i in. 2019). Interesujące jest to, że co piąty przypadek FALS wiąże się z mutacją w genie SOD1, który koduje enzym dysmutazę nadadtlenkową 1. Na bazie tej mutacji powstał jeden z najczęściej stosowanych eksperymentalnych modeli zwierzęcych ALS myszy (SOD1G93A), który uznawany jest za tzw. złoty standard w badaniach nad ALS. W fazie objawowej przejawia on większość cech choroby obserwowanych u ludzi, w tym dysfunkcję nerwowo-mięśniową (Naumenko i in. 2011). W modelu (SOD1G93A) występuje mutacja ludzkiej dysmutazy nadadtlenkowej 1, polegająca na zmianie aminokwasu glicyny na alaninę w pozycji 93. Myszy (SOD1G93A) (mysi model ludzkiej choroby ALS) mają skróconą długość życia w porównaniu z osobnikami typu dzikiego C57BL/6J (Gurney i in. 1994).

1.2. Postępowanie lecznicze w stwardnieniu zanikowym bocznym; rola treningu

Spośród leków stosowanych u pacjentów z ALS jedynie riluzol i edarawon wykazały umiarkowany wpływ na wydłużenie życia chorych (Chio i in. 2020). Z tego względu głównym celem terapii w ALS jest poprawa jakości życia i możliwości utrzymania sprawności pacjentów (Wijesekera i Leigh 2009).

Badania z zastosowaniem różnego rodzaju wysiłku fizycznego u chorych na ALS są w ostatnich latach tematem licznych prac. Bada się wpływ czterech typów programów treningowych opartych na: gibkości, sile, równowadze i wytrzymałości. Każdą z tych strategii stosuje się z wielką ostrożnością i jak dotąd – brakuje przekonujących dowodów na wydłużenie życia, opóźnienie pojawienia się pierwszych objawów choroby oraz obniżenie zmęczenia (Lopes de Almeida i in. 2012). Z uwagi na progresywny charakter choroby badania z udziałem osób chorych na ALS napotykać wiele przeszkód. Wyniki badań realizowanych u pacjentów z ALS, ze względu na swoją naturę i aplikacyjny charakter, nie są w stanie wyjaśnić komórkowych i molekularnych mechanizmów choroby. Większym potencjałem w tym zakresie charakteryzują się badania z wykorzystaniem zwierzęcych modeli ALS (Ziółkowski i in. 2020).

Badania realizowane na modelach zwierzęcych umożliwiają wielowymiarową ocenę wpływu programów treningowych bez jednoczesnego ryzyka narażenia pacjentów. Na skuteczność podejmowanych interwencji wpływają głównie ich intensywność i rodzaj (Ziółkowski i in. 2020). W jednej z pierwszych prac zbadano wpływ treningu biegowego o umiarkowanej intensywności w grupie transgenicznymy myszy (SOD1G93A). Wyniki wskazują, że regularne ćwiczenia o umiarkowanej intensywności nie miały szkodliwego wpływu na rozwój choroby, a co najważniejsze – wydłużyły życie osobników (Kirkinetzos i in. 2003). W kolejnym badaniu zastosowano zupełnie odmienne podejście. Mysiom (SOD1G93A) zaaplikowano wysiłek fizyczny o wysokiej intensywności. W efekcie u zwierząt objawy choroby pojawiły się wcześniej, ponadto zwierzęta żyły krócej niż grupa kontrolna (Mahoney i in. 2004). W roku 2004 u myszy z ALS zastosowano trening biegowy na kole obrotowym o dużej objętości i charakteryzujący się niską intensywnością. Trenowane zwierzęta nie różniły się w zakresie średniej długości życia od grupy kontrolnej. W badaniu udowodniono, że to nie rola objętości, a intensywności podjętych ćwiczeń jest przyczyną negatywnych zmian wpływających na przyspieszenie pojawienia się objawów choroby i skrócenie długości życia (Liebetanz i in. 2004). W kolejnym badaniu postanowiono sprawdzić, czy opisane we wcześniejszych pracach pozytywne efekty są wynikiem treningu o charakterze biegowym, czy wiążą się wyłącznie ze zmianami środowiska. Stwierdzono, że samo przekładanie myszy z klatki na unieruchomioną bieżnię wydłuża życie zwierząt z ALS (w porównaniu z długością życia grupy kontrolnej). Pokazuje to, że czynnikiem ochronnym może być sama zmiana środowiska bytowania zwierząt (Gerber i in. 2012).

1.3. Trening pływacki a stwardnienie zanikowe boczne

W praktycznym podejściu do procedur treningowych realizowanych z zastosowaniem modeli zwierzęcych ALS najistotniejsze okazało się przeprowadzenie treningu w środowisku wodnym (Deforges i in. 2009). Trening pływacki realizowany jest w odciążeniu i charakteryzuje go duża amplituda i częstotliwość ruchów kończyn tylnych (Beaumont i Gardiner 2002; Deforges i in. 2009). Zespół Federica Charbonniera pierwszy opublikował

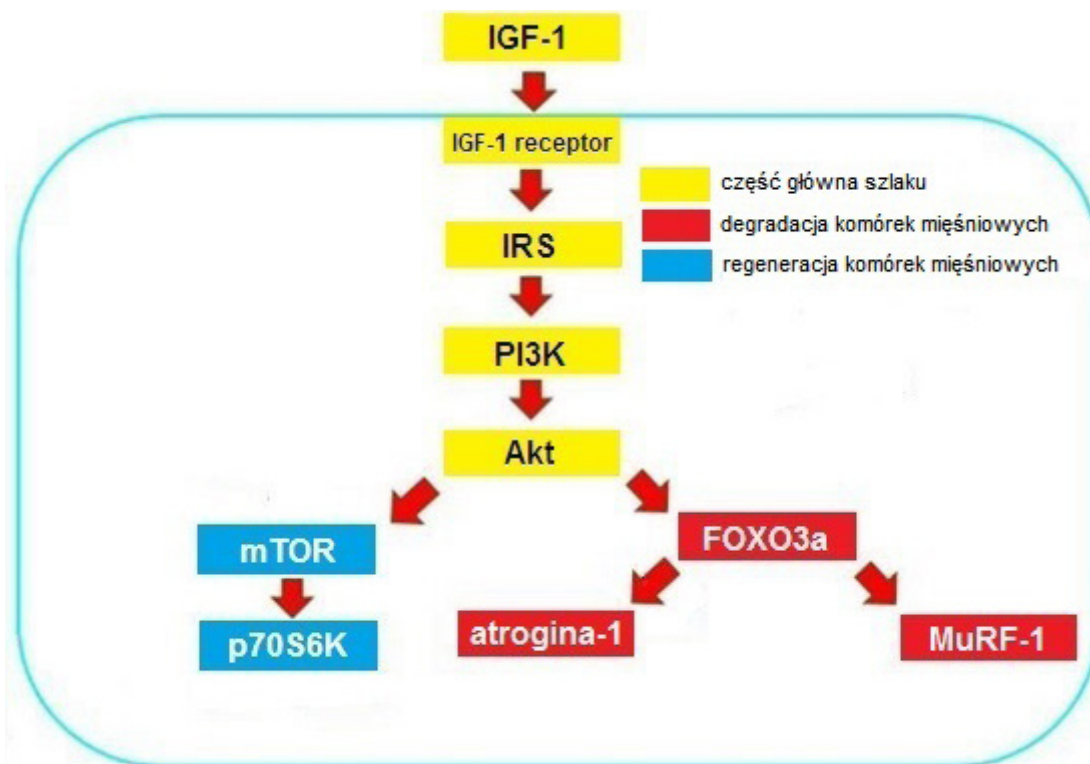
cykl prac, w których zastosowano to nowatorskie podejście. W 2008 roku zaprezentowano wyniki badań, w których porównano dwie metody treningu realizowanego na mysim modelu ALS: trening biegowy jako formę angażującą kończyny dolne z niską częstotliwością ruchów oraz trening pływacki charakteryzujący się wysoką częstotliwością ruchów. Autorzy wykazali, że trening pływacki angażuje większe ($>600 \mu\text{m}^2$) i szybsze jednostki motoryczne w porównaniu z treningiem biegowym, który działa ochronnie na mniejsze ($<300 \mu\text{m}^2$) i wolniejsze jednostki motoryczne (Grondard i in. 2008). Kolejna praca porównująca protokół treningu biegowego z pływackim ukazała się w roku 2009. Badanie dowiodło, że trening pływacki jest skuteczniejszy niż trening biegowy, ponieważ opóźnia pojawienie się pierwszych objawów choroby o 16 dni w porównaniu z grupą nietrenującą oraz wydłuża przeżycie myszy z ALS o 25 dni. Dodatkowo trening pływacki wpłynął na utrzymanie masy ciała osobników, podczas gdy w treningu biegowym nie zaobserwowano takich zmian (Deforges i in. 2009). Kolejna praca tego zespołu udowodniła, że trening pływacki u myszy z ALS wpływa na poprawę metabolizmu glukozy, zwiększa ekspresję białek transportujących lipidy w mięśniach szkieletowych oraz reguluje proces autofagii, zaburzony w ALS (Desseille i in. 2017). Ponadto badania zespołu, w które zaangażowany był autor niniejszej dysertacji, dowiodły, że trening pływacki poprawia funkcję mitochondriów (zmniejsza ilość mitochondrialnego cholesterolu z jednoczesnym wzrostem ilości białka kaweoliny-1), obniża wskaźniki wolnorodnikowego uszkodzenia makromolekuł oraz poprawia bioenergetykę mięśni szkieletowych (Flis i in. 2018, 2019).

1.4. Szlak sygnałowy Akt

Jednym ze szlaków sygnałowych regulujących masę mięśni i procesy związane z atrofią, hipertrofią i regeneracją jest szlak sygnałowy Akt (Schiaffino i Mammucari 2011). Zaburzona sygnalizacja szlaku w ALS wpływa na brak równowagi pomiędzy syntezą białek mięśniowych a proteolizą, co ostatecznie prowadzi do zaniku mięśni (Halon-Golabek i in. 2018; Scicchitano i in. 2018; Wang i in. 2019). Szlak sygnałowy Akt może mieć również wpływ na różnicowanie neuronów ruchowych, wydłużanie ich żywotności i promowanie biogenezy (Ojeda i in. 2011). Głównymi elementami tego szlaku są białka: IGF-1, Akt oraz mTOR (ryc. 1). IGF-1 odpowiada za aktywację komórek satelitarnych, które przyczyniają się do regeneracji mięśni. Oba procesy komórkowe – regeneracja i hipertrofia – odbywają się przy udziale komórek satelitarnych mięśni, które przechodzą odpowiednio procesy aktywacji, proliferacji i różnicowania (Philippou i in. 2007). Akt steruje zarówno syntezą białek za pośrednictwem mTOR, jak i degradacją białek mięśniowych poprzez czynniki transkrypcyjne z rodziny FoxO. Akt hamuje degradację białek poprzez fosforylację i tym samym tłumi czynniki transkrypcyjne z rodziny FoxO, a stymuluje syntezę kinazy mTOR (Peltier i in. 2007; King i in. 2015). Dwa niezależne badania wskazały, że pod wpływem choroby dochodzi do obniżenia poziomu Akt w mięśniach szkieletowych u ludzi oraz w modelu zwierzęcym (Leger i in. 2006; Halon-Golabek i in. 2018). Sygnalizacja Akt-FoxO odpowiada za atrofię mięśni. Czynniki FoxO są niezbędne do transkrypcyjnej regulacji atroginy-1 (MAFbx) oraz MuRF-1 (Sandri 2008). Wykazano, że myszy poddane treningowi biegowemu mają wyższy poziom FOXO3a w mięśniach szkieletowych w porównaniu z myszami nietrenowanymi (Slopack i in. 2014). W modelu szczurzym ludzkiej choroby ALS dochodzi do podwyższenia poziomu FOXO3a w stosunku do zdrowych osobników, podczas gdy w modelu mysim ilość FOXO3a jest niższa niż w grupie kontrolnej. W obu badaniach poziom atroginy-1 jest wyższy u zwierząt z ALS (Leger i in. 2006; Halon-Golabek i in. 2018). Akt może mieć wiele różnych efektorów, jednak z punktu widzenia regeneracji

komórki mięśniowej najistotniejszy wydaje się mTOR (Rafalski i Brunet 2010). W dostępnych badaniach przeprowadzonych na modelach mysich ALS poziom mTOR okazał się obniżony w rdzeniu kręgowym w stosunku do zwierząt zdrowych (Morimoto i in. 2007). Głównym efektem mTOR jest białko p70S6K. Udowodniono, że włókna mięśniowe miały mniejszą objętość u myszy zmodyfikowanych genetycznie, nieposiadających białka p70S6K. Jednocześnie zwierzęta te charakteryzowały się upośledzeniem procesu syntezy białek i nasiloną proteolizą (Sandri 2008). Trening biegowy na bieżni ruchomej nie zmienia ilości i aktywności p70S6K u szczurów z ALS (Gwąg i in. 2009).

Przeprowadzona analiza piśmiennictwa wykazała brak prac badawczych oceniających wpływ treningu pływackiego na przebieg szlaku sygnałowego Akt realizowanego na modelach zwierzęcych ALS. Był to przyczynek do powstania pierwszej publikacji, stanowiącej część niniejszej dysertacji doktorskiej.



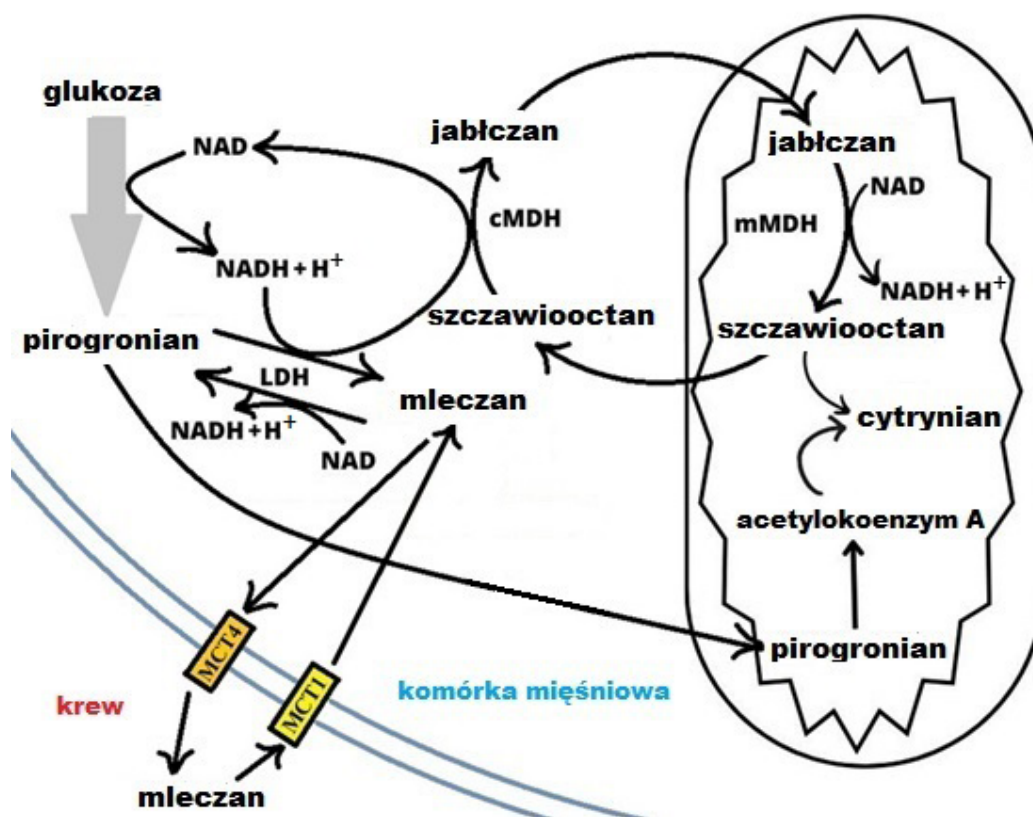
Rycina 1. Przebieg szlaku sygnałowego Akt z podziałem na funkcje poszczególnych białek w procesie syntezy i proteolizy białek mięśniowych (opracowanie własne)

1.5. Zmiany metaboliczne towarzyszące stwardnieniu zanikowemu bocznemu

U myszy z ALS obserwujemy zmniejszony metabolizm tlenowy i beztlenowy w mięśniach szkieletowych (Desseille i in. 2017; Flis i in. 2018, 2019). W świetle dostępnych wyników niezwykle cenna i warta rozważania wydaje się mleczanowa hipoteza ALS przedstawiona w 2012 roku. Autorzy pracy zaprezentowali nowy, molekularny model patogenezy ALS. Obejmuje on zależny od adenozyntrifosforanu (ATP) mięśniowo-neuronalny transport mlecza (MNLS), mający odpowiadać za regulację przepływu mlecza z mięśni do neuronów i odwrotnie. Dysfunkcja łańcucha oddechowego spowodowana chorobą ma upośledzać działanie MNLS, co powoduje akumulację toksycznej ilości mle-

czanu. Ta z kolei wpływa na degenerację zakończeń nerwowych w połączeniach nerwo-mięśniowych, prowadząc do odnerwienia mięśnia. Zdaniem badaczy, w krytycznym momencie choroby, w którym odnerwienie przewyższa powstawanie nowych połączeń nerwo-mięśniowych, unerwione włókna mięśniowe muszą pracować ciężiej, aby zrekomensować zmniejszenie ilości połączeń nerwo-mięśniowych. W wyniku tego wytwarzają one toksyczne stężenie mleczanu, napędzające dalsze odnerwienie i śmierć neuronów. Opisany mechanizm może wyjaśniać wykładniczą progresję ALS (Meethal i Atwood 2012). Mleczan może być również eksportowany poza komórkę mięśniową za pomocą transporterów monokarboksylowych (MCT) (Adijanto i Philp 2012). Mięśnie szkieletowe zawierają transportery MCT1 i MCT4 (Juel i Halestrap 1999). MCT1 jest obecny w wielu tkankach, natomiast MCT4 występuje głównie w mięśniach szkieletowych (Bonen 2001). MCT1 odpowiedzialny jest za import mleczanu z krwi do komórek mięśniowych, rolą MCT4 jest zaś eksportowanie mleczanu z komórek mięśniowych do krwi (ryc. 2). Hipotezę mleczanową wzmacniają badania pokazujące, że usunięcie transportera MCT4 u myszy nie zmieniło morfologii i kurczliwości mięśni szkieletowych, ale wywołało brak tolerancji na wysiłek fizyczny oraz degradację połączeń nerwo-mięśniowych (Bisetto i in. 2019). Jak dotąd, w piśmiennictwie światowym brakuje danych wyjaśniających, w jaki sposób trening pływacki u myszy z ALS wpływa na ekspresję tych transporterów i jakie może to mieć znaczenie fizjologiczne w aspekcie rozwoju choroby.

Mleczan (LA) jest uważany za produkt odpadowy glikolizy (Roy i Sherrington 1890). Redukcja pirogronianu do mleczanu z udziałem zredukowanego dinukleotydu nikotyno-amidoadeninowego (NADH) jest katalizowana przez dehydrogenazę mleczanową (LDH: pirogronian + NADH + H⁺ ↔ mleczan + NAD⁺). NADH pochodzący z glikolizy może alter-



Rycina 2. Metabolizm mleczanu we krwi i mięśniach szkieletowych z uwzględnieniem transporterów mleczanu oraz kluczowych reakcji metabolicznych i enzymów (opracowanie własne)

natywnie reagować ze szczawiooctanem (cytoplazmatyczna dehydrogenaza jabłczanowa, cMDH: $\text{szczawiooctan} + \text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{jabłczan} + \text{NAD}^+$) i pod postacią jabłczanu jony wodorowe transportowane są do mitochondriów przy udziale enzymów transportowych (układ przenoszący jabłczanowo-asparaginianowy) (Schantz i in. 1986) (ryc. 2). W tej sytuacji pirogronian nie zamienia się w mleczan, ale preferencyjnie przedostaje się do mitochondriów, gdzie jest utleniany do CO_2 i H_2O (Proia i in. 2016). Dodatkowo, mleczan w komórkach mięśni szkieletowych może przekształcić się w pirogronian i dalej utleniać się w mitochondriach. Konwersja mleczanu do pirogronianu jest również katalizowana przez dehydrogenazę mleczanową (LDH: $\text{LA} + \text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{pirogronian} + \text{NADH} + \text{H}^+$) (Brooks 2020). Warto zauważyć, że dinukleotydy nikotynoamidoadeninowe są substratami lub produktami reakcji katalizowanych przez dehydrogenazy, a także związkami krytycznymi w przebiegu ALS. Wzrost dostępności NAD^+ zwiększa umiarkowanie przeżywalność myszy (SOD1G93A), opóźnia degenerację neuronów ruchowych, zmniejsza poziom markerów stanu zapalnego w rdzeniu kręgowym oraz modyfikuje metabolizm mięśni (Harlan i in. 2020).

Ilość i dostępność dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w mięśniach szkieletowych zależy m.in. od szybkości ich przemiany w procesie glikolizy. Udowodniono, że tempo glikolizy jest obniżone w ALS, ale równocześnie zwiększa się pod wpływem treningu pływackiego u myszy z ALS (Flis i in. 2018). Do dzisiaj nie zweryfikowano natomiast, czy zmianom w aktywnościach enzymów metabolizmu energetycznego towarzyszą zmiany w stężeniu wspomnianych dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych.

2. CELE I HIPOTEZY

Celem pracy była próba określenia molekularnych mechanizmów związanych z ochronnym działaniem treningu pływackiego u myszy (SOD1G93A) w mysim modelu ludzkiej choroby ALS. Postanowiono sprawdzić, czy progresja choroby i trening pływacki wpływają na dwa procesy potencjalnie związane z atrofią mięśni szkieletowych: przebieg szlaku sygnałowego Akt oraz metabolizm mleczanu.

Postawiono następujące hipotezy badawcze:

1. U myszy z ALS sygnalizacja szlaku Akt jest zaburzona, a masa mięśniowa i masa ciała są obniżone.
2. Trening pływacki wpływa na przebieg szlaku sygnałowego Akt, ogranicza atrofię komórek mięśniowych oraz działa ochronnie, redukując spadki masy mięśniowej i masy ciała zwierząt chorych.
3. ALS moduluje metabolizm mleczanu, stężenie dinukleotydów nikotynoamidoadeniny (NAD⁺, NADH) oraz aktywność enzymów układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego w mięśniu szkieletowym myszy.
4. Trening pływacki odwraca zmiany w metabolizmie mleczanu w mięśniu piszczelowym przednim myszy chorych.

3. CYKL PUBLIKACJI

Przedłożona dysertacja doktorska to cykl prac pod wspólnym tytułem *Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego*. Na cykl składają się dwie publikacje naukowe:

1. Cieminski K., Flis D.J., Dzik K., Kaczor J.J., Czyrko E., Halon-Golabek M., Wieckowski M.R., Antosiewicz J., Ziolkowski W. (2021) Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 11: 20899. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00319-1>
punktacja MEiN: 140; IF: 4,996
2. Cieminski K., Flis D.J., Dzik K.P., Kaczor J.J., Wieckowski M.R., Antosiewicz J., Ziolkowski W. (2022) Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (19): 11504. <https://doi.org/10.3390/ijms231911504>
punktacja MEiN: 140; IF: 6,208

Łącznie punktacja MEiN: 280; IF: 11,204

4. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

4.1. Materiały i metody badawcze wykorzystane w publikacjach 1 i 2

Wszystkie procedury doświadczalne, które obejmowały minimalizację liczby zwierząt i ograniczenie ich cierpienia, uzyskały pozytywną opinię Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja nr 11/2013) oraz Ministerstwa Środowiska (decyzja nr 155/2012). Wszystkie procedury związane z realizacją badania zostały wykonane w zgodzie z europejskim prawem (European Communities Council Directive, dyrektywa nr 2010/63/UE). Badanie zostało przeprowadzone według wytycznych ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments).

Transgeniczne samce myszy B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J z mutacją SOD1G93A (mysi model ludzkiej choroby ALS) (n = 35) i samce myszy B6SJL typu dzikiego (WT) (n = 7) zakupiono z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Myszy bytowały w kontrolowanym środowisku (23°C ±1°C, z 12-godzinnym cyklem dzień–noc) ze stałym dostępem do karmy i wody. Po 14 dniach aklimatyzacji myszy przydzielono losowo do grup, uwzględniając postęp choroby oraz procedurę treningową: ALS BEFORE: nietrenowane myszy z ALS bez widocznych objawów choroby, ALS ONSET: nietrenowane i trenowane myszy z ALS z pierwszymi objawami choroby, ALS TERMINAL: nietrenowane i trenowane myszy z ALS w ostatnim stadium choroby, oraz grupa WT, stanowiąca grupę kontrolną dla zmodyfikowanych genetycznie zwierząt.

U myszy z ALS zastosowano test oceny klinicznej w celu oceny objawów i ustalenia stopnia zaawansowania choroby (Hamadeh i in. 2005). Wynik 0 oznaczał brak objawów choroby; 1 – drżenie kończyn tylnych lub rozchyłanie kończyn tylnych, gdy zwierzęta były trzymane za ogon (wykazanie osłabienia kończyn tylnych); 1,5 – osłabienie jednej kończyny tylnej (kompensacja jednej z kończyn); 2 – zmiana chodu; 2,5 – skrajne osłabienie jednej kończyny tylnej (niezdolność do zgięcia grzbietowego); 3 – skrajne osłabienie obu kończyn tylnych; 3,5 – paraliż czynnościowy w jednej kończynie tylnej; 4 – paraliż czynnościowy obu kończyn tylnych, z możliwością obrócenia się przez zwierzę w czasie krótszym niż 20 sekund po ułożeniu na boku; 5 – zwierzę nie może obrócić się w ciągu 20 sekund po ułożeniu na boku (punkt końcowy poprzedzający uśmiercenie).

Myszy uśmiercono w następujących punktach czasowych: grupy ALS BEFORE i WT w wieku 10 tygodni; grupy ALS ONSET w wieku 16 tygodni, gdy zaobserwowano pierwsze objawy choroby u nietrenowanych zwierząt (wynik testu oceny klinicznej: 1); grupy ALS TERMINAL, gdy zaobserwowano ostatni etap choroby u nietrenowanych zwierząt (wynik testu oceny klinicznej: 5) zgodnie z wcześniejszymi badaniami (Hamadeh i in. 2005; Flis i in. 2018).

4.1.1. Trening pływacki

Począwszy od 70. dnia życia, transgeniczne myszy (zwierzęta z grup ALS ONSET trenowane i ALS TERMINAL trenowane) rozpoczęły procedurę treningową zaproponowaną wcześniej przez zespół Federica Charbonniera (Deforges i in. 2009) z niewielką modyfikacją opisaną przez Flisa i współautorów (Flis i in. 2018). Trening pływacki przeprowadzono

w specjalnie przygotowanym basenie z regulowanym przepływem wody. Trening wykonywany był 5 razy w tygodniu przez 30 minut. Temperatura wody wynosiła 30°C, a maksymalna prędkość przepływu 5 l/min. Od 105. dnia życia wprowadzono zmodyfikowaną wersję protokołu (Deforges i in. 2009) i zmniejszono częstotliwość jednostek treningowych do 3 w tygodniu. Dodatkowo czas ćwiczeń i przepływ wody były dostosowane do indywidualnych możliwości myszy z ALS (Flis i in. 2018). Procedura treningowa odbywała się do 115. dnia życia. Zwierzęta uśmiercono poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Następnie pobrano próbki krwi i mięśnie piszczelowe przednie.

4.1.2. Pobranie krwi

Próbki krwi pobrano bezpośrednio z serca i zebrano do probówek zawierających kwas wersenowy (EDTA). Następnie odwirowano przy 2000 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Otrzymane osocze zebrano do probówek Eppendorf i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu przeprowadzenia dalszych analiz.

4.1.3. Homogenizacja tkanek i przygotowanie lizatów do pomiaru metodami western blotting, separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej oraz analizy proteomicznej

Po preparacji z próbek mięśni piszczelowych przednich wycięto widoczną tkankę łączną, zważono, zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia dalszych procedur. Następnie próbki homogenizowano przy użyciu zestawu Bio-Plex Pro™ Cell Signaling Reagent Kit (Bio Rad, nr kat. 171-304006M, Hercules, CA, USA). Tkanek umieszczono w probówce Eppendorf 1,5 ml i dodano 100 µl buforu do płukania. Po wypłukaniu i odsączeniu materiał został pocięty i przeniesiony do probówki Eppendorf 2 ml. Do materiału dodano bufor lizujący w celu uzyskania 10-procentowego lizatu i homogenizowano ręcznie 20 razy. Bufor lizujący z dodatkiem inhibitorów proteaz (Sigma P8340) i fosfataz (PhosSTOP™, PHOSS-RO Sigma Aldrich) został przygotowany zgodnie z instrukcjami producenta. Następnie każdy lizat zamrażano (-70°C) i rozmrażano (30°C) trzy razy, po czym ponownie homogenizowano (10 razy). Na koniec materiał odwirowano przy 15 000 × g przez 10 minut w temperaturze 4°C (wirówka Sigma 3K30). Otrzymany supernatant zdekantowano i zamrożono w -70°C, pozostawiając do dalszej analizy. Stężenie białka w lizacie oznaczono metodą Bradforda (Bradford 1976).

4.1.4. Western blotting

Równe ilości lizatów (50 µg białka na próbkę) rozdzielono na gradientowych żelach poliakrylamidowych (SDS, 4–20%) i przeniesiono na membranę polifluorku winylidenu (PVDF). Po transferze membrany zablokowano w 5-procentowym odtłuszczonym mleku, rozpuszczonym w 1 × TBST przez 60 minut w temperaturze pokojowej (publikacja 1) lub w buforze blokującym EveryBlot (nr kat. 12010020, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) przez 15 minut w temperaturze pokojowej (publikacja 2). Następnie membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4°C z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Zastosowano następujące przeciwciała: Rabbit monoclonal anty-p-FOXO3a (Ser253) (nr kat. ab154786, 1 : 1000; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania), Rabbit polyclonal anty-p-Akt 1/2/3 (Ser473)

(nr kat. sc-7985R, 1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Rabbit polyclonal anty-Akt 1/2/3 (nr kat. sc-8312, 1 : 600; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Rabbit polyclonal anty-FOXO3a (nr kat. ab23683, 1 : 1000; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania), Rabbit polyclonal anty-mTOR (nr kat. 2972, 1 : 1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA), Mouse monoclonal anty-MAFbx/Atrogin-1 (nr kat. sc166806, 1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Mouse monoclonal anty-MuRF-1 (nr kat. sc398608, 1 : 500; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) (publikacja 1) oraz Rabbit polyclonal Anti-MCT1/Monocarboxylic acid transporter 1 (nr kat. ab93048, 1 : 1000; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania), Rabbit polyclonal anty-SLC16A3/MCT 4 (nr kat. Ab74109-100, 1 : 1000; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) (publikacja 2). Po nocnej inkubacji membrany płukano (3×10 minut) w $1 \times$ TBST i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi: anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (nr kat. A9169, 1 : 25 000; Sigma Aldrich) lub anti-mouse IgG-peroxidase conjugate (nr kat. A9044, 1 : 25 000; Sigma Aldrich). Następnie prążki otrzymane na membranie zwizualizowano przy użyciu wzmacnionego odczynnika do chemiluminescencji (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Zmiany w poziomach białek oceniano metodą densytometrii pasm immunoreaktywnych i znormalizowano do całkowitej ilości białka w próbkach przeniesionych na membranę, wykrytych przy użyciu technologii *stain-free*. Względne poziomy białek przeanalizowano i oszacowano ilościowo przy użyciu systemu analizy obrazu Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Wyniki uzyskane w grupach ALS zostały następnie znormalizowane do grupy WT. Analizę western blotting przeprowadzono dla pięciu (publikacja 1) i trzech (publikacja 2) losowo wybranych zwierząt z każdej grupy.

4.1.5. Analiza proteomiczna

Za pomocą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS/MS) wykonanej w Thermo Fisher Center for Multiplexed Proteomics (Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Cambridge, MA, USA) oceniono poziom wybranych białek szlaku sygnałowego Akt: IGF-1, Akt, FOXO3a, atroginy-1, MuRF-1, mTOR, p70S6K (publikacja 1), białek związanych z procesem glikolizy: HXK1, HXK2, G6PI, K6PF, ALDOA, TPIS, GAPDH, PGK1, PGAM, ENOA, ENOB, B0QZL1, KP YM, KP YM1, E9Q509 i LDH, oraz czterech enzymów układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego (cASPAT, mASPAT, cMDH, mMDH) (publikacja 2). Próbki przygotowano zgodnie z wcześniejszym opisem (Weekes i in. 2014). Frakcje peptydowe analizowano przy użyciu strategii zbierania danych LC-MS3 spektrometrem masowym Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.2. Metody badawcze wykorzystane w publikacji 1

4.2.1. Pomiar masy ciała i masy mięśnia piszczelowego przedniego (TA)

Masę ciała oceniano raz w tygodniu. Mięśnie TA wycięto i zważono w celu określenia poziomu atrofii. Dane przedstawiono jako miligram mięśnia na gram masy ciała zwierzęcia (mg/g) (Derave i in. 2003; Halon i in. 2010).

4.2.2. Pomiar aktywności kinazy kreatynowej (CK)

Aktywność CK mierzono w próbkach osocza w temperaturze 37°C, stosując test RANDOX CK-NAC (nr kat. CK522, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) zgodnie z instrukcjami producenta. Aktywność CK została wyrażona jako U/l.

4.2.3. Metoda separacji magnetycznej i cytometrii przepływowej

Z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex Multiplex System (Bio Rad, nr kat. 171-V50033M, Hercules, CA, USA) przeprowadzono pomiar ilościowy białek IGF-1, p70S6K i p-p70S6K. Do analizy użyto równe ilości lizatów (10 µg białka). Procedura analizy została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami producenta. Dane gromadzono i przetwarzano przy użyciu oprogramowania Bio-Plex Manager (Bio-Rad). Wyniki znormalizowano do ilości aktywności w próbkach. Analizę przeprowadzono dla pięciu losowo wybranych zwierząt z każdej grupy.

4.3. Metody badawcze wykorzystane w publikacji 2

4.3.1. Pomiar mleczanu we krwi

Stężenie mleczanu mierzono fluorymetrycznie (GloMax-Multi+, Promega Corp.; Madison, USA) w temperaturze 25°C (Maughan 1982). 5 µl osocza i 5 µl standardu (mleczan litu w stężeniu 0–10 mmol/l) inkubowano 30 minut z 250 µl mieszaniny zawierającej: bufor hydrazynowy (1,1 M hydrazyny, pH 9,0: 1,3 g siarczanu hydrazyny, 5,0 g wodzianu hydrazyny, 0,2 g Na₂EDTA, woda destylowana do 100 ml), 1 U/ml LDH i 5 mmol/l NAD⁺. Po inkubacji zmierzono fluorescencję przy Ex = 365 nm, Em = 410–460 nm. Stężenie mleczanu zostało wyrażone jako mmol/l.

4.3.2. Pomiar mleczanu w mięśniu piszczelowym przednim (TA)

Stężenie mleczanu mierzono fluorymetrycznie (GloMax-Multi+, Promega Corp.; Madison, USA) w temperaturze 25°C (Maughan 1982). 10 µl lizatu lub standardu (mleczan litu w stężeniu 0–10 mmol/l) inkubowano przez 30 minut z 250 µl mieszaniny zawierającej: bufor hydrazynowy (1,1 M hydrazyny, pH 9,0: 1,3 g siarczanu hydrazyny, 5,0 g wodzianu hydrazyny, 0,2 g Na₂EDTA, woda destylowana do 100 ml), 1 U/ml LDH i 5 mmol/l NAD⁺. Po inkubacji zmierzono fluorescencję przy Ex = 365 nm, Em = 410–460 nm. Stężenie mleczanu zostało wyrażone jako mmol/kg mokrej masy mięśnia szkieletowego.

4.3.3. Homogenizacja tkanek i przygotowanie lizatów do pomiaru ilościowego dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NAD⁺, NADH) i mleczanu

Wszystkie procedury zostały wykonane zgodnie z instrukcją NAD/NADH Assay Kit (Abcam, ab176723) przy użyciu odczynników dostarczonych przez producenta. Tkanekę (20 mg mięśnia TA) przepłukano w zimnym PBS i homogenizowano w 400 µl buforu do lizy. Następnie homogenaty odwirowano z prędkością 2500 RPM przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Otrzymane lizaty użyto do pomiaru NAD⁺, NADH oraz LA.

4.3.4. Pomiar ilości dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych

Pomiar ilościowy sumy NAD⁺ i NADH oraz NAD⁺ wykonano zgodnie z zestawem testów NAD⁺/NADH (Abcam, ab176723). 25 µl tkanki, próby kontrolnej lub standardu dodano do 25 µl roztworu kontrolnego lub roztworu do ekstrakcji NAD⁺. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze 37°C dodano kolejne 25 µl roztworu kontrolnego lub roztwór do ekstrakcji NADH (w celu zneutralizowania ekstraktów NAD⁺). Następnie nałożono po 75 µl mieszaniny reakcyjnej do każdego dołka. Po inkubacji (30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu do światła) zmierzono fluorescencję przy Ex = 525 nm, Em = 580–640 nm z wykorzystaniem GloMax-Multi+ (Promega Corp.; Madison, USA). Ilość NADH obliczono według wzoru: (suma NAD⁺ i NADH) – NAD⁺. Stężenie NAD⁺, NADH oraz sumy NAD⁺ i NADH wyrażono w µM.

4.3.5. Homogenizacja i przygotowanie tkanek do pomiaru aktywności enzymów

Po rozmrożeniu tkanki zważono i dodano do schłodzonego buforu do homogenizacji (skład: 50 mmol KPi, 1 mmol EDTA, 0,5 mmol DTT, 1,15% KCl, pH 7,4, z dodatkiem koktajlu inhibitorów proteaz). Tkanekę homogenizowano w ręcznym homogenizatorze szklanym 30 razy. Po uzyskaniu 5-procentowego homogenatu zamrożono go i przechowywano w temperaturze –80°C do czasu dalszej analizy.

4.3.6. Pomiar aktywności enzymów

Wszystkie aktywności enzymów zmierzono spektrofotometrycznie (Cecil CE9200, Cecil Instruments Ltd., Cambridge, UK) w homogenatach mięśnia piszczelowego przedniego.

4.3.7. Pomiar dehydrogenazy jabłczanowej (MDH)

Aktywność MDH zmierzono w temperaturze 30°C (Schantz i in. 1986). 10 µl homogenatu (1 : 10, 5%) inkubowano przez 2 minuty w 970 µl buforu (50 mmol Tris-HCl, 5 mmol EDTA, pH 7,6) i uzupełniono 10 µl NADH (20 mmol). Następnie dodano 10 µl szczawiooctanu (20 mmol) w celu zainicjowania reakcji. Pomiaru były przeprowadzane podwójnie i odczytane przy absorbancji 340 nm. Aktywność izoenzymu mitochondrialnej MDH (mMDH) oceniano po 2 minutach wstępnej inkubacji 20 µl homogenatu (1 : 10, 5%) z 98-procentowym etanolem (1 : 1 objętości). Izoenzym cytozolowej MDH (cMDH) obliczono jako różnicę pomiędzy aktywnościami MDH i mMDH. Aktywności enzymów wyrażono w nmol/min/mg białka.

4.3.8. Pomiar dehydrogenazy mleczanowej (LDH)

Aktywność LDH mierzono w temperaturze 30°C (Léger i Taylor 1982). Dwa stężenia pirogronianu (PYR) wykorzystano do określenia maksymalnej aktywności charakterystycznych podjednostek dehydrogenazy mleczanowej: M4 (LDH 2,1) z 2,1 mmol PYR i H4 (LDH 0,3) z 0,3 mmol PYR. Po 2 minutach wstępnej inkubacji 10 µl homogenatu (1 : 10, 5%)

z buforem (970 μ l 50 mmol KPi, 1 mmol EDTA, pH 7,4) dodano NADH i PYR w celu rozpoczęcia reakcji. Końcowa objętość w kuwecie wynosiła 1000 μ l. Spadek absorbancji mierzono przy długości fali 340 nm przez 2 minuty. Aktywności enzymatyczną wyrażono w μ mol/minutę/mg białka.

4.4. Analiza statystyczna

W obu pracach analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica v. 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Wyniki zostały wyrażone jako średnia \pm błąd standardowy średniej. W celu określenia testu statystycznego przetestowano normalność rozkładów i równość wariancji. Różnice związane z progresją choroby oraz między grupami ALS i WT analizowano za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) lub testu Kruskala–Wallisa. W przypadku wykrycia różnic w tych modelach testowych poziom istotności określano za pomocą testu *post hoc* Tukeya. W celu określenia istotności zmian wywołanych treningiem pływackim (ALS ONSET nietrenowane wobec trenowane i ALS TERMINAL nietrenowane wobec trenowane) zastosowano test t-Studenta lub test U Manna–Whitneya. Wyniki uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$. Do analizy proteomicznej głównych składowych (PCA) wykorzystano oprogramowanie R Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria).

5. WYNIKI

5.1. Publikacja 1

Stwardnienie zanikowe boczne spowodowało utratę masy mięśniowej (TA) we wszystkich grupach niepoddanych procedurze treningowej względem grupy kontrolnej. Trening pływacki ograniczył redukcję masy mięśniowej w grupach trenowanych. Oprócz obniżenia masy mięśniowej choroba wpłynęła na masę ciała myszy. Masa ciała zwierząt w grupie przed pojawieniem się objawów choroby, grupie nietrenowanej z pierwszymi objawami choroby oraz grupie terminalnej niepoddanej treningowi była niższa niż w grupie kontrolnej. Trening pływacki ograniczył obniżenie masy ciała w terminalnym stadium choroby. Aby oszacować poziom atrofii mięśni, obliczono stosunek masy mięśnia TA do masy ciała zwierząt. Względem grupy kontrolnej stosunek masy mięśniowej do masy ciała był niższy w grupach nietrenowanej i trenowanej z pierwszymi objawami choroby oraz u zwierząt nietrenowanych w końcowym stadium choroby. W terminalnym stadium choroby stosunek ten był wyższy w grupie trenowanej niż nietrenowanej. Przyczyn tych zmian szukano w regulacji szlaku sygnałowego Akt.

Pierwszym z analizowanych białek szlaku sygnałowego Akt było IGF-1. Jego poziom był wyższy w grupie ALS terminalnej nietrenowanej względem zwierząt zdrowych oraz zwierząt chorych niewykazujących objawów choroby. Nie stwierdzono znaczących zmian w ilości i aktywności Akt oraz stosunku p-Akt/Akt pod wpływem progresji choroby i zastosowania treningu pływackiego. Kluczowe okazało się określenie poziomu białek szlaku sygnałowego Akt odpowiedzialnych za proteolizę białek mięśniowych. Poziom FOXO3a był wyższy w grupie ALS przed pojawieniem się objawów choroby, w obu grupach z pierwszymi objawami oraz w grupie terminalnej nietrenowanej w porównaniu z grupą kontrolną. W końcowym stadium choroby trening pływacki przyczynił się do obniżenia poziomu FOXO3a. Nie stwierdzono różnic między grupami w odniesieniu do nieaktywnej formy FOXO3a (p-FOXO3a) i stosunku FOXO3a/p-FOXO3a. Poziom MuRF-1 w grupie nietrenowanej z pierwszymi objawami choroby był wyższy niż w grupie kontrolnej i grupie niewykazującej objawów choroby. W końcowym stadium choroby w grupie nietrenowanej poziom MuRF-1 był zwiększony w porównaniu z grupą nietrenowaną z pierwszymi objawami choroby. Trening pływacki spowodował obniżenie poziomu MuRF-1 na etapie pierwszych objawów choroby i w stadium końcowym choroby. Nie zaobserwowano natomiast zmian w ilości atrogin-1 we wszystkich analizowanych grupach. Nie odnotowano również zmian w poziomie kinazy mTOR w żadnej z analizowanych grup. Progresja choroby i trening pływacki nie miały wpływu na poziom p70S6K.

5.2. Publikacja 2

Poza opisanym wyżej szlakiem sygnałowym Akt również metabolizm mleczanu może odgrywać istotną rolę w rozwoju ALS. W związku z tym w kolejnej pracy określono, w jaki sposób progresja choroby i trening pływacki wpływają na stężenie mleczanu we krwi i mięśniach szkieletowych oraz na białka i koenzymy związane z tym metabolizmem.

Stężenie mleczanu we krwi było niższe w grupie terminalnej nietrenowanej niż w grupie kontrolnej oraz w grupie nietrenowanej z pierwszymi objawami choroby. Zaobser-

wowano podwyższenie stężenia mleczanu we krwi pod wpływem treningu pływackiego w końcowym stadium choroby. Stężenie mleczanu w mięśniu TA było wyższe w grupie terminalnej nietrenowanej niż w grupie kontrolnej. Co więcej, odnotowano niższe stężenie mleczanu po treningu pływackim w końcowym stadium choroby w porównaniu z grupą nietrenowaną.

Na kolejnym etapie badania, w związku z obserwowanymi zmianami w ilościach mleczanu, określono ilość transporterów mleczanu MCT1 i MCT4. Zmniejszone ilości MCT1 (różnice bez istotności statystycznej), importującego mleczan z krwi do komórek mięśniowych, zaobserwowano na etapie pierwszych objawów choroby i w fazie końcowej. Nie odnotowano zmian w ilości białka MCT4 eksportującego mleczan z komórek mięśniowych do krwi. Nieznaczne zmiany nie pozwoliły wyjaśnić, dlaczego ilość mleczanu we krwi i mięśniu zmienia się wraz z progresją choroby i pod wpływem zastosowanego treningu pływackiego.

Sprawdzono zatem, czy zmianom w stężeniach mleczanu we krwi i mięśniach szkieletowych towarzyszą zmiany w aktywności dehydrogenazy mleczanowej, głównego enzymu glikolizy. Aktywność LDH 2,1, charakterystycznej dla podjednostki M (mięśniowej), była niższa w grupach nietrenowanej i trenowanej z pierwszymi objawami choroby oraz w obu grupach zwierząt w stadium terminalnym w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatkowo aktywność LDH 2,1 była niższa w nietrenowanej grupie terminalnej niż w grupie nietrenowanej przed pojawieniem się objawów choroby. Podobne wyniki uzyskano w przypadku LDH 0,3, charakterystycznej dla podjednostki H (sercowej), której aktywność była niższa w grupach ALS nietrenowanej i trenowanej z pierwszymi objawami choroby oraz w grupie terminalnej nietrenowanej względem zwierząt zdrowych. Na podstawie wyników LDH 2,1 i LDH 0,3, według metody opisanej przez Luca A. Légera i Alberta W. Taylora, obliczono aktywności podjednostek LDH M (mięśniowej) i H (sercowej), całkowitą aktywność LDH oraz stosunek podjednostki H do M (Léger i Taylor 1982). Całkowita aktywność LDH była niższa w obu grupach (nietrenowanej i trenowanej) z pierwszymi objawami choroby oraz w grupach będących w stadium terminalnym choroby w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto aktywność LDH była niższa w grupie nietrenowanej terminalnej niż w grupie niewykazującej objawów choroby. Aktywność podjednostki LDH M była niższa u zwierząt nietrenowanych i trenowanych z grup w końcowym stadium choroby w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono znaczących zmian w aktywności podjednostki LDH H oraz w stosunku aktywności podjednostki H do M, uwzględniając progresję choroby i trening pływacki.

Kolejnym krokiem było zbadanie, czy zmiany w aktywności dehydrogenazy mleczanowej były związane ze stężeniem dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (NAD^+ i NADH) oraz aktywnością enzymów układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego w mięśniach szkieletowych. Całkowite stężenie NADH i NAD^+ było niższe w grupach nietrenujących z pierwszymi objawami choroby i w stadium terminalnym w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano trend polegający na zwiększeniu stężenia dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w grupach poddanych treningowi pływackiemu. Stężenia NAD^+ w mięśniu piszczelowym przednim było niższe w grupie nietrenowanej z pierwszymi objawami choroby oraz w obu grupach (nietrenowanej i trenowanej) terminalnych w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi. Stężenie NADH było niższe w grupach zwierząt ALS nietrenowanych z pierwszymi objawami choroby i w stadium terminalnym niż w grupie kontrolnej. Trening pływacki nie zwiększył stężenia NADH w badanych grupach. Nie odnotowano również zmian w stosunku NAD^+/NADH w żadnej z analizowanych grup.

Następnie sprawdzono, czy zmiany w stężeniu NAD^+ spowodowane progresją choroby były związane z aktywnością dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) jako ścieżki alterna-

tywnej dla reakcji katalizowanej przez LDH. Nie stwierdzono różnic w aktywności MDH i mMDH w analizowanych grupach. Trening pływacki zwiększył natomiast aktywność cMDH w stadium terminalnym choroby.

Aby sprawdzić zależność pomiędzy cMDH a LDH 2,1, obliczono stosunek aktywności obu tych enzymów. Był on wyższy w obu grupach ALS z pierwszymi objawami choroby i w grupie trenowanej w końcowym stadium choroby względem grupy kontrolnej. Trening pływacki w stadium terminalnym choroby spowodował zwiększenie stosunku cMDH do LDH 2,1 co oznacza przewagę aktywności enzymu układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego – cMDH nad LDH 2,1.

6. DYSKUSJA

IGF-1 jest wytwarzany przez wiele tkanek, w tym przez mięśnie szkieletowe (Schiaffino i Mammucari 2011). Kontroluje on hipertrofię komórek mięśniowych i regenerację oraz hamuje proteolizę (Musaro i in. 2001). W badaniu stwierdzono, że wraz z rozwojem ALS zwiększa się ilość IGF-1 w mięśniach szkieletowych. Można przypuszczać, że jest to mechanizm obronny mięśni przed atrofią. W związku z tym oceniono wpływ progresji ALS i treningu pływackiego na całkowitą (Akt) i aktywną (p-Akt) formę Akt w mięśniach szkieletowych. W przeciwieństwie do rosnącej ilości IGF-1 stosunek p-Akt/Akt nie zmienił się podczas choroby. Transgeniczne myszy z nadekspresją Akt charakteryzują się przerostem mięśni szkieletowych i lepiej radzą sobie z atrofią wywołaną odnerwieniem (Lai i in. 2004; Izumiya i in. 2008). Potwierdza to, że Akt nasila hipertrofię mięśni i jednocześnie blokuje proteolizę białek mięśniowych (Lai i in. 2004; Sartori i in. 2009). Biorąc pod uwagę poprzednie badania realizowane na szczurzym modelu ALS (Halon-Golabek i in. 2018) oraz inne doniesienia (Leger i in. 2006), uzyskane rezultaty potwierdzają dezaktywację Akt podczas progresji ALS. Możliwym wyjaśnieniem powyższego zjawiska jest hamowanie zależnej od IGF-1 sygnalizacji przez fosfatazę i homolog tensyny (PTEN). Ponadto stres oksydacyjny prowadzi do aktywacji PTEN, tłumiąc w konsekwencji sygnalizację IGF-1 w kierunku Akt (Lai i in. 2004). W związku z tym zaangażowanie PTEN w ALS wydaje się prawdopodobne. Wymaga to jednak dalszego potwierdzenia. Trening pływakki zwiększa całkowitą ilość Akt w mięśniu piszczelowym przednim u zwierząt z pierwszymi objawami choroby i w stadium terminalnym. Zmiany te można uznać za zjawisko ochronne.

Część szlaku sygnałowego Akt: FOXO3a/atrogina-1/MuRF-1 bierze udział w indukcji proteolizy białek mięśniowych i uczestniczy w procesie atrofii mięśni (Dobrovolsky i in. 2008; Sanchez i in. 2014). Atrogina-1 może kontrolować zarówno procesy związane z rozpadem białek, jak i syntezą, jednak tylko MuRF-1 uczestniczy w rozpadzie białek miofibrylarnych. Zmiany w ekspresji FOXO3a i MuRF-1 u zwierząt poddanych treningowi pływackiemu można wyjaśnić zmniejszonym stresem oksydacyjnym u zwierząt trenowanych (Flis i in. 2018). Coraz więcej dowodów wskazuje, że zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu w mięśniach szkieletowych znacząco indukuje dysfunkcję mitochondriów, aktywuje FOXO3a i przyczynia się do atrofii mięśni (Qiu i in. 2018). W prezentowanym badaniu analiza proteomiczna białek FOXO3a, atroginy-1 i MuRF-1 wykazała znaczną zmianę w grupie trenowanej w stadium terminalnym choroby względem grupy nietrenowanej, przybliżając ją w kierunku grupy przed pojawieniem się objawów choroby. Potwierdza to skuteczność treningu pływackiego jako środka ograniczającego atrofię. Zgodnie z przewidywaniami, poziom FOXO3a i p-FOXO3a oraz stosunek FOXO3a/p-FOXO3a były wyższe w grupach ALS na wszystkich etapach choroby w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi. Trening pływacki obniżył poziom FOXO3a w grupie trenowanej w stadium terminalnym choroby, nie wpłynął natomiast na p-FOXO3a. Towarzyszyło temu zmniejszenie ilości MuRF-1 w grupach poddanych treningowi pływackiemu w chwili pojawienia się pierwszych objawów choroby i w fazie końcowej choroby względem grup nietrenowanych. Co ciekawe, w przeciwieństwie do wcześniej opublikowanych wyników badań realizowanych na modelu mysim i szczurzym ALS (Leger i in. 2006; Halon-Golabek i in. 2018) nie zaobserwowano zmian w poziomie atroginy-1 u myszy z ALS.

Oprócz FOXO3a efektem Akt jest również mTOR, która wraz z p70S6K odpowiada za syntezę białek mięśniowych (Nave i in. 1999). Nie odnotowano zmian w poziomie mTOR oraz p70S6K w mięśniu piszczelowym przednim pomiędzy badanymi grupami. Podobne wyniki uzyskano, badając ekspresję kinazy mTOR w komórkach neuronów korowych myszy z ALS (Morimoto i in. 2007). Na podstawie analizy piśmiennictwa należy stwierdzić, że jest to pierwsze badanie oceniające poziom mTOR w mięśniach szkieletowych u myszy z ALS. Trening pływacki spowodował spadek poziomu p-p70S6K w grupie z pierwszymi objawami choroby. W związku z tym efekt treningu pływackiego w tej części szlaku sygnałowego Akt jest trudny do określenia. W pracy badającej aktywności p70S6K w komórkach rdzenia kręgowego u pacjentów z ALS poziom p70S6K był wyższy niż w grupie kontrolnej (Wagey i in. 1998). W innym badaniu analiza biopsji mięśni szkieletowych u chorych na ALS i w grupie kontrolnej nie wykazała różnic w ekspresji p70S6K na poziomie mRNA, chociaż aktywność Akt była niższa u osób chorych na ALS (Leger i in. 2006). Brak zmian w ilości p70S6K może wynikać ze zmniejszonej aktywacji Akt w mięśniach szkieletowych myszy z ALS.

Powyższe obserwacje wskazują, że ochronny efekt treningu pływackiego opiera się na hamowaniu sygnalizacji FOXO3a/MuRF-1, a nie na indukcji białek mTOR/p70S6K. Potwierdza to pogląd, że zaburzenie równowagi między syntezą białek a ich katabolizmem prowadzi do zaniku mięśni szkieletowych (Halon-Golabek i in. 2018; Scicchitano i in. 2018).

ALS powoduje postępujący zanik mięśni, ostatecznie prowadzący do śmierci (Verber i Shaw 2020). W związku z tym w prezentowanych tu badaniach myszy (SOD1G93A) charakteryzowały się progresywną utratą masy mięśniowej, której towarzyszyła utrata masy ciała. To potwierdzone już wcześniej obserwacje (Derave i in. 2003; Halon i in. 2010). Trening pływacki wpływa na zmniejszenie utraty masy ciała i masy mięśniowej u zwierząt z ALS. Zmianom tym towarzyszy zwiększenie długości życia, redukcja stresu oksydacyjnego oraz poprawa bioenergetyki i siły mięśni (Flis i in. 2018, 2019). Ponadto aby ustalić, czy utracie masy ciała i masy mięśniowej towarzyszy rozpad sarkolemy i uszkodzenie komórek mięśniowych, w badaniu określono aktywność kinazy kreatynowej w osoczu. Zmiany w poziomie kinazy kreatynowej są zależne od uszkodzenia komórek mięśni szkieletowych i mają związek z przerostem pozostałych włókien mięśniowych jako rezultatem postępującej miopatii wtórnej (Schwartz i in. 1976). Aktywność kinazy kreatynowej nie zmieniła się wraz z rozwojem choroby. Trening pływacki spowodował nieznaczny spadek aktywności kinazy kreatynowej u myszy z ALS. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie. Co ciekawe, wartości kinazy kreatynowej w osoczu są znacznie podwyższone u większości chorych na ALS, jednak nie u wszystkich. Na przykład w jednym z badań aktywność kinazy kreatynowej była podwyższona u 43% pacjentów. U 93% pacjentów z podwyższonym poziomem kinazy kreatynowej obserwowano osłabienie mięśni kręgosłupa jako główny objaw choroby (Harrington i in. 1983). Istnieją również dowody na zwiększoną aktywność kinazy kreatynowej mierzonej w osoczu we wczesnym stadium SALS (Ito i in. 2019). Zmiany aktywności kinazy kreatynowej we krwi u pacjentów z ALS zostały niedawno przedstawione z nowej perspektywy, z wyższym poziomem kinazy kreatynowej zgłaszanym dla przypadków ALS z wolno postępującą chorobą w porównaniu z szybko postępującą chorobą. W badaniu zasugerowano również, że myszy z wolno postępującą chorobą charakteryzowały się większą masą ciała, przez co mogły zwalczać chorobę przez dłuższy czas niż zwierzęta z odmianą szybko postępującą (Ceccanti i in. 2020).

ALS towarzyszy znaczna utrata masy mięśniowej związana z aktywacją i zwiększoną syntezą białek odpowiedzialnych za proteolizę białek mięśniowych (FOXO3a/MuRF-1). Towarzyszą temu zmiany polegające na pogorszeniu funkcji kończyn, które objawiają się m.in. zmniejszoną siłą mięśniową (Flis i in. 2019). Dokładna przyczyna tych zjawisk nie

jest znana, jednak w 2012 roku postawiono tezę, że może być to związane z upośledzeniem metabolizmu mleczanu. Autorzy zasugerowali, że zaburzenie zależnego od ATP mięśniowo-neuronalnego transportu mleczanu (MNLS) regulującego przepływ mleczanu z mięśni do neuronów i odwrotnie może być krytycznym czynnikiem w patogenezie ALS (Meethal i Atwood 2012). W przeprowadzonym badaniu zaobserwowano obniżenie stężenia mleczanu we krwi w wyniku choroby, z jednoczesnym zwiększeniem jego stężenia w mięśniach szkieletowych. Opisane zjawisko może być spowodowane zakłóceniami w transporcie mleczanu przez sarkolemmę. Trening pływacki obniżył akumulację mleczanu w mięśniach szkieletowych z jednoczesnym zwiększeniem jego ilości we krwi w terminalnym stadium choroby. Wykazano wcześniej, że trening pływacki zwiększa stężenie mleczanu we krwi u myszy z ALS w porównaniu ze zwierzętami nietrenowanymi (Desseille i in. 2017), jednak wpływ treningu na jego metabolizm w mięśniach szkieletowych myszy z ALS nie był dotychczas badany.

Transportery MCT1 i MCT4 obecne w mięśniach szkieletowych są odpowiedzialne za transport mleczanu z krwi do komórek mięśniowych i odwrotnie. Wychwytywanie mleczanu z krwi jest silnie skorelowane z zawartością MCT1 w mięśniach szkieletowych (Bonen 2001). Zmniejszone ilości MCT1 zaobserwowano na etapie pierwszych objawów choroby i w fazie końcowej w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi. Udokumentowano wcześniej, że ekspresja MCT1 jest silnie skorelowana z metabolizmem oksydacyjnym (Pilegaard i in. 1999; Bonen 2001). Poziom MCT1 wzrasta również w wyniku treningu lub stymulacji elektrycznej mięśni kończyn tylnych szczura (McDermott i Bonen 1993; Pilegaard i in. 1993; Bonen 2001), a zmniejsza się w wyniku odnerwienia mięśni (McCullagh i in. 1997). Pośrednio wiąże się to z przebiegiem ALS. Prezentowane wyniki mogą wskazywać, że postępujący wraz z rozwojem choroby spadek kurczliwości mięśni szkieletowych może przyczyniać się do zmniejszonej ekspresji białka MCT1. MCT4 odpowiada za transport mleczanu z komórek mięśniowych do krwi (Bonen 2001). Wcześniejsze doniesienia wskazują, że MCT4 nie zmienia prawidłowej morfologii i kurczliwości mięśni, ale indukuje degenerację strukturalną połączeń nerwowo-mięśniowych (Bisetto i in. 2019). Upośledzenie połączeń nerwowo-mięśniowych jest zjawiskiem typowym w przebiegu ALS (Stoklund Dittlau i in. 2021) i prowadzi do atrofii mięśni, osłabienia funkcji mięśni oraz postępującego paraliżu (Flis i in. 2019). Postanowiono więc sprawdzić poziom MCT4 w mięśni szkieletowych u myszy z ALS. Wbrew oczekiwaniom nie zaobserwowano różnic w ekspresji tego białka pomiędzy grupami ALS na różnych etapach choroby w porównaniu z grupą kontrolną. Brak widocznych zmian w ilości MCT4 w mięśniach piszczelowych przednich myszy z ALS w porównaniu ze zwierzętami zdrowymi może wskazywać na inny patomechanizm odpowiedzialny za akumulację mleczanu w mięśniach szkieletowych w terminalnym stadium choroby. Brak zmian w ilościach MCT1 i MCT4 nie w pełni tłumaczy jednak działanie obu transporterów. Pomimo niezmięionej ilości mogą one funkcjonować nieprawidłowo poprzez spadek ich aktywności, co wymaga dalszych badań. Z drugiej strony, najnowsze doniesienia wskazują, że hamowanie transporterów MCT1 i MCT4 zwiększa ilość mleczanu w mięśniach szkieletowych (Kitaoka i in. 2022).

Ważnym zjawiskiem zaobserwowanym w badaniu, choć nieoczekiwanym i trudnym do wyjaśnienia, jest rozbieżność pomiędzy akumulacją mleczanu w mięśniach szkieletowych w końcowym stadium choroby a obniżoną aktywnością LDH, głównego enzymu glikolizy. Zwiększone stężenie mleczanu w mięśniach szkieletowych powinno odzwierciedlać tempo glikolizy. Rzeczywiście, wcześniejsze badania wykazały znaczne zmniejszenie aktywności enzymów glikolitycznych w mięśniach szkieletowych zwierząt z ALS szczególnie widoczne w końcowej fazie choroby (Flis i in. 2018). W pracy zaobserwowano zmniejszenie aktywności LDH 2.1, odpowiedzialnej za produkcję mleczanu w komórkach

mięśniowych. Poprzednie badania (wykonane w mięśniach ud myszy) udokumentowały spadek aktywności LDH 2,1 i LDH 0,3, ale nie były powiązane z metabolizmem mleczanu (Flis i in. 2018). Inny zespół zaobserwował natomiast zmniejszoną aktywność dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH) w mięśniach szkieletowych myszy z ALS (Desseille i in. 2017). Zmiany obserwowane w aktywności LDH i analiza proteomu białek glikolitycznych sugerują, że były one kluczowe podczas progresji ALS w mięśniach szkieletowych.

W celu zbadania przyczyn zahamowania glikolizy zmierzono stężenie dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych: sumy NAD^+ i NADH , NAD^+ oraz NADH . Jak dowiedziono wcześniej, aktywność GAPDH, kluczowego enzymu glikolizy, zależy od dostępności NAD^+ . NAD^+ hamuje aktywność GAPDH i przebieg glikolizy (Kaczara i in. 2020). Wykazano także, że zwiększenie puli dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych jest korzystne dla metabolizmu komórkowego i łagodzi progresję ALS (Harlan i in. 2020; Kaczara i in. 2020). Co ciekawe, suma NAD^+ i NADH okazała się niższa u myszy chorych z pierwszymi objawami choroby niż u zwierząt w stadium terminalnym. Podobnie stężenie samego NAD^+ było na tym etapie choroby najbardziej obniżone, co może tłumaczyć zmniejszenie aktywności enzymów glikolitycznych, w tym LDH, w mięśniach szkieletowych myszy z ALS.

Istnieją dwa sposoby na odbudowanie NAD^+ w komórkach mięśniowych. Pierwszym z nich jest utlenianie NADH do NAD^+ w reakcji katalizowanej przez podjednostkę M LDH. Ponieważ zaobserwowano zmniejszoną aktywność tego enzymu w mięśniach szkieletowych myszy z ALS, postanowiono zbadać alternatywną drogę odbudowy NAD^+ . Określono aktywność MDH (formy całkowitej oraz mMDH i cMDH) jako enzymu transportującego NADH . MDH jest częścią układu przenoszącego jabłczanowo-asparaginianowego, stanowiącego alternatywną ścieżkę odbudowy NAD^+ . Nie zaobserwowano różnic w całkowitej aktywności MDH. cMDH konkuruje z LDH 2,1 o NADH i oddziałuje pośrednio z tym enzymem, zwiększając pulę cytoplazmatycznego NAD^+ w komórkach mięśniowych. Stwarza to szansę na przyspieszenie szlaku glikolitycznego. Najniższą aktywność cMDH w mięśniach szkieletowych zaobserwowano u zwierząt w końcowym stadium choroby, co wskazuje na załamanie tego alternatywnego szlaku odbudowy NAD^+ . Wyniki aktywności MDH różniły się od uzyskanych w mięśniach ud myszy z pierwszymi objawami ALS (Flis i in. 2019). Różnice te mogą wynikać z odmiennego składu włókien mięśniowych badanych mięśni (Mänttari Järvilehto 2005; Bloemberg i Quadrilatero 2012; Giacomello i in. 2020). Innym wyjaśnieniem tych różnic może być zwiększona ruchliwość myszy, którą zaobserwowano we wczesnym okresie życia, aż do pojawienia się pierwszych objawów choroby (Dzik i in. 2021).

Uzyskane wyniki sugerują, że nie ma sposobu na przywrócenie stężenia NAD^+ , co prowadzi do zahamowania glikolizy w mięśniach szkieletowych u myszy z ALS. Spowolniona glikoliza przeczy jednak wyjaśnieniu zwiększonego stężenia mleczanu w mięśniach szkieletowych. Postanowiono więc zbadać alternatywny szlak degradacji mleczanu w mięśniach szkieletowych i zmierzyć aktywność enzymu LDH 0,3, charakterystycznego dla podjednostki enzymu H4. Przekształca ona mleczan w pirogronian, umożliwiając jego dalsze utlenianie w mitochondriach do CO_2 i H_2O . Co ciekawe, najniższa aktywność tego enzymu była widoczna w mięśniu piszczelowym przednim u myszy w stadium terminalnym choroby. Grupa ta charakteryzowała się również największą akumulacją mleczanu. Obniżona aktywność LDH 0,3 wydaje się istotnym czynnikiem odpowiedzialnym za zakłócenie metabolizmu mleczanu poprzez ograniczenie możliwości utleniania go w komórkach mięśniowych. Inną możliwością wyjaśniającą rozbieżność pomiędzy tempem glikolizy a stężeniem mleczanu jest wyciek dehydrogenazy mleczanowej z powodu uszkodzenia błony komórkowej mięśni u myszy w stadium terminalnym ALS. Wyniki aktywności kina-

zy kreatynowej we krwi potwierdzają tę możliwość, wskazując na największe uszkodzenie mięśni u myszy w stadium końcowym choroby.

Zastosowanie treningu pływackiego może przynieść wiele korzyści w mysim modelu ludzkiej choroby ALS. Wyniki niniejszych badań należy jednak rozpatrywać w świetle pewnych ograniczeń. Chociaż myszy (SOD1G93A) uznaje się za tzw. złoty standard w badaniach przedklinicznych ALS, potrzebne są dodatkowe analizy w celu potwierdzenia uzyskanych wyników na innych modelach ALS. Wpływ treningu pływackiego na organizm jest natomiast wielowymiarowy. Może on wpływać na mechanizmy psychologiczne, fizjologiczne i molekularne, które należy uwzględnić w kolejnych badaniach. Poszukiwanie nowych mechanizmów wywoływanych przez trening pływacki, związanych z poprawą długości i jakości życia w ALS, może być pomocne w leczeniu zarówno tej choroby, jak i innych chorób neurodegeneracyjnych.

7. WNIOSKI

1. W ALS sygnalizacja szlaku Akt jest zaburzona w części odpowiadającej za atrofię komórek mięśniowych (FOXO3a/MuRF-1). Dodatkowo obserwowane jest obniżenie masy mięśniowej (TA) i masy ciała na wszystkich etapach choroby.
2. Trening pływacki pełni funkcję represora białek FOXO3a i MuRF-1 odpowiedzialnych za proces atrofii komórek mięśniowych oraz działa ochronnie, redukując spadki masy mięśniowej i masy ciała zwierząt chorych na ALS, opóźniając tym samym rozwój atrofii mięśni szkieletowych.
3. W ALS metabolizm mleczanu jest zaburzony. Objawia się to jego nagromadzeniem w mięśniach szkieletowych w końcowym stadium choroby, z jednoczesnym zmniejszeniem jego stężenia we krwi. Zmiany w stężeniach mleczanu nie są związane z ilością transporterów MCT1 i MCT4.
4. W ALS obserwujemy znaczne zmniejszenie stężenia NAD^+ i NADH w mięśniach szkieletowych oraz aktywności markerowego enzymu glikolizy LDH. Jednocześnie brak istotnych zmian w aktywności MDH nie wskazuje na to, aby układ przenoszący jabłczanowo-asparaginianowy mógł być nadrzędnym systemem odbudowy dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych w mięśniu szkieletowym myszy z ALS przy obniżonej aktywności LDH.
5. Trening pływacki częściowo kompensuje zmiany w stężeniu mleczanu we krwi i mięśniach szkieletowych myszy z ALS, nie wpływa jednak na ilości transporterów mleczanu MCT1 i MCT4 oraz na stężenie NAD^+ i NADH .

8. PIŚMIENICTWO

- Adijanto J., Philp N. (2012) The SLC16A family of monocarboxylate transporters (MCTs) –physiology and function in cellular metabolism, pH homeostasis, and fluid transport. *Current Topics in Membranes*, 70, 275–311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00009-0>
- Beaumont E., Gardiner P. (2002) Effects of daily spontaneous running on the electrophysiological properties of hindlimb motoneurons in rats. *Journal of Physiology*, 540, 129–38. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013084>
- Bisetto S., Wright M., Nowak R., Lepore A., Khurana T., Loro E., Philp N. (2019) New insights into the lactate shuttle: Role of MCT4 in the modulation of the exercise capacity. *iScience*, 22, 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.041>
- Bloemberg D., Quadriatero J. (2012) Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS ONE*, 7: e35273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>
- Bonen A. (2001) The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 86 (1), 6–11. <https://doi.org/10.1007/s004210100516>
- Bradford M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brooks G. (2020) Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biology*, 35: 101454. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101454>
- Ceccanti M., Pozzilli V., Cambieri C., Libonati L., Onesti E., Frasca V., Fiorini I., Petrucci A., Garibaldi M., Palma E., Bendotti C., Fabbrizio P., Trolese M., Nardo G., Inghilleri M. (2020) Creatine kinase and progression rate in amyotrophic lateral sclerosis. *Cells*, 9: 5. <https://doi.org/10.3390/cells9051174>
- Chio A., Mazzini L., Mora G. (2020) Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*. 167: 107986. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107986>
- Deforges S., Branchu J., Biondi O., Grondard C., Pariset C., Lécolle S., Lopes P., Vidal P., Chanoine C., Charbonnier F. (2009) Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Physiology*, 587, 3561–3572. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169748>
- Derave W., Van Den Bosch L., Lemmens G., Eijnde B., Robberecht W., Hespeler P. (2003) Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: Effects of creatine treatment. *Neurobiology of Disease*. 13, 264–272. [https://doi.org/10.1016/s0969-9961\(03\)00041-x](https://doi.org/10.1016/s0969-9961(03)00041-x)
- Desseille M., Deforges S., Biondi O., Houdebine L., D'amico D., Lamazière A., Caradeuc C., Bertho G., Bruneteau G., Weill L., Bastin J., Djouadi F., Salachas F., Lopes P., Chanoine C., Massaad C., Charbonnier F. (2017) Specific physical exercise improves energetic metabolism in the skeletal muscle of amyotrophic-lateral-sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10: 332. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00332>
- Dobrowolny G., Aucello M., Rizzuto E., Beccafico S., Mammucari C., Boncompagni S., Belia S., Wannenes F., Nicoletti C., Del Prete Z., Rosenthal N., Molinaro M., Protasi F., Fanò G.,

- Sandri M., Musarò A. (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metabolism*, 8, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.002>
- Dupuis L., Gonzalez de Aguilar J., Echaniz-Laguna A., Eschbach J., Rene F., Oudart H., Halter B., Huze C., Schaeffer L., Bouillaud F., Loeffler J.P. (2009) Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS ONE*, 4: e5390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005390>
- Dzik K., Flis D., Bytowska Z., Karnia M., Ziolkowski W., Kaczor J. (2021) Swim training ameliorates hyperlocomotion of ALS mice and increases glutathione peroxidase activity in the spinal cord. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (21): 11614. <https://doi.org/10.3390/ijms222111614>
- Flis D., Dzik K., Kaczor J., Cieminski K., Halon-Golabek M., Antosiewicz J., Wieckowski M., Ziolkowski W. (2019) Swim training modulates mouse skeletal muscle energy metabolism and ameliorates reduction in grip strength in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2): 233. <https://doi.org/10.3390/ijms20020233>
- Flis D., Dzik K., Kaczor J., Halon-Golabek M., Antosiewicz J., Wieckowski M., Ziolkowski W. (2018) Swim training modulates skeletal muscle energy metabolism, oxidative stress, and mitochondrial cholesterol content in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5940748. <https://doi.org/10.1155/2018/5940748>
- Gerber Y., Sabourin J., Hugnot J., Perrin F. (2012) Unlike physical exercise, modified environment increases the lifespan of SOD1G93A mice however both conditions induce cellular changes. *PLoS ONE*, 7: e45503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045503>
- Giacomello E., Crea E., Torelli L., Bergamo A., Reggiani C., Sava G., Toniolo L. (2020) Age dependent modification of the metabolic profile of the tibialis anterior muscle fibers in C57BL/6J mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (11): 3923. <https://doi.org/10.3390/ijms21113923>
- Grondard C., Biondi O., Pariset C., Lopes P., Deforges S., Lécolle S., Gaspera B., Gallien C., Chanoine C., Charbonnier F. (2008) Exercise-induced modulation of calcineurin activity parallels the time course of myofibre transitions. *Journal of Cellular Physiology*, 214, 126–135. <https://doi.org/10.1002/jcp.21168>
- Gurney M., Pu H., Chiu A., Dal Canto M., Polchow C.M., Alexander D., Caliendo J., Hentati A., Kwon Y., Deng H. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Gwag T., Lee K., Ju H., Shin H., Lee J., Choi I. (2009) Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-up process for atrophied muscle. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24, 537–546. <https://doi.org/10.1159/000257510>
- Halon M., Kaczor J., Ziolkowski W., Flis D., Borkowska A., Popowska U., Nyka W., Wozniak M., Antosiewicz J. (2014) Changes in skeletal muscle iron metabolism outpace amyotrophic lateral sclerosis onset in transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Free Radical Research*, 48, 1363–1370. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.955484>
- Halon M., Sielicka-Dudzin A., Wozniak M., Ziolkowski W., Nyka W., Herbik M., Grieb P., Figarski A., Antosiewicz J. (2010) Up-regulation of ferritin ubiquitination in skeletal muscle of transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Neuromuscular Disorders*, 20, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.08.014>
- Halon-Golabek M., Borkowska A., Kaczor J., Ziolkowski W., Flis D., Knap N., Kasperuk K., Antosiewicz J. (2018) hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabo-

- lism is mediated by impairment of Akt signalling pathway. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9, 557–569. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12283>
- Hamadeh M., Rodriguez M., Kaczor JJ., Tarnopolsky M. 2005. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle and Nerve*, 31, 214–220. <https://doi.org/10.1002/mus.20255>
- Hardiman O., Al-Chalabi A., Brayne C., Beghi E., van den Berg L., Chio A., Martin S., Logroscino G., Rooney J. (2017) The changing picture of amyotrophic lateral sclerosis: lessons from European registers. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 88, 557–563. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-314495>
- Harlan B., Killooy K., Pehar M., Liu L., Auwerx J., Vargas M. (2020) Evaluation of the NAD⁺ biosynthetic pathway in ALS patients and effect of modulating NAD⁺ levels in hSOD-1-linked ALS mouse models. *Experimental Neurology*, 327: 113219. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113219>
- Harrington T., Cohen M., Bartleson J., Ginsburg W. (1983) Elevation of creatine kinase in amyotrophic lateral sclerosis. Potential confusion with polymyositis. *Arthritis & Rheumatology*, 26, 201–205. <https://doi.org/10.1002/art.1780260212>
- Ito D., Hashizume A., Hijikata Y., Yamada S., Iguchi Y., Iida M., Kishimoto Y., Moriyoshi H., Hirakawa A., Katsuno M. (2019) Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 266, 2952–2961. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09507-6>
- Izumiya Y., Hopkins T., Morris C., Sato K., Zeng L., Viereck J., Hamilton J., Ouchi N., LeBrasseur N., Walsh K. (2008) Fast/glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metabolism*, 7, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.003>
- Juel C., Halestrap A. (1999) Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. *Journal of Physiology*, 517 (Pt 3), 633–642. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0633s.x>
- Kaczara P., Sitek B., Przyborowski K., Kurpinska A., Kus K., Stojak M., Chlopicki S. (2020) Antiplatelet effect of carbon monoxide is mediated by NAD(+) and ATP depletion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40 (10), 2376–2390. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314284>
- Kiernan M., Vucic S., Cheah B., Turner M., Eisen A., Hardiman O., Burrell J. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377, 942–955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61156-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61156-7)
- King D., Yeomanson D., Bryant H. (2015) PI3K the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 37, 245–251. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000329>
- Kirkinezos I., Hernandez D., Bradley W., Moraes C. (2003) Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 53, 804–807. <https://doi.org/10.1002/ana.10597>
- Kitaoka Y., Takahashi K., Hatta H. (2022) Inhibition of monocarboxylate transporters (MCT) 1 and 4 reduces exercise capacity in mice. *Physiological Report*, 10: e15457. <https://doi.org/10.14814/phy2.15457>
- Lai K., Gonzalez M., Poueymirou W., Kline W., Na E., Zlotchenko E., Stitt T., Economides A., Yancopoulos G., Glass D. (2004) Conditional activation of Akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 9295–9304. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9295-9304.2004>
- Leger B., Vergani L., Soraru G., Hespel P., Derave W., Gobelet C., D'Ascenzio C., Angelini C., Russell A. (2006) Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis

- reveals a reduction in Akt and an increase in atrogen-1. *FASEB Journal*, 3, 583–585. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5249fje>
- Léger L., Taylor A. 1982. The chronic effects of continuous and intermittent running upon lactate dehydrogenase activity of heart, fast and slow twitch muscles in the rat. *Journal of Physiology (Paris)*, 78 (6), 499–506.
- Liebetanz D., Hagemann K., von Lewinski F., Kahler E., Paulus W. (2004) Extensive exercise is not harmful in amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*, 20, 3115–3120. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03769.x>
- Logroscino G., Traynor, B., Hardiman O., Chiò A., Mitchell D., Swingler R., Millul A., Benn E., Beghi E. (2009) Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81, 385–390. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.183525>
- Lopes de Almeida J., Silvestre R., Pinto A., de Carvalho M. (2012) Exercise and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological Sciences*, 33, 9–15. <https://doi.org/10.1007/s10072-011-0921-9>
- Mahoney D., Rodriguez C., Devries M., Yasuda N., Tarnopolsky M. (2004) Effects of high-intensity endurance exercise training in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle and Nerve*, 29, 656–662. <https://doi.org/10.1002/mus.20004>
- Mänttari S., Järvilehto M. (2005) Comparative analysis of mouse skeletal muscle fibre type composition and contractile responses to calcium channel blocker. *BMC Physiology*, 5: 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-5-4>
- Maughan R. (1982) A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20-mul blood sample. *Clinica Chimica Acta*, 122 (2), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90282-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90282-0)
- McCullagh K., Poole R., Halestrap A., Tipton K., O'Brien M., Bonen A. (1997) Chronic electrical stimulation increases MCT1 and lactate uptake in red and white skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 273 (2), E239–E246. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.2.E239>
- McDermott J., Bonen A. (1993) Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. *Acta Physiologica Scandinavica*, 147 (3), 323–327. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09505.x>
- Meethal S.V., Atwood C. (2012) Lactate dyscrasia: a novel explanation for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, 33 (3), 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.012>
- Mehta P., Kaye W., Bryan L., Larson T., Copeland T., Wu J., Muravov O., Horton K. (2016) Prevalence of amyotrophic lateral sclerosis – United States, 2012–2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65, 1–12. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6508a>
- Mejzini R., Flynn L., Pitout I.L., Fletcher S., Wilton S., Akkari P. (2019) ALS genetics, mechanisms, and therapeutics: where are we now? *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Morimoto N., Nagai M., Ohta Y., Miyazaki K., Kurata T., Morimoto M., Murakami T., Takehisa Y., Ikeda Y., Kamiya T., Abe K. (2007) Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research*, 1167, 112–117.
- Musaro A., McCullagh K., Paul A., Houghton L., Dobrowolny G., Molinaro M., Barton E., Sweeney H., Rosenthal N. (2001) Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genetics*, 27, 195–200. <https://doi.org/10.1038/84839>
- Naumenko N., Pollari E., Kurronen A., Giniatullina R., Shakirzyanova A., Magga J., Koistinaho J., Giniatullin R. (2011) Gender-specific mechanism of synaptic impairment and its

- prevention by GCSF in a mouse model of ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5: 26. <https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00026>
- Nave B., Ouwens M., Withers D., Alessi D., Shepherd P. (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: Identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochemical Journal*, 344 (2), 427–431. <https://doi.org/10.1042/bj3440427>
- Nichols N., Van Dyke J., Nashold L., Satriotomo I., Suzuki M., Mitchell G. (2013) Ventilatory control in ALS. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 189, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.05.016>
- Ojeda L., Gao J., Hooten K., Wang E., Thonhoff J., Dunn T., Gao T., Wu P. (2011) Critical role of PI3K/Akt/GSK3 β in motoneuron specification from human neural stem cells in response to FGF2 and EGF. *PLoS ONE*, 6: 23414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023414>
- Peltier J., O'Neill A., Schaffer D. (2007) PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental Neurobiology*, 67, 1348–1361. <https://doi.org/10.1002/dneu.20506>
- Philippou A., Halapas A., Maridaki M., Koutsilieris M. (2007) Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 7 (3), 208–218.
- Pilegaard H., Juel C., Wibrand F. (1993) Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effect of training. *American Journal of Physiology*, 264 (2), E156–E160. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.2.E156>
- Pilegaard H., Terzis G., Halestrap A., Juel C. (1999) Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 276 (5), E843–E848. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.5.E843>
- Proia P., Di Liegro C., Schiera G., Fricano A., Di Liegro I. (2016) Lactate as a metabolite and a regulator in the central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (9): 1450. <https://doi.org/10.3390/ijms17091450>
- Qiu J., Fang Q., Xu T., Wu C., Xu L., Wang L., Yang X., Yu S., Zhang Q., Ding F., Sun H. (2018) Mechanistic role of reactive oxygen species and therapeutic potential of antioxidants in denervation-or fasting-induced skeletal muscle atrophy. *Frontiers in Physiology*, 9: 215. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00215>
- Rafalski V., Brunet A. (2010) Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Progress in Neurobiology*, 93, 182–203. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.10.007>
- Rowland L.P. (1998) Diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 160 (Suppl 1), S6–S24. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(98\)00193-2](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(98)00193-2)
- Roy C., Sherrington C. (1890) On the regulation of the blood-supply of the brain. *Journal of Physiology*, 11 (1–2), 85–158. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1890.sp000321>
- Sanchez A., Bernardi H., Py G., Candau R. (2014) Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307, R956–969. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00187.2014>
- Sandri M. (2008) Signaling in muscle atrophy and hipertrophy. *Physiology*, 23, 160–170. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2007>
- Sartori R., Milan G., Patron M., Mammucari C., Blaauw B., Abraham R., Sandriet M. (2009) Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296, C1248–1257. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2009>
- Schantz P., Sjoberg B., Svedenhag J. (1986) Malate-aspartate and alpha-glycerophosphate shuttle enzyme levels in human skeletal muscle: methodological considerations and

- effect of endurance training. *Acta Physiologica Scandinavica*, 128 (3), 397–407. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1986.tb07993.x>
- Schiaffino S., Mammucari C. (2011) Regulation of skeletal muscle growth by the IGF-1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1: 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>
- Schwartz M., Sargeant M., Swash M. (1976) Longitudinal fibre splitting in neurogenic muscular disorders—Its relation to the pathogenesis of “myopathic” change. *Brain Journal Neurology*, 99, 617–636. <https://doi.org/10.1093/brain/99.4.617>
- Scicchitano M., Dobrowolny G., Sica G., Musaro A. (2018) Molecular insights into muscle homeostasis, atrophy and wasting. *Current Genomics*, 19, 356–369. <https://doi.org/10.2174/1389202919666180101153911>
- Slopock D., Roudier E., Liu S., Nwadozi E., Birot O., Haas T. (2014) ForkheadBoxO transcription factors restrain exercise-induced angiogenesis. *Journal of Physiology*, 592, 4069–4082. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.275867>
- Stoklund Dittlau K., Krasnow E., Fumagalli L., Vandoorne T., Baatsen P., Kerstens A., Giacomazzi G., Pavie B., Rossaert E., Beckers J., Sampaolesi M., Van Damme P., Van Den Bosch L. (2021) Generation of human motor units with functional neuromuscular junctions in microfluidic devices. *Journal of Visualized Experiments*, 175. <https://doi.org/10.3791/62959>
- Verber N., Shaw P. (2020) Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: A review of new developments. *Current Opinion in Neurology*, 33, 662–668. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000854>
- Wagey R., Pelech S., Duronio V., Krieger C. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase: Increased activity and protein level in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71, 716–722. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71020716.x>
- Wang J., Fry C., Walker C. (2019) Carboxyl-terminal modulator protein regulates Akt signaling during skeletal muscle atrophy in vitro and a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Report*, 9 (1): 3920. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40553-2>
- Weekes M., Tomasec P., Huttlin E., Fielding C., Nusinow D., Stanton R., Wang E., Aicheler R., Murrell I., Wilkinson G., Lehner P., Gygi S. (2014) Quantitative temporal viromics: An approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell*, 157, 1460–1472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.028>
- Wijesekera L., Leigh P. (2009) Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4: 3. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-3>
- Wong M., Martin L. (2010) Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 19, 2284–2302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq106>
- Ziółkowski W., Ciemiński K., Flis D. (2020) Aktywność fizyczna oraz „trening mitochondriów” w stwardnieniu zanikowym bocznym. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 4, 639–654. https://doi.org/10.36921/kos.2020_2715

ZAŁĄCZNIK 1. OŚWIADCZENIA

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Karol Ciemiński
imię i nazwisko kandydata

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie kandydata

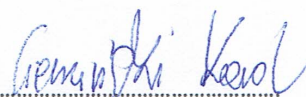
Oświadczam, że mój wkład w powstanie przedłożonej rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na*:

- publikacja 1 - pomyśle i zaprojektowaniu badań, realizacji badań, analizie danych, walidacji, wizualizacji, pisaniu oryginału manuskryptu
- publikacja 2 - pomyśle i zaprojektowaniu badań, realizacji badań, analizie danych, pisaniu oryginału manuskryptu

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.

2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.


.....
podpis kandydata

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Damian Flis
imię i nazwisko współautora

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautora

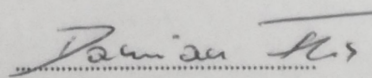
Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 – pomyśle i zaprojektowaniu badań, realizacji badań, nadzorze, walidacji, analizie danych, wizualizacji, pisaniu oryginału manuskryptu
- publikacja 2 - pomyśle i zaprojektowaniu badań, realizacji badań, analizie danych, pisaniu oryginału manuskryptu


.....
podpis współautora

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Katarzyna Dzik
imię i nazwisko współautorki

Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautorki

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 - realizacji badań, walidacji, analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu
- publikacja 2 - realizacji badań, recenzji i korekcie manuskryptu


.....
podpis współautorki

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Jan Jacek Kaczor
imię i nazwisko współautora

Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautora

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 – realizacji badań, nadzorze, walidacji, analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu
- publikacja 2 – realizacji badań, recenzji i korekcie manuskryptu


.....
podpis współautora

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Emilia Białobrodzka (Czyrko)
imię i nazwisko współautorki

Akademia Wychowania Fizycznego w Poznaniu, Szkoła Doktorska
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu
stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze
fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautorki

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 – analizie danych, realizacji badań, recenzji i korekcie manuskryptu


.....
podpis współautorki

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Małgorzata Hałoń-Gołąbek
imię i nazwisko współautorki

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautorki

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *ScientificReports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of MolecularSciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 –analizowanych, recenzji i korekcie manuskryptu

Hałoń-Gołąbek Małgorzata
.....
podpis współautorki

Warszawa, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Mariusz Więckowski
imię i nazwisko współautora

Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautora

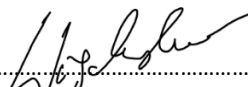
Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gotąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 - analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu
- publikacja 2 - analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu


.....
podpis współautora

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Jędrzej Antosiewicz
imię i nazwisko współautora

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Oświadczenie współautora

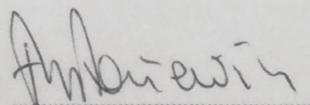
Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hałoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Scientific Reports, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. International Journal of Molecular Sciences, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 –analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu
- publikacja 2 - analizie danych, recenzji i korekcie manuskryptu



.....
podpis współautora

Poznań, 22.12.2022 r.
miejsowość, data

Wiesław Ziółkowski
imię i nazwisko współautora

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
miejsce zatrudnienia (uczelnia, jednostka)

Dotyczy: postępowania w sprawie nadania Panu Karolowi Ciemińskiemu stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o kulturze fizycznej w Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Óswiadczenie współautora

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna, Kaczor Jan Jacek, Czyrko Emilia, Hatoń-Gołąbek Małgorzata, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *ScientificReports*, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-00319-1.
2. Ciemiński Karol, Flis Damian Józef, Dzik Katarzyna Patrycja, Kaczor Jan Jacek, Więckowski Mariusz Roman, Antosiewicz Jędrzej, Ziółkowski Wiesław. Swim training affects on muscle lactate metabolism, nicotinamide adenine dinucleotides concentration, and the activity of NADH shuttle enzymes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *International Journal of MolecularSciences*, 2022, doi: 10.3390/ijms231911504.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie rozprawy doktorskiej pt. „Molekularny mechanizm ochronnego działania treningu pływackiego na mięśnie szkieletowe w mysim modelu ludzkiej choroby stwardnienia zanikowego bocznego”

polegał na:

- publikacja 1 -pomyśle i zaprojektowaniu badań, pozyskiwaniu finansowania, realizacji badań, nadzorze, analizie danych, wizualizacji, pisaniu oryginału manuskryptu
- publikacja 2 - pomyśle i zaprojektowaniu badań, realizacji badań, analizie danych, pisaniu oryginału manuskryptu


.....
podpis współautora



OPEN

Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis

Karol Cieminski¹, Damian Jozef Flis^{2,3}, Katarzyna Dzik^{2,4}, Jan Jacek Kaczor^{2,4}, Emilia Czyrko², Malgorzata Halon-Golabek⁵, Mariusz Roman Wieckowski⁶, Jędrzej Antosiewicz⁷ & Wiesław Ziolkowski⁸

We tested the hypothesis that swim training reverses the impairment of Akt/FOXO3a signaling, ameliorating muscle atrophy in ALS mice. Transgenic male mice B6SJL-Tg (SOD1^{G93A}) 1Gur/J were used as the ALS model ($n = 35$), with wild-type B6SJL (WT) mice as controls ($n = 7$). ALS mice were analyzed before ALS onset, at ALS onset, and at terminal ALS. Levels of insulin/Akt signaling pathway proteins were determined, and the body and tibialis anterior muscle mass and plasma creatine kinase. Significantly increased levels of FOXO3a in ALS groups (from about 13 to 21-fold) compared to WT mice were observed. MuRF1 levels in the ONSET untrained group (12.0 ± 1.7 AU) were significantly higher than in WT mice (1.12 ± 0.2 AU) and in the BEFORE ALS group (3.7 ± 0.9 AU). This was associated with body mass and skeletal muscle mass reduction. Swim training significantly ameliorated the reduction of skeletal muscle mass in both TERMINAL groups ($p < 0.001$) and partially reversed changes in the levels of Akt signaling pathway proteins. These findings shed light on the swimming-induced attenuation of skeletal muscle atrophy in ALS with possible practical implications for anti-cachexia approaches.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable, chronic neurodegenerative disease characterized by selective death of motoneurons, which control any muscle activity in the motor cortex, brainstem, and spinal cord¹. ALS is phenotypically characterized by the loss of muscle tone, paresis, muscle atrophy, and spasticity². Approximately 90% of ALS cases are sporadic (sALS), with unknown etiology, and the rest are genetically determined (fALS). In clinical terms, both forms are identical.

The role of muscle in ALS has been extensively studied and gave rise to highly inconsistent results. On the one hand, the data from the last decade shows that the causes of neurodegeneration in ALS should be sought outside the nervous system. For example, overexpression of SOD1^{G93A} in skeletal muscle initiates motoneurons death³ and causes profound muscle atrophy^{2,3}. Additional support for this view is provided by the observations that the destruction of neuromuscular junctions has been linked to oxidative stress induced by a tissue-specific breakdown of muscle mitochondria⁴. Nevertheless, on the other hand, no evidence targeting muscle to boost its volume/function provides compelling, lasting, or meaningful protective effects against motoneurons degeneration and clinical motor deficits in rodent models or even patients.

The imbalance between muscle protein synthesis and proteolysis in ALS results in muscle atrophy and is regulated by the insulin/Akt signaling pathway^{5,6}. The insulin/Akt/Forkhead box O3 (FOXO3a) signaling pathway is essential for protein breakdown and autophagy, while the insulin/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway plays an essential role in muscle protein synthesis and regeneration⁷. Activation or deactivation

¹Poznan University of Physical Education, Poznan, Poland. ²Department of Physiology and Biochemistry, Gdansk University of Physical Education and Sport, 80-336 Gdansk, Poland. ³Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland. ⁴Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, University of Gdansk, Gdansk, Poland. ⁵Department of Physiotherapy, Faculty of Health Sciences Medical, University of Gdansk, Gdansk, Poland. ⁶Laboratory of Mitochondrial Biology and Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland. ⁷Department of Bioenergetics and Physiology of Exercise, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland. ⁸Department of Rehabilitation Medicine, Faculty of Health Sciences Medical, University of Gdansk, 80-219 Gdansk, Poland. ✉email: damian.flis@gumed.edu.pl; wieslaw.ziolkowski@gumed.edu.pl

of the Akt serine/threonine kinase determines the course of these pathways. Active FOXO3a protein is responsible for stimulating muscle protein breakdown and increasing antioxidant defense enzyme activity^{5,7}. We have recently shown that Akt is inactivated, while FOXO3a is activated, with ALS development in rat skeletal muscle, accompanied by an increased expression of Atrogin-1, a protein responsible for muscle cell atrophy⁷. Of note, despite the accompanying increased activity of FOXO3a-stimulated antioxidant enzymes, oxidative stress in ALS is higher than that in wild-type (WT) skeletal muscles^{5,8-10}. We have also demonstrated that changes in the active forms of Akt and FOXO3a are responsible for ferritin up-regulation and iron accumulation in skeletal muscle of ALS rat and are accompanied by an increase in amyloid precursor protein and iron chaperone PCBP1 levels⁵.

An increasing number of studies suggest that swim training prolongs the lifespan of ALS mice, with an accompanying improvement in muscle bioenergetics and glucose metabolism and a reduction of muscle fiber loss and weight¹¹⁻¹³. In addition, recently, we have shown that swim training attenuates the reduction of muscle strength in ALS mice¹⁴ and positively influences skeletal muscle mitochondria's function by modifying the cellular structure components created by the mitochondria and endoplasmic reticulum membranes¹³.

Swim training in WT animals leads to the activation of Akt and mTOR proteins¹⁵. To the best of our knowledge, the impact of swim training on the Akt signaling pathway and the accompanying process of muscle atrophy has not been evaluated to date. Therefore, we hypothesized that ALS modulates the insulin/Akt/FOXO3a pathway, resulting in muscle atrophy, and that swim training at least partially reduces aberrant activation of this pathway in ALS, with a concomitant amelioration of skeletal muscle mass atrophy. We analysed representative proteins of the insulin/Akt/mTOR and insulin/Akt/FOXO3a pathways in the ALS mouse model, with and without training, and at different ALS stages to test this hypothesis.

Results

Clinical score of the ALS mice at sacrifice time. On the day of euthanasia, mice in the ALS BEFORE, ONSET, and TERMINAL untrained groups had clinical scores of 0, 1, and 4.5 ± 0.2 points, respectively. On the same day, mice from trained groups had a clinical score of 0.4 ± 0.2 and 2.8 ± 0.7 points in the ONSET and TERMINAL groups, respectively.

The effect of swim training on the Akt signaling pathway in ALS skeletal muscle. *IGF-1/Akt signaling pathway proteins.* IGF-1 levels were significantly higher in untrained TERMINAL mice than in WT mice (2.52 ± 0.5 AU). Further, IGF-1 levels were significantly higher in the TERMINAL group than in the BEFORE group (1.1 ± 0.2 AU) (Fig. 1a).

Akt levels were significantly higher in trained ALS mice at the ONSET stage of the disease than in WT mice (6.3 ± 1.5 AU). In the ONSET untrained group, Akt levels were significantly higher than those in the BEFORE group (4.4 ± 1.1 and 1.4 ± 0.4 AU, respectively). At terminal-stage disease, swim training increased Akt level (2.4 ± 0.5 and 3.9 ± 0.6 AU in TERMINAL untrained and trained, respectively; Fig. 1b).

No significant changes in the active form of Akt (p-Akt) and p-Akt/Akt ratio were apparent between the groups (Fig. 1c,d). The p-Akt/Akt ratios in the ONSET and TERMINAL groups were greatly reduced compared with BEFORE and WT groups, but the change was not statistically significant.

Changes in the IGF-1 and Akt protein levels described above were confirmed by the analysis of tissue proteomes (Fig. S2).

Akt-dependent signaling pathway proteins responsible for the proteolysis of muscle proteins. FOXO3a and p-FOXO3a levels, and FOXO3a/p-FOXO3a ratio were next analyzed. A significant increase in the active form of FOXO3a in the ALS BEFORE, and the ONSET untrained and the ONSET trained, and TERMINAL untrained groups (13.6 ± 2.6 , 14.7 ± 2.9 , 14.9 ± 2.5 , and 21.8 ± 4.6 AU, respectively) in comparison with WT mice (1.29 ± 0.22 AU) was observed. At terminal-stage disease, swim training induced FOXO3a level reduction (9.9 ± 1.2 AU) (Fig. 2a). However, no significant differences between the groups were apparent concerning the inactive FOXO3a (p-FOXO3a) levels and the FOXO3a/p-FOXO3a ratio (Fig. 2b,c).

MuRF1 and Atrogin-1 induce proteolysis in skeletal muscle cells. However, the observed changes in the levels of these two proteins were not the same. Specifically, MuRF1 levels in the ONSET untrained group were significantly higher than in WT mice (12.0 ± 1.7 AU). In the untrained ONSET group, MuRF1 levels were higher than those in the BEFORE ALS group (3.7 ± 0.9 AU). An increase in MuRF1 levels accompanied ALS progression. At terminal-stage disease in the untrained group, MuRF1 levels were reduced (5.6 ± 0.7 AU) compared with those in the untrained ONSET group. Further, swim training induced MuRF1 level reduction in the ONSET and TERMINAL groups (6.1 ± 1.7 and 1.9 ± 0.8 AU, respectively) (Fig. 2d). By contrast, no significant changes in Atrogin-1 levels were apparent in any analyzed groups (Fig. S3).

Proteome analysis of FOXO3a, Atrogin-1, and MuRF1 levels in ALS BEFORE, and TERMINAL trained and untrained groups confirmed the above changes (Fig. S4).

Proteins involved in the synthesis of muscle proteins. No changes in the mTOR levels were noted in any of the analyzed groups (Fig. 3a). Further, p70S6K levels were unaffected by ALS or swim training (Fig. 3b). Interestingly, in the untrained ONSET group, levels of the active form of p70S6K (p-p70S6K) (1.3 ± 0.03 AU) were higher than those in WT mice. Further, at the onset of disease symptoms, swim training significantly reduced p-p70S6K levels (1.1 ± 0.1 AU vs. untrained animals) (Fig. 3c).

The proteomic analysis confirmed the lack of a clear directionality of changes in the levels of anabolic proteins in trained TERMINAL vs. untrained TERMINAL and BEFORE ALS mice (Fig. S5).

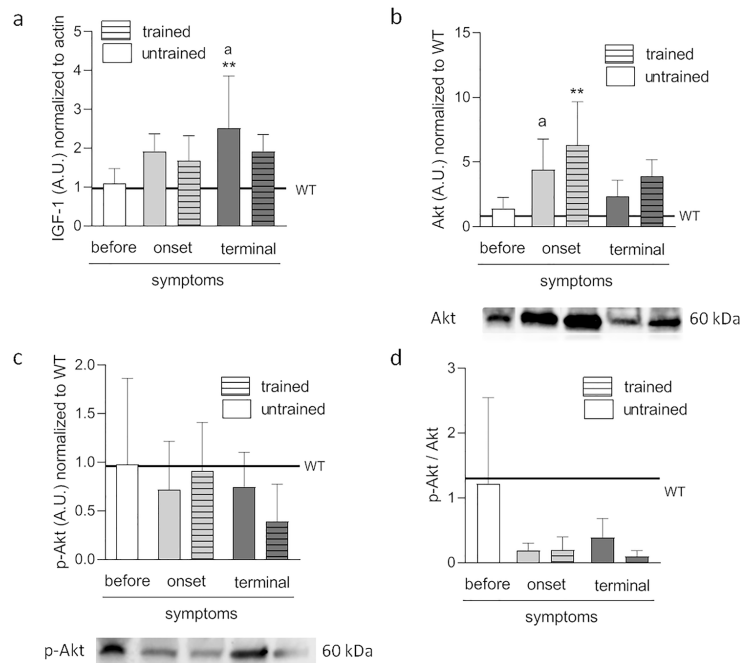


Figure 1. Effects of ALS disease progression and swim training on IGF-1 and Akt signaling pathway. IGF-1 (a), Akt (b), p-Akt (c), and p-Akt to Akt ratio (d) were measured in tibialis anterior muscle. There were significant differences between the groups: ** $p < 0.01$ vs. WT group of mice, * $p < 0.05$ vs. BEFORE group. The data are presented as the means \pm SEM ($n = 5$ in each group). Full-length blots are displayed in Supplementary Fig. S6 and Fig. S7.

The effect of swim training on skeletal muscle mass in ALS mice. ALS reduced TA muscle mass in all ALS mice compared to WT mice (68.7 ± 1.4 mg), with a reduction in skeletal muscle mass related to disease progression (54.8 ± 0.9 , 41.9 ± 2.4 , and 39.3 ± 0.7 mg in ALS BEFORE, ONSET, and TERMINAL groups, respectively). Swim training ameliorated the reduction in skeletal muscle mass (45.7 ± 2.4 and 49.1 ± 1.5 mg in the trained ONSET and TERMINAL groups, respectively) (Fig. 4a). Besides skeletal muscle mass reduction, ALS also affected mouse body mass so that the body mass of ALS mice was lower than that of WT mice (31.7 ± 0.7 g). The body mass of animals in the TERMINAL groups (22.2 ± 0.5 g) was significantly lower than in the BEFORE and ONSET groups (25.5 ± 0.5 and 25.6 ± 0.8 g, respectively). In addition, swim training attenuated body mass reduction at terminal-stage disease (25.0 ± 0.4 g) (Fig. 4b).

To evaluate skeletal muscle atrophy, the ratio of TA to animal body mass was calculated. In comparison to WT mice (2.2 ± 0.1 mg/g), the ratio was significantly reduced in the untrained ONSET, trained ONSET, and untrained TERMINAL groups (1.6 ± 0.04 , 1.9 ± 0.05 and 1.8 ± 0.04 mg/g, respectively). The ratio was significantly higher in the TERMINAL trained group (2.0 ± 0.04 mg/g) than in the TERMINAL untrained group (Fig. 4c).

The effect of swim training on skeletal muscle damage in ALS mice. No significant differences in plasma CK activity were observed between the groups (Fig. 4d). However, a tendency ($p = 0.078$ BEFORE vs. untrained TERMINAL) of increasing plasma CK activity during disease progression was apparent (982.2 ± 186.3 , 1295.0 ± 306.4 , and 1983.0 ± 369.9 U/L in the untrained ALS BEFORE, ONSET, and TERMINAL groups, respectively). Conversely, swimming reduced the CK activity in the trained ONSET and TERMINAL groups (860.0 ± 207.1 and 1206.0 ± 229.5 U/L, respectively), but the effect was not significant (Fig. 4d).

Discussion

We showed that swim training exerts an anti-atrophic effect by influencing the levels of Akt signaling pathway proteins, particularly the Foxo-3/MuRF1 proteins. Muscle atrophy is an active process controlled by specific signaling pathways and transcriptional programs. Indeed, the genes induced most strongly in muscle atrophy encode two muscle-specific ubiquitin ligases, Atrogin-1 (also known as MAFBx) and MuRF1^{16,17}. The obtained results confirmed our hypothesis that ALS progression modulates the insulin/Akt/FOXO3a pathway, resulting

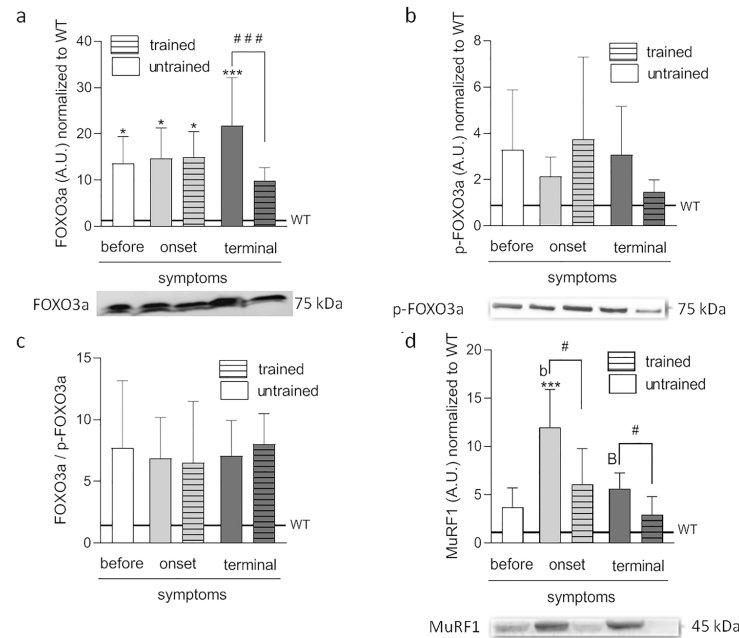


Figure 2. Effects of ALS disease progression and swim training on the proteins responsible for the proteolysis of muscle proteins. FOXO3a (a), p-FOXO3a (b), FOXO3a to p-FOXO3a ratio (c), and MuRF1 (d) were measured in tibialis anterior muscle. There were significant differences between the groups: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. WT group of mice, # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ between indicated groups, ^b $p < 0.01$ vs. BEFORE group, ^B $p < 0.01$ vs. ONSET group. The data are presented as the means \pm SEM ($n = 5$ in each group). Full-length blots are displayed in Supplementary Fig. S8, Fig S9 and Fig. S10.

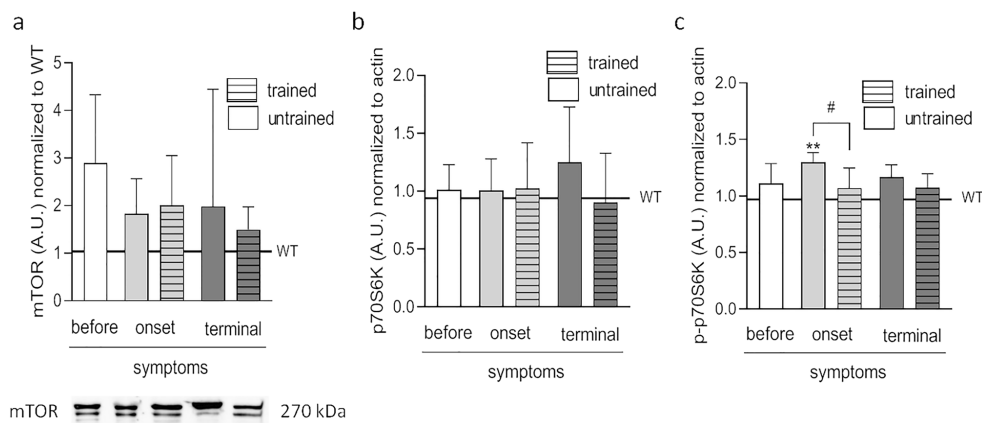


Figure 3. Effects of ALS disease progression and swim training on the proteins involved in the process of muscle protein synthesis. mTOR (a), p70S6K (b), p-p70S6K (c) were measured in the tibialis anterior muscle. There were significant differences between the groups: ** $p < 0.01$ vs. WT group of mice, * $p < 0.05$ between indicated groups. The data are presented as the means \pm SEM ($n = 5$ in each group). Full-length blot is displayed in Supplementary Fig. S11.

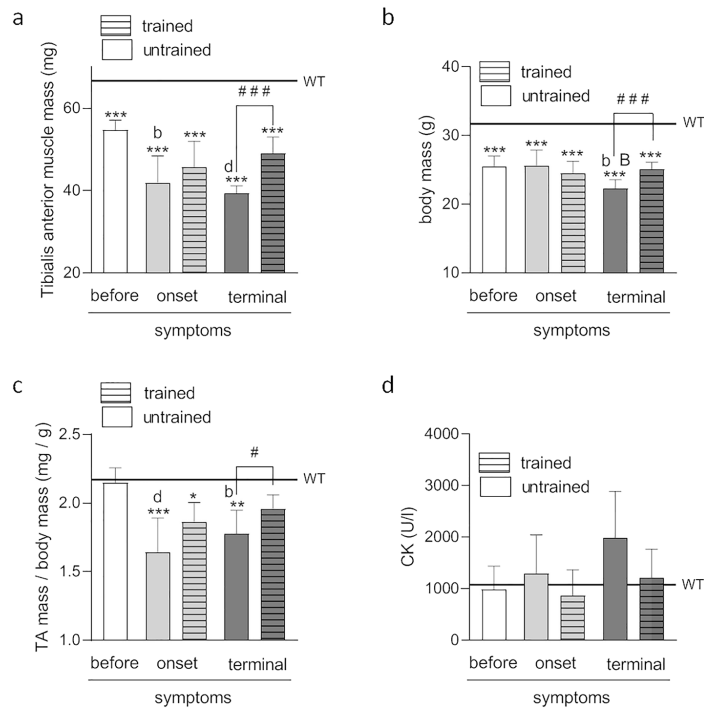


Figure 4. Effects of ALS disease progression and swim training on body mass, tibialis anterior muscle mass, and blood creatine kinase activity. Tibialis anterior muscle mass (a) body mass (b), the ratio of tibialis anterior to body mass (c), and activity of blood creatine kinase (d) in mice. There were significant differences between the groups: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT group of mice, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ between indicated group, ^b $p < 0.01$, ^d $p < 0.001$ vs. BEFORE group, ^b $p < 0.01$ vs. ONSET group. The data are presented as the means \pm SEM [$n = 7$ in each group (a,b,c) and $n = 6$ in each group (d)].

in muscle atrophy, and that swim training partially reduces the aberrant activation of this pathway, with a concomitant amelioration of skeletal muscle mass atrophy.

The insulin/Akt signaling pathway begins with the common IGF-1–Akt axis. IGF-1, a circulating growth factor, is produced locally by many tissues, including skeletal muscle (reviewed in¹⁸). IGF-1 sustains muscle growth and regeneration¹⁹, and IGF-1 and/or insulin signaling suppresses protein breakdown while promoting muscle growth. Furthermore, IGF-1 plays a crucial role in the inhibition of muscle atrophy and cardiac cachexia. We observed a progressive increase in muscle IGF-1 levels accompanying ALS development, which could be explained as a 'muscle's defense mechanism against atrophy. Swim training did not affect IGF-1 levels.

The binding of IGF-1 to its receptor triggers the activation of several intracellular kinases, including phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). PI3K phosphorylates the membrane phospholipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), creating a lipid-binding site on the cell membrane for the serine/threonine kinase Akt (also PKB, protein kinase B). The subsequent translocation of Akt to the membrane facilitates its phosphorylation and activation by the PDK-1 kinase. Therefore, we evaluated the total and active forms of Akt in skeletal muscle of ALS mice and the effect of swim training on Akt activation. Unlike the rising IGF-1 levels, the p-Akt/Akt ratio decreased during disease. Considering our previous studies in a rat ALS model⁵ and other reports²⁰, these observations confirm Akt inactivation during ALS progression.

A possible explanation of the above phenomenon is inhibiting IGF-dependent signaling by phosphatase and tensin homolog (PTEN). PTEN dephosphorylates PIP3 and thus inhibits its activity, resulting in the inhibition of Akt. Further, oxidative stress leads to the activation of PTEN phosphatase, which dephosphorylates the IGF-1 receptor and PI3K, dampening IGF-1 signaling²¹. Therefore, PTEN involvement in ALS is plausible, as we have previously reported on the occurrence of oxidative stress in the muscle of ALS mouse^{13,14}. Nonetheless, this possibility requires further confirmation.

Although no statistically significant differences were noted in the current study, the p-Akt/total Akt ratio in the ONSET and TERMINAL groups was lower than that in the BEFORE and WT groups, indicating inactivation

of this protein in the former two groups. Transgenic mice overexpressing Akt in skeletal muscle display muscle hypertrophy and protection from denervation-induced atrophy^{22,23}, confirming that the Akt pathway promotes muscle growth and simultaneously blocks protein degradation^{22,24}. We showed that swim training increases the total Akt protein in the TA muscle of ALS mice in the ONSET and TERMINAL groups, which was additionally illustrated by proteome analysis of the IGF-1 and Akt protein levels (Fig. S2), and could be considered as a protective phenomenon. However, this did not translate into an increased fraction of the active form of Akt in animals suffering from ALS, which further should affect the activity of the FOXO3a protein. Consequently, we measured the expression of FOXO3a and its downstream targets, i.e., Atrogin-1 and MuRF1, in skeletal muscle. The FOXO3a/Atrogin-1/MuRF1 signaling pathway is involved in the induction of muscle protein proteolysis and muscle atrophy⁷. As anticipated, levels of FOXO3a and p-FOXO3a, and the FOXO3a/p-FOXO3a ratio, indicative of FOXO3a activation, were increased in the TA muscle in ALS mice compared with the controls. At the same time, swim training decreased the FOXO3a and p-FOXO3a levels (the latter, without statistical significance) in the TERMINAL group. This was accompanied by changes in MuRF1 levels in the ONSET and TERMINAL groups. Interestingly, in contrast to the results of our studies in the rat ALS model and other reports^{5,20}, we did not observe changes in the Atrogin-1 levels in ALS animals, despite the increase in the FOXO3a levels (Fig. S3). The same was previously reported by Dobrovolsky³. Atrogin-1 can control both the processes associated with the breakdown of cytoskeletal proteins and processes associated with protein synthesis, while MuRF1 is involved only in the breakdown of myofibrillar proteins. Due to these facts, there may be another mechanism in skeletal muscle that regulates the expression of atrogin-1 independent of phosphorylation/dephosphorylation of FOXO3a, like histone deacetylase-1²⁵. Changes in the FOXO3a and MuRF1 expression can be explained by the notion that swim training reduces oxidative stress in the muscles of animals with ALS¹³. Growing evidence suggests that increased reactive oxygen species production in skeletal muscle significantly induces mitochondrial dysfunction, activates forkhead box class O (FoxO) transcription factors, and contributes to muscle atrophy^{26,27}. In the current study, the proteome analysis of the FOXO3a, Atrogin-1, and MuRF1 levels in ALS mice revealed a significant shift in the expression of these proteins in the TERMINAL trained group towards the BEFORE group levels, which further confirms the effectiveness of swim training as an anti-atrophic agent.

Apart from FOXO3a, the second target of Akt is mTOR, which, together with p70S6K, is responsible for the synthesis of muscle proteins²⁸. We did not observe any significant differences in these protein levels in the studied groups of animals in the current study. Further, swim training resulted in a decrease of p-p70S6K levels only in the ONSET group. Thus, the effect of swim training in the ONSET group is difficult to explain. However, in one 2018 study, inhibition of p70S6K by A77 1726, the active metabolite of the anti-inflammatory drug leflunomide, induced mTOR feedback activation and UNC-51-like kinase 1 phosphorylation in NSC34 cells, a hybrid mouse motoneuron cell line²⁹. This was accompanied by an induction of co-localization of SOD1 G93A variant aggregates with autophagosomes and accelerated SOD1 G93A degradation. This suggests that p70S6K inhibition induces autophagy in NSC34 cells and that blocking S6K1 activity by a small molecule inhibitor, such as leflunomide, may offer a new strategy for ALS treatment²⁹. However, whether the effect of swim training is based on the same mechanism remains to be clarified.

In another study³⁰ no difference in p70 ribosomal S6 kinase (S6K) activity in ALS patients and controls was reported in the spinal cord tissue. However, the amount of S6K protein in ALS patients was significantly higher than in the controls³⁰. In yet another study²⁰, analysis of skeletal muscle biopsies from individuals with ALS and controls revealed no differences in p70S6K expression on the mRNA and protein levels, although the Akt activity was relatively lower in the ALS group. Thus, no changes in the expression of p70S6K may result from a decreased activation of the Akt protein in the muscle of ALS animals.

Further, mTOR kinase 'levels' did not significantly change in the ALS skeletal muscle. To the best of our knowledge, this is the first report on mTOR protein levels in skeletal muscle in ALS mice. Similar trends in mTOR expression were reported earlier in ALS cortical neuron cells³¹. Proteome analysis confirmed the lack of changes in these protein levels (Fig. S5). The above observations indicate that the anti-atrophic effect of swim training is based on the inhibition of the FOXO3a/MuRF1 pathway and not on protein induction of the mTOR/p70S6K pathway. This agrees with the notion that disruption of the balance between protein synthesis and catabolism leads to muscle atrophy^{5,6}.

ALS causes progressive muscle atrophy, ultimately leading to death³². Accordingly, in the current study, ALS (SOD1 G93A) mice showed progressive muscle loss accompanied by weight loss. This confirmed earlier observations^{9,33}. In addition, to determine whether the muscle and body mass loss is accompanied by sarcolemma breakdown and muscle cell damage, we determined CK activity in the plasma of ALS mice. Changes in blood CK levels are related to general skeletal muscle cells damage associated with hypertrophy of remaining fibers as a result of the progressive secondary myopathy³⁴. The CK activity was elevated in the ALS TERMINAL untrained group as compared to other groups. However, the differences were not statistically significant.

Interestingly, plasma CK values are significantly elevated in most, but not all, ALS patients. For example, in one study, CK activities were elevated in 43% of patients (mean, 240 U/L; range, 59–1327 U/L). However, elevated CK levels did correlate with spinal somatic muscle weakness in that study. Ninety-three percent of patients with elevated CK levels observed spinal somatic muscle weakness as their major presenting symptom³⁵. There is also evidence of elevated serum CK levels in the early stage of sALS³⁶. Changes in the blood CK activities in patients with ALS were recently presented in a new perspective, with higher CK levels reported for an ALS model with a slowly progressing disease than in an ALS model with a fast-progressing disease³⁷. The study suggested that the slow-progressing mice progress slower because they have greater muscle mass and may counter disease mechanisms for more extended periods than the fast-progressing mice³⁷.

In the current study, we demonstrated that swim training reduces weight and muscle mass loss and is accompanied by insignificant drops in plasma CK activity. These changes were accompanied by an extended lifespan, with swim training reducing oxidative stress and improving the bioenergetics and muscle strength^{13,14}.

The findings of our study have to be considered in light of some limitations. Although SOD1 G93A mice are still a gold standard in preclinical studies of ALS disease, additional studies are needed to confirm the obtained results on other ALS models. Moreover, the effects of swim training on the organism are multidimensional. Thus, the influence of swimming might occur through psychological, physiological, and molecular mechanisms that should be taken into account in future studies.

In conclusion, the presented data suggest that insulin signaling is impaired in the atrophied skeletal muscle in ALS mice, with concomitant induction of proteolytic protein levels. Swim training partially reversed these changes. These findings shed light on the swim-induced retardation of the development of skeletal muscle atrophy in ALS, with possible practical implications for anti-cachexia approaches.

Methods

Animals. All experimental procedures which included minimizing the number of animals and their suffering were reviewed and approved by the 3rd Local Ethical Committee for Experiments on Animals in Gdansk (decision number 11/2013, 22 April 2013) and the Polish Ministry of the Environment (decision number 155/2012, 05 December 2012). Guidelines for the handling, use, and ethical treatment of laboratory animals based on European Union Directive 2010/63/E.U. were followed in all experiments. The study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

Transgenic male mice expressing human SOD1 with the G93A substitution, B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J (ALS mice) (five groups, $n = 7$ per group) and WT male mice B6SJL ($n = 7$) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The mice were housed in an environmentally controlled room (23 ± 1 °C, with a 12 h light/dark cycle) and received standard mice chow and water ad libitum. After acclimatization, the mice were randomly divided into the following groups, as previously described in^{13,14}: ALS BEFORE, untrained ALS mice with no visible signs of the disease; ALS ONSET, mice with first symptoms of the disease, untrained and trained (see below); and ALS TERMINAL, animals at the last stage of the disease, untrained and trained. Clinical score assessment³⁸ in the ALS mice was performed to establish the time of animals' scarification. Clinical score was assessed by an 8-point scale dependent on signs exhibited to identify the severity of the disease: 0 no evidence of disease; 1 shaking of the hindlimbs or splaying of the hindlimbs when suspended by the tail (an indication of weakness in the hindlimbs); 1.5 weakness in one hindlimb (compensation for footdrop); 2 change in gait; 2.5 extreme weakness in one hindlimb (inability to dorsiflex); 3 extreme weakness in both hindlimbs; 3.5 functional paralyzes in one hindlimb; 4 functional paralyzes in both hindlimbs but the animal can right itself in less than 20 s after being placed on its side; and 5 animal cannot right itself within 20 s after being placed on its side (endpoint, followed by euthanasia).

The mice were euthanized by cervical dislocation at the following time points: ALS BEFORE group at 10 weeks of age; ALS ONSET groups, at 16 weeks, when the first symptoms of the disease were apparent in untrained animals (clinical score—1); ALS TERMINAL groups, when the last stage of the disease was apparent in untrained ALS animals (clinical score—5) according to^{13,38}.

Swim training protocol. Starting at 70-day-old, animals in the ALS ONSET trained and ALS TERMINAL trained mouse groups underwent swim training, as described by Deforges et al.¹¹, with slight modifications¹³. Briefly, the swim training was conducted in a special pool with regulated water flow five times a week for 30 min. The water temperature was 30 °C, and the maximum flow speed was 5 L/min. At 105-day-old, the training frequency was reduced to three times a week. The exercise time and water flow were adapted to the individual aptitude of the ALS groups. The training was terminated at 115-day-old.

Body and tibialis anterior (TA) mass assessment. Body mass was assessed once a week in the morning. TA muscle samples were dissected at 4 °C at the end of the study and weighed to determine muscle atrophy. The data are presented as mg muscle per g of animal weight (mg/g)^{9,33}.

Tissue homogenization and lysate preparation. Following dissection, the TA muscle samples were frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until analysis. The samples were homogenized using the Bio-Plex Pro™ Cell Signaling Reagent kit (cat. no. 171-304006 M, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with minor modifications. Briefly, tissue (approximately 20 mg) was placed in a 1.5-mL Eppendorf tube and washed with 100 μ L of Cell Wash Buffer. After rinsing and draining, the material was cut and transferred to a 2-mL Eppendorf tube. Then, 200 μ L of Cell Lysis Buffer was added, and the sample was homogenized manually 20 times. The lysis buffer was prepared according to the manufacturer's instructions, but additionally contained a cocktail of protease (cat. no. P8340, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP™, PHOSS-RO Sigma Aldrich.), 10 μ L each per 1.02 mL of the final buffer volume. The lysate was then frozen at -70 °C and thawed at 30 °C, three times and re-homogenized 10 times. Finally, the material was centrifuged at 15,000 \times g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was decanted and frozen at -70 °C for further analysis. Protein concentration in the lysate was determined using the Bradford method.

Immunoblotting. Equal amounts of muscle lysates (50 μ g of protein per sample) were separated on 4–20% SDS-polyacrylamide gradient gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. The analysis procedure was performed according to⁹. The following antibodies were used: rabbit monoclonal IgG anti-p-FOXO3a (Ser253) (cat. no. ab154786, 1:1000; Abcam, Cambridge, Great Britain); rabbit polyclonal anti-p-Akt 1/2/3 (Ser473) (cat. no. sc-7985R, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-Akt 1/2/3 (cat. no. sc-8312, 1:600; Santa Cruz Biotechnology), anti-FOXO3a (cat. no. ab23683, 1:1000; Abcam), and anti-mTOR (cat. no. 2972, 1:1000; Cell Signaling, Beverly, MA, USA); mouse monoclonal IgG anti-MAFbx/Atrogin-1 (cat.

no. sc166806, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology) and anti-MuRF1 (cat. no. sc398608, 1:500; Santa Cruz Biotechnology). After washing (3×10 min) in $1 \times$ TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with gentle shaking with anti-rabbit IgG–peroxidase conjugate (cat. no. A9169, 1:25,000; Sigma Aldrich) and anti-mouse IgG–peroxidase conjugate (cat. no. A9044, 1:25,000; Sigma Aldrich). After blocking in a blocking buffer as mentioned above, immunoblots were detected and visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Pierce; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Changes in protein levels were assessed by densitometry of the immunoreactive bands and normalized to the total amount of protein in the samples transferred onto the membrane. Relative protein levels were analyzed and quantified using ChemiDoc image analysis system (Bio-Rad Laboratories, Inc.), as shown in Fig. S1. ALS group data were then normalized to the WT group data. The immunoblotting analyses were done for five randomly selected animals from each group.

Multiplex measurement of IGF-1, p70S6K, and p-p70S6K levels. Bio-Rad Bio-Plex Luminescence 200 multiplex assay system (Bio-Rad) was used to determine the levels of specific proteins of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/Akt pathway (IGF-1, p70S6K, and p-p70S6K), with actin as a reference. For the analysis, $10 \mu\text{g}$ of skeletal muscle lysate protein was used. The analysis procedure was performed according to manufacturer's recommendations. Data were collected and processed using the Bio-Plex Manager software (Bio-Rad). The results were normalized to the amount of actin in the samples.

Proteomic analysis. In some experiments, protein levels were determined using liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS) at the Thermo Fisher Center for Multiplexed Proteomics (Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Cambridge, MA, USA). The samples were prepared as previously described³⁹. Peptide fractions were analyzed using an LC–MS³ data collection strategy and an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Principal component analysis (PCA) was performed using the R Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), a free software environment for statistical computing and graphics to visualize the similarities and differences between the studied groups.

Blood sampling and creatine kinase (CK) measurements. After euthanasia, the blood was taken directly from the heart, collected into EDTA-containing tubes and centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min at 4°C . CK activity was measured in plasma samples at 37°C using a RANDOX CK-NAC assay (cat. no. CK522, Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) according to the manufacturer's instructions. The CK activity is expressed as U/L.

Data analysis. Statistical analyses were performed using the software package Statistica v. 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The normality of distribution and similarity of variances were tested to determine which statistical test should be used. The differences associated with disease progression and between ALS and WT groups were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) or Kruskal–Wallis test. If a difference was detected in these test models, the significance level was then determined using Tukey's post-hoc test. To verify the significance of small, swim training-associated changes (ONSET untrained vs. trained and TERMINAL untrained vs. trained), Student's *t*-test or Mann–Whitney U test was used. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors.

Received: 21 June 2021; Accepted: 11 October 2021

Published online: 22 October 2021

References

- Andersen, P. M. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **6**, 37–46. <https://doi.org/10.1007/s11910-996-0008-9> (2006).
- Wong, M. & Martin, L. J. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2284–2302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq106> (2010).
- Dobrowolny, G. *et al.* Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* **8**, 425–436. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.002> (2008).
- Dupuis, L. *et al.* Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS ONE* **4**, e5390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005390> (2009).
- Halon-Golabek, M. *et al.* hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabolism is mediated by impairment of Akt signalling pathway. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **9**, 557–569. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12283> (2018).
- Scicchitano, B. M., Dobrowolny, G., Sica, G. & Musaro, A. Molecular insights into muscle homeostasis, atrophy and wasting. *Curr. Genomics* **19**, 356–369. <https://doi.org/10.2174/1389202919666180101153911> (2018).
- Sanchez, A. M., Bernardi, H., Py, G. & Candau, R. B. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R956–969. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00187.2014> (2014).
- Kaspar, B. K., Frost, L. M., Christian, L., Umapathi, P. & Gage, F. H. Synergy of insulin-like growth factor-1 and exercise in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **57**, 649–655. <https://doi.org/10.1002/ana.20451> (2005).
- Halon, M. *et al.* Up-regulation of ferritin ubiquitination in skeletal muscle of transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Neuromusc. Disord.* **20**, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.08.014> (2010).
- Halon, M. *et al.* Changes in skeletal muscle iron metabolism outpace amyotrophic lateral sclerosis onset in transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Free Radic. Res.* **48**, 1363–1370. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.955484> (2014).
- Dehofges, S. *et al.* Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* **587**, 3561–3572. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169748> (2009).

12. Deseille, C. *et al.* Specific physical exercise improves energetic metabolism in the skeletal muscle of amyotrophic-lateral- sclerosis mice. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 332. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00332> (2017).
13. Flis, D. J. *et al.* Swim training modulates skeletal muscle energy metabolism, oxidative stress, and mitochondrial cholesterol content in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 5940748. <https://doi.org/10.1155/2018/5940748> (2018).
14. Flis, D. J. *et al.* Swim training modulates mouse skeletal muscle energy metabolism and ameliorates reduction in grip strength in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms20020233> (2019).
15. Ma, Z., Qi, J., Meng, S., Wen, B. & Zhang, J. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**, 2473–2486. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2685-9> (2013).
16. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A. & Goldberg, A. L. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198> (2001).
17. Bodine, S. C. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014–1019. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014> (2001).
18. Schiaffino, S. & Mammucari, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle* **1**, 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4> (2011).
19. Musaro, A. *et al.* Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* **27**, 195–200. <https://doi.org/10.1038/84839> (2001).
20. Leger, B. *et al.* Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogin-1. *FASEB J.* **20**, 583–585. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5249je> (2006).
21. Singh, K. *et al.* Superoxide anion radicals induce IGF-1 resistance through concomitant activation of PTP1B and PTEN. *EMBO Mol. Med.* **7**, 59–77. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404082> (2015).
22. Lai, K. M. *et al.* Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9295–9304. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9295-9304.2004> (2004).
23. Izumiya, Y. *et al.* Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab.* **7**, 159–172. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.003> (2008).
24. Sartori, R. *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1248–1257. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2009> (2009).
25. Mochalova, E. P., Belova, S. P., Mirzoev, T. M., Shenkman, B. S. & Nemirovskaya, T. L. Atrogin-1/MAFbx mRNA expression is regulated by histone deacetylase 1 in rat soleus muscle under hindlimb unloading. *Sci. Rep.* **9**, 10263. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46753-0> (2019).
26. Matsui, Y. Pathological state or cause of sarcopenia. *Clin. Calcium* **27**, 45–52 (2017).
27. Qiu, J. *et al.* Mechanistic role of reactive oxygen species and therapeutic potential of antioxidants in denervation- or fasting-induced skeletal muscle atrophy. *Front. Physiol.* **9**, 215. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00215> (2018).
28. Nave, B. T., Ouwens, M., Withers, D. J., Alessi, D. R. & Shepherd, P. R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: Identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* **344**(Pt 2), 427–431 (1999).
29. Sun, J. *et al.* Inhibition of p70 S6 kinase activity by A77 1726 induces autophagy and enhances the degradation of superoxide dismutase 1 (SOD1) protein aggregates. *Cell Death Dis.* **9**, 407. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0441-0> (2018).
30. Wagey, R., Pelech, S. L., Duronio, V. & Krieger, C. Phosphatidylinositol 3-kinase: Increased activity and protein level in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **71**, 716–722. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71020716.x> (1998).
31. Morimoto, N. *et al.* Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 protein. *Brain Res.* **1167**, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.045> (2007).
32. Verber, N. & Shaw, P. J. Biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: A review of new developments. *Curr. Opin. Neurol.* **33**, 662–668. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000854> (2020).
33. Derave, W. *et al.* Skeletal muscle properties in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis: Effects of creatine treatment. *Neurobiol. Dis.* **13**, 264–272. [https://doi.org/10.1016/s0969-9961\(03\)00041-x](https://doi.org/10.1016/s0969-9961(03)00041-x) (2003).
34. Schwartz, M. S., Sargeant, M. & Swash, M. Longitudinal fibre splitting in neurogenic muscular disorders—Its relation to the pathogenesis of “myopathic” change. *Brain J. Neurol.* **99**, 617–636. <https://doi.org/10.1093/brain/99.4.617> (1976).
35. Harrington, T. M., Cohen, M. D., Bartleson, J. D. & Ginsburg, W. W. Elevation of creatine kinase in amyotrophic lateral sclerosis. Potential confusion with polymyositis. *Arthritis Rheum.* **26**, 201–205. <https://doi.org/10.1002/art.1780260212> (1983).
36. Ito, D. *et al.* Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **266**, 2952–2961. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09507-6> (2019).
37. Ceccanti, M. *et al.* creatine kinase and progression rate in amyotrophic lateral sclerosis. *Cells* <https://doi.org/10.3390/cells9051174> (2020).
38. Hamadeh, M. J., Rodriguez, M. C., Kaczor, J. J. & Tarnopolsky, M. A. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle Nerve* **31**, 214–220. <https://doi.org/10.1002/mus.20255> (2005).
39. Weekes, M. P. *et al.* Quantitative temporal viromics: An approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell* **157**, 1460–1472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.028> (2014).

Acknowledgements

Special thanks to Dr. Robert A. Olek for constructive discussion and comments on the manuscript.

Author contributions

Conceptualization, K.C., D.J.F. and W.Z.; Formal analysis, K.C., D.J.F., K.D., J.J.K., E.C., M.H.-G., M.R.W., J.A. and W.Z.; Funding acquisition, W.Z.; Investigation, K.C., D.J.F., K.D., J.J.K., E.C. and W.Z.; Supervision, D.J.F., J.J.K. and W.Z.; Validation, K.C., D.J.F., K.D. and J.J.K.; Visualization, K.C., D.J.F. and W.Z.; Writing—original draft, K.C., D.J.F. and W.Z.; Writing—review & editing, K.D., J.J.K., E.C., M.H.-G., J.A. and M.R.W. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by grants from the National Science Centre, Poland (DEC-2013/09/NZ7/02538), and the Polish Ministry of Science and Higher Education (DSRiK/2019). MRW was supported by the Polish National Science Centre grant (UMO-2014/15/B/NZ1/00490).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00319-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.J.F. or W.Z.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021



Article

Swim Training Affects on Muscle Lactate Metabolism, Nicotinamide Adenine Dinucleotides Concentration, and the Activity of NADH Shuttle Enzymes in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Karol Cieminski ¹, Damian Jozef Flis ^{2,*}, Katarzyna Patrycja Dzik ³, Jan Jacek Kaczor ³,
Mariusz Roman Wieckowski ⁴, Jędrzej Antosiewicz ⁵ and Wiesław Ziolkowski ^{6,*}

- ¹ Doctoral School, Poznan University of Physical Education, Królowej Jadwigi 27/39 Street, 61-871 Poznan, Poland
 - ² Department of Pharmaceutical Pathophysiology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Gdansk Dębinki 7 Street, 80-211 Gdansk, Poland
 - ³ Department of Animal and Human Physiology, University of Gdansk, J. Bazyńskiego 8 Street, 80-308 Gdansk, Poland
 - ⁴ Laboratory of Mitochondrial Biology and Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, L. Pasteura 3 Street, 02-093 Warsaw, Poland
 - ⁵ Department of Bioenergetics and Physiology of Exercise, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdansk, Dębinki 1 Street, 80-211 Gdansk, Poland
 - ⁶ Department of Rehabilitation Medicine, Faculty of Health Sciences, Medical University of Gdansk, Aleja Zwycięstwa 30, 80-219 Gdansk, Poland
- * Correspondence: damian.flis@gumed.edu.pl (D.J.F.); wieslaw.ziolkowski@gumed.edu.pl (W.Z.);
Tel.: +48-58-349-1518 (D.J.F.); Tel.: +48-58-347-1072 (W.Z.)



Citation: Cieminski, K.; Flis, D.J.; Dzik, K.P.; Kaczor, J.J.; Wieckowski, M.R.; Antosiewicz, J.; Ziolkowski, W. Swim Training Affects on Muscle Lactate Metabolism, Nicotinamide Adenine Dinucleotides Concentration, and the Activity of NADH Shuttle Enzymes in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11504. <https://doi.org/10.3390/ijms231911504>

Academic Editor: Viviana Moresi

Received: 12 August 2022

Accepted: 23 September 2022

Published: 29 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In this study, we aim to verify whether swim training can improve lactate metabolism, NAD⁺ and NADH levels, as well as modify the activity of glycolytic and NADH shuttle enzymes and monocarboxylate transporters (MCTs) in skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice. ALS mice (SOD1G93A) (*n* = 7 per group) were analyzed before the onset of ALS, at first disease symptoms (trained and untrained), and the last stage of disease (trained and untrained), and then compared with a wild-type (WT) group of mice. The blood lactate and the skeletal muscle concentration of lactate, NAD⁺ and NADH, MCT1 and MCT4 protein levels, as well as lactate dehydrogenase (LDH) and malate dehydrogenase (MDH) activities in skeletal muscle were determined by fluorometric, Western blotting, liquid chromatography-MS3 spectrometry, and spectrometric methods. In the untrained terminal ALS group, there were decreased blood lactate levels (*p* < 0.001) and increased skeletal muscle lactate levels (*p* < 0.05) as compared with a WT group of mice. The amount of nicotinamide adenine dinucleotides in the ALS groups were also significantly reduced as well as LDH activity and the level of MCT1. Swim training increased lactate levels in the blood (*p* < 0.05 vs. ALS TERMINAL untrained). In addition, cytosolic MDH activity and the cMDH/LDH 2.1 ratio were significantly higher in trained vs. untrained mice (*p* < 0.05). The data indicate significant dysfunction of lactate metabolism in ALS mice, associated with a reduction in muscle anaerobic metabolism and NADH transporting enzymes, as well as swim-induced compensation of energy demands in the ALS mice.

Keywords: ALS; neurodegeneration; muscle metabolism; exercise; nicotinamide adenine nucleotides; monocarboxylate transporters

1. Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an incurable, chronic neurodegenerative disease characterized by the selective death of motoneurons in the motor cortex, brainstem, and spinal cord, which control any muscle action [1]. Approximately 90% of ALS cases are

sporadic (sALS), with unknown etiology, and the remaining are genetically determined (fALS). However, in clinical terms, both forms are identical.

Significant reductions in aerobic and anaerobic energy metabolism, enhanced oxidative stress, increased proteolytic proteins, and atrophy of muscle fibers in skeletal muscle of ALS mice have been observed [2–9].

The disruption of skeletal muscle glycolytic metabolism in ALS mice develops as the disease progresses. The influence of swim training on lactate metabolism is still an unexplored phenomenon in the skeletal muscles of individuals with ALS.

Lactate (LA) is considered to be a waste product of the Embden–Meyerhof–Parnas pathway, known as glycolysis [10]. A reduction in pyruvate to LA, with the participation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), is catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH) (pyruvate + NADH + H⁺ ↔ Lactate + NAD⁺) (see graphical abstract). However, NADH derived from glycolysis can alternatively react with oxaloacetate (OAA) in the cytosol (cytoplasmic malate dehydrogenase (cMDH): oxaloacetate + NADH + H⁺ → Malate + NAD⁺) and under the malate form, hydrogen can be transported into the mitochondria by NADH transport enzymes (the malate-aspartate shuttle system (MAS)) [11]. In this situation, pyruvate does not turn into LA but preferentially enters the mitochondria, where it is oxidized to CO₂ and H₂O [12]. This mechanism of NADH oxidation can be identified by the ratio of cMDH to LDH activity. The higher the ratio of these two enzymes, the greater the role of MAS in the transport of NADH to the mitochondria and the recovery of the NAD⁺ pool in this way. As mentioned earlier, LA in skeletal muscle cells can be converted to pyruvate and further oxidized in the mitochondria (see graphical abstract). The conversion of LA to pyruvate is also catalyzed by lactate dehydrogenase (LDH) (LA + NAD⁺ → pyruvate + NADH + H⁺) [13].

It is worth noting that nicotinamide adenine dinucleotides are substrates or products of reactions catalyzed by dehydrogenases and also critical compounds in the course of ALS disease. Enhancing NAD⁺ availability moderately increases hSOD1G93A mouse survival but also delays motor neuron degeneration, decreases markers of neuroinflammation in the spinal cord, and modifies muscle metabolism [14].

LA can also be exported out of cells through monocarboxylate transporters (MCTs) encoded by the SLC16A gene family [15]. Skeletal muscle contains MCT1 and MCT4 [16]. MCTs are the essential transporters that regulate LA flux across the plasma membrane. MCT1 is ubiquitously expressed in many tissues, whereas MCT4 is present primarily in skeletal muscle [17]. Interestingly, it has been found that inhibiting MCT4 (MCT4^{-/-} mice) did not change the normal muscle morphology and contractility but induced an exercise intolerant phenotype and a significant structural degeneration of the neuromuscular junctions (NMJs). Therefore the idea that disruption of the lactate shuttle impacts motor function and destabilizes the motor unit [18] may strengthen the “lactate” hypothesis of amyotrophic lateral sclerosis proposed by VadakkadathMeethal and Atwood in 2012 [19] seems to be very interesting.

Authors have proposed that dysfunction of the adenosine triphosphate (ATP)-dependent muscle neuronal lactate shuttle (MNLS) at the NMJ that regulates the flow of LA from muscle to neurons and vice versa may be a critical factor in the pathogenesis of ALS. Failure of the MNLS due to respiratory chain dysfunction was proposed to result in LA toxicity and degeneration of nerve endings at the NMJ leading to nerve terminus dysfunction from the muscle cell. Indeed, our previous studies have shown significant decreases in oxidative metabolism in the skeletal muscles of ALS animals, especially evident during the terminal phase of the disease [5]. In the final stage of the disease, significant decreases in glycolytic enzyme activities (LDH) were also observed [5]. However, interestingly, in the spinal cord, LDH activity, after dropping at the first onset of the disease, increases its activity during the terminal stage of ALS [20]. However, it has not been investigated if changes in LDH activity are accompanied by changes in muscle and blood LA levels, or the effects of swim training on LA metabolism, the amount of NAD⁺ and NADH muscle nucleotides, as well

as the activities of NADH shuttle enzymes in skeletal muscle of ALS mice. This change may underlie muscle degeneration in ALS.

The aim of this study was to determine if ALS affected lactate concentration in blood and skeletal muscle and the amount of lactate transporters (MCT1 and MCT4) during the disease progression. We also investigated if changes in LDH activity were associated with the amount of NAD⁺ and NADH muscle nucleotides and the activities of NADH shuttle enzymes in the skeletal muscle of ALS mice. Here, we hypothesize that ALS modulates LA metabolism, the amount of NAD⁺ and NADH skeletal muscle nucleotides, and the activities of MAS enzymes in the skeletal muscle of ALS mice. Furthermore, swim training at least partially reverses changes in LA metabolism in the tibialis anterior (TA) skeletal muscle.

2. Results

2.1. Effects of ALS Disease Progression and Swim Training on Skeletal Muscle LDH 2.1 and LDH 0.3 Activities and Skeletal Muscle and Blood Lactate Concentrations

LDH 2.1 activity was significantly lower in both (trained and untrained) ONSET and TERMINAL groups of mice (643.65 ± 45.77 , 679.57 ± 35.61 , 588.49 ± 30.93 , and 652.54 ± 36.87 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein in ONSET untrained, ONSET trained, TERMINAL untrained, and TERMINAL trained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice (944.08 ± 31.09 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). Further, LDH 2.1 activity was significantly lower in the TERMINAL untrained group than in the BEFORE group (805.76 ± 59.08 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Figure 1A).

The LDH 0.3 activity was significantly lower in both (trained and untrained) ONSET and TERMINAL groups of mice (738.27 ± 46.08 , 720.01 ± 44.88 , 679.14 ± 33.27 , and 784.37 ± 53.09 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein in ONSET untrained, ONSET trained, TERMINAL untrained, and TERMINAL trained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice (1033.42 ± 34.44 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). Further, LDH 0.3 activity was significantly lower in the TERMINAL untrained group than in the BEFORE group (895.11 ± 72.08 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Figure 1B).

Based on the method described by [21], the LDH M and H subunit activities and total LDH and the ratio of M and H subunits were calculated.

The total LDH activity was significantly lower in both (trained and untrained) ONSET and TERMINAL groups of mice (779.45 ± 45.73 , 791.60 ± 48.12 , 706.20 ± 35.60 , and 799.19 ± 37.04 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein in ONSET untrained, ONSET trained, TERMINAL untrained and TERMINAL trained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice (1106.56 ± 35.12 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein). Further, total LDH activity was significantly lower in the TERMINAL untrained group than in the BEFORE group (948.82 ± 72.75 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Figure S1A).

The LDH M subunit activity was significantly lower in both (trained and untrained) TERMINAL groups of mice (117.66 ± 20.97 and 166.36 ± 22.93 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein in TERMINAL untrained and TERMINAL trained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice (294.13 ± 36.64 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Figure S1B).

The LDH H subunit activity was significantly lower in trained ONSET and untrained TERMINAL groups of mice (560.15 ± 49.39 and 588.54 ± 30.14 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein in ONSET trained and TERMINAL untrained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice (812.44 ± 42.74 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) (Figure S1C).

There were no significant changes in the LDH H to M subunit activity ratio. However, this ratio tended to increase in the TERMINAL untrained group of mice (7.00 ± 1.66) as compared with those in the WT (3.36 ± 0.66 , $p = 0.091$), BEFORE (3.31 ± 0.45 , $p = 0.083$), and ONSET trained (3.21 ± 0.78 , $p = 0.071$) groups of mice (Figure S1D).

The LA concentration in the blood of mice was significantly lower in the TERMINAL untrained group of mice (3.08 ± 0.29 mmol/L) than that in the WT group of mice (6.11 ± 0.57 mmol/L). Further, blood LA concentration was significantly lower in the TERMINAL untrained group than in the ONSET untrained group (5.65 ± 0.35 mmol/L). There

was also a significantly higher blood LA concentration after training at the terminal stage of the disease (4.63 ± 0.23 mmol/L) than in TERMINAL untrained group of mice (Figure 1C).

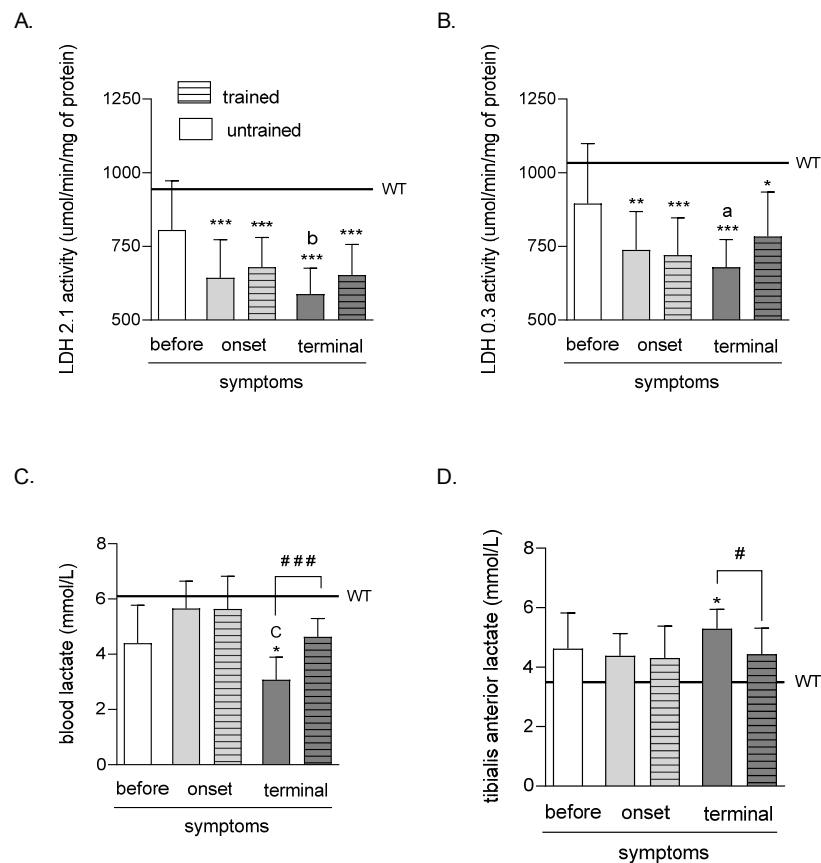


Figure 1. Effects of ALS disease progression and swim training on skeletal muscle LDH 2.1 and LDH 0.3 activities and skeletal muscle and blood LA concentration. LDH 2.1 (A) and LDH 0.3 (B) activities were measured in the tibialis anterior muscle of mice; LA concentration was measured in the blood (C) and the tibialis anterior muscle of mice (D). There were significant differences between the groups: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. WT group of mice, ^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ vs. BEFORE group, ^C $p < 0.001$ vs. ONSET group (Tukey's post-hoc test), # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ between indicated group (Student's *t*-test). The data are presented as the means \pm SEM ($n = 7$ in each group).

The LA concentration in the TA muscle of mice was significantly higher in the TERMINAL untrained group of mice (5.30 ± 0.23 mmol/L) than that in the WT group of mice (3.49 ± 0.34 mmol/L). Further, there was a significantly lower TA muscle LA concentration after training at the terminal stage of the disease (4.43 ± 0.31 mmol/L) than that in TERMINAL untrained group of mice (Figure 1D).

2.2. Effects of ALS Disease Progression and Swim Training on Skeletal Muscle Amounts of Total Nicotinamide Adenine Dinucleotides (NAD⁺ and NADH), NAD⁺, NADH, and the NAD⁺/NADH Ratio

The total amounts of TA muscle nicotinamide adenine dinucleotides (NAD⁺ and NADH) were significantly lower in both ONSET and TERMINAL untrained groups (1.51 ± 0.22 and 1.45 ± 0.13 μ M, respectively) than that in the WT group of mice (3.04 ± 0.31 μ M). Swim training did not significantly increase the analyzed coenzyme amounts in both groups

(2.28 ± 0.42 and $1.94 \pm 0.28 \mu\text{M}$ in ONSET and TERMINAL trained groups, respectively) (Figure 2A).

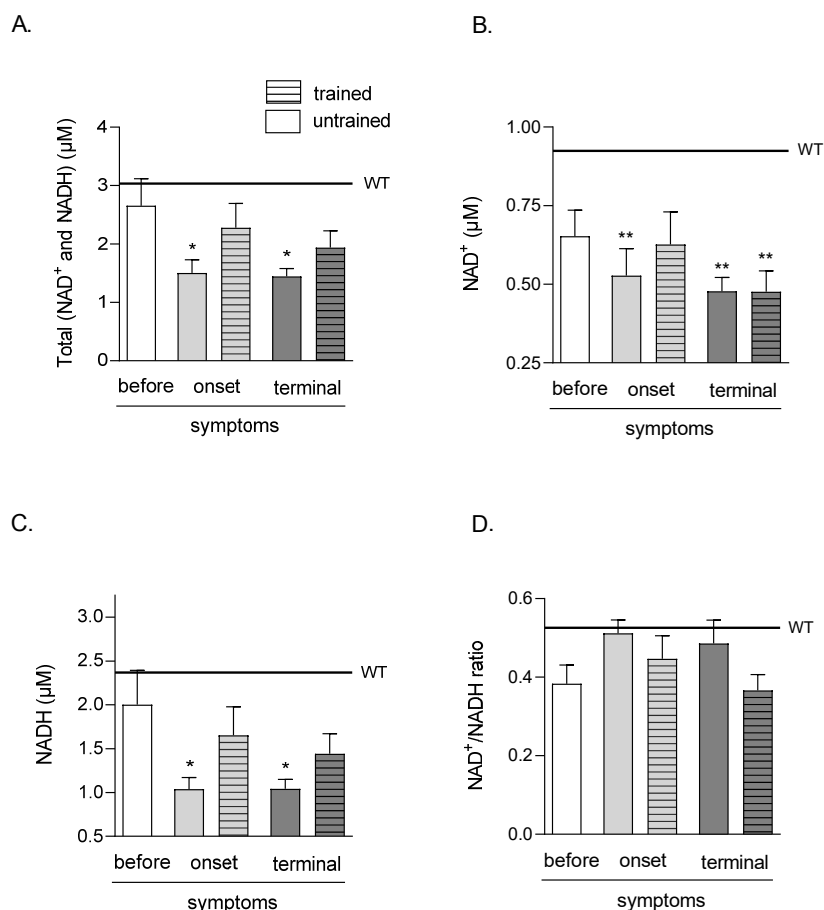


Figure 2. Effects of ALS disease progression and swim training on skeletal muscle amounts of total (NAD⁺ and NADH), NAD⁺, NADH, and NAD⁺/NADH ratio. Total (NAD⁺ and NADH) (A), NAD⁺ (B), NADH (C) NAD⁺/NADH ratio (D) were measured in the tibialis anterior muscle of mice. There were significant differences between the groups: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. WT group of mice (Tukey's post hoc test). The data are presented as the means \pm SEM ($n = 6$ in each group).

The amounts of NAD⁺ in TA muscle were significantly lower in ONSET untrained and both TERMINAL (untrained and trained) groups (0.53 ± 0.08 , 0.48 ± 0.04 , and $0.48 \pm 0.07 \mu\text{M}$ in ONSET untrained, TERMINAL untrained and trained groups of mice, respectively) than in the WT group of mice ($0.92 \pm 0.04 \mu\text{M}$) (Figure 2B).

NADH in the TA muscle was significantly lower in both ONSET and TERMINAL untrained groups of mice (1.04 ± 0.13 and $1.04 \pm 0.11 \mu\text{M}$, respectively) than that in the WT group of mice ($2.37 \pm 0.36 \mu\text{M}$). Swim training did not significantly increase NADH in both groups of mice (1.65 ± 0.32 and $1.44 \pm 0.23 \mu\text{M}$ in ONSET and TERMINAL trained groups, respectively) (Figure 2C).

There were no NAD⁺/NADH ratio changes in all analyzed groups (Figure 2D).

2.3. Effects of ALS Disease Progression and Swim Training on Skeletal Muscle MDH, mMDH, cMDH Activities, and cMDH/LDH 2.1 Ratio

There were no significant differences in all analyzed groups in TA muscle MDH and mMDH activities (Figure 3A,B). Further, there were significant increases in cMDH activity after swim training in the terminal groups (735.32 ± 91.81 and 1107.68 ± 88.97 nmol/min/mg of protein in untrained and trained TERMINAL groups, respectively) (Figure 3C).

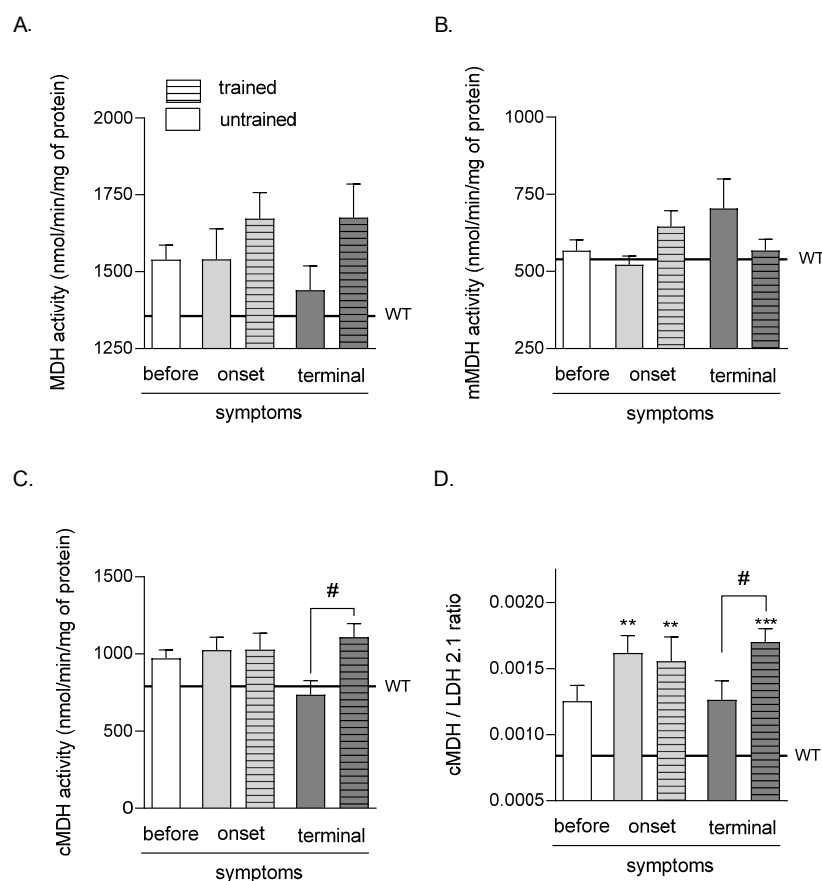


Figure 3. Effects of ALS disease progression and swim training on skeletal muscle MDH, mMDH, cMDH activities, and the cMDH/LDH2.1 ratio. MDH activity (A), mMDH activity (B), cMDH activity (C), and the cMDH/LDH2.1 ratio (D) were measured in the tibialis anterior muscle of mice. There were significant differences between the groups: ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs. WT group of mice (Tukey's post hoc test), # $p < 0.05$ between indicated group (Student's t -test). The data are presented as the means \pm SEM ($n = 7$ in each group).

The values of the cMDH/LDH 2.1 ratio were significantly higher in both (trained and untrained) ONSET and TERMINAL trained groups of mice (0.0016 ± 0.00013 , 0.0015 ± 0.00018 , and 0.0017 ± 0.0001 in ONSET untrained, ONSET trained, and TERMINAL trained groups of mice, respectively) than that in the WT mice group of mice (0.001 ± 0.00004). Further, the cMDH/LDH 2.1 ratio was significantly lower in the TERMINAL untrained group (0.0013 ± 0.00014) than that in the TERMINAL trained group (Figure 3D).

2.4. Effects of ALS Disease Progression and Swim Training on Skeletal Muscle MCT1 and MCT4 Protein Levels

The MCT1 protein level was significantly lower in the ONSET trained group of mice (0.13 ± 0.04 A.U.) than those in the WT (0.64 ± 0.15 A.U.) and BEFORE (0.56 ± 0.02 A.U.) groups of mice (Figure 4A).

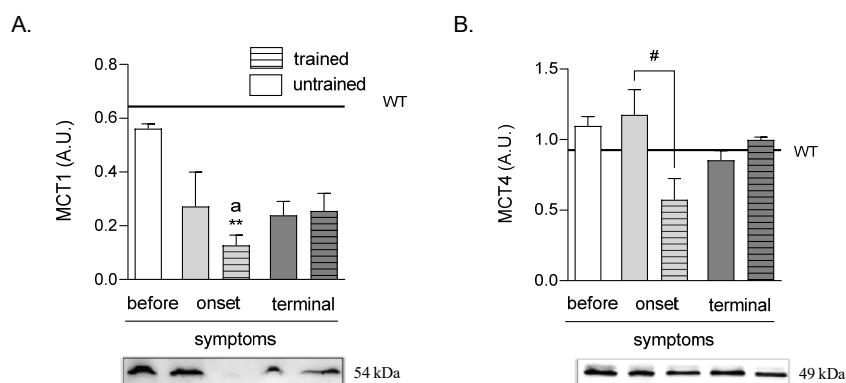


Figure 4. Effects of ALS disease progression and swim training on skeletal muscle MCT1 and MCT4 protein levels. MCT1 (A) and MCT4 (B) protein levels were measured in the tibialis anterior muscle of mice. There were significant differences between the groups: ** $p < 0.01$ vs. WT group of mice, ^a $p < 0.05$ vs. BEFORE group (Tukey's post-hoc test), # $p < 0.05$ between indicated group (Student's *t*-test). The data are presented as the means \pm SEM ($n = 3$ in each group).

There were no changes in MCT4 protein levels in all ALS groups as compared with the WT group of mice. Further, swim training at the ONSET stage of the disease (0.58 ± 0.15 A.U.) induced a lowering of MCT4 protein level as compared with the ONSET untrained group (1.18 ± 0.18 A.U.). There was also a tendency of an increased MCT4 protein level at the terminal stage of the disease from 0.85 ± 0.07 A.U. in the TERMINAL untrained to 1.00 ± 0.01 A.U. in the TERMINAL trained groups of mice ($p = 0.088$) (Figure 4B).

2.5. Effects of Swim Training on the Glycolysis and NADH Shuttle Enzyme Proteomic Profiles of ALS Mice Skeletal Muscle

To investigate the effect of swim training on the glycolysis and NADH shuttle enzyme proteomic profiles, we took into consideration 16 proteins identified in the proteomic analysis that were related to the glycolysis process, i.e., HXK1, HXK2, G6PI, K6PF, ALDOA, TPIS, GAPDH, PGK1, PGAM2, ENOA, ENOB, B0QZL1, KPYM, KPYM1, E9Q509, and LDHA. PCA enabled the linear transformation of the 16 variables (the levels of individual above-listed proteins) into a two-dimensional space, simultaneously retaining the maximum amount of information about individual variables taken for the analysis. The newly created PCA variables, PC1 and PC2, indicated possible differences in the "glycolysis proteomic profiles" among the BEFORE, TERMINAL untrained, and TERMINAL trained groups (Figure 5A). Much better results were obtained using the three newly created PCA variables (PC1, PC2, and PC3), i.e., 3D graphs from above listed 16 identified proteins. We found that the BEFORE glycolytic signature (fingerprint created based on the proteomic profile) seemed to be different from those obtained for the TERMINAL untrained and TERMINAL trained groups. Interestingly, a similar analysis performed for the four identified in the proteome NADH shuttle enzymes (cASPAT, mASPAT, cMDH, and mMDH) revealed no differences between the obtained profiles (Figure 6A,B). The lack of differences in the profiles of cASPAT, mASPAT, cMDH, and mMDH means that swim training has no effect on the level of NADH shuttle enzymes when they are analyzed globally. A separate analysis of individual proteins also revealed any changes in the level of investigated proteins. Moreover,

the unchanged levels of mMDH and cMDH support the lack of differences in the measured (total) MDH activity (Figure 3A). The increased activity of cMDH in the TERMINAL trained mice as compared with the untrained counterparts can not be explained by the changes in the level of cMDH level, which is stable, based on the proteomic analysis.

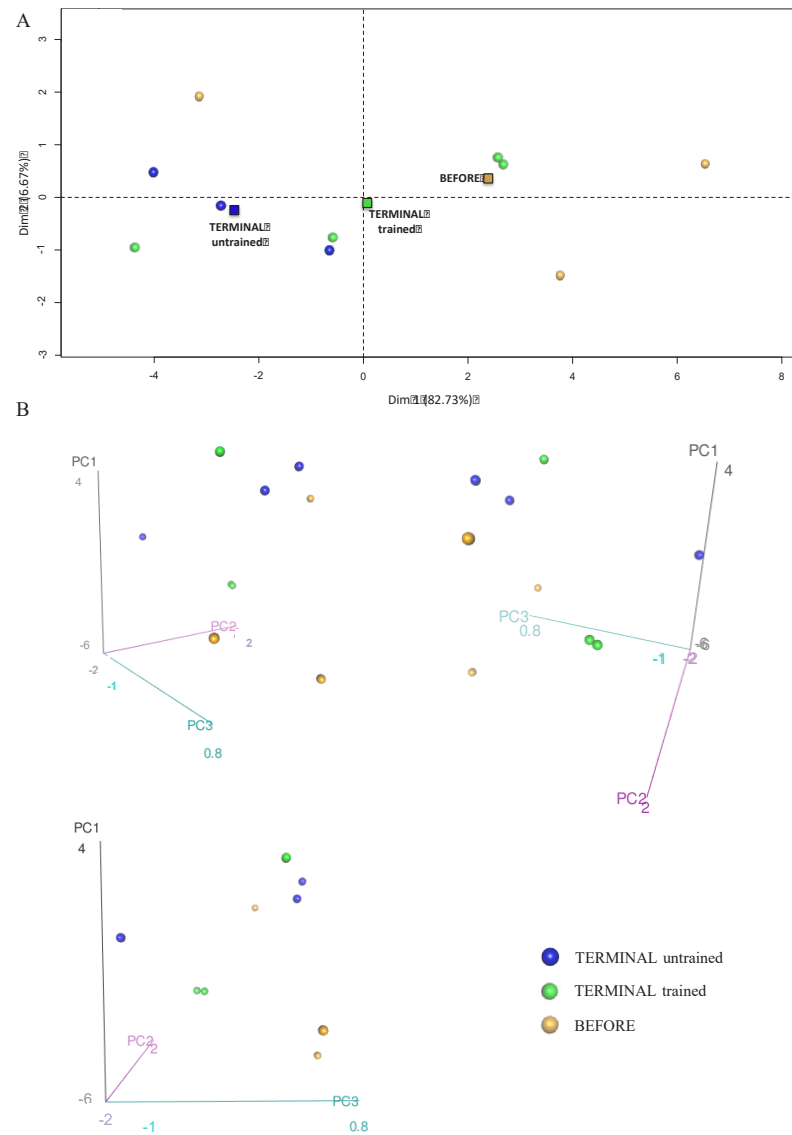


Figure 5. Principal component analysis showing differences in the glycolysis proteome profiles of the BEFORE, TERMINAL untrained, and TERMINAL trained groups: (A) The 2D graph of variables PC1 and PC2 created using a PCA based on the level of 16 identified proteins involved in glycolysis measured in TA muscle of ALS mice; (B) the 3D graphs of variables PC1, PC2, and PC3 created using a PCA based on the level of 16 identified proteins involved in glycolysis measured in the TA muscle of ALS mice. 3D individual graphs show the view from a different angle on the same distribution of events in the 3D space. The data are presented as the means (squares) and individual results (dots) ($n = 3$ in each group).

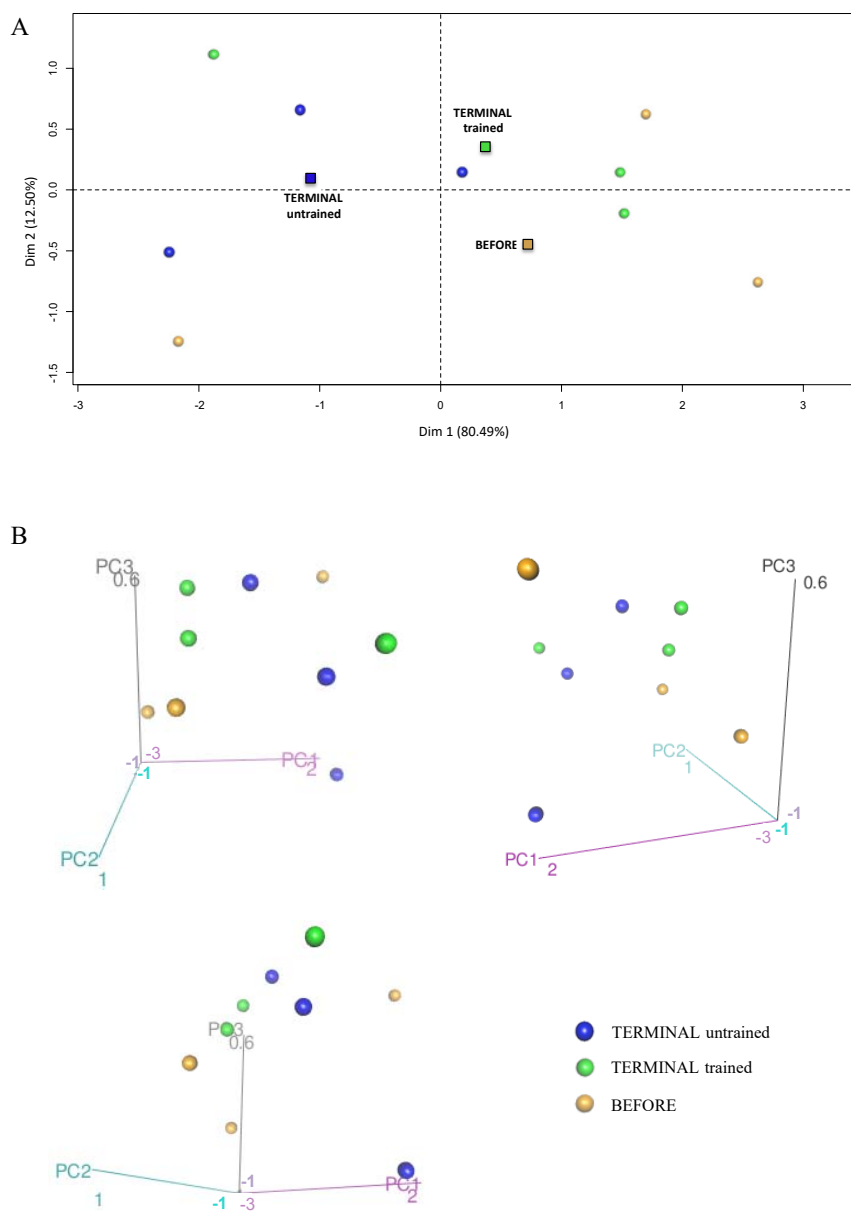


Figure 6. Principal component analysis presenting the profile of NADH shuttle enzymes (cASPAT, mASPAT, cMDH, and mMDH) in the skeletal muscle of the BEFORE, TERMINAL untrained, and TERMINAL trained mice: (A) The 2D graph of variables PC1 and PC2 created using PCA based on the level of 4 identified NADH shuttles enzymes (MAS) measured in ALS mice samples; (B) the 3D graphs of variables PC1, PC2, and PC3 created using PCA based on the level of 4 identified NADH shuttles enzymes (MAS) measured in ALS mice samples. 3D individual graphs show the view from a different angle on the same distribution of events in the 3D space. The data are presented as the means (squares) and individual results (dots) ($n = 3$ in each group).

3. Discussion

3.1. Effect of ALS Disease on Lactate Metabolism

An important, although unexpected and challenging to explain, phenomenon observed in our study is the discrepancy between the accumulation of LA in TA muscle and the activity of the LDH enzyme as an indicator of the glycolytic pathway in a group of ALS mice during the terminal stage of the disease. Generally, first, increased LA concentration in the skeletal muscles results in greater LA production, thus, accelerating the glycolytic pathway. Second, it may be caused by a disruption in the LA transport into and out of the muscle cells. Third, it may result from dysfunction in LA oxidation in skeletal muscles. Fourth, it appears that it may be related to the phenomenon of skeletal muscle damage, as discussed below.

However, the accumulation of LA in TA muscle in ALS mice is intriguing because of the lower activity of the LDH 2.1 enzyme, which is responsible for the production of lactic acid in muscle cells. Our previous studies that used the thigh muscle also documented a decrease in LDH 2.1 and LDH 0.3 activities, but we did not link this to lactate metabolism or investigate the reason for a decrease in these activities. Meanwhile, another team also documented the reduced activities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in the skeletal muscles of ALS mice [3]. The changes observed in LDH activity and glycolytic protein proteome analysis suggested that the dysfunction in the glycolytic process was a crucial variable during ALS progression in skeletal muscle. In order to investigate the reasons for glycolysis inhibition, we decided to measure the concentration of NAD⁺ and NADH nucleotides. As shown, the activity of GAPDH, the key glycolytic enzyme, depends on the availability of the NAD⁺ pool. NAD⁺ limitation inhibits the activity of GAPDH and the course of glycolysis [22]. Interestingly, the concentrations of the NAD⁺ and NADH nucleotide pools turned out to be significantly lower in ALS mice from the first symptoms of ALS than in mice during the terminal stage of the disease. Similarly, the concentration of NAD⁺ alone was most reduced there, which may explain the reduced activities of glycolytic enzymes, including LDH, in the skeletal muscle of ALS mice.

There are two mechanisms to rebuild the concentration of NAD⁺ in muscle cells. The first is the oxidation of NADH to NAD⁺ in a reaction catalyzed by M-LDH. Because we observed reduced activity of this enzyme in skeletal muscle in ALS mice, we decided to investigate an alternative route of NAD⁺ recovery, the activity of NADH transporting enzymes, including malate dehydrogenase (total, mMDH, and cMDH). cMDH competes with LDH 2.1 for NADH and, at the same time, indirectly interacts with this enzyme because increasing the cytosolic NAD⁺ pool in muscle cells creates a chance to accelerate the glycolytic pathway. However, the lowest cMDH activities in TA muscle seen in ALS mice during the terminal stage of the disease indicate a breakdown of this alternative pathway. Therefore, these results suggest that the lack of a mechanism to restore the NAD⁺ pool may inhibit glycolysis in the TA muscle of ALS mice. Inhibition of glycolysis in mice with ALS contradicts the explanation for the increased LA concentration in TA muscle.

The second explanation for the observed changes relates to the potential disruption in LA transport through the sarcolemma. As mentioned earlier, the MCT1 and MCT4 transporters in skeletal muscle are responsible for LA uptake from the circulation and LA extrusion out of muscle cells, where lactate uptake from the circulation is highly correlated with the MCT1 content in muscles [17]. However, reduced amounts of MCT1 protein are seen in both of the groups of ALS mice (ONSET and TERMINAL). It has been documented that MCT1 expression correlates highly with oxidative metabolism [17,23]. MCT1 expression also increases due to training or chronic electrical stimulation of rat hindlimb muscles [17,24,25] and decreases, for example, due to the denervation of rat hind limb muscles [26], which indirectly relates to the course of ALS disease. Therefore, our results may indicate that decreases in the contractile activity of skeletal muscles, progressing with the development of the disease, may contribute to a decrease in the expression of MCT1 protein.

The deletion of MCT4 does not change the normal muscle morphology and contractility but does induce a significant structural degeneration of NMJ [18]. Therefore, we decided to investigate MCT4 protein expression in the TA muscle of ALS mice. Contrary to expectations, we did not observe differences in the expression of this protein between the groups of ALS mice nor between the groups of ALS and control mice. Moreover, MCT4 is responsible for LA efflux from muscle cells [17]. Thus, the lack of visible changes in MCT4 protein concentrations in the TA muscles of ALS mice may indicate a different pathomechanism responsible for LA accumulation in these animals. However, the lack of changes in the amount of MCT4 does not necessarily explain the activity of this transporter, which, despite the unchanged amount, may not function properly, which requires further study. Inhibition of MCT1 and MCT4 increases the amount of LA in the muscle [27]. This dysfunction of the LA transport system probably explains the higher LA concentration in the skeletal muscle of ALS mice.

Therefore, we set out to investigate an alternative pathway of muscle LA degradation and measure the activity of the LDH 0.3 enzyme, characteristic of the H4 enzyme subunit, which converts lactate to pyruvate, enabling its further oxidation in the mitochondria to CO₂ and H₂O. Interestingly, the lowest activities of this enzyme were in the TA muscle of the terminal group of ALS mice, which also had the highest accumulation of LA. Thus, the decreased activity of the LDH 0.3 enzyme seems to be a significant factor responsible for the disruption of LA metabolism by limiting the possibility of LA oxidation in muscle cells.

Fourth, the last possibility is leakage of the LDH enzyme due to damage to the muscle cell membranes in terminal ALS mice. Our blood creatine kinase (CK) activity results confirm this possibility, showing the greatest muscle damage in ALS mice at this stage [8].

3.2. Effect of Swim Training on Lactate Metabolism in ALS Mice

Our research and other teams have shown that swim training could bring many benefits in a mouse model of ALS disease, including extending the lifespan of ALS mice [5,28]. We have demonstrated, among others, that it reduced body weight loss, skeletal muscle mass, and oxidative stress, and it improved muscle bioenergetics [4,5,8]. Moreover, Desseille et al. showed that swim training reduced drops in blood LA concentrations (2017), similar to the results of our research. However, so far, the effect of training on skeletal muscle LA metabolism has not been studied. Contrary to expectations, swim training did not significantly affect the MCT 1 and MCT 4 transport protein levels. This proved that the explanation of changes in LA concentrations in skeletal muscles should be associated with the possibility of LA oxidation. Swim training partially reversed the changes in LA concentrations in ALS mice by increasing blood LA concentrations and decreasing skeletal muscle LA concentrations in terminal ALS mice. Interestingly, although not statistically significant, these changes were accompanied by increases in the activities of both LDH 2.1 and LDH 0.3 enzymes, responsible for the production and oxidation of LA in TA muscle. Although not statistically significant, an upward trend was also observed in the NAD⁺ and NADH nucleotide pools and NADH itself after training in both early-symptomatic and terminal ALS mice. Increasing the pool of nucleotides has been shown to be beneficial for cellular metabolism and the course of ALS disease as it may accelerate glycolysis and slow down the disease's negative symptoms, as mentioned above [14,22]. Significant effects of swim training were visible in the case of the cMDH enzyme, which, alternatively to LDH 2.1, is responsible for the oxidation of NADH generated during glycolysis and the restoration of NAD⁺. It seems that this enzyme, along with mMDH, especially during the terminal stage of ALS disease, becomes alternative protection of the nucleotide pool and a source of additional ATP molecules generated on the respiratory chain in mitochondria in skeletal muscles. The cMDH/LDH 2.1 ratio confirmed the increasing role of cMDH as the disease progresses. The results of total MDH and its isoform activities differed from those obtained in the thigh muscle of mice with the first symptoms of ALS [4]. These differences may result from differences in the muscle fiber type composition between these muscles [29–31]. Another explanation for these differences may be the greater hyperloco-

motion of these mice, which is seen early in life until the first symptoms of the disease appear, i.e., around 16 weeks of age [20]. The observed changes in the glycolysis process are in line with proteomic analysis; however, the unchanged levels of mMDH and cMDH support the lack of differences in the measured (total) MDH activity (Figure 3A). The increased activity of cMDH in TERMINAL trained mice as compared with the untrained counterparts can not be explained by the changes in the level of cMDH, which was stable, based on the proteomic analysis.

Although SOD1 G93A mice are still a gold standard in preclinical studies of ALS disease, additional studies are needed to confirm the obtained results on other ALS models that also include other gene mutations associated with ALS. Searching for new mechanisms induced by swim training to improve ALS lifespan and quality of life might help treat ALS and other neuromuscular diseases.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

Transgenic male mice with the G93A human SOD1 mutation B6SJL-Tg (SOD1G93A) 1Gur/J (ALS mice) ($n = 35$), and wild-type male mice B6SJL ($n = 7$) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The mice were housed in an environmentally controlled room (23 ± 1 °C with a 12 h light/dark cycle); the mice received standard chow and water ad libitum. After acclimatization, the mice were randomly divided into the following groups according to disease progression and training status as previously described [4,5]: ALS BEFORE, ALS untrained mice with no visible signs of the disease; ALS ONSET, ALS untrained and trained with first symptoms disease; ALS TERMINAL, untrained and trained in the last stage of disease; and the wild-type (WT) group of mice. The mice were euthanized by cervical dislocation. The mice from the ALS BEFORE and WT groups of mice were euthanized on the 10th week of life. The mice from the ALS ONSET group were euthanized when we observed the first symptoms of disease (16th week of life), and the mice from the ALS TERMINAL group were euthanized when we observed the last stage of disease (19th week of life), as described by [8].

4.2. Swim Training Protocol

Starting at 10 weeks of age, the transgenic groups of ALS mice (ONSET TRAINED and ALS TERMINAL TRAINED) underwent the training procedure according to Deforges et al. [28] with the slight modification described by Flis et al. [5]. The swim training was conducted in a unique pool with regulated water flow, 5 times a week for 30 min. The water temperature was 30 °C, and the maximum flow speed was 5 L/min. At 105 days of life, the training frequency was reduced to 3 times a week. The exercise time and water flow were adapted to the individual possibility of the ALS mice. The training was continued to 115 days of age.

4.3. Tissue Homogenization and Lysate Preparation

Following the dissection performed at 4 °C, the tibialis anterior muscle samples were rapidly removed, trimmed of visible connective tissue, weighed, frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C until further analysis.

4.3.1. Preparation for the Western Blotting Analysis in the Tibialis Anterior Muscle

Next, the samples were homogenized using a Bio-Plex Pro™ Cell Signaling Reagent Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, catalog # 171-304006M) with minor modifications. Tissue (about 20 mg) was placed in 1.5 mL Eppendorf and treated with 100 μ L cell wash buffer. After rinsing and draining, the material was cut and transferred to 2 mL Eppendorf, and 200 μ L cell lysis buffer was added to the material and was homogenized manually 20 times. The lysis buffer was prepared according to the instructions and contained a protease cocktail (Sigma P8340). The lysis buffer composition per 1.02 mL was: 1 mL of cell lysis buffer, 10 μ L cell lysis factor QG, and 10 μ L cocktail of protease and phosphatase inhibitors.

Then, each lysate was frozen ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) and thawed ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) three times, and re-homogenized (10 times). Finally, the material was centrifuged at $15,000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sigma 3K30 centrifuge). The resulting supernatant was decanted and frozen for further measurements.

4.3.2. Preparation for the Nicotinamide Adenine Dinucleotides (NAD^+ and NADH) and Lactate Analysis in the Tibialis Anterior Muscle

All procedures were conducted according to an NAD^+/NADH Assay Kit (Abcam, ab176723) using chemicals supplied by the manufacturer. Briefly, tissues (20 mg of tibialis anterior muscle) were washed with cold PBS and homogenized in a 400 μL lysis buffer. Then, homogenates were centrifuged at 2500 rpm for 10 min at room temperature. The supernatants were used to measure nicotinamide adenine dinucleotides (NAD^+ and NADH) and LA.

4.3.3. Preparation for the Analysis of Enzyme Activities in the Tibialis Anterior Muscle

After thawing, skeletal muscle was weighed and immediately inserted into cold homogenization buffer (50 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1.15% KCl, pH 7.4, supplemented with protease inhibitor cocktail). Next, 5% homogenate was made in a hand-glass homogenizer. After obtaining the homogenate (around 30 stokes), the homogenate was immediately frozen and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

4.4. Blood Collection and Preparation

Blood was collected for lactate measurement from the heart of mice into tubes containing EDTA, and then centrifuged $2000\times g$ for 10 min. The plasma thus obtained was used for all analyses.

4.5. Measurement of Enzymes Activities

All enzyme activities were measured spectrophotometrically (Cecil CE9200, Cecil Instruments Limited, Cambridge, UK) in tibialis anterior muscles homogenates.

4.5.1. Malate Dehydrogenase

The malate dehydrogenase (MDH) activity was measured at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, according to [11]. Briefly, 10 μL of homogenate (1:10, 5%) was incubated for 2 min in 970 μL of buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.6) supplemented with 10 μL of freshly made NADH (20 mM). Next, 10 μL of freshly made oxaloacetic acid (20 mM) was added to initiate the reaction. The reactions were conducted in duplicate, and absorbance was read at 340 nm. The mitochondrial MDH (mMDH) activity was assessed after 2 min preincubation of 20 μL homogenate (1:10, 5%) with 98% ethanol (1:1 vol). The cytosolic MDH (cMDH) was calculated as the difference between MDH and mMDH activities. The enzyme activities are expressed as nmol/minute/mg of protein.

4.5.2. Lactate Dehydrogenase

The lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, according to [21]. Two concentrations of pyruvate (PYR) were used to determine the maximal activity of lactate dehydrogenase characteristics for subunit M4 (LDH 2.1) in the presence of 2.1 mM PYR and subunit H4 (LDH 0.3) in the presence of 0.3 mM PYR. After 2 min preincubation of tissue (10 μL homogenate (1:10, 5%)) with buffer (970 μL , 50 mM KPi, 1 mM EDTA, pH 7.4), the substrates NADH and pyruvate were added immediately before the measurement of the enzyme activity, and the reaction was started. The final volume in the cuvette was 1000 μL . The decrease in absorbance at 340 nm was followed for 2 min. The enzyme activities are expressed as $\mu\text{mol}/\text{minute}/\text{mg}$ of protein.

The total LDH, LDH M, and LDH H subunits were calculated, as previously described [21].

4.6. Lactate Measurement

Lactate concentration was measured fluorometrically (GloMax-Multi+, Promega Corporation; Madison, WI, USA) at 25 °C, according to [32]. Briefly, 5 µL of plasma and 10 µL skeletal muscle homogenate, or standard (lithium lactate in concentration between 0–10 mmol/L), was incubated 30 min with 250 µL of the mixture containing: buffer (1.1 M hydrazine, pH 9.0, 1.3 g hydrazine sulfate, 5.0 g hydrazine hydrate, 0.2 g Na₂EDTA, distilled water to 100 mL), 1 U/mL LDH, and 5 mmol/L NAD⁺. After incubation, the fluorescence was measured at Ex = 365 nm and Em = 410–460 nm. The lactate concentration is expressed as mmol/L in the blood and mmol/kg wet mass in skeletal muscle.

4.7. Total Amount of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH and NAD⁺) Measurements

The total amount of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺ and NADH) levels were conducted according to an NAD⁺/NADH Assay Kit (Abcam, ab176723, Cambridge, UK). Briefly, 25 µL of the sample, blank control, or standard were added to 25 µL of specific control or NAD⁺ extraction solutions. After 15 min of incubation at 37 °C, another 25 µL of control solution or NADH extraction solution (to neutralize NAD⁺ extracts) was added. Next, 75 µL of NADH reaction mixture was added to each well. After incubation (30 min at room temperature in the dark), fluorescence was measured at Ex = 525 nm and Em = 580–640 nm in a GloMax-Multi+ System (Promega Corporation; Madison, WI, USA). The amount of NADH was calculated by the formula: total (NAD⁺ and NADH) minus NAD⁺. The concentration of NAD⁺, NADH, and total are expressed as µM.

4.8. Western Blotting Analysis of MCT1 and MCT4

Equal amounts of muscle lysates (50 µg of protein per sample) were separated on 4–20% SDS-polyacrylamide gradient gels and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. The analysis procedure was performed as previously described by [7]. After transfer, membranes were blocked in an EveryBlot Blocking Buffer (cat. no. 12010020, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 15 min at room temperature. Next, membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. The following antibodies were used: rabbit polyclonal IgG anti-MCT1/monocarboxylic acid transporter 1 (cat. no. ab93048, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK); rabbit IgG anti-SLC16A3/MCT 4 (cat. no. Ab74109-100 1:1000, Abcam, Cambridge, UK). After washing (3 × 10 min) in 1 × TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with gentle shaking with anti-rabbit IgG–peroxidase conjugate (cat. no. A9169, 1:25,000, Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA). After incubation, immunoblots were detected and visualized using enhanced chemiluminescence reagents (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Changes in protein levels were assessed by densitometry of the immunoreactive bands and normalized to the total amount of protein in the samples transferred onto the membrane. Relative protein levels were analyzed and quantified using a ChemiDoc image analysis system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). The immunoblotting analyses were performed for three randomly selected animals from each group.

4.9. Proteomic Analysis

The levels of investigated proteins (16 identified proteins related to the glycolysis process: HXK1, HXK2, G6PI, K6PF, ALDOA, TPIS, GAPDH, PGK1, PGAM2, ENOA, ENOB, B0QZL1, KPYM, KPYM1, E9Q509, and LDHA) and 4 NADH shuttle enzymes (cASPAT, mASPAT, cMDH, and mMDH) were determined in ALS BEFORE, ALS TERMINAL, untrained and trained groups, using liquid chromatography-MS3 spectrometry (LC-MS/MS) at the Thermo Fisher Center for Multiplexed Proteomics (Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Cambridge, MA, USA). The samples were prepared as previously described by [33]. Peptide fractions were analyzed using an LC-MS3 data collection strategy and an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

4.10. Data Analysis

Statistical analyses were performed using the software package Statistica v. 13.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The differences associated with disease progression and between the ALS and WT groups of mice were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA). If a difference was detected in these test models, the significance level was determined using Tukey's post hoc test. To verify the significance of small, swim training-associated changes (ONSET untrained vs. trained and TERMINAL untrained vs. trained), Student's *t*-test was used. The results were considered statistically significant at $p < 0.05$. For proteomic data, a principal component analysis (PCA) was performed using the R Statistical Software (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), a free software environment for statistical computing and graphics to visualize the similarities and differences between the studied groups.

5. Conclusions

In conclusion, the presented data indicate that ALS, during the terminal stage of the disease, induced a disruption in LA concentration and NAD⁺ and NADH dinucleotide pools. ALS also caused a significant reduction in the levels of the MCT1 transporter protein and decreased LDH activity in the TA muscle. Swim training partially reversed these changes, which was related to the influence of training on LDH activity and MDH enzymes and not on the level of MCT1 and MCT4 proteins.

The findings of this study shed light on the new metabolic disturbances and swimming-induced compensation of energy demands through the pathophysiological adaptation of LA metabolism in skeletal muscle.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231911504/s1>.

Author Contributions: K.C., D.J.F. and W.Z. conceived and designed the research and wrote the manuscript; K.C., D.J.F., K.P.D., J.J.K. and W.Z. conducted the experiments; K.C., D.J.F., M.R.W., J.A. and W.Z. analyzed the data; K.P.D., J.J.K., M.R.W. and J.A. reviewed and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the National Science Centre, Poland (DEC-2013/09/NZ7/02538 and 2020/39/B/NZ7/03366). M.R.W. was supported by statutory funding from the Nencki Institute of Experimental Biology.

Institutional Review Board Statement: All experimental procedures, which included minimizing the number of animals and their suffering, were reviewed and approved with a favorable opinion by the Local Ethical Committee for Experiments on Animals (decision number 11/2013 of 22 April 2013) and the Ministry of the Environment (decision number 155/2012). We used guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals based on European Union Directive 2010/63/E.U.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Robberecht, W.; Philips, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 248–264. [[CrossRef](#)]
2. Tefera, T.W.; Wong, Y.; Barkl-Luke, M.E.; Ngo, S.T.; Thomas, N.K.; McDonald, T.S.; Borges, K. Triheptanoin Protects Motor Neurons and Delays the Onset of Motor Symptoms in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161816. [[CrossRef](#)]
3. Desseille, C.; Deforges, S.; Biondi, O.; Houdebine, L.; D'Amico, D.; Lamazière, A.; Caradec, C.; Bertho, G.; Bruneteau, G.; Weill, L.; et al. Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 332. [[CrossRef](#)]

4. Flis, D.J.; Dzik, K.; Kaczor, J.J.; Cieminski, K.; Halon-Golabek, M.; Antosiewicz, J.; Wieckowski, M.R.; Ziolkowski, W. Swim Training Modulates Mouse Skeletal Muscle Energy Metabolism and Ameliorates Reduction in Grip Strength in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 233. [[CrossRef](#)]
5. Flis, D.J.; Dzik, K.; Kaczor, J.J.; Halon-Golabek, M.; Antosiewicz, J.; Wieckowski, M.R.; Ziolkowski, W. Swim Training Modulates Skeletal Muscle Energy Metabolism, Oxidative Stress, and Mitochondrial Cholesterol Content in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 5940748. [[CrossRef](#)]
6. Halon, M.; Sielicka-Dudzin, A.; Wozniak, M.; Ziolkowski, W.; Nyka, W.; Herbiak, M.; Grieb, P.; Figarski, A.; Antosiewicz, J. Up-regulation of ferritin ubiquitination in skeletal muscle of transgenic rats bearing the G93A hmSOD1 gene mutation. *Neuromuscul. Disord.* **2010**, *20*, 29–33. [[CrossRef](#)]
7. Halon-Golabek, M.; Borkowska, A.; Kaczor, J.J.; Ziolkowski, W.; Flis, D.J.; Knap, N.; Kasperuk, K.; Antosiewicz, J. hmSOD1 gene mutation-induced disturbance in iron metabolism is mediated by impairment of Akt signalling pathway. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2018**, *9*, 557–569. [[CrossRef](#)]
8. Cieminski, K.; Flis, D.J.; Dzik, K.; Kaczor, J.J.; Czyrko, E.; Halon-Golabek, M.; Wieckowski, M.R.; Antosiewicz, J.; Ziolkowski, W. Swim training affects Akt signaling and ameliorates loss of skeletal muscle mass in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 20899. [[CrossRef](#)]
9. Wang, J.; Fry, C.M.E.; Walker, C.L. Carboxyl-terminal modulator protein regulates Akt signaling during skeletal muscle atrophy in vitro and a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3920. [[CrossRef](#)]
10. Barańska, J.; Dzugaj, A.; Kwiatkowska-Korczak, J. Embden–Meyerhof–Parnas, the First Metabolic Pathway: The Fate of Prominent Polish Biochemist Jakub Karol Parnas. In *Comprehensive Biochemistry*; Semenza, G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; Volume 45, pp. 157–207.
11. Schantz, P.G.; Sjöberg, B.; Svedenah, J. Malate-aspartate and alpha-glycerophosphate shuttle enzyme levels in human skeletal muscle: Methodological considerations and effect of endurance training. *Acta Physiol. Scand.* **1986**, *128*, 397–407. [[CrossRef](#)]
12. Proia, P.; Di Liegro, C.M.; Schiera, G.; Fricano, A.; Di Liegro, I. Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1450. [[CrossRef](#)]
13. Brooks, G.A. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox Biol.* **2020**, *35*, 101454. [[CrossRef](#)]
14. Harlan, B.A.; Killoy, K.M.; Pehar, M.; Liu, L.; Auwerx, J.; Vargas, M.R. Evaluation of the NAD⁺ biosynthetic pathway in ALS patients and effect of modulating NAD⁺ levels in hSOD1-linked ALS mouse models. *Exp. Neurol.* **2020**, *327*, 113219. [[CrossRef](#)]
15. Adjianto, J.; Philp, N.J. The SLC16A family of monocarboxylate transporters (MCTs)—physiology and function in cellular metabolism, pH homeostasis, and fluid transport. *Curr. Top. Membr.* **2012**, *70*, 275–311. [[CrossRef](#)]
16. Juel, C.; Halestrap, A.P. Lactate transport in skeletal muscle—Role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J. Physiol.* **1999**, *517 Pt 3*, 633–642. [[CrossRef](#)]
17. Bonen, A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2001**, *86*, 6–11. [[CrossRef](#)]
18. Bisetto, S.; Wright, M.C.; Nowak, R.A.; Lepore, A.C.; Khurana, T.S.; Loro, E.; Philp, N.J. New Insights into the Lactate Shuttle: Role of MCT4 in the Modulation of the Exercise Capacity. *iScience* **2019**, *22*, 507–518. [[CrossRef](#)]
19. Vadakkadath Meethal, S.; Atwood, C.S. Lactate dyscrasia: A novel explanation for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 569–581. [[CrossRef](#)]
20. Dzik, K.P.; Flis, D.J.; Bytowska, Z.K.; Karnia, M.J.; Ziolkowski, W.; Kaczor, J.J. Swim Training Ameliorates Hyperlocomotion of ALS Mice and Increases Glutathione Peroxidase Activity in the Spinal Cord. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11614. [[CrossRef](#)]
21. Leger, L.A.; Taylor, A.W. The chronic effects of continuous and intermittent running upon lactate dehydrogenase activity of heart, fast and slow twitch muscles in the rat. *J. De Physiol.* **1982**, *78*, 499–506.
22. Kaczara, P.; Sitek, B.; Przyborowski, K.; Kurpinska, A.; Kus, K.; Stojak, M.; Chlopicki, S. Antiplatelet Effect of Carbon Monoxide Is Mediated by NAD⁺ and ATP Depletion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2020**, *40*, 2376–2390. [[CrossRef](#)]
23. Pilegaard, H.; Terzis, G.; Halestrap, A.; Juel, C. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Metab.* **1999**, *276*, E843–E848. [[CrossRef](#)]
24. McDermott, J.C.; Bonen, A. Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. *Acta Physiol. Scand.* **1993**, *147*, 323–327. [[CrossRef](#)]
25. Pilegaard, H.; Juel, C.; Wibrand, F. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: Effect of training. *Am. J. Physiol. Metab.* **1993**, *264*, E156–E160. [[CrossRef](#)]
26. McCullagh, K.J.; Poole, R.C.; Halestrap, A.P.; Tipton, K.F.; O'Brien, M.; Bonen, A. Chronic electrical stimulation increases MCT1 and lactate uptake in red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Metab.* **1997**, *273*, E239–E246. [[CrossRef](#)]
27. Kitaoka, Y.; Takahashi, K.; Hatta, H. Inhibition of monocarboxylate transporters (MCT) 1 and 4 reduces exercise capacity in mice. *Physiol. Rep.* **2022**, *10*, e15457. [[CrossRef](#)]
28. Deforges, S.; Branchu, J.; Biondi, O.; Grondard, C.; Pariset, C.; Lecolle, S.; Lopes, P.; Vidal, P.P.; Chanoine, C.; Charbonnier, F. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 3561–3572. [[CrossRef](#)]
29. Giacomello, E.; Crea, E.; Torelli, L.; Bergamo, A.; Reggiani, C.; Sava, G.; Toniolo, L. Age Dependent Modification of the Metabolic Profile of the Tibialis Anterior Muscle Fibers in C57BL/6J Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3923. [[CrossRef](#)]

30. Mänttari, S.; Järvillehto, M. Comparative analysis of mouse skeletal muscle fibre type composition and contractile responses to calcium channel blocker. *BMC Physiol.* **2005**, *5*, 4. [[CrossRef](#)]
31. Bloemberg, D.; Quadrilatero, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35273. [[CrossRef](#)]
32. Maughan, R.J. A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20- μ L blood sample. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *122*, 231–240. [[CrossRef](#)]
33. Weekes, M.P.; Tomasec, P.; Huttlin, E.L.; Fielding, C.A.; Nusinow, D.; Stanton, R.J.; Wang, E.C.Y.; Aichelner, R.; Murrell, I.; Wilkinson, G.W.G.; et al. Quantitative temporal viromics: An approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell* **2014**, *157*, 1460–1472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



prof. dr hab. Wiesław Ziółkowski

Urodzony w 1973 r. w Bydgoszczy. Zatrudniony jest w Pracowni Regeneracji Mięśni w Klinice Rehabilitacji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zainteresowania naukowe: metabolizm energetyczny oraz uszkodzenia i regeneracja mięśni szkieletowych, a zwłaszcza bioenergetyka mitochondriów i ich struktur oraz molekularne mechanizmy odpowiedzialne za ochronę mięśni szkieletowych w przebiegu choroby stwardnienia zanikowego bocznego.



dr Damian Flis

Urodzony w 1989 r. w Toruniu. Ukończył studia magisterskie w Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku. Zatrudniony jest na stanowisku adiunkta w Katedrze Patofizjologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zainteresowania naukowe: metabolizm energetyczny oraz wolnorodnikowy w warunkach fizjologicznych i patologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem roli mitochondriów w tych procesach.



mgr Karol Ciemiński

Urodzony w 1991 r. w Chojnicach. Ukończył studia w Akademii Wychowania Fizycznego i Sportu w Gdańsku. Zainteresowania naukowe: wpływ wysiłku fizycznego na progresję chorób neurodegeneracyjnych, trening proprioceptywny a obniżanie urazowości w sporcie, skuteczność działań technicznych w piłce siatkowej i ich wpływ na wynik sportowy. Prezes i trener piłki siatkowej w UKS Gdyńska Akademia Siatkówki oraz nauczyciel wychowania fizycznego w Szkole Podstawowej nr 21 w Gdyni.

